



## 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 : 8897

**To cite this version :**

Lartigue, Danaé. *Les modèles murins de cancer du sein : synthèse bibliographique et contribution à la constitution d'une banque de xénogreffes de tumeurs primaires dérivées de patientes*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 93 p.

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

# LES MODÈLES MURINS DE CANCER DU SEIN : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTRIBUTION À LA CONSTITUTION D'UNE BANQUE DE XÉNOGREFFES DE TUMEURS PRIMAIRES DÉRIVÉES DE PATIENTE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**LARTIGUE Danaé**  
Née, le 16 mai 1986 à TOULOUSE (31)

---

**Directeur de thèse : Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**Mme Laurence LAMANT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Isabelle RAYMOND-LETRON**  
**Mme Sylvie CHASTANT**

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

MEMBRE INVITE :  
**Mme Emmanuelle CHARAFE-  
JAUFFRET**

Professeur à l'Université de la Timone de MARSEILLE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. A. MILON

**Directeurs honoraires** M. G. VAN HAVERBEKE.  
M. P. DESNOYERS

**Professeurs honoraires** :

|               |               |                                 |
|---------------|---------------|---------------------------------|
| M. L. FALIU   | M. J. CHANTAL | M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE |
| M. C. LABIE   | M. JF. GUELF  | M. DORCHIES                     |
| M. C. PAVAU   | M. EECKHOUTTE | M. BRAUN (émérite)              |
| M. F. LESCURE | M. D.GRIESS   | M. TOUTAIN (émérite)            |
| M. A. RICO    | M. CABANIE    |                                 |
| M. A. CAZIEUX | M. DARRE      |                                 |
| Mme V. BURGAT | M. HENROTEAUX |                                 |

**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**, *Zootecnie*  
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. **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*

M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*

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*

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*

**MAITRES DE CONFERENCE 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*

Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcin*

**Au Président du Jury,**

**Madame le Professeur Laurence LAMANT,**

Professeur des Universités

*Praticien hospitalier*

*Service d'Anatomie-Pathologie*

Qui nous fait l'honneur de présider ce jury de thèse

**Au jury de thèse,**

**Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON,**

Maître de Conférences à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

*Service d'Anatomie-Pathologie*

Qui a bien voulu accepter de diriger et encadrer cette thèse

**Madame le Docteur Sylvie CHASTANT-MAILLARD**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

*Service de la Reproduction*

Qui a accepté le rôle d'assesseur pour cette thèse

**Aux encadrants du M2R,**

**Madame le Professeur Emmanuelle Charafe-Jauffret**

Professeur des Universités

*Service d'Anatomie-Pathologie de l'Institut Paoli-Calmette à Marseille dans l'équipe du Dr Daniel Birnbaum*

**Et Monsieur le Docteur Christophe Ginestier,**

Chargé de recherche à l'Institut Paoli-Calmette dans l'équipe du Dr Daniel Birnbaum

Qui ont guidé, encadré, conseillé et rendu possible la réalisation de ce travail

**A mes parents, au Grand et au Petit,**

Pour être toujours présents, soudés et d'un soutien sans faille dans tous les moments importants.

**A tous mes anciens colocs « véto » et « non véto », « jeunes » et « moins jeunes »,**

Pour tous nos « Grands » moments et galères passés ensemble...

**A Camille, Marguerite, Agnès, aux « pétrelles », et aux « gros canards »,**

Pour être à mes côtés.

**A Malik, Olivier et Emma**

Pour leur aide, leur bonne humeur et leur amitié au cours des 6 mois marseillais, merci à vous 3.

**Et à tous ceux non cités,**

Mais qui le méritaient aussi, comme il faut aussi savoir s'arrêter, merci à vous...



## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Table des figures .....  | 10        |
| Table des tableaux .....   | 10        |
| Table des abréviations .....   | 11        |
| <b>1. Le modèle transgénique, un modèle d'approche des premiers stades de la maladie.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>1.1 Le modèle transgénique un bon moyen pour comprendre l'origine génétique des tumeurs du cancer du sein (Tableau 3) .....</b>     | <b>15</b> |
| <b>1.2 La Construction du modèle .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.2.1 Les promoteurs.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.2.2 Les gènes spécifiques classiquement retrouvés comme mutés ou amplifiés dans les tumeurs primaires de cancer du sein .....</b> | <b>18</b> |
| <b>1.3 L'apport du modèle transgénique dans la compréhension de la maladie métastatique .....</b>                                      | <b>23</b> |
| <b>1.3.1 Signature génomique des cancers du sein métastatiques .....</b>   | <b>23</b> |
| <b>1.3.2 Etude des interactions tumeur-système immunitaire.....</b>  | <b>23</b> |
| <b>1.3.3 Rôle des DTC (Disseminated Tumor Cells) .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>1.3.4 Rôle du microenvironnement dans la formation des métastases.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1.3.5 Essais précliniques des agents thérapeutiques ciblant la maladie métastatique .....</b>                                       | <b>25</b> |
| <b>1.4 Les limites des modèles GEM pour la compréhension des cancers.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>1.4.1 Des différences cellulaires et métaboliques .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>1.4.2 Des différences de sensibilité tumorale .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>1.4.3 Des différences moléculaires.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>1.4.4 Des différences dans des voies de signalisation majeures.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>1.4.5 Le cas spécifique du cancer du sein.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>2. Le modèle de lignée cellulaire, un modèle reproductible et maîtrisé pour la constitution de profil génomique .....</b>           | <b>31</b> |
| <b>2.1 La constitution du modèle : sélection des animaux et considérations techniques.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>2.1.1 Le rôle du système immunitaire dans le développement tumoral .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>2.1.2 Les modèles murins classiquement utilisés.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>2.1.3 Le choix du site d'injection.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.1.4 L'apport du matrigel .....</b>  | <b>35</b> |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 2.1.5 | La correspondance des modèles <i>in-vitro</i> et <i>in-vivo</i> .....  | 35 |
| 2.2   | L'apport des allogreffes par rapport aux modèles GEM.....  | 36 |
| 2.3   | L'apport des xénogreffes dans la compréhension de la progression du cancer du sein.....  | 37 |
| 2.3.1 | L'acquisition d'un phénotype hormono-indépendant.....  | 37 |
| 2.3.2 | La création de modèles résistants aux drogues.....   | 37 |
| 2.4   | Apport des xénogreffes dans la compréhension du processus métastatiques.....   | 39 |
| 2.4.1 | Vers la création de modèles murins fiables (Tableau 2).....  | 39 |
| 2.4.2 | Vers la création de profils génomiques métastatiques spécifiques d'organes.....  | 39 |
| 2.4.3 | Vers la compréhension du concept des cellules souches cancéreuses ..   | 39 |
| 3.    | Les xénogreffes de tumeurs primaires : pour s'approcher au plus près des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des tumeurs des patientes..... | 44 |
| 3.1   | Quels apports de cette nouvelle technique dans la compréhension des cancers ? .....  | 44 |
| 3.2   | La constitution d'une banque de xénogreffes de tumeurs primaires humaines.....   | 46 |
| 3.2.1 | Contrainte .....   | 46 |
| 3.2.2 | Approche expérimentale .....   | 46 |
| 3.2.3 | Constitution de la banque.....   | 49 |
| 4.    | Un nouveau modèle murin de xénogreffe de tumeur primaire de patientes pour l'étude de la maladie métastatique dans le cas du cancer du sein.....       | 52 |
| 4.1   | Pourquoi s'intéresser à la maladie métastatique chez l'homme ?.....  | 52 |
| 4.1.1 | La conception actuelle : la maladie métastatique, une maladie séquentielle.....  | 53 |
| 4.1.2 | L'apport des cellules souches cancéreuses dans la compréhension de la maladie métastatique .....   | 54 |
| 4.1.3 | L'exemple de la maladie métastatique dans le cas du cancer du sein .....   | 57 |
| 4.2   | Matériel et méthode .....  | 59 |
| 4.2.1 | Animaux d'expérimentation et choix des xénogreffes.....  | 59 |
| 4.2.2 | Dissociation de la tumeur .....  | 59 |
| 4.2.3 | Infection virale.....  | 59 |
| 4.2.4 | Quantification et tri des cellules humaines tumorales GFP positives .....  | 61 |
| 4.2.5 | Greffe des cellules tumorales .....  | 61 |
| 4.2.6 | Exérèse de la tumeur.....  | 62 |
| 4.2.7 | Suivi métastatique par bioluminescence.....  | 63 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| <b>4.3</b> | <b>Résultats</b> .....  | 66 |
| 4.3.1      | Mise en place du protocole de xénogreffes pour l'étude de la formation des métastases ..... | 66 |
| 4.3.2      | Contrôle de la stabilité du vecteur .....   | 69 |
| 4.3.3      | Inspection des organes et bilan d'extension .....   | 72 |
| 4.3.4      | Validation d'un processus de « Homing » spécifique en fonction des organes colonisés .....  | 76 |
| <b>4.4</b> | <b>Discussion</b> .....   | 78 |
| 4.4.1      | « Affinité » du vecteur pour certaines greffes et stabilité.....                            | 78 |
| 4.4.2      | Réflexion générale sur le modèle bioluminescent .....                                       | 79 |
| <b>4.5</b> | <b>Perspectives</b> .....   | 82 |
|            | <b>Bibliographie</b> .....  | 85 |

## Table des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Génération de souris GEM .....   | 17 |
| <b>Figure 2</b> : Spécificité d'organes des modèles de GEM pour la formation de métastases.....  | 29 |
| <b>Figure 3</b> : Humanisation de la glande murine [32].....   | 47 |
| <b>Figure 4</b> : Protocole de greffe de cellules tumorales [32] .....   | 48 |
| <b>Figure 5</b> : Principales étapes de la formation d'une métastase .....   | 54 |
| <b>Figure 6</b> : Relation entre EMT et cellules souches cancéreuses dans la progression tumorale .....  | 56 |
| <b>Figure 7</b> : Les preuves in-vivo des capacités métastatiques des cellules souches cancéreuses (CSC)<br>dans le cas du cancer du sein .....        | 57 |
| <b>Figure 8</b> : construction du vecteur Luc-GFP .....  | 60 |
| <b>Figure 9</b> : Réaction chimique entre l'enzyme, la luciférase et son substrat, la luciférine.....  | 64 |
| <b>Figure 10</b> : Protocole d'infection et de suivi métastatique .....  | 68 |
| <b>Figure 11</b> : Contrôle du pourcentage d'infection des cellules tumorales .....  | 70 |
| <b>Figure 12</b> : Pourcentage des cellules infectées en fonction des passages pour les xénogreffes<br>CRCM174X, CRCM318X, CRCM341X, et CRCM389X ..... | 71 |
| <b>Figure 13</b> : suivi du développement métastatique des xénogreffes CRCM434X, CRCM389X, et<br>CRCM318X.....   | 74 |
| <b>Figure 14</b> : Comparaison des profils métastatiques pour le modèle CRCM341X pour les générations<br>G1 et G2.....                                 | 75 |
| <b>Figure 15</b> : Protocole de Homing.....  | 77 |

## Table des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Tableau récapitulatif des modèles de souris transgéniques métastatiques.....                              | 30 |
| <b>Tableau 2</b> : Tableau récapitulatif des lignées cellulaires pour l'étude des métastases .....                           | 42 |
| <b>Tableau 3</b> : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes techniques de<br>modèles murins..... | 50 |

## Table des abréviations

**ADN** : Acide Desoxyribonucleique

**ADR** : Adriamycine

**ALDH** : Aldehyde Deshydrogenase

**APC** : Allophycocyanine

**ATP** : Adenosine Tri-Phosphate

**Bg** : Beige

**CDK** : Cyclin-Dependent Kinase

**CSC** : Cellule Souche Cancéreuse

**CTC** : Cellule Tumorale Circulante

**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**DTC** : Disseminated Tumor Cells

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**EGFR** : Epithelial Growth Factor Receptor

**EMCV** : Encéphalomyélite virus

**EMT** : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

**EpCAM** : epithelial cell adhesion molecule

**ER** : Estrogen Receptor

**ESA** : Epithelial specific antigen

**FSH** : Follicle-stimulating hormone

**GEM** : Genetically Engineered Mice

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**HER-2** : Human epidermal growth factor  
receptor 2

**HIF** : Hypoxia Inductible Factor

**Hpg** : Hypogonadal

**IP** : Intraperitoneal

**IRES** : Internal Ribosome Entry Site

**LAK** : Lymphokine-Activated Killer

**LH** : Luteinizing hormone

**LTR** : Long Terminal Repeat

**MDR** : Multi Drug Resistant

**MET** : Transition Mésenchymo-Epithéliale

**MMTV** : Mouse Mammary Tumor Virus long  
terminal repeat

**NK** : Natural Killer

**Nod** : Non-Obese Diabetic

**Nu** : Nude

**PGR** : Progesteron receptor

**PI3 K** : phosphoinositol 3 phosphate kinase

**PIK** : phosphoinositide kinases

**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog

**Rb** : Retinoblastoma

**RTK** : Receptor tyrosine kinase

**Scid** : Severe combined deficiency mutation

**SCP** : cell progenitor

**SFFV** : Spleen-focus-forming-virus

**SIN** : Self-inactivating

**TAM** : Tumor associated macrophage

**TGF** : Transforming growth factor

**WAP** : Whey acidic protein promoter

**Wg** : Wingless

Avec environ 1000 nouveaux cas de cancer par jour en France, le cancer représente un enjeu majeur de santé publique. Ces 40 dernières années, les efforts portés par la recherche médicale pour la lutte contre le cancer ont déjà permis une amélioration de la prise en charge et de la survie des patients atteints de cancer. Toutefois, ces améliorations restent variables en fonction des types de cancers, de la précocité du diagnostic, ou encore de la présence de métastases au moment du diagnostic et de la mise en place du premier traitement.

Chez la femme, le cancer du sein avec les cancers colo-rectaux représente la très large majorité des cancers. Le cancer du sein revêt donc une importance médicale particulière. Actuellement près de 80 % des patientes atteintes d'un cancer du sein présenteront une survie supérieure à 5 ans. Mais ces dernières décennies, l'absence d'amélioration de la survie à 5 ans des patientes métastatiques atteintes de cancer du sein explique l'intérêt toujours présent de la recherche pour ce type de cancer.

Afin d'améliorer les connaissances scientifiques, médicales et thérapeutiques sur le cancer, bon nombre de moyens sont disponibles pour les équipes de recherche. Toutefois, face aux limites des modèles *in-vitro*, de plus en plus d'équipes s'intéressent activement aux modèles *in-vivo* et notamment aux modèles animaux dont les modèles murins. Ces modèles animaux présentent un grand nombre d'applications : de la modélisation de la maladie et de son évolution pour la compréhension des mécanismes génétiques, moléculaires et cellulaires du cancer aux études pré-cliniques pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques.

Etant donné l'importance médicale de la connaissance des cancers du sein et des modèles murins comme moyen d'étude de ces cancers, il sera présenté ici les différents modèles murins existants (GEM (Genetically Engineered Mice), xénogreffes de lignée cellulaire et enfin xénogreffe de tumeur primaire) ainsi que leurs apports

spécifiques et leurs limites pour la compréhension de la maladie cancéreuse et de son évolution. La dernière partie du manuscrit reprend le protocole élaboré dans le laboratoire de recherche d'Oncologie moléculaire de Marseille de Daniel Birnbaum par une technique de xéno greffe de tumeur primaire de patientes en région orthotopique sur des souris NOD/SCID afin d'étudier le développement métastatique. Les prélèvements proviennent de la banque de xéno greffe en cours d'élaboration dans l'équipe de recherche du Dr. Charafé-Jauffret. Ils ont été infectés par un lentivirus portant le gène de la GFP (Green fluorescent Protein) et de la luciférase pour permettre le suivi métastatique. Ce protocole, actuellement mis en place sur 4 xéno greffes différentes, nous a permis d'obtenir toutes les localisations métastatiques classiquement retrouvées chez les patientes atteintes de cancer du sein. Il nous a permis aussi de distinguer 2 «comportements» différents dans le développement de la maladie métastatique en fonction des modèles animaux. Toutefois, la présence de localisations métastatiques «atypiques» des cancers du sein humains chez les souris de nos modèles, ainsi que le manque de stabilité de notre vecteur, nécessitent encore de plus amples investigations. Enfin, ce protocole s'inscrit, dans un projet de recherche plus large sur le criblage génomique des tumeurs et de leurs cellules souches cancéreuses, en fonction de leur comportement métastatique.



# **1. Le modèle transgénique, un modèle d'approche des premiers stades de la maladie**

Les modèles de GEM (Genetically Engineered Mice) sont utilisés depuis près de 20 ans dans l'étude des cancers. Ils permettent en premier lieu une approche pertinente et unique pour investiguer les premiers stades de la maladie et notamment l'initiation spontanée de tumeurs. Dans le cas du cancer du sein, on retrouve donc les stades classiques retrouvés chez la femme : hyperplasie, adénome puis stades précoces (et tardifs) du carcinome.

Même si la formation de métastases est plutôt rare dans ce genre de modèle et globalement limitée aux poumons et au système lymphatique, certains modèles de GEM peuvent aussi être utilisés dans le suivi de toutes les étapes du processus métastatique.

## **1.1 Le modèle transgénique un bon moyen pour comprendre l'origine génétique des tumeurs du cancer du sein (Tableau 3)**

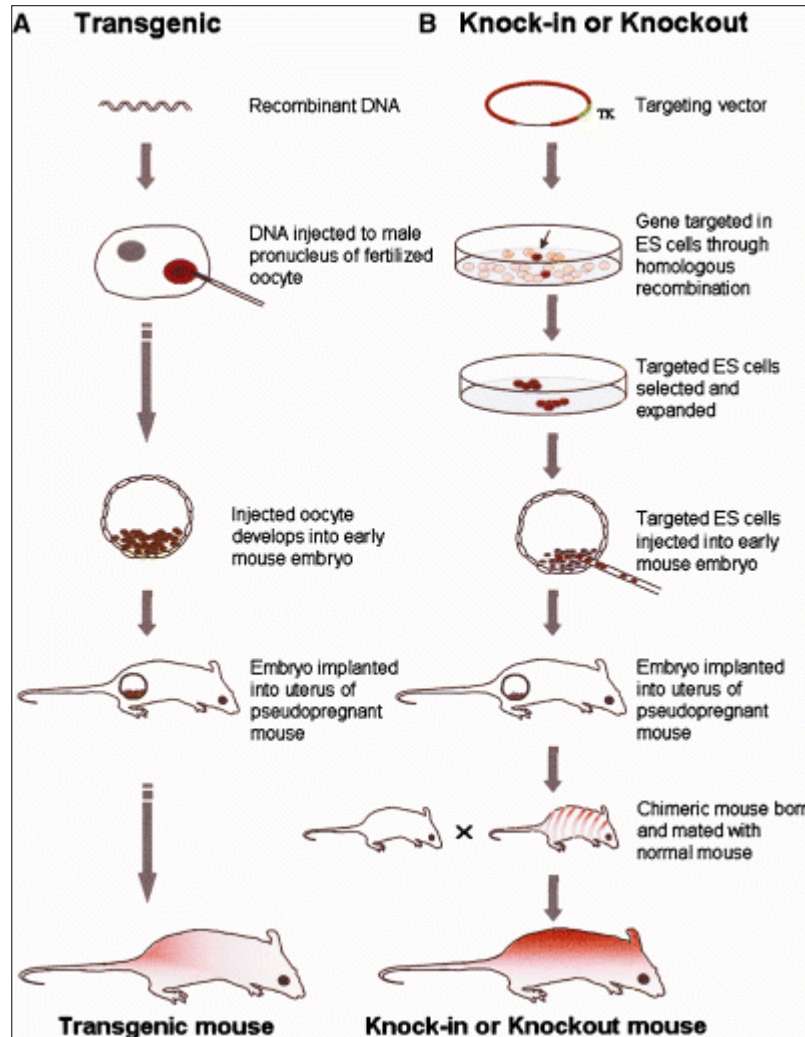
La majorité des modifications génétiques trouvées dans les cancers du sein se divisent en 2 catégories :

- le gain de fonction par mutation d'un proto-oncogènes (ex : c-myc, cyclin D1, ErbB-2/Neu) qui régissent la croissance, la survie et les divisions cellulaires. La majorité des gains de fonction retrouvés dans les cas du cancer du sein correspond à une amplification de une à 3 régions chromosomiques (exemple : c-myc, ErbB-2 ou encore la bande 11q13) [104].
- la perte de fonction par mutation de gènes nommés « suppresseurs de tumeur », qui régulent en général la croissance et le bon fonctionnement du cycle cellulaire. Les pertes observées chez les patientes sont souvent des mutations de gènes ou des pertes d'hétérozygotie sur des régions multiples (ex : p53, PTEN, BRCA) [16] [33] [62].

Un bon moyen de mimer ces modifications génétiques est donc l'utilisation de modèles de souris transgénique exprimant un niveau élevé d'un gène spécifique dans un tissu cible et connu comme jouant un rôle dans la pathogénicité tumorale. Alternativement, l'extinction d'un gène spécifique par recombinaisons homologues permet aussi d'approcher le rôle de ce



gène dans la progression tumorale (**Figure 1**). La dernière possibilité est la création de souris bigéniques combinant les 2 techniques ou encore l'utilisation de souris inductible.



**Figure 1 : Génération de souris GEM**

**A : Génération d'un modèle transgénique :** L'ADN recombinant portant l'information génétique est introduit en général dans le pronucléus mâle d'un oocyte fécondé. Il s'insère au hasard dans le génome. L'oocyte injecté est réimplanté dans l'utérus d'une souris pseudogestante.

**B : Génération de souris knock-in et knock-out :** La modification génétique est introduite via un vecteur qui porte en général une région de résistance à une drogue et une région homologue. La région homologue définit la région spécifique d'intégration au génome. Le vecteur est introduit par électroporation par exemple dans les cellules souches embryonnaires de souris. Les cellules infectées sont sélectionnées par l'ajout d'antibiotique. Ces cellules peuvent alors être implantées dans un embryon de souris et réimplantées dans une souris pseudogestante. La souris chimérique est croisée avec une souris de type sauvage pour obtenir des souris qui dérivent exclusivement des cellules souches modifiées. Le terme knock-in est utilisé pour la modification d'un gène alors que le terme knock-out est réservé aux souris ayant une délétion d'un gène (ou des gènes).

*D'après Chen et Roop, Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings [40]*

## 1.2 La Construction du modèle

Les modèles de GEM utilisés actuellement pour étudier l'origine génétique des cancers reposent sur l'activation ou l'extinction de gènes d'intérêts dans la glande mammaire murine grâce à des promoteurs spécifiques.

### 1.2.1 Les promoteurs

La majorité des modèles transgéniques dans le cas du cancer du sein repose sur l'utilisation de 2 promoteurs :

- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus long terminal repeat : promoteur viral actif durant le développement mammaire et dont l'activité augmente au cours de la gestation [132]
- WAP (Whey Acidic Protein promoter) : uniquement actif dans la glande mammaire lors du milieu de la gestation.

Ces 2 promoteurs sont donc dépendants du stade de l'animal et présentent une variabilité individuelle selon les souris.

### 1.2.2 Les gènes spécifiques classiquement retrouvés comme mutés ou amplifiés dans les tumeurs primaires de cancer du sein

Les connaissances acquises ces dernières décennies sur les altérations génétiques des cellules cancéreuses humaines ont permis d'isoler un certain nombre de gènes d'intérêt suspectés comme jouant un rôle central dans les fonctions de la cellule cancéreuse. Ces gènes ont été modifiés chez la souris pour étudier plus précisément leur rôle dans la tumorigenèse.

#### 1.2.2.1 *c-myc*

Le gène *c-myc* est un facteur de transcription fréquemment amplifié dans les tumeurs humaines [16] [91] et décrit comme jouant un rôle important dans la progression du cancer du sein [98] [151] [163]. Les modèles de souris combinant cet oncogène avec les promoteurs MMTV ou WAP présentent un développement rapide (4 à 8 semaines) de tumeurs locales

infiltrantes dans la glande mammaire murine ainsi que la formation de métastases pulmonaires dans les modèles inductibles.

#### 1.2.2.2 cyclin D1

La cyclin D1 régule l'activation des CDKs (cyclin-dependent kinase) lors de la progression du cycle cellulaire, l'entrée dans la phase S et la réplication de l'ADN. Le gène portant cette protéine se trouve dans la région 11q13 amplifiée dans 15-20% des cas de tumeur primaire de cancer du sein [16] [24]. La longue latence avant la formation de tumeur et la nature focale de la lésion laisse présager que cette protéine serait un promoteur de la tumorigénicité nécessitant une autre modification génétique pour le développement d'un carcinome mammaire. Elle serait un événement important dans l'induction de tumeur par activation d'Erb-B2 par exemple [99] [141].

#### 1.2.2.3 Erb-B2 (= Neu. = HER2)

Un niveau élevé de l'expression d'Erb-B2 se retrouve dans 20-30 % des cas de tumeur primaire de cancer du sein par amplification du proto-oncogène [158] [160]. Il est associé à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein [7] [77] [143]. Il est utilisé comme un facteur prédictif de la résistance au tamoxifène [133]. Il est aussi actuellement utilisé pour cibler les patientes qui seront sensibles aux protocoles de chimiothérapie à base de Trastuzumab® [159].

C'est un membre de la famille des EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) appartenant aux récepteurs tyrosine kinase (RTK). Ces récepteurs forment des homo ou hétéro-dimères en réponse à l'activation par un ligand et à la phosphorylation de certaines tyrosines du récepteur. La transduction du signal a lieu par liaison de ces tyrosines avec des domaines SH2 et SH3 présents sur certaines protéines endogènes [49] [77]. La substitution valine-acide glutamique sur le domaine transmembranaire du récepteur entraîne l'activation constitutive du récepteur en l'absence de ligand. Le rôle oncogénique de cette anomalie a été découvert au départ chez le rat dans les cas de neuroblastomes [150].

Bon nombre de modèles transgéniques ont confirmé le rôle direct d'HER2 dans la tumorigénèse dans le cas du cancer du sein. Toutefois, si l'histologie des adénocarcinomes des patientes présentant une tumeur HER2 positive et celles des souris transgéniques Neu sont

très proches [35] [68] [164], on ne retrouve pas de mutations identiques au modèle murin chez les patientes mais plutôt une surexpression du sous-type sauvage d'Erb-B2. La génération de nouveaux modèles où le sous-type sauvage d'Erb-B2 est exprimé sous le control de MMTV a permis la génération de tumeurs de morphologie proche des patientes et capables de métastaser aux poumons [155].

#### 1.2.2.4 *Wnt-1*

Les protéines de la voie de signalisation de Wnt-1 ont été isolées comme mutées ou dérégulées dans certains types de cancer, dont le cancer du sein [15] mais la protéine Wnt-1 ne semble pas directement impliquée dans la formation de cancer du sein. Cette protéine ainsi que d'autres membres de la même famille sont exprimés de manière constitutive dans la glande mammaire humaine. Seuls certains membres (autre que Wnt-1) sont surexprimés dans les cancers du sein [103].

Le gène Wnt-1 a été le premier gène reconnu comme amplifié suite à l'activation par l'insertion virale de MMTV dans les tumeurs mammaires murines.

Gène homologue du gène Wg (Wingless) de la drosophile, le gène Wnt-1 code pour un membre appartenant à une grande famille de protéines qui sont riches en cystéine, glycosylées et peu solubles. Une des réponses intracellulaires majeures de l'activation de Wnt-1 est la stabilisation et l'augmentation du niveau de  $\beta$ -caténine cytosolique, protéine multifonctionnelle impliquée dans l'activation d'un grand nombre de gènes (c-myc, Cycline 1, Cox-2 par exemple) [103].

#### 1.2.2.5 *La voie PI3 Kinase*

Après l'altération de la protéine p53, cette voie est considérée comme la plus affectée par des altérations génétiques lors de développement de cancers et notamment de cancers du sein [27]. Ainsi dans le cas des cancers du sein de type basal par exemple plus de 70% des patientes présentent une altération sur un des composants de cette voie [109]. De plus, l'identification des altérations génomiques et de leurs fréquences dans les différents sous-types de cancer du sein prédisent la réponse des patientes à certaines thérapies ciblées [81] [174].

Le Phosphatidylinositol est un composant des membranes cellulaires des organismes eucaryotes. La tête inositol de ce phospholipide peut être phosphorylée sur différents sites par une protéine de la famille des phosphoinositide kinases (PIKs). L'action de cette PIK sur son substrat entraîne la formation d'un second messenger (PIP3 dans le cas de PI3K) qui est responsable de la transduction d'un signal régulant de nombreuses fonctions cellulaires comme la croissance cellulaire et l'apoptose. La protéine PI3K a été décrite comme mutée dans 26 % des cancers du sein [11] mais d'autres protéines telles que PTEN [22] [135], RAS [148], ou encore AKT [8] sont connues comme dérégulées dans les cas de cancer du sein.

De nombreux modèles murins faisant intervenir cette voie par extinction ou activation de protéines impliquées, ont confirmé le rôle central de la voie PI3K dans la tumorigenèse et la progression de la maladie vers le stade métastatique. Ainsi l'inhibition de cette voie dans les modèles transgéniques entraîne la régression tumorale et une diminution des capacités métastatiques [114], alors que l'activation de cette voie est souvent le signe d'une plus grande agressivité de la tumeur et d'une mauvaise réponse au traitement pour les tumeurs humaines de sous-types basal [52] [148].

#### 1.2.2.6 *BRCA-1 et BRCA-2*

Ces 2 gènes sont fortement impliqués dans les cas de cancer du sein héréditaire. Ils sont mutés dans 90% des cas de cancers familiaux ovaire/sein [3] [133]. Des centaines de mutations existent et il en résulte en général la production d'une protéine inactive couramment tronquée.

BRCA1 et BRCA2 sont localisés respectivement sur les régions chromosomiques 17q21 et 13q12-13 connues comme impliquées dans la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN suite à un stress en activant les processus de réparation de l'ADN [23]. La protéine produite par BRCA1 par exemple, p220, est une protéine d'interaction avec la chromatine et agit comme une ligase de l'ubiquitine E3 [156].

Le problème des approches transgéniques portant sur ces gènes est la viabilité du modèle et sa durée de vie. En effet, les souris homozygotes meurent au cours de l'embryogenèse alors que les hétérozygotes ne semblent pas prédisposées à la formation de tumeurs mammaires [107]. La création de modèles de mutants conditionnels a permis de

dépasser les difficultés à mettre en place ce modèle. La création de mutants Cre-Lox [149] a permis l'excision de gènes d'intérêt dans des tissus spécifiques. Les gènes situés proche de la séquence Lox sont excisés par recombinaison spécifique par la séquence Cre. Dans ces modèles l'instabilité génétique observée chez ces mutants corrobore le rôle de BRCA1 dans la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome [184].

#### 1.2.2.7 TP53

Il correspond au gène le plus communément altéré par délétion ou mutation dans les cas de cancer du sein [58]. La protéine p53 est traduite suite à un ensemble de stimuli considérés par la cellule comme un stress. Les rôles de p53 sont multiples et expliquent la place clé de cette protéine dans les différents cancers. Son rôle est central [173] dans :

- la mort cellulaire en intervenant dans l'induction de l'apoptose, la sénescence ou l'autophagie
- le cycle cellulaire en régulant les phases d'arrêt du cycle cellulaire
- la stabilité du génome notamment par son rôle clé dans la réparation de l'ADN
- ou encore l'angiogenèse en inhibant l'HIF (Hypoxia Inductible Factor)

Les problèmes rencontrés par les modèles transgéniques déficients en p53 sont multiples. Les souris knock-out pour le gène p53 présentent un développement aberrant de différentes tumeurs mais les tumeurs mammaires sont rarement observées. Les souris knock-out p53 développent des lymphomes et des tumeurs thymiques qui entraînent la mort de l'animal à un âge précoce [54]. La génération de certains mutants de p53, comme la substitution sur l'acide aminé 172<sup>Arg-His</sup> (R172H) sous le control du promoteur WAP [102] a permis la création de modèles beaucoup plus sensibles aux agents carcinogènes. De même que BRCA1, la formation de mutants Cre spécifiques du tissu mammaire a permis de générer des mutants p53 et d'étudier le rôle central de ce gène dans la tumorigenèse [108] [171].

### **1.3 L'apport du modèle transgénique dans la compréhension de la maladie métastatique**

Il a été vu que ces modèles de GEM sont classiquement utilisés pour comprendre l'origine des cancers et les premières phases de la tumorigenèse. Toutefois, ce type de modèle transgénique semble aussi présenter un intérêt pour l'étude des étapes les plus tardives de la maladie et notamment de la maladie métastatique.

#### **1.3.1 Signature génomique des cancers du sein métastatiques**

L'étude des altérations génomiques des tumeurs a montré que certaines classes de gènes sont sélectivement activées ou réprimées sous certaines conditions. De plus, ces altérations semblent varier selon les différents stades d'évolution du cancer. Ces deux observations sont retrouvées dans les modèles de souris transgéniques mais aussi dans les tumeurs de patientes. Par exemple, dans le cas d'infiltration cérébrale, COX-2, le ligand HBEGF de l'EGFR, et ST6GAL-NAC5 ont été identifiés comme médiateurs pour le passage de la barrière hémato-méningée [20] dans des modèles murins utilisant des lignées cellulaires de cancer du sein. On note aussi que certaines cytokines telles que Cxcl12, Igf1 et Pdgfa sont sélectivement surexprimées dans métastases osseuses comparées aux autres métastases [82].

#### **1.3.2 Etude des interactions tumeur-système immunitaire**

Les modèles transgéniques présentent pour certains un avantage indéniable dans la compréhension de certains processus mis en place dans le développement de la maladie métastatique comme les interactions tumeur-système immunitaire. Seul ce type de modèle présente l'avantage d'utiliser des souris immunocompétentes. Le modèle MMTV-PyMT/Csf-1<sup>-/-</sup> [105] correspondant à la déplétion des macrophages associés à la tumeur (TAM) illustre le rôle de ces cellules dans la formation de métastases. Si ce modèle ne voit pas d'effet évident sur la croissance tumorale, on note toutefois une diminution des capacités d'infiltration de la tumeur ainsi que de ces capacités métastatiques avec un retard à la formation des métastases pulmonaires par rapport au modèle MMTV-PyMT [110]. Dans le modèle MMTV-PyMT, les TAMs expriment l'EGF (Epidermal Growth Factor) mais pas la



tumeur. A contrario, la tumeur exprime l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) alors que les TAMs en sont dénués. L'existence de cette interaction entre tumeur et TAM semble donc soutenir les capacités invasives de la tumeur [21]. La sécrétion d'EGF par les TAMs est stimulée par les cellules T CD4<sup>+</sup> comme le prouve la déplétion des cellules T dans les modèles MMTV-PyMT/Rag1<sup>-/-</sup> et MMTV-PyMT/IL-4<sup>-/-</sup> [88]. Ces résultats suggèrent un réseau d'interactions entre les cellules du système immunitaire inné, les cellules de la réponse immunitaire adaptative et les cellules cancéreuses dans l'invasion tumorale dans le cas du cancer du sein.

### 1.3.3 Rôle des DTC (Disseminated Tumor Cells)

Une des hypothèses pour expliquer la généralisation de la maladie cancéreuse est l'acquisition de variations génétiques permettant à certaines cellules de croître dans un autre organe et de former des tumeurs secondaires à distance du site primaire [61]. Pour étudier ce phénomène, la transplantation dans des souris de tumeurs génétiquement marquées, ainsi que l'implantation de cellules tumorales manipulées génétiquement *ex-vivo* ont permis l'identification des gènes impliqués [76] [93]. Mais c'est l'utilisation de modèles inductibles transgéniques qui a permis la compréhension plus fine de ce phénomène complexe. En effet, l'introduction de cellules mammaires non tumorales directement dans la circulation sanguine aboutit à une extravasation dans les poumons de cellules sans acquisition de phénotype particulier. Par contre si les cellules injectées ont une induction d'un oncogène, elles sont capables de donner ensuite naissance à la formation d'une tumeur secondaire dans le parenchyme pulmonaire [138]. Ces résultats sont controversés et soulèvent des interrogations sur les réelles capacités des DTC précoces à former une tumeur dans un organe secondaire. L'équipe de Kouros-Mehr [93] par exemple semble confirmer l'inefficacité de ces DTC à initier une tumeur secondaire.

### 1.3.4 Rôle du microenvironnement dans la formation des métastases

L'importance du micro-environnement tumoral a émergé ces 10 dernières années avec l'émergence d'un nouveau concept dans lequel la tumeur est considérée comme un organe. Ce concept s'oppose à la vision ancienne dans laquelle la tumeur est considérée comme une masse de cellules autonomes. L'équipe de Farmer, en 2009, démontre enfin une signature

stromale prédictive de la réponse des patientes, atteintes de cancer du sein, à certains traitements de chimiothérapie [60]. Dans un organe, on retrouve différents types d'interactions : cellules - matrice extracellulaire, cellules - cellules de même type ou cellules – cellules de types différents (stroma, épithélium...). La première preuve de l'importance de l'environnement tissulaire dans le développement des tumeurs a été démontrée en 1984 par David Dolberg et Mina Bissell sur des embryons de poulet [53]. Depuis l'utilisation de modèles transgéniques a permis de confirmer le rôle du microenvironnement dans le cancer du sein [137] par des modèles d'activation de gènes codant pour des protéines membres de la famille des TGF (Transforming Growth Factor) permettant la création de souris résistantes à l'induction de tumeurs par des carcinogènes. De plus, l'inactivation de TGF $\beta$  dans le stroma tumoral augmente la sensibilité des souris aux radiations [14]. La dernière preuve de l'importance de ce microenvironnement est la preuve apportée par l'équipe de Briksen du rôle central des signaux paracrines passant par le récepteur à l'ER $\alpha$  (Estrogen Receptor alpha) [109] dans le développement et la prolifération de la glande mammaire.

### **1.3.5 Essais précliniques des agents thérapeutiques ciblant la maladie métastatique**

Un autre avantage des modèles de souris est leur utilisation facile et pertinente dans les essais pré-cliniques pour l'évaluation de nouveaux agents thérapeutiques (antiangiogénique, traitement humoral ciblé...) [50] [80] [127] [130]. Si on retrouve ce type de modèles dans une multitude d'approches pré-cliniques, toutefois la difficulté à modéliser l'ensemble des sous-types moléculaires du cancer du sein ainsi que les différences inter-espèces des cellules cancéreuses font que dans certains cas le recours à des modèles de xénogreffes in vivo s'avère nécessaire. L'avantage des modèles de xénogreffes pour mimer les stades avancés de cancer réside dans la pratique d'une résection chirurgicale de la xénogreffe primaire avant la mise en place de la thérapie, mimant au mieux la situation clinique observée chez les patientes [57].

## **1.4 Les limites des modèles GEM pour la compréhension des cancers**

Nous avons vu que les souris transgéniques permettaient de modéliser un certain nombre d'éléments de cancer du sein, mais elles présentent malheureusement aussi des limites.

### **1.4.1 Des différences cellulaires et métaboliques**

#### *1.4.1.1 La taille des organismes*

Une différence évidente entre l'organisme humain et murin repose sur le nombre de cellules. Ce nombre est très supérieur chez l'homme et on note  $10^5$  plus de mitose dans l'espèce humaine par rapport à l'espèce murine ( $10^{16}$  contre  $10^{11}$ ). Cette différence s'accompagne donc d'un risque fortement augmenté d'altérations, de modifications... génétiques au cours des réplifications successives ainsi que par la formation plus fréquentes d'allèles mutants. Pourtant d'un point de vue épidémiologique, un taux de cancer similaire est retrouvé chez ces 2 espèces et s'élève à environ 1/3 de la population totale (sur une durée de vie de 2-3 ans chez la souris et 70-80 ans chez homme) [73].

#### *1.4.1.2 Le taux basal de fonctionnement du métabolisme*

Ce taux est 7 fois plus élevé chez la souris, il en découle donc une production plus élevée d'oxydants et d'autres mutagènes endogènes produits lors du fonctionnement normal du métabolisme. Ainsi par kilo de poids vif, chez la souris, la production d'oxydants toxiques pour l'ADN est 18 fois plus élevée que chez l'homme [2] [5].

### **1.4.2 Des différences de sensibilité tumorale**

Chez les souris de laboratoire, la majorité des cancers développés sont des lymphomes ou des sarcomes. Chez l'homme on retrouve en premier lieu des carcinomes. Les différences de régime alimentaire ainsi que du mode de vie influent fortement sur les types de cancer développés. Mais les processus moléculaires qui dictent ces différences profondes entre les 2 espèces sur l'incidence de spécificité tumorale pour certains types de tissu ne sont pas encore élucidés. Curieusement, on a observé que les mutants murins-Trp53, gène retrouvé le plus

largement muté dans les cancers humains, développent beaucoup plus de cancers épithéliaux, normalement minoritaires chez la souris [9].

### **1.4.3 Des différences moléculaires**

#### *1.4.3.1 Les anomalies génétiques*

L'anomalie génétique majoritaire chez l'homme dans le cas des cancers est la translocation non réciproque. Cette anomalie n'est en général pas retrouvée chez la souris [10]. Elle devient tout de même beaucoup plus fréquente chez les souris mutantes-Trp53 et déficiente en télomérase [9].

#### *1.4.3.2 Le rôle de la télomérase*

Cette protéine est exprimée dans la majorité des cellules murines [140] mais rarement dans les cellules humaines adultes. Cette expression permet l'acquisition de propriétés particulières rendant les cellules murines plus réceptives à l'immortalisation et à la formation de lignées cellulaires [123].

### **1.4.4 Des différences dans des voies de signalisation majeures**

#### *1.4.4.1 les voies p53 et Rb et la sénescence*

La voie p53 semble avoir un rôle central dans la régulation de la sénescence chez la souris mais il semble que ce soit la voie Rb chez l'homme [152] [186].

#### *1.4.4.2 La voie PI3K*

Chez la souris l'activation de la voie Raf-MAPK est suffisante pour la conversion tumorigénique. A contrario, chez l'homme les effecteurs incriminés sont PP2A, RAL-GEF, ainsi que plusieurs effecteurs de RAS [34] [69] [185].

Cet ensemble de différences physiologiques, métaboliques et génétiques entre l'espèce humaine et murine illustre bien les difficultés toujours existantes à l'utilisation des modèles animaux pour reproduire parfaitement et étudier les maladies humaines.

## 1.4.5 Le cas spécifique du cancer du sein

En ce qui concerne la glande mammaire, d'autres spécificités d'espèce sont retrouvées, distinguant les cancers du sein chez la femme des cancers mammaires murins.

### 1.4.5.1 *Les mutations mises en jeu, validité du modèle Neu*

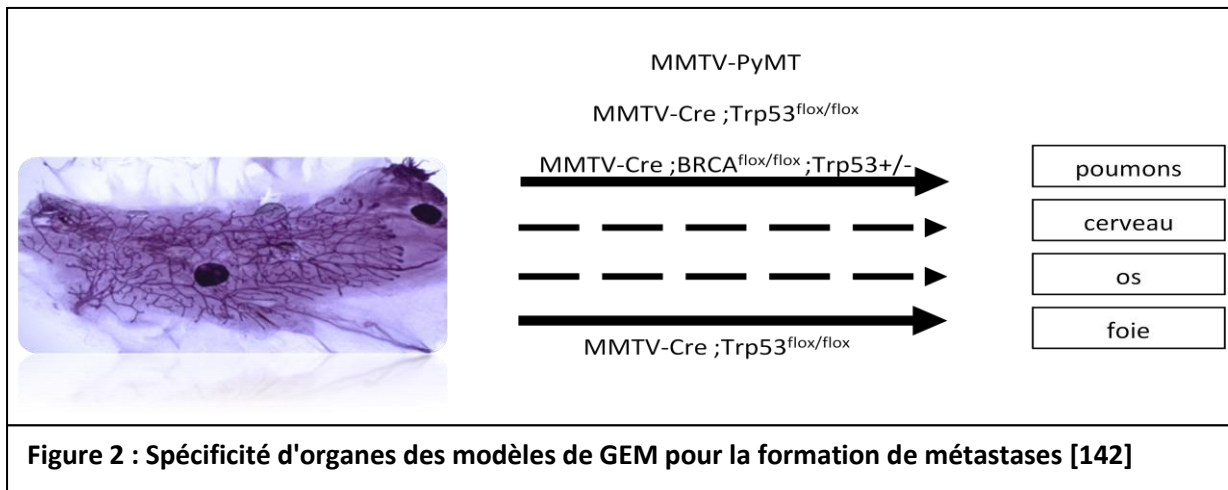
On retrouve un grand nombre de modèles basés sur la modulation de l'expression d'Erb-B2. Ce gène est retrouvé surexprimé dans 30% des cancers du sein chez la femme. Mais dans la plupart des cas, la mutation murine ne correspond pas à l'amplification du gène retrouvée chez la femme [35] [68] [164].

### 1.4.5.2 *La difficulté à obtenir des sous-types murins ER positifs*

Environ 60% des cancers du sein chez la femme sont ER positifs et hormono-dépendants au moins dans les stades précoces. Pourtant les modèles murins ER+ sont très rares [106]. Ceci illustre bien la difficulté à utiliser ces modèles dans des essais pré-cliniques pour la validité de nouveaux agents thérapeutiques basés sur de l'hormono-thérapie ainsi que la difficulté à générer tous les sous-types moléculaires retrouvés dans le cancer du sein chez la femme.

### 1.4.5.3 *La difficulté à obtenir l'ensemble des localisations métastatiques*

L'inconvénient majeur noté dans les modèles transgéniques de cancers mammaires réside dans la difficulté à obtenir l'ensemble des localisations métastatiques préférentielles retrouvées chez les patientes développant une maladie métastatique suite à un cancer du sein. Ainsi la majorité des modèles de GEM classés comme fortement métastatiques (**Tableau 1**) présentent des métastases pulmonaires et/ou des ganglions lymphatiques de drainage de la tumeur avec une forte spécificité (**Figure 2**). Ces localisations sont classiquement retrouvées chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique. Toutefois les autres localisations préférentielles telles les localisations osseuses et hépatiques ou à une moindre fréquence le cérébrales sont extrêmement rares [142].



Les modèles de GEM ont donc joué un rôle capital dans la compréhension de la maladie cancéreuse en apportant un «éclairage» important sur l'origine génétique des tumeurs et le rôle des différents gènes dans le développement tumoral. Leur utilisation dans la signature génomique de la maladie métastatique démontre encore une fois l'utilité de ces modèles pour l'étude des cancers. Toutefois, il existe toujours de nombreuses différences histologiques, moléculaires et génétiques entre les cancers humains et murins. Ceci explique donc l'intérêt grandissant des équipes de recherche pour la création de nouveaux modèles animaux. Dans la deuxième partie, est donc présenté un autre modèle murin : la xénogreffe de lignées de cellules cancéreuses humaines.

**Tableau 1 : Tableau récapitulatif des modèles de souris transgéniques métastatiques [89]**

|  | Souche de souris transgénique                                  | Tumeur primaire |                    | métastases    |                    | Organes cibles                   | références     |
|--|--|-----------------|--------------------|---------------|--------------------|----------------------------------|----------------|
|  |  | Incidence (%)   | Latence (semaines) | Incidence (%) | Latence (semaines) |                                  |                |
| Modèle de progression tumorale spontanée       | MMTV-PyMT  | 100             | 4-8                | 85-100        | 14                 | Po, NL                           |                |
|  | MMTV-Neu   | 100             | 28-33              | 75            | 32                 | Po                               |                |
|  | MMTV-Neu <sup>N<sup>DL</sup></sup>                             | 100             | 12-20              | 75            | 14                 | Po                               |                |
|  | MMTV-Wnt1  | 60              | 32                 |               |                    | Po, NL                           |                |
|  | WAP-Ras  | 100             | 25                 | 14            |                    | Po                               |                |
| Modèle de résistance à la formation de tumeurs | MMTV-Neu ;PTP1B <sup>-/-</sup>                                 | 40              | 3 ans              |               |                    |                                  |                |
|  | MMTV-PyMT;Akt1 <sup>-/-</sup>                                  | 100             | 30                 | 37            |                    | Po                               |                |
|  | MMTV-PyMT;CD44 <sup>-/-</sup>                                  | 100             | 14                 | 66            | 14                 | Po                               |                |
|  | MMTV-PyMT;CSF-1 <sup>op/op</sup>                               |                 | 8-10               | Retardée*     |                    | Po                               |                |
|  | MMTV-PyMT;CD4 <sup>-/-</sup>                                   | 100             | 10-11              | Atténuée*     |                    | Po                               |                |
| Modèle knock-out de gène suppresseur de tumeur | MMTV-cre ;MMTV-p53 <sup>flox/flox</sup>                        | 100             | 40-72              | 50            |                    | Po, Fo                           |                |
|  | MMTV-Neu ;WAP-p53R172H   | 100             | 22                 |               |                    |                                  |                |
|  | MMTV-Cre ;Brca1 <sup>Co/co</sup> ;Trp53 <sup>+/-</sup>         | 100             | 20-25              |               |                    | Po,NL                            |                |
|  | MMTV-Neu;MMTV-Cre;PTEN <sup>flox/flox</sup>                    | 100             | 6-7                | 87,5          |                    | Po,NL                            | Schade (2009)  |
|  | WAP-Cre ;Cdh1 <sup>flox/flox</sup> ;Trp53 <sup>flox/flox</sup> | 100             | 28-43              | 70            |                    | NL, Po, Fo, Ra, os, TD, Pa, peau | Derksen (2009) |
|  | MMTV-LMW-Cyl-E ;Trp53 <sup>+/-</sup>                           | 27              | 73-80              | 25            |                    | Po, Ce, NL                       | Akli(2007)     |
| Modèle murin inductible                        | MMTV-rtTA;TetO-NeuNT   | 100             | 6                  | 92            | ?                  | Po                               | Moody (2002)   |
|  | MMTV-rtTA;TetO-MYC   | 86              | 22                 |               |                    |                                  |                |
|  | MMTV-PyMT;WAP-rtTA-Cre;GATA <sup>fl/fl</sup>                   | Petites tumeurs | 2-8                |               |                    |                                  |                |

Ce : cerveau ; Fo : foie ; NL : nœud lymphatique ; Pa : pancréas ; Po : poumons ; Ra : rate ; TD : tube digestif ; retardée : absence de métastases à 22 semaines alors que les souris control présentent des métastases pulmonaires entre 18 et 22 semaines ; atténuée : diminution de 30 % du développement de métastases comparé aux souris CRD44<sup>+/-</sup> ; latence : temps nécessaire pour que la masse tumorale atteigne les 1,5 cm<sup>3</sup>. L'incidence et la latence pour les modèles murins inductibles sont calculées à partir de l'induction par la tétracycline.

D'après Kim I.S, *Biochemical and Biophysical research Communications*, 2010 [89] et Rampetsreiter P, *Drug Discovery Today : Disease Models*, 2011 [142]

## **2. Le modèle de lignée cellulaire, un modèle reproductible et maîtrisé pour la constitution de profil génomique**

Avec l'idée qu'il n'y a pas meilleur modèle pour étudier la diversité et la spécificité des cancers humains qu'en utilisant des cellules humaines, l'autre approche pour étudier les cancers avec notamment une perspective thérapeutique est l'utilisation de xéno greffes de cellules humaines en injection ecto- ou orthotopique. On s'intéressera donc dans ce paragraphe à l'apport de cette technique par rapport aux modèles transgéniques.

### **2.1 La constitution du modèle : sélection des animaux et considérations techniques**

#### **2.1.1 Le rôle du système immunitaire dans le développement tumoral**

Dès les années 80, le rôle du système immunitaire dans la réponse tumorale est prouvé. Ainsi, la présence importante de cellules médiatrices de l'immunité est inversement corrélée à la capacité métastatique [17] [75]. Dans une famille, un faible taux d'activité des cellules Natural Killer (NK) est aussi fortement associé à l'existence de cancers du sein familiaux [165]. De plus, l'activité des cellules NK est en général absente dans les ganglions des patientes fortement métastatiques [18] [74].

La littérature montre actuellement que de nombreux types cellulaires peuvent avoir un rôle dans le développement tumoral.

##### *2.1.1.1 Les cellules NK*

Les cellules NK représentent environ 1 à 2,5 % des lymphocytes périphériques et elles semblent posséder une activité anti-tumorale [181] mais aussi contribuer au contrôle du développement des métastases [64] [166].



### 2.1.1.2 Les cellules LAK (Lymphokine-Activated Killer)

Les cellules LAK sont capables de tuer les cellules cancéreuses ainsi que les cellules cancéreuses résistantes à la cytolysse de cellules NK [67].

### 2.1.1.3 Les macrophages

C'est en 1987 que l'équipe de Cummins a mis en évidence l'existence d'une population particulière au sein des tumeurs : les TAMs (Tumor Associated Macrophages, macrophages associés à la tumeur) [6] [84] [85]. Ces macrophages produisent une cytolysse non spécifique mais leur présence a aussi été associée à un effet stimulant sur la progression tumorale du fait de leur sécrétion de facteurs mitotiques [1].

## 2.1.2 Les modèles murins classiquement utilisés

Les modèles murins immuno-déficients semblent indispensables pour améliorer les prises de greffes de matériel exogène d'une espèce différente.

### 2.1.2.1 *Nude (Nu)*

Le phénotype *Nude* a été décrit la première fois en 1962 à Glasgow [129]. Il correspond au phénotype le plus couramment utilisé comme modèle murin immunodéficient. Les souris sont mutées sur le chromosome 11. Les souris homozygotes sont athymiques [129], et présentent donc une réponse antigénique T-dépendante faible [90]. On retrouve également une maturation des cellules B défectueuse même si les formes précoces semblent normales [180]. Par contre on observe une réponse des cellules NK augmentée comparée aux hétérozygotes ou au phénotype sauvage [71] [87]. L'activité des cellules LAK et des macrophages est aussi équivalente aux souris « normales » [70] [79]. Le faible pouvoir métastatique de ce modèle *Nude* est en partie expliqué par cette dernière propriété d'activité anormalement élevée des cellules NK [64] [145] [178].

### 2.1.2.2 *Beige (bg)*

La mutation est localisée sur le chromosome 12. Les souris *Beige* homozygotes ne présentent pas d'activité des cellules NK [146] [147] mais aussi des altérations des fonctions des LT (Lymphocyte T), des macrophages et des granulocytes ainsi qu'un dysfonctionnement de l'aggrégation plaquettaire. Cette dernière anomalie explique en grande partie la préférence

du modèle Nude comparé à ce second modèle. Toutefois des croisements bg/nu qui combinent les déficiences immunitaires des 2 modèles sont possibles [42] [71] [83] [87].

#### 2.1.2.3 *Scid (severe combined deficiency mutation)*

Le modèle SCID est devenu un des modèles actuellement les plus employés comme modèle murin immunodéficient. La mutation touche le chromosome 16 (homologue de la région chromosomique 8q11 humaine). Ces souris présentent des organes lymphoïdes sous-développés et une différenciation et maturation des lymphocytes B et T défectueuses dues à un défaut de formation des immunoglobulines [112]. La lignée B est en général indétectable et les cellules T résiduelles sont en général non fonctionnelles [55]. Toutefois les cellules NK et LAK ainsi que les macrophages semblent normaux [13] [56]. Ces souris présentent un phénotype d'immunodépression beaucoup plus sévère que les autres modèles

De façon générale, on peut remarquer que certaines lignées cellulaires de cancer du sein peuvent donner des métastases ou pas en fonction du modèle murin immunodéficient choisi [43] [183] sans que l'on puisse élucider l'origine de cette différence d'adaptabilité des tumeurs à leur hôte.

#### 2.1.2.4 *Nog*

Le modèle Nog est un autre modèle de souris immunodéficientes, issu du modèle SCID, créé dans les années 2000. Ce modèle semblait plus propice aux xénotransplantations [78] [150]. Il est issu d'un croisement de 2 modèles murins. Le premier modèle est le modèle NOD (Non-Obese Diabetic) auquel on surajoute un KO (Knock-Out) pour la chaîne  $\gamma_c$  de IL2-R. Le deuxième modèle est le modèle murin SCID donnant naissance à des souris NOD/Shi-scid-IL-2Rc. Ces souris présentent une déficience combinée des cellules B, T et NK et NKT (Natural killer T).

#### 2.1.2.5 *Hypogonadal/scid (hpg/scid), modèle murin post-ménopause*

Les souris Scid présentent une mutation à l'origine de la production d'une protéine LHRH non fonctionnelle car tronquée [36]. Comme chez les souris ovariectomisées, le taux de LH et FSH des souris Hpg/scid est non détectable [39] et permet de générer une souris immunodéprimée avec un environnement endocrinien comparable à celui retrouvé chez les patientes post-ménopause.

### 2.1.3 Le choix du site d'injection

Il existe une multitude de preuve montrant l'importance du choix de la voie d'injection dans la pertinence des modèles de xénogreffes. Si le site de référence de transplantation des xénogreffes reste l'inoculation dans le tissu sous-cutané, il ne se présente pas clairement comme le site optimal pour toutes les xénogreffes [43]. De plus en plus de preuves de l'importance des interactions tumeur-hôte, ou encore tumeur-stroma dans la progression du cancer et notamment le cancer du sein sont apportées dans la littérature [45] et illustrent les limites de ce choix d'injection sous-cutané.

En 2005, l'équipe de J. Massagué pour les mêmes lignées dérivées de SCP de MDA-MB-231, observe des différences notables sur les sites métastatiques en fonction de la voie d'injection [118] [119] choisie pour la xénogreffe. Ainsi les métastases montrent un tropisme plus prononcé pour l'os lors d'injection intra-cardiaque et pour les poumons lors d'injection intraveineuse à la veine caudale. Pour cette équipe de chercheurs, cette différence prononcée peut être mise sur le compte de l'incapacité des cellules humaines à circuler dans les capillaires murins. Cette étude illustre bien les limites du modèle murin pour le développement métastatique. Avec la volonté de s'approcher au plus près du développement métastatique des patientes, d'autres équipes ont essayé d'optimiser le modèle de xénogreffes en utilisant notamment l'injection orthotopique. Les résultats sont variables selon les équipes.

En 2005, l'équipe de M. Rosenblatt [96] montre l'importance de l'environnement de l'organe ciblé lors de la formation de métastases. L'introduction de fragments osseux humains viables et fonctionnels sur le flanc de souris immunodéficientes perfectionnent le modèle murin dans le cas des métastases osseuses. Lors d'injection orthotopique, parmi les lignées testées, seulement une, SUM1315, permet le développement de métastases sur le greffon osseux humain. Quelle que soit la lignée, l'absence de métastase osseuse sur le squelette murin leur permet de déduire qu'il existe une spécificité d'espèce forte dans ce type de métastases. Cette spécificité semble être limitée à l'os car ils observent des métastases pulmonaires chez les souris greffées avec certaines de ces lignées. Cette étude montre aussi les difficultés toujours présentes dans la mise en place de ce genre de protocole. Notamment l'existence d'un rejet du greffon tumoral par les cellules de la moelle osseuse du greffon osseux fait obstacle au développement métastatique. Dans une étude plus récente de 2012 sur l'étude des métastases osseuses de MDA-MB-231 à partir de l'injection de la tumeur primaire

dans le site orthotopique [183], les résultats sont plutôt décevants pour l'obtention de métastases. En effet, la mise en place d'un micro-environnement humain par implantation de fragments osseux humains en position sous-cutanée n'a pas permis l'observation de résultats probants de métastases osseuses à distance du site primaire. Cette lignée pourtant connue comme faisant des métastases osseuses en injection intra-cardiaque, s'avère peu capable de franchir les premières étapes du processus métastatique en injection orthotopique. Pourtant l'injection orthotopique semble le site le plus approprié pour la greffe de cellules cancéreuses mammaires et ce site est maintenant utilisé en routine [44] [29] [168]. Comparé à l'injection sous-cutanée, l'injection orthotopique peut augmenter significativement le taux de prise de greffe et de facilité métastatique dans certains cas [94] [117] [121] [177].

#### **2.1.4 L'apport du matrigel**

Cette membrane artificielle joue deux rôles principaux :

- Une barrière protectrice contre l'action des macrophages et des cellules NK et LAK
- Une matrice structurale permettant un attachement des cellules cancéreuses ainsi qu'un accès à des molécules ayant une action mitotique (fibronectine, laminine, collagène de type IV...)

#### **2.1.5 La correspondance des modèles *in-vitro* et *in-vivo***

Les caractéristiques phénotypiques des lignées cellulaires semblent conservées lors de leur passage dans l'animal. Ainsi le statut ER positif/négatif, PGR (Progesterone Receptor) positif/négatif, hormono-dépendant ou non, réponse ou non aux anti-oestrogènes, ainsi que leur résistance ou non aux drogues [43] semblent être identiques entre la lignée et la tumeur primaire obtenue sur l'animal.

## 2.2 L'apport des allogreffes par rapport aux modèles GEM

Le principe de l'allogreffe repose sur la greffe de matériel organique (ici tumoral) dans un individu de la même espèce. La particularité des allogreffes par rapport aux modèles GEMs est donc l'utilisation de lignées cellulaires murines greffées à des souris hôtes.

Comparé aux modèles de GEM, ce modèle présente des désavantages majeurs comme l'absence des premières étapes de la tumorigenèse et de l'initiation tumorale mais d'autres certains aspects rendent ce modèle tout à fait intéressant et en particulier pour l'étude des caractéristiques de la maladie métastatique.

Il a été vu que les modèles GEM sont connus comme rarement métastatiques et comme difficilement organe-spécifiques. Dans le cas des allogreffes de lignées murines, certains laboratoires ont rapidement réussi à obtenir des sous-populations ayant des capacités métastatiques différentes. Cette observation ouvre la porte à une caractérisation moléculaire de cellules cancéreuses ayant des capacités spécifiques [12] [25] [122]. Ainsi pour certaines lignées, 2 sous-populations arrivent à être isolées : les fortement métastatiques et les non métastatiques. Les mécanismes expliquant le défaut de certains sous-types à former des métastases peuvent donc être plus facilement appréhendés même si non encore entièrement élucidés. Classiquement les lignées étudiées sont les lignées 67, 168, 66, et 410.4. Ces lignées ont été isolées d'une tumeur mammaire spontanée d'une souris Balb/cfC3H. Même si leur origine est commune, les différences phénotypiques sont évidentes. L'isolement de la sous-population 4T1 de 410.4 présente un intérêt tout particulier car elle métastase à toutes les localisations classiquement retrouvées (poumons, foie, os et cerveau) chez les patientes métastatiques ayant contracté un cancer du sein. La sous population 67NR issue de la lignée 67 est quant à elle non métastatique. La compréhension précise des altérations génétiques spécifiques de ces différentes sous-populations demande encore à être approfondie.

## **2.3 L'apport des xénogreffes dans la compréhension de la progression du cancer du sein**

Les cellules cancéreuses humaines étant directement injectées dans la souris, cette technique ne permet pas l'étude des stades très précoces de l'initiation tumorale. En revanche, cette technique est actuellement amplement utilisée dans l'étude de la progression tumorale.

3 lignées sont communément utilisées dans ces modèles de xénogreffes : MCF-7 [162], ZR-75-1 [59] et T47D [86], lignées hormono-dépendantes dérivées pourtant de patientes post-ménopausées.

### **2.3.1 L'acquisition d'un phénotype hormono-indépendant**

La majorité des tumeurs ER/PR positives répond aux traitements anti-oestrogènes mais dans les stades les plus avancés, ces tumeurs vont acquérir un phénotype résistant [46]. *In vivo*, cette résistance s'acquiert suite à une forte dose ou une exposition prolongée aux drogues anti-hormonales [26] [66] [125]. La création d'une lignée dérivée de MCF-7, MCF-7/LCC2, a permis la formation d'une lignée résistante au triphényléthylène (molécules présentant une action anti-oestrogéniques mais ne présentant pas la structure caractéristique des molécules stéroïdiennes) mais pas aux anti-œstrogènes stéroïdiens par analogie à ce qu'on retrouve chez les patientes [43]. Dans ces lignées cellulaires implantées *in-vivo*, l'absence de réponse aux traitements antihormonaux s'accompagne en général du maintien de l'expression de l'ER comme observé couramment chez les patientes atteintes de cancer du sein [28] [29] [44].

### **2.3.2 La création de modèles résistants aux drogues**

Un des modèles couramment employé dans les modèles résistants aux drogues est le modèle MCF-7<sup>ADR</sup> sélectionné *in vitro* pour sa perte de sensibilité à la doxorubicine et sa surexpression de gp170 (P-glycoprotéine, PGP) produit par le gène MDR-1. Cette lignée est aussi présentée comme ER-négative et comme résistante aux anti-œstrogènes [175]. Il semblerait aussi que ce modèle présente d'autres mécanismes de résistance aux drogues (comme la résistance à l'ADR (adriamycine)).

Un autre modèle est la lignée dérivée MDA-435/LCC6<sup>MDR-1</sup> par transduction avec l'ADNc MDR-1. Les caractéristiques générales de la lignée sont conservées comme sa propension à proliférer rapidement en tumeur solide et à former des ascites malignes [100].

## **2.4 Apport des xénogreffes dans la compréhension du processus métastatiques**

### **2.4.1 Vers la création de modèles murins fiables (Tableau 2)**

Les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-435 produisent des tumeurs localement invasives (infiltrantes) mais aussi de façon reproductible des métastases pulmonaires et dans certains autres organes [30] [139]. Le modèle MCF-7 transfecté avec FGF-4 présente aussi un taux élevé et reproductible de métastases provenant de la voie hématogène qui pourrait être du à l'augmentation de son potentiel angiogénique [116]. D'autres variants issus de MCF-7 (MCF-7/MIII et MCF-7/LCC1) présentent un potentiel métastatique exacerbé pouvant générer des métastases empruntant la voie lymphatique ou hématogène mais de reproductibilité et d'incidence trop faibles pour générer un modèle métastatique fiable [29] [44] [168].

### **2.4.2 Vers la création de profils génomiques métastatiques spécifiques d'organes**

L'équipe de J. Massagué a sélectionné la lignée MDA-MB-231 pour essayer de mieux connaître les propriétés génétiques spécifiques des métastases des patientes atteintes de cancer du sein. La greffe de cette lignée à des souris BALB/c nudes a permis d'identifier des signatures génomiques spécifiques des localisations métastatiques (poumons, os, cerveau). Ces signatures issues de ces modèles murins semblent garder leur pertinence quant elles sont appliquées aux patientes [20] [118] [119].

### **2.4.3 Vers la compréhension du concept des cellules souches cancéreuses**

#### *2.4.3.1 L'émergence du concept*

L'évolution d'une cellule normale vers un phénotype cancéreux requiert la dérégulation d'un grand nombre de processus cellulaires. Le modèle classique de carcinogénèse, le modèle stochastique repose sur l'accumulation d'évènements indépendants et aléatoires dans des cellules différentes donnant à terme différents clones tumoraux et donc l'hétérogénéité tumorale. Ce modèle est mis à mal depuis 15 ans avec l'émergence d'une nouvelle hypothèse



basée sur la connaissance plus approfondie des leucémies considérant une origine unique de l'hétérogénéité tumorale : la cellule souche cancéreuse (CSC) [19] [97] [157]. Cette cellule souche cancéreuse présente des caractéristiques particulières *in-vitro* et *in-vivo* permettant de la différencier des cellules tumorales « classiques » : auto-renouvellement, capacité de différenciation, forte tumorigénicité, capacité à pousser en milieu non adhérent (capacité à faire des sphères), mais aussi un potentiel métastatique élevé [63]... La solidité de ce dernier modèle, dit modèle hiérarchique, semble se confirmer actuellement dans un grand nombre de tumeurs solides : côlon, poumons, pancréas, et sein notamment. Ces CSC, grâce à leur caractère quiescent se présenteraient aussi comme une population résistante aux traitements de chimiothérapie classiques agissant sur les cellules en mitose, à tel point qu'on pourrait assister à un enrichissement de la tumeur en CSC suite au traitement [101].

#### 2.4.3.2 L'apport des modèles de xéno greffes pour la compréhension du rôle des CSC

L'équipe d'Al-Hajj en 2003 montre que la population de cellules souches cancéreuses peut être isolée sur l'expression de marqueurs particuliers ( $CD44^+/CD24^{-low}/Lin^-$ ). Cette population est capable de former une tumeur suite à l'injection de 100 cellules dans des souris NOD/SCID. Ces cellules présentent des caractéristiques communes avec les cellules identifiées comme CSC *in-vitro*. A contrario, 20 000 cellules ne présentant pas ce phénotype sont incapables de reformer des tumeurs *in-vivo* [4]. L'initiation tumorale semble donc être l'apanage de ces CSC. Mais ces cellules souches ne semblent pas présenter uniquement un rôle promoteur de la tumorigénèse et semble aussi jouer un rôle dans la formation des métastases. Ainsi plusieurs équipes s'intéressent aux relations qui peuvent exister entre CSC et métastases. En 2009, l'équipe d'E. Charafe-Jauffret grâce à l'utilisation d'un autre marqueur ALDH-1 (Aldéhyde Dëshydrogènesase), propre aux cellules souches et l'utilisation d'un modèle murin de souris NOD/SCID, montre les capacités métastatiques accrues de la sous-population ALDH-1 positive comparée aux cellules tumorales n'exprimant pas ce marqueur [38]. L'équipe de F. Clarke, la même année, confirme les capacités métastatiques de ces CSC isolées cette fois par leur marqueur CD44 [108], grâce à des modèles de souris NOD/SCID. Il confirme aussi par cette étude la capacité de différenciation et d'auto-renouvellement des CSC. Ceci est démontré grâce à l'étude de la répartition du marqueur CD44 dans les métastases pulmonaires. Les métastases pulmonaires étudiées sont obtenues suite à des greffes dans le coussinet graisseux (mammary fat-pad) de métastases pulmonaires provenant d'une génération antérieure de souris. Cette génération antérieure de souris a été

xéno greffée avec une lignée cellulaire de cancer du sein, et a développé des métastases à distance.

Les modèles de xéno greffes apportent donc une nouvelle approche dans la compréhension de la maladie métastatique. L'utilisation de matériel tumoral humain rend ce modèle intéressant pour reproduire différents sous-types tumoraux et les différences d'évolution de la maladie retrouvés chez la femme et non reproductible par les modèles de GEM. Ce modèle a permis aussi une meilleure compréhension cellulaire du cancer du sein humain, notamment avec la découverte des CSC. Mais le passage *in-vitro* peut limiter l'analogie entre les tumeurs de patientes et les tumeurs xéno greffées provenant de lignées cellulaires. Afin de rester toujours au plus près des caractéristiques histologiques, moléculaires et génétiques de la tumeur d'origine, une nouvelle technique, la xéno greffe de tumeur primaire, a émergé depuis quelques années. Cette technique est présentée en troisième partie.

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des lignées cellulaires pour l'étude des métastases (pour les tumeurs mammaires de sous-type luminal et basal)**

| cellulaires | tumoral | prélèvement | moléculaire | ER | PR | ErbB2 | Site injection | Nombres de cellules               | localisation | Latence (semaines) | References |
|-------------|---------|-------------|-------------|----|----|-------|----------------|-----------------------------------|--------------|--------------------|------------|
| MDA-MB-231  | AK      | EP          | Basal B     | -  | -  |       | Veine caudale  | $2 \times 10^5$                   | Po           | 8-15               |            |
|             |         |             |             |    |    |       | orthotopique   | $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ | Po, Fo, Ce   | 5-9                |            |
|             |         |             |             |    |    |       | intracardiaque | $1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$ | Ce, os       | 4                  |            |
| MDA-MB-435  | KCI     | EP          | Basal B     | -  | -  |       | orthotopique   | $2 \times 10^6$                   | Po           | 9                  |            |
| MDA-MB-453  | AK      | EP          | Luminal     | -  | -  | +     | intracardiaque | $1 \times 10^5$                   | os           | 4                  |            |
| SUM1315     | KCA     | NMC         | Basal B     | -  | -  |       | orthotopique   | $1 \times 10^6$                   | Po, os       | 8-12               |            |
| SUM149      | KC inf  | TP          | Basal B     | -  | -  |       | Veine caudale  | $2 \times 10^6$                   | Po           | 8                  |            |
| BT-474      | KCI     | TP          | Luminal     | +  | +  | +     | intracardiaque | $1 \times 10^6$                   | os           | 4                  |            |
| MCF7        | KCA     | EP          | Luminal     | +  | +  |       | orthotopique   | $1 \times 10^6$                   | NL, VL       | 12                 |            |
| T47D        | KCA     | EP          | Luminal     | +  | +  |       | orthotopique   | $1 \times 10^6$                   | NL, VL       | 12                 |            |

AK : adénocarcinome ; KCI : carcinome canalaire invasif ; KCA : carcinome canalaire infiltrant ; KC Inf : carcinome canalaire inflammatoire ; EP : effusion pleurale ; NMC : nodule métastatique cutané ; TP : tumeur primaire ; Po : poumons ; Fo : foie ; Ce : cerveau ; NL : nœud lymphatique ; VL : vaisseau lymphatique ;

*D'après Kim I.S, Biochemical and Biophysical research Communications, 2010 [89]*



### **3. Les xénogreffes de tumeurs primaires : pour s'approcher au plus près des caractéristiques phénotypiques et génotypiques des tumeurs des patientes**

La xénogreffe de tumeur primaire de patiente est une technique qui consiste à greffer directement chez l'animal le prélèvement chirurgical humain sans étape de culture cellulaire préalable. Donc contrairement aux xénogreffes de lignée cellulaire, les cellules tumorales humaines ne connaîtront pas d'étapes *in-vitro* susceptibles de modifier leur génome avant leur greffe sur l'animal.

#### **3.1 Quels apports de cette nouvelle technique dans la compréhension des cancers ?**

La nécessité de cette nouvelle technique a émergé avec la difficulté des autres modèles à représenter et résumer l'ensemble des sous-types moléculaires retrouvés dans les cancers en général ; et donc les cancers du sein pour ce qui nous intéresse. Les lignées cellulaires déjà existantes ainsi que les modèles de GEM même s'ils permettent de représenter assez fidèlement les cancers du sein humains ne permettent pas de balayer tout l'« éventail » des variétés génomiques et transcriptomiques des tumeurs de cancer du sein observés chez les patientes. L'étape d'immortalisation par exemple lors de la fabrication d'une lignée cellulaire, modifie les caractéristiques phénotypiques et génomiques des cellules tumorales. Pour les modèles de GEM, la difficulté à représenter toute l'hétérogénéité des cancers du sein pourrait présager de la difficulté à produire *a priori* des modèles de mutations polygéniques sans connaître l'(les) origine(s) de l'initiation des tumeurs.

Actuellement quelques études commencent à apporter les preuves de la pertinence de ce nouveau type d'approche de xénogreffe directe de tumeur de patientes pour étudier l'hétérogénéité des propriétés génomiques, des comportements, et des évolutions des

différents cancers du sein. Ainsi Petrillo et son équipe montre déjà la concordance de pattern d'expression des gènes de la xénogreffe avec la tumeur primaire de la patiente dont elle est issue [136]. L'équipe de Welm prouve la concordance d'évolution clinique et de comportement tumoral entre la xénogreffe et la tumeur primaire de la patiente [51].

A la lumière de notre connaissance actuelle, le clinicien retrouve toujours des difficultés à établir un comportement « type » d'un sous-type moléculaire de cancer du sein à une thérapie donnée. Ainsi l'étude de P. Cottu montre tout l'intérêt de cette approche de xénogreffe directe de tumeurs primaires sur des souris immunodéficientes pour reproduire la diversité des comportements d'un même sous-type moléculaire (dans ce cas le sous-type luminal) vis-à-vis des traitements de chimiothérapie (ici l'acquisition d'hormono-résistance) [48].

Cette approche permettrait aussi de tester des thérapies ciblées sur des cellules souches cancéreuses en phase de recherches précliniques ainsi que l'étude des propriétés fonctionnelles des cellules après traitement ou encore la compréhension des mécanismes en relation avec les sous-types moléculaires de cancer du sein (**Tableau 3**).

## **3.2 La constitution d'une banque de xénogreffes de tumeurs primaires humaines**

Afin d'avoir accès à l'ensemble des sous-types moléculaires de cancer du sein ainsi qu'à la plus grande variété possible des spécificités tumorales retrouvées chez les patientes atteintes de cancer du sein, ces banques de xénogreffes commencent à être constituées.

### **3.2.1 Contrainte**

La première contrainte à la constitution de cette « xéno-banque » est la difficulté de prise de greffe initiale de la tumeur primaire de patiente directement implantée en région orthotopique chez la souris sans étape d'immortalisation préalable. La différence d'espèce est donc la première barrière à franchir. Pour optimiser au maximum la prise du greffon étranger, le modèle de souris à choisir est donc le plus immunodéprimé possible, le choix a été fait sur le modèle NOG (NOD/SCID/IL2R<sup>null</sup>) [32].

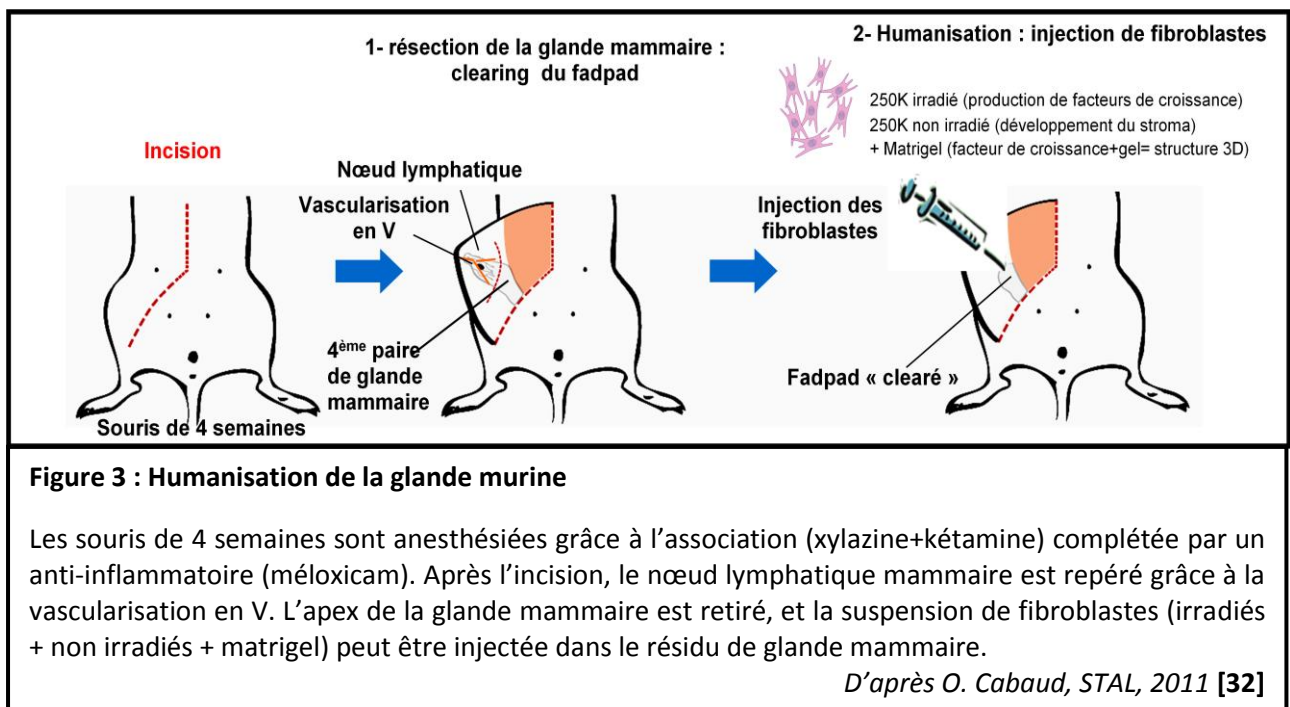
La deuxième contrainte est l'efficacité à reproduire un environnement autour de la tumeur propice à son initiation et à son expansion. En effet, le stroma murin s'est avéré insuffisant pour concourir à la reconstitution du tissu épithélial mammaire humain normal [126] [153]. Récemment la mise en place d'une nouvelle technique par l'équipe de Kupperwasser consiste à greffer des fibroblastes d'origine humaine dans la glande mammaire murine et a permis la constitution d'un tissu conjonctif chimérique propice à la croissance du tissu mammaire humain dans la glande murine. Ce micro-environnement « humanisé » permet la reconstitution d'un arbre mammaire normal et fonctionnel.

### **3.2.2 Approche expérimentale**

Cette technique de xénogreffe se divise donc en plusieurs étapes [32].

### 3.2.2.1 L'humanisation de la glande mammaire murine

Après résection de la majorité du tissu épithélial murin sur des souris de moins de 3 à 4 semaines, des fibroblastes humains en partie irradiés (4 grays) dans le résidu de tissu mammaire murin sont réimplantés. Le choix de l'âge des animaux à cette étape est capital car la colonisation du coussinet graisseux par l'épithélium mammaire murin n'a pas encore eu lieu sur ces animaux pré-pubères. L'irradiation des fibroblastes humains est aussi une étape importante permettant l'activation physiologiques des cellules qui vont se mettre à produire des protéases, des protéines matricielles et des facteurs de croissance. En dernier lieu, les fibroblastes sont réinjectés après leur suspension dans du matrigel permettant la constitution d'une matrice de maintien et d'apport de facteurs protéiques (figure 3).



**Figure 3 : Humanisation de la glande murine**

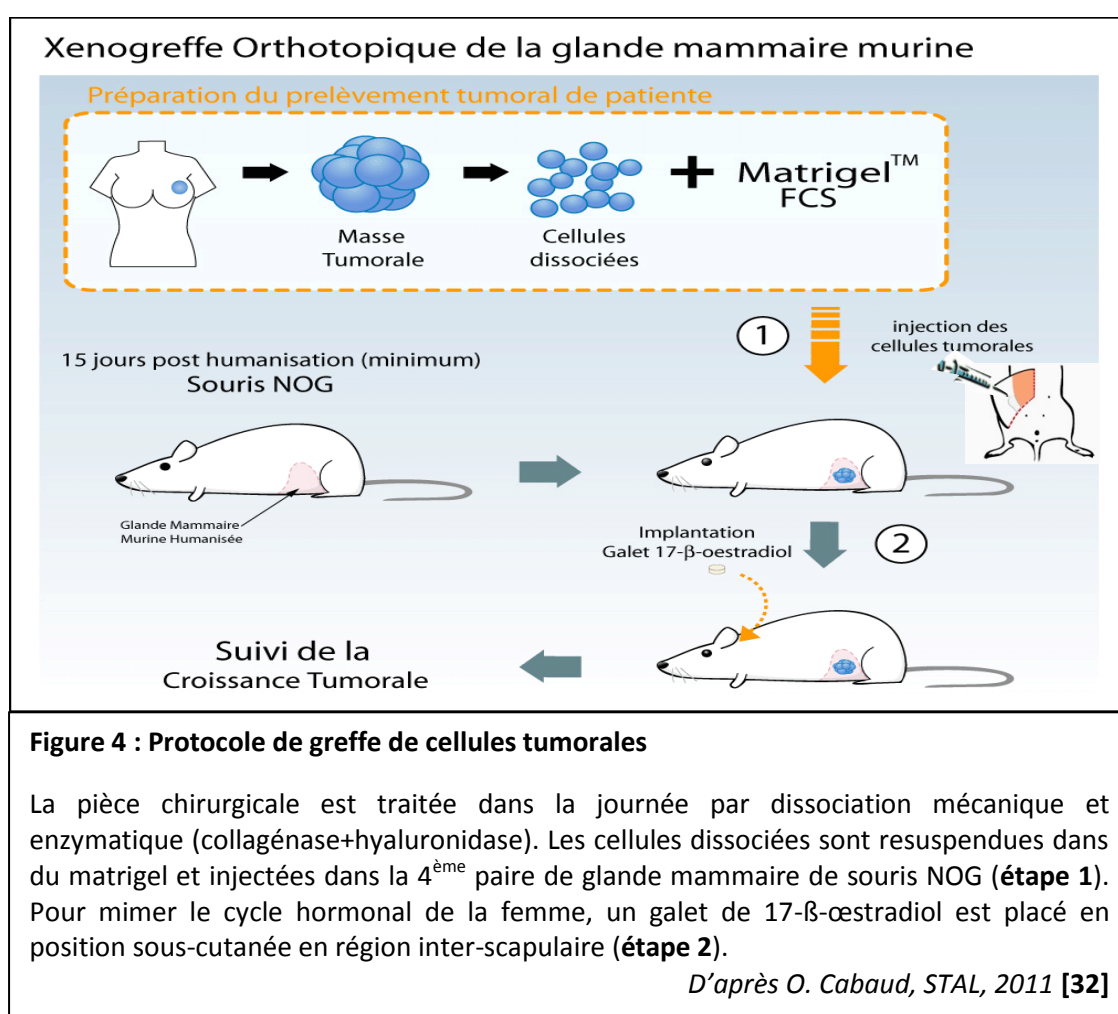
Les souris de 4 semaines sont anesthésiées grâce à l'association (xylazine+kétamine) complétée par un anti-inflammatoire (méloxicam). Après l'incision, le nœud lymphatique mammaire est repéré grâce à la vascularisation en V. L'apex de la glande mammaire est retiré, et la suspension de fibroblastes (irradiés + non irradiés + matrigel) peut être injectée dans le résidu de glande mammaire.

*D'après O. Cabaud, STAL, 2011 [32]*



### 3.2.2.2 La greffe des cellules tumorales (Figure 4)

La greffe de cellules tumorales a lieu au moins 15 jours après l'humanisation. La biopsie de la patiente est traitée dans la journée par un procédé mécanique puis enzymatique permettant la dissociation des cellules tumorales. Les cellules peuvent alors être préparées en suspension unicellulaire dissociée dans du matrigel puis réimplantées dans la glande mammaire « humanisée ». Pour augmenter la prise de greffe tumorale et mimer l'environnement hormonal humain, des implants à libération prolongée de 17 $\beta$ -oestradiol sont implantés en localisation sous-cutanée en région inter-scapulaire.



### 3.2.3 Constitution de la banque

Tous les échantillons primaires issus des tumeurs des patientes implantés chez la souris ne pourront pas entrer dans la constitution de la banque. En effet, une période de 1 an est fixée comme période limite après implantation des cellules tumorales pour décider de la non-prise de la greffe et le sacrifice des animaux.

Lors de la prise de greffe, les souris sont sacrifiées lorsque la taille tumorale maximale éthiquement acceptable est atteinte (10 mm de diamètre). La masse tumorale récupérée subit une validation vis-à-vis des caractéristiques initiales de la tumeur primaire de patiente. La validation a lieu par une comparaison histologique, génomique et transcriptomique de la tumeur de la patiente avec son équivalent produit sous forme de xénogreffe.

Des passages sériés de la xénogreffe initiale sont effectués sur des souris NOG afin d'augmenter la disponibilité des échantillons exploitables pour la mise en œuvre d'approches complémentaires par la suite. Ces passages successifs nécessitent à chaque fois une validation histologique, génomique et transcriptomique pour vérifier la pertinence biologique de l'échantillon par rapport à la tumeur primaire. Cette caractérisation est essentielle pour les passages tardifs où une dérive des tumeurs vers des aptitudes tumorigènes et métastatiques augmentées est observée [176]. L'équipe de Charafe-Jauffret expliquerait cette dérive par une sélection clonale au sein de l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur primaire lors des passages sériés [32].

Les échantillons de xénogreffes des différents passages sont conservés par congélation en suspension unicellulaire.

Par cette technique, la prise de greffe avoisine les 30% et 4 des sous-types moléculaires de cancer du sein ont déjà été établis sous forme de xénogreffes primaires (pour l'équipe de E. Charafe-Jauffret).

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes techniques de modèles murins**

|  | Avantages  | Inconvénients  |
|--|--|--|
| Modèle de lignée cellulaire              | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Potentiel de propagation élevé</li> <li>➤ Manipulation génétique aisée</li> <li>➤ Reproductivité/conditions expérimentales maîtrisées</li> <li>➤ modèle de cancer hormono-dépendants</li> <li>➤ possibilité d'isoler des populations initiatrices de tumeur et stem cell-like</li> <li>➤ étude de l'implication de certaines voies de signalisation dans les étapes du développement tumoral</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ défaut de représentativité de l'hétérogénéité tumorale des tumeurs primaires</li> <li>➤ défaut de concordance des différents sous-types moléculaires entre les patientes-et les modèles murins</li> <li>➤ défaut de représentativité de la totalité des sous-types moléculaires (absence de distinction des sous-types luminaux)</li> <li>➤ animaux immunodéficients donc peu d'interactions tumeur-système immunitaire</li> <li>➤ niveaux d'expression des gènes pouvant être différents entre le modèle murin et les patientes atteintes de cancer du sein</li> </ul> |
| Modèle de xéno greffe de tumeur primaire | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ correspondance des caractéristiques histologiques, et phénotypiques entre la tumeur primaire de la patiente et la tumeur murine</li> <li>➤ correspondance du sous-type moléculaire entre la tumeur primaire de la patiente et la tumeur murine</li> <li>➤ conservation de toutes les mutations génétiques des cancers du sein chez la femme</li> <li>➤ modèle de cancer hormono-dépendant</li> <li>➤ obtention de toutes les localisations métastatiques</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ difficulté à obtenir certains sous-types moléculaires peu agressifs (luminal A)</li> <li>➤ animaux immunodéficients donc problème pour étudier le rôle du système immunitaire dans la progression tumorale</li> <li>➤ peu de preuves d'une réelle correspondance de l'évolution de la maladie entre la patiente et la souris xéno greffée</li> <li>➤ absence de réponse des cellules tumorales à certains facteurs de l'hôte</li> </ul>   |
| modèle transgénique                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ correspondance des gènes inducteurs de tumeurs chez les patientes et les modèles murins</li> <li>➤ modèle immunocompétent</li> <li>➤ parallélisme génétique des régions mutées ou amplifiées entre les patientes et ce modèle murin</li> <li>➤ étude des gènes et de leur voie de signalisation impliqués dans la formation et la progression tumorale</li> <li>➤ meilleur contrôle du minutage de l'expression ou la perte de gène ainsi que la sélectivité à un tissu</li> <li>➤ possibilité d'induction des gènes</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ niveaux d'expression des gènes pouvant être différents entre le modèle murin et les patientes atteintes de cancer du sein</li> <li>➤ problème de ciblage sélectif des cellules à l'origine de la tumeur</li> <li>➤ problème de correspondance de type histologique entre les tumeurs primaires de patientes atteintes de cancer du sein et les tumeurs murines</li> <li>➤ problème de fréquence métastatique peu élevée et de localisation quasi-exclusivement aux poumons</li> <li>➤ tumeurs majoritairement hormono-indépendantes dans les modèles murins</li> </ul>  |



## **4. Un nouveau modèle murin de xénogreffe de tumeur primaire de patientes pour l'étude de la maladie métastatique dans le cas du cancer du sein**

Il a été présenté dans les premières parties de cette thèse, les 3 modèles murins les plus utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les cancers du sein. Le but de cette dernière partie est de présenter la mise en pratique du modèle murin le plus récent, la xénogreffe de tumeur primaire, pour l'étude de la maladie métastatique par une technique de suivi par fluorescence. Cette étude a été menée au sein des laboratoires de recherche de l'Institut Paoli-Calmettes en partenariat avec le CRCM (Centre de Recherche contre le Cancer de Marseille) dans l'équipe de M. Daniel Birnbaum sous la responsabilité du Docteur E. Charafe-Jauffret. En premier lieu, nous présenterons brièvement les caractéristiques de la maladie métastatique ainsi que le rôle des CSC dans cette maladie métastatique puis nous exposerons. Le protocole établi au sein du laboratoire pour étudier la maladie métastatique, ainsi que les premiers résultats obtenus par cette nouvelle approche. Une discussion des résultats ainsi que les perspectives ouvertes par ce nouveau protocole terminent cette partie expérimentale.

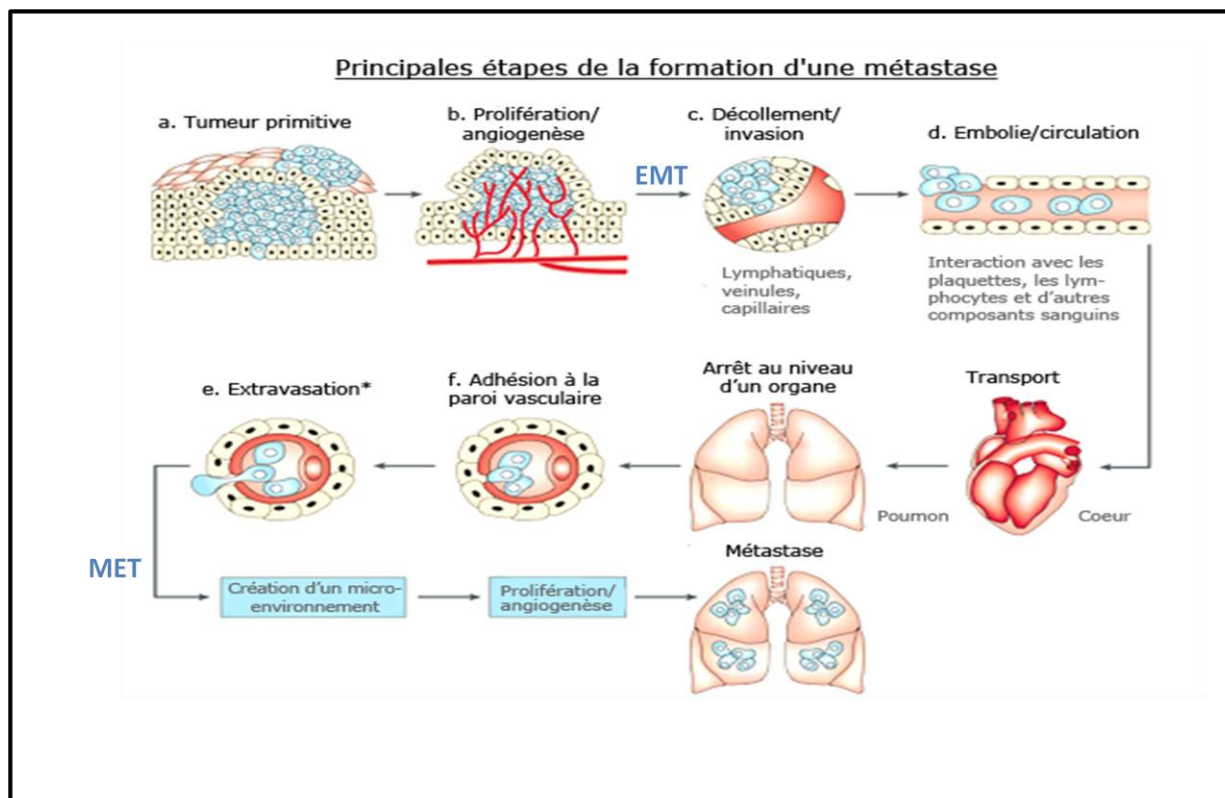
### **4.1 Pourquoi s'intéresser à la maladie métastatique chez l'homme ?**

Le stade métastatique est l'étape ultime de la progression des tumeurs solides malignes. Il se caractérise par l'apparition de tumeurs secondaires dans des organes différents de la tumeur primaire et à distance du site primaire. Il est responsable de la majorité des causes de mortalité due au cancer.

L'intérêt clinique de détecter le plus précocement possible ce stade métastatique repose sur l'impact pronostique, retrouvé dans certaines pathologies, de la présence de micrométastases médullaires ou de cellules circulantes, avant même qu'une métastase soit constituée [128]. D'un point de vue clinique, 2 grandes phases évolutives des cancers peuvent donc être définies : le cancer localisé dont le pronostic est favorable dans la majeure partie des cas et la maladie métastatique, incurable dans tous les cas.

#### **4.1.1 La conception actuelle : la maladie métastatique, une maladie séquentielle**

L'hypothèse classiquement admise pour expliquer le passage de la maladie localisée à l'apparition de métastases est l'acquisition séquentielle par quelques cellules tumorales de la capacité à franchir un ensemble d'étapes successives : invasion locale, extravasation, interaction des cellules tumorales circulantes (CTC) avec les éléments figurés du sang, arrêt, extravasation, nidation dans un nouvel organe et prolifération finale, et ce après une phase de dormance des éléments tumoraux plus ou moins longue [37] [47] (**figure 5**). Etant donné le nombre d'étapes à franchir par ces cellules, le développement métastatique est considéré comme un processus exigeant et peu « efficace ». La grande majorité des cellules de la masse tumorale primaire ne donneront donc pas de CTC, et bon nombre des CTC ne s'implanteront jamais pour donner de nouvelles tumeurs à distance du site primaire. Une des étapes jugées comme la plus critique dans l'avancée de ce processus est le passage de la barrière endothéliale par des cellules tumorales d'origine épithéliale. En effet, aucun modèle n'apportait une réponse convenable pour expliquer comment des cellules programmées pour être en interaction permanente avec leur environnement et en liaisons étroites avec leurs voisins du même tissu pouvaient « abandonner » toutes ces propriétés pour partir dans la circulation sanguine. C'est la découverte d'un processus physiologique mis en place durant le développement embryonnaire et permettant la « conversion » des cellules d'un profil épithélial vers un profil mésenchymateux, l'EMT (transition épithélio-mésenchymateuse) [134] [167], qui a permis d'apporter une réponse satisfaisante à cette question. Durant l'activation de l'EMT, les cellules subissent des changements morphologiques avec réorganisation du cytosquelette, répression des protéines d'adhésion et perte des marqueurs épithéliaux aux profits des marqueurs mésenchymateux. La nécessité pour une cellule tumorale d'activer un programme d'EMT pour le développement de métastases est de plus en plus clairement évoqué [41] [169]. Il peine cependant à être clairement démontré, au moins en partie à cause des difficultés techniques à capter cet état transitoire. De plus, il pourrait ne concerner qu'une petite fraction de la population cellulaire tumorale, ce qui augmente encore la difficulté à le mettre clairement en évidence par des études concernant l'ensemble des fractions tumorales [37].



**Figure 5 : Principales étapes de la formation d'une métastase**

A partir de la tumeur primaire (a), seules quelques cellules présentent la capacité à passer la barrière des parois vasculaires ou lymphatiques (c) et devenir des cellules circulantes tumorales (CTC). Cette étape est permise par la conversion des cellules épithéliales vers un profil mésenchymateux (EMT : transition épithélio-mésenchymateuse). Aidées par les éléments figurés du sang (d) lors de leur transport, une petite minorité de ces cellules vont adhérer à l'endothélium vasculaire (f) et pénétrer un nouvel organe (e) selon un tropisme encore peu connu. Cette étape nécessiterait la reconversion des cellules vers un profil épithélial (MET : transition mésenchymo-épithéliale). Ces cellules formeront à terme une nouvelle tumeur proche de la tumeur primaire, une métastase.

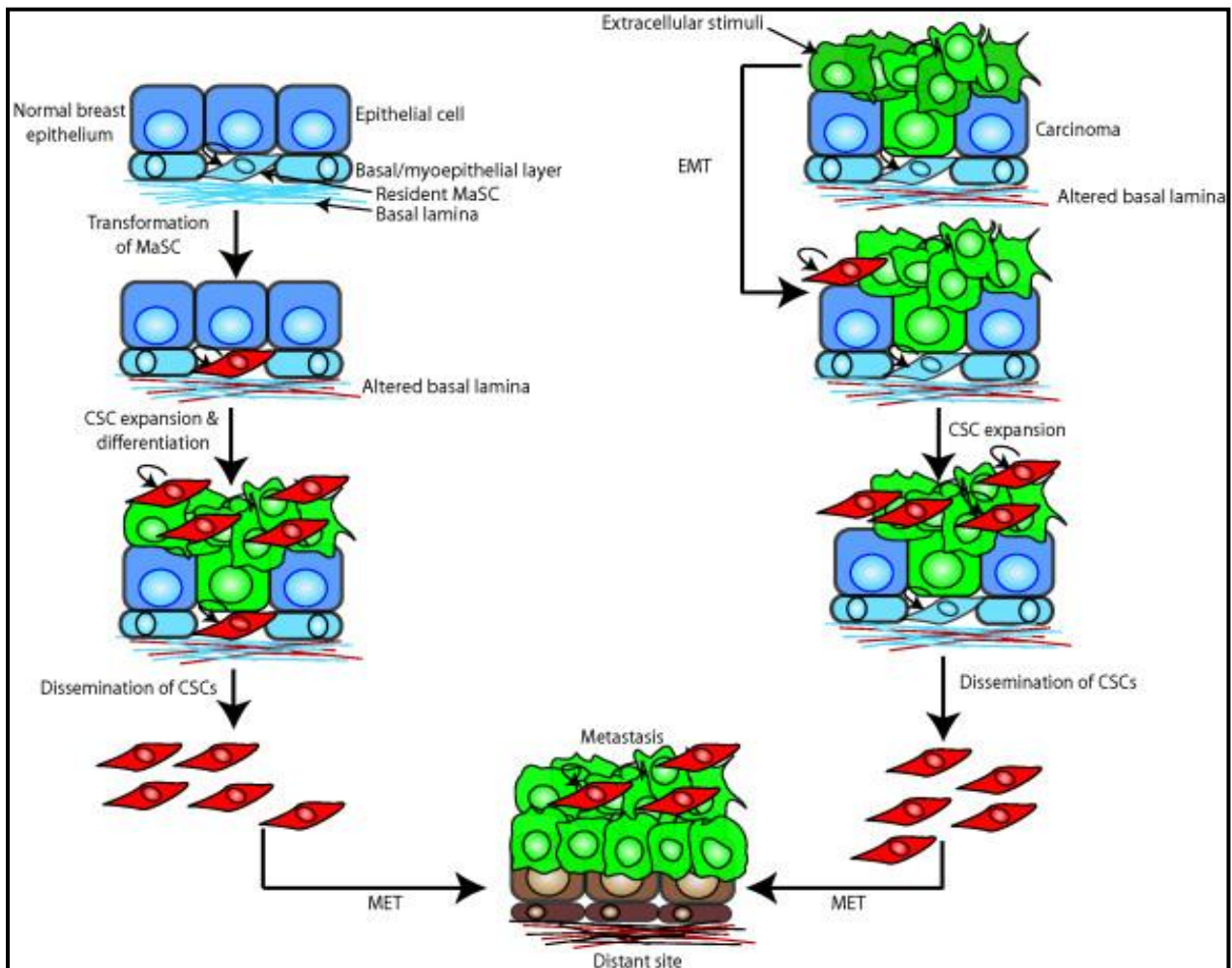
D'après l'Université de Liège, <http://reflexions.ulg.ac.be> [187]

#### 4.1.2 L'apport des cellules souches cancéreuses dans la compréhension de la maladie métastatique

Toutefois, ce modèle par lequel quelques cellules vont acquérir au cours du temps une somme de « mutations » leur permettant de franchir petit à petit les différentes étapes de la dissémination métastatique est mis à mal par un nouveau modèle émergent depuis une dizaine d'année, celui de l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC). Ce modèle est basé sur la connaissance et les caractéristiques des cellules souches adultes présentes de façon physiologique dans les tissus de l'organisme. Il s'est construit en premier lieu sur la connaissance des modèles leucémiques. Comme les cellules souches adultes, ces CSC sont définies par leur capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces CSC présenteraient

aussi des propriétés les rendant plus aptes à passer les « barrières » physiologiques lors de dissémination métastatique. En effet, elles semblent par exemple exprimer les marqueurs de l'EMT [113] reflet de leur capacité à migrer et circuler facilement dans l'organisme. Ces cellules tumorales deviendraient ainsi des CSC "induites" par le passage par la transition épithélio-mésenchymateuse [37] (**figure 6**).





**Figure 6 : Relation entre EMT et cellules souches cancéreuses dans la progression tumorale**

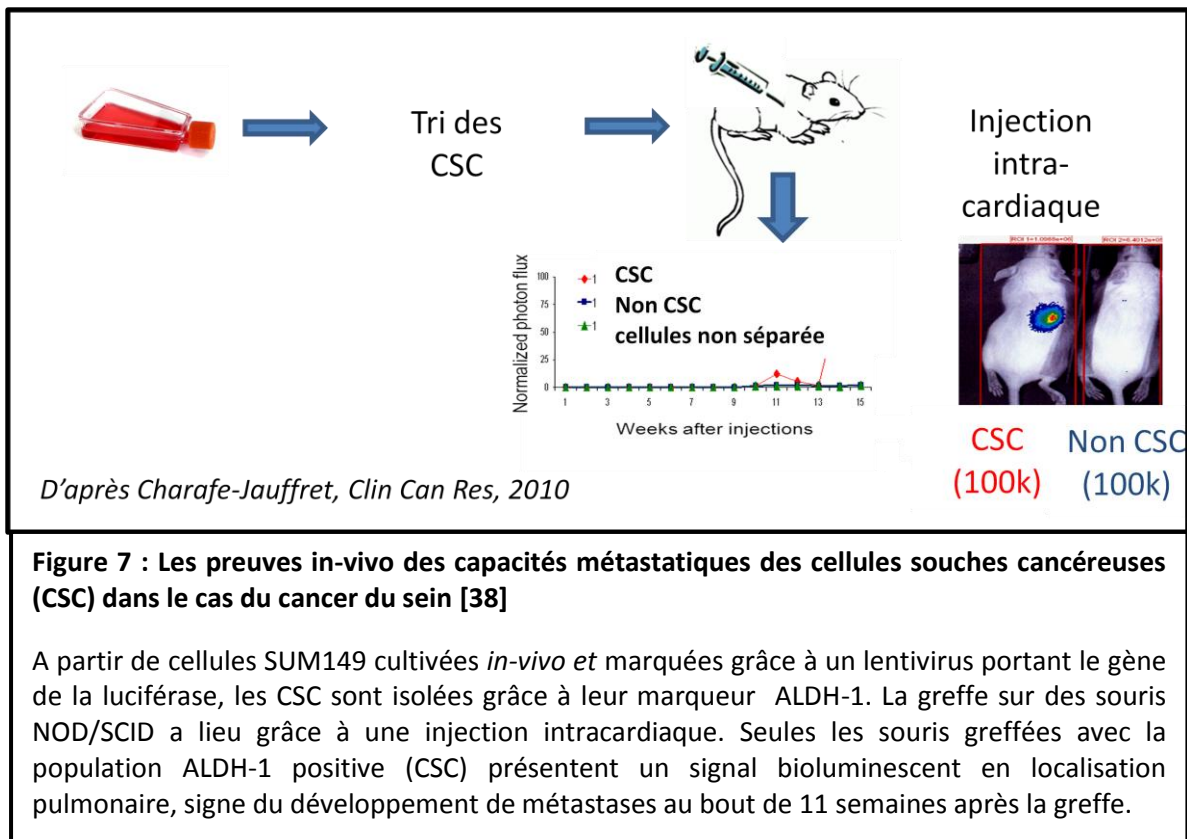
2 hypothèses peuvent être émises dans l'acquisition du caractère mésenchymateux des cellules tumorales et leur passage dans la circulation :

**A :** La cellule souche normale du tissu subit une altération génétique et se transforme en une cellule souche cancéreuse. Le caractère mésenchymateux est intrinsèque aux propriétés tumorales de la cellule souche cancéreuse (CSC). Cette cellule est déjà capable de donner à la fois la masse tumorale hétérogène ainsi que les cellules circulantes.

**B :** L'acquisition du caractère migratoire a lieu au cours du développement de la masse primaire lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). C'est l'acquisition de ce caractère et de l'auto-renouvellement qui permet la constitution d'un pool de CSC qui donnera les cellules circulantes. Dans les 2 cas, la colonisation de l'organe et la création d'une nouvelle masse nécessite le retour du caractère épithélial de certaines cellules lors de la MET (transition mésenchymal-épithéliale).

*D'après May et al., Breast Cancer Research, 2011 [115]*

De plus, elles semblent aussi présenter des capacités à initier des tumeurs ce qui les rend tout à fait apte à coloniser un nouvel organe pour former des métastases [38][93] (Figure 7).



#### 4.1.3 L'exemple de la maladie métastatique dans le cas du cancer du sein

Dans le cas du cancer du sein et de son développement métastatique, les métastases sont classiquement retrouvées dans les os et les poumons, moins fréquemment dans le foie, le cerveau et les glandes surrénales des patientes. L'impasse thérapeutique représentée par la phase du stade métastatique chez les patientes souffrant d'un cancer explique l'intérêt grandissant à pouvoir cibler précocement ces populations de patientes à risque métastatique. Dans le but de répondre à cette attente, depuis 10 ans, on assiste à l'apparition des premiers phénotypes et signatures génomiques prédictives de l'évolution métastatique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. En 2002 est publiée la première signature génomique « mauvais pronostic » pour les patientes atteintes de cancer du sein [170] [172]. Cette signature est fortement corrélée au développement de métastases à distance chez ses patientes.

La prédiction des sites de métastases chez les patientes revêtirait aussi un intérêt capital puisqu'ils diffèrent en termes d'évolution, de traitement, de morbidité et de mortalité [161]. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'adressage d'éléments tumoraux dans certaines localisations des signatures moléculaires spécifiques de certaines localisations métastatiques ont également été mises en évidence ces dernières années. Ces travaux ont largement utilisé des modèles de xénogreffes. Dans le cancer du sein, l'équipe de J. Massagué a proposé une signature des cellules métastatiques osseuses [119], puis des cellules métastatiques pulmonaires [118] ou encore cérébrales [20] à partir d'une lignée cellulaire, MDA-MB-231, implantée à des souris BALB/c nudes. Ces signatures, validées fonctionnellement dans les xénogreffes, permettent de donner des pistes pour mieux comprendre les mécanismes de « homing » de ces métastases, et envisager de nouvelles pistes thérapeutiques.

La compréhension du processus métastatique présente donc encore beaucoup de « zones d'ombre » qui pourraient être en partie comblées par l'existence de modèles animaux permettant d'approcher les situations cliniques. Toutefois, comme vu précédemment, de nombreuses « barrières » sont encore à franchir pour obtenir un modèle animal fiable pouvant reproduire la complexité de la situation clinique et ceci quelque soit le choix du modèle animal employé (GEM, lignée cellulaire ou xénogreffe de tumeurs primaires).

Le modèle proposé a pour but d'essayer de conserver au mieux les caractéristiques phénotypiques et transcriptomiques des tumeurs primaires des patientes afin de garder toute l'hétérogénéité de la population tumorale d'origine afin. Cette population pourrait alors être étudiée de façon approfondie par la suite.

## **4.2 Matériel et méthode**

### **4.2.1 Animaux d'expérimentation et choix des xénogreffes**

Les animaux utilisés sont des souris femelles âgées de 21 à 35 jours de type NOD/SCID (Non Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficient) ou NOG (NOD/Shi-*scid*/IL-2R $\gamma^{\text{null}}$ ). Les souris sont maintenues dans un environnement indemne de pathogènes : tout le matériel ainsi que l'eau sont stérilisés à l'autoclave, la nourriture est stérilisée par irradiation. Les conditions d'élevage sont contrôlées (20-24°C, 40-70% d'humidité) avec un cycle nyctéméral de 12h d'éclairage par jour.

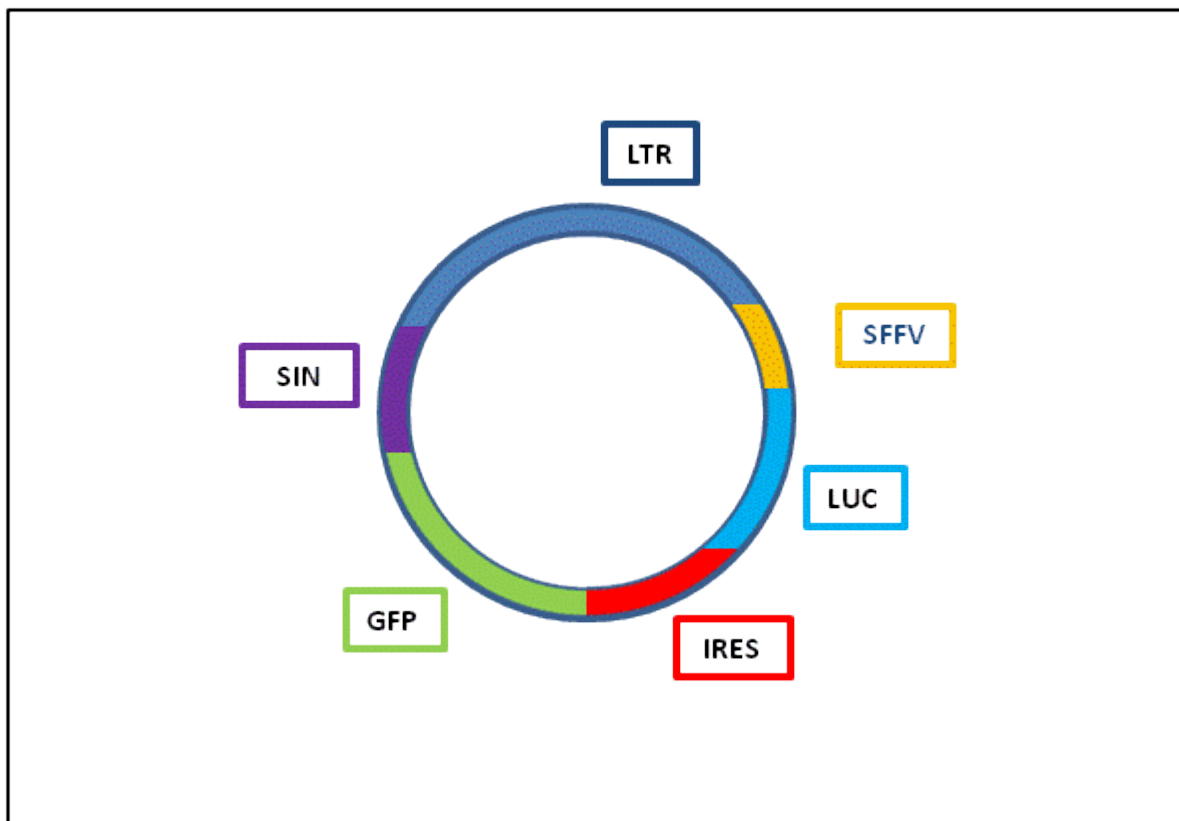
Nous avons choisi d'analyser des xénogreffes qui couvraient au maximum l'ensemble des différents sous-types moléculaires retrouvés dans les cancers du sein. 13 xénogreffes ont été sélectionnées : 5 de sous-type luminal B, 6 de sous-type Basal, et 2 de sous-type HER2.

### **4.2.2 Dissociation de la tumeur**

La tumeur prélevée sur souris est maintenue dans du milieu RPMI jusqu'à sa prise en charge à 4°C. La dissociation a lieu en 2 étapes : une dissociation mécanique au scalpel, puis une dissociation enzymatique avec l'ajout de 5 à 15 ml de collagénase-hyaluronidase diluées à 1/20 dans du milieu 199 (Gibco®). L'ensemble est laissé à 37°C pendant 30 minutes sous agitation. Le mélange cellulaire dans son milieu de dissociation est ensuite filtré 2 fois avec des filtres en nylon de 40  $\mu\text{m}$  (BD Falcon® puis Biogenetics®) avec ajout au 1/2 de HBSS (Gibco®) additionné de 5% de sérum bovin. Les cellules vivantes sont comptées par comptage manuel à l'aide de cellule de Malassez après ajout de bleu trypan 0.4% dilué au 1/2 (Sigma®).

### **4.2.3 Infection virale**

Le vecteur utilisé est un lentivirus contenant le gène de la luciférase et le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) séparés par une séquence initiatrice de la traduction (IRES). Le promoteur utilisé (SFFV = Spleen-Focus-Forming-Virus) est commun aux 2 gènes (**Figure 8**).



**Figure 8 : construction du vecteur Luc-GFP**

Le gène de la GFP sert de gène rapporteur de la présence du gène de la luciférase. Le promoteur SFFV régit l'expression des gènes GFP et Luciférase. La séquence IRES est un facteur d'initiation de la traduction. La séquence LTR joue un rôle dans l'insertion de la séquence virale dans la cellule hôte. La séquence SIN est une séquence protectrice des séquences LTR.

LTR : Long Terminal Repeat ; SFFV : Spleen-Focus-Forming-Virus ; LUC : luciférase ; IRES : Internal Ribosome Entry Site, GFP : Green Fluorescent Protein ; SIN : Self-INactivating

L'infection est réalisée sur des cellules en suspension de la façon suivante 3 millions de cellules tumorales sont remises en suspension dans 5 ml de milieu de culture : DMEM/F-12 + GlutaMAX (Gibco®) associé à 5% de sérum équin, 1 % d'acides aminés non essentiels (MEM NEAA 100x, Gibco®), de l'insuline (Actrapid®) à 2mg/ml, de l'EGF à 10 µg/ml, de la cholera toxine à 100 µg/ml et de la Gentamycine (Gibco®) à 50 mg/ml. Puis il est ajouté 15 µl du Lentivirus et 5 µl de polybrène à 10mg/ml (Merck Millipore®). L'ensemble est incubé toute la nuit à 37°C, et dans une centrifugeuse à 500 rpm (« Spinoculation »). Le lendemain, le culot cellulaire est repris avec 5 ml de HBSS (Gibco®) additionné de 10% de sérum foetal de bovin puis préparé avec le matrigel et le sérum foetal bovin pour la réinjection.

#### **4.2.4 Quantification et tri des cellules humaines tumorales GFP positives**

L'efficacité de l'infection est appréciée par une technique cytométrique permettant de vérifier la présence ou l'absence du gène rapporteur de la Luciférase, la GFP. Lorsque la masse tumorale approche les 10 mm, la tumeur est retirée (excisée), puis dissociée. Après comptage à la cellule de Malassez, les cellules sont concentrées à 4 millions de cellules par ml dans du HBSS (Gibco®) additionné de 10% de sérum fœtal bovin et marquées avec un anticorps anti-H2Kd couplé à l'APC (allophycocyanine) (ebioscience®) à la concentration de 1/100<sup>ième</sup> pendant 20 minutes dans de la glace. Les cellules sont récupérées après centrifugation, et remises en suspension dans 3 ml d'un tampon de lyse des globules rouges (ACK lysing Buffer Invitrogen®), et mélangées doucement pendant environ 30 à 60 secondes. Après centrifugation et retrait du surnageant, les cellules sont concentrées à 10 millions de cellule par ml dans du HBSS (Gibco®) additionné de 10% de sérum fœtal bovin et de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) à la concentration de 1/5000<sup>ième</sup>. Le tube est trié par technique cytométrique à l'aide de l'appareil BDFACS Aria III (BD Biosciences®). Lorsque le pourcentage en cellules épithéliales humaines GFP positives est inférieur à 90%, le tube est entièrement trié pour récupérer la population positive. Sinon la suspension cellulaire est directement conditionnée dans le matrigel pour être réinjectée.

#### **4.2.5 Greffe des cellules tumorales**

Juste avant la chirurgie, les cellules prélevées sont resuspendues de 15 000 jusqu'à 1 millions dans 110 µl de BD Matrigel Basement Membrane matrix (BD Biosciences) associé à du sérum fœtal bovin au ½. La suspension cellulaire est injectée de façon unilatérale dans le coussinet graisseux droit de la 4<sup>ème</sup> paire de glande mammaire.

Pour limiter la douleur pendant et après la chirurgie, 20 minutes avant l'intervention du Métacam® (méloxicam administré à 0.5 mg/kg) est injecté en sous-cutanée. L'anesthésie des souris associe du Rompun® (xylazine à 10mg/kg) à de l'Imalgene® (kétamine à 100mg/kg) en injection IP (intrapéritonéale). Après tonte de la zone chirurgicale, une incision de la peau de l'appendice xiphoïde jusqu'à la région ombilicale puis de la région ombilicale jusqu'à la région de l'articulation fémoro-tibiale est réalisée. La peau est décollée de la paroi abdominale par dilacération à la pince du tissu sous-cutané, puis le volet cutané est récliné sur le côté et fixée avec une aiguille laissant apparaître la 4<sup>ème</sup> glande mammaire. La suspension

cellulaire est alors injectée dans le coussinet graisseux après introduction d'une aiguille 26G par le bord ventral de la glande mammaire 4 (*cf technique présentée en **figure 4***). Le volet cutané est alors refermé à l'aide d'un point unique avec du fil résorbable (Mersuture® Polyester décimale 2) dans la région ombilicale et d'agrafes chirurgicales.

Pour soutenir la pousse tumorale, un implant de 17  $\beta$ -oestradiol (0.72mg) est introduit après incision de la peau en position sous-cutanée dans la région inter-scapulaire. La peau est refermée à l'aide d'un point unique au fil résorbable (Mersuture® polyester décimale 2) et de 2 agrafes chirurgicales.

Les souris sont suivies toutes les semaines pour suivre la formation de la tumeur et la taille est mesurée avec un pied à coulisse. Afin de mieux suivre le développement métastatique, les tumeurs sont retirées lorsque le diamètre approche les 10 millimètres. S'il est observé des signes de souffrance, ou une perte de poids importante, l'animal est sacrifié et la tumeur est réimplantée.

#### **4.2.6 Exérèse de la tumeur**

Pour limiter efficacement la douleur lors de ce type d'intervention et potentialiser l'anesthésie, du Buprecare® (buprénorphine à 10 $\mu$ g/kg) en injection sous cutanée est administré 20 minutes avant l'intervention. Les souris sont ensuite anesthésiées à l'aide du même mélange Rompun® (xylazine à 10mg/kg) et Imalgene® (kétamine à 100mg/kg) injecté en IP.

Après tonte de la zone chirurgicale, l'incision de la peau est réalisée parallèle à la cicatrice de greffe le long du bord opposé à la masse. Après dilacération à la pince et aux ciseaux des adhérences fibreuses formées lors de la précédente intervention, le volet cutané est récliné sur le côté et fixé avec une aiguille. La tumeur, encore adhérente au volet cutané est libérée délicatement du tissu conjonctif sous-cutané par dilacération au ciseau à partir du bord latéral de la tumeur jusqu'à isoler visuellement les vaisseaux principaux irriguant la tumeur. L'hémostase de ces vaisseaux principaux (provenant des vaisseaux de la glande mammaire 3 et de l'artère fémorale) est réalisée à l'aide d'une pince chauffée. Le reste du tissu conjonctif rattachant la tumeur au volet cutané est coupé et la tumeur enfin détachée peut être retirée. Le résidu dorsal non tumoral de la glande mammaire 4 est alors visible et peut

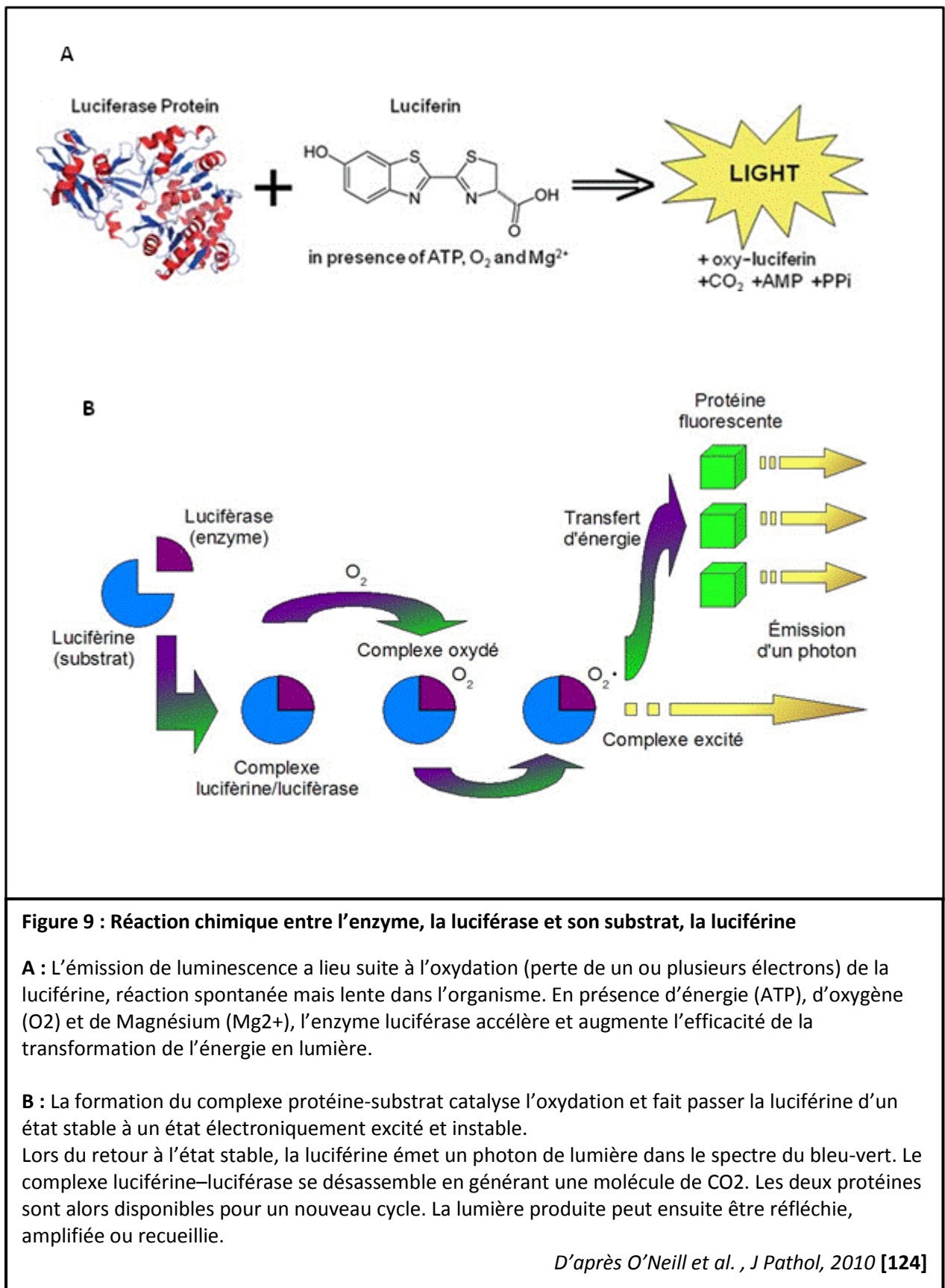
être excisé. Ainsi la glande mammaire 4 est totalement retirée. Dans le cas d'adhérence de la tumeur à la paroi abdominale ou d'infiltration de la paroi abdominale, l'exérèse de la masse s'accompagne de l'exérèse de la partie du péritoine atteint. Le péritoine est refermé grâce à un surjet simple à l'aide de fil résorbable (Polysyn® Polyglycol décimale 2). Le volet cutané est alors refermé comme pour la greffe à l'aide d'un point unique de fil résorbable dans la région ombilicale et d'agrafes chirurgicales.

En suivi post-opératoire les souris reçoivent une injection de Buprecare® (buprénorphine administrée à 10µg/kg) 12 heures après l'intervention en injection sous-cutanée. Puis une injection de Métacam® (méloxicam administré à 0.5 mg/kg) en sous-cutané 36 heures après l'intervention.

#### **4.2.7 Suivi métastatique par bioluminescence**

La technique utilisée pour le suivi métastatique est une technique d'imagerie par bioluminescence. Cette technique d'imagerie non invasive est basée sur la détection d'une lumière produite par des cellules exprimant le gène de la luciférase. Ce gène code pour une enzyme oxydant la D-Luciferine ou coelenterazine en présence d'ATP (adenosine triphosphate) et d'oxygène en oxy-luciferine, état excité de la molécule (**figure 9**). La lumière émise lors du retour de l'état excité à l'état stable de l'oxy-luciférine se visualise dans le spectre jaune-vert ou jaune-orange de la lumière visible. Cette enzyme peut aussi être utilisée *in vivo* comme marqueur reporteur de l'expression d'un gène et l'émission de photons est proportionnelle à la masse de cellules marquées [144]. Cette technique présente une multitude d'application dans l'étude des cancers, elle permet notamment de détecter les masses tumorales non palpables ou de petite taille. Depuis quelques années, l'intérêt porté à cette technique pour l'étude du développement métastatique va grandissant puisqu'elle permet de réaliser un suivi régulier de l'avancée de la maladie sans examen invasif, tout en laissant l'animal en vie.





Le suivi métastatique est réalisé toutes les semaines après l'exérèse de la tumeur. Les souris reçoivent 5 minutes avant le passage au bioluminomètre 100µl de Luciférine en injection intrapéritonéale. Pour l'acquisition des images, les souris sont anesthésiées grâce à un dispositif d'anesthésie volatile (TEM SEGA®) à un débit de 1 l O<sub>2</sub>/min et 2,5 à 3,5 % (volume/volume) d'isoflurane. Le Photon imageur Biospace Lab® est utilisé pour la détection de la luminescence. Le logiciel Photo-acquisition Biospace Lab® est utilisé pour la transformation et la visualisation du signal. Le logiciel M3 Vision Biospace Lab® pour le traitement des données.

## 4.3 Résultats

### 4.3.1 Mise en place du protocole de xénogreffes pour l'étude de la formation des métastases

Le protocole de suivi des métastases a nécessité de nombreuses adaptations techniques pour aboutir à un résultat final présenté en **figure 10**. Ce protocole mis en place s'appuie sur un modèle orthotopique de xénogreffe de tumeur primaire de patiente atteinte de cancer du sein. Toutes les étapes sont étudiées pour limiter au maximum le temps de culture *in vitro* afin d'éviter les différents biais potentiellement générés cette étape comme l'immortalisation ou l'acquisition de caractéristiques de lignée cellulaire. Le but est de rester le plus proche possible des caractéristiques génotypiques et phénotypiques de la tumeur primaire de la patiente. La biopsie de la tumeur primaire mammaire de la patiente est donc directement dissociée (mélange collagénase/hyaluronidase), resuspendue dans un mélange de matrigel et de sérum bovin puis réimplantée dans une souris NOG pour optimiser les chances de prise de greffe. Ceci est réalisé sans mise en culture de l'échantillon. La primo-infection se fait sur une période courte et sur des éléments cellulaires pour lesquels on évite au maximum la culture cellulaire pour les raisons pré-citées. L'étude porte donc sur des cellules infectées alors qu'elles sont en suspension. Cette phase d'infection est limitée à une nuit avant réinjection dans la souris pour limiter au maximum le temps passé *in vitro*.

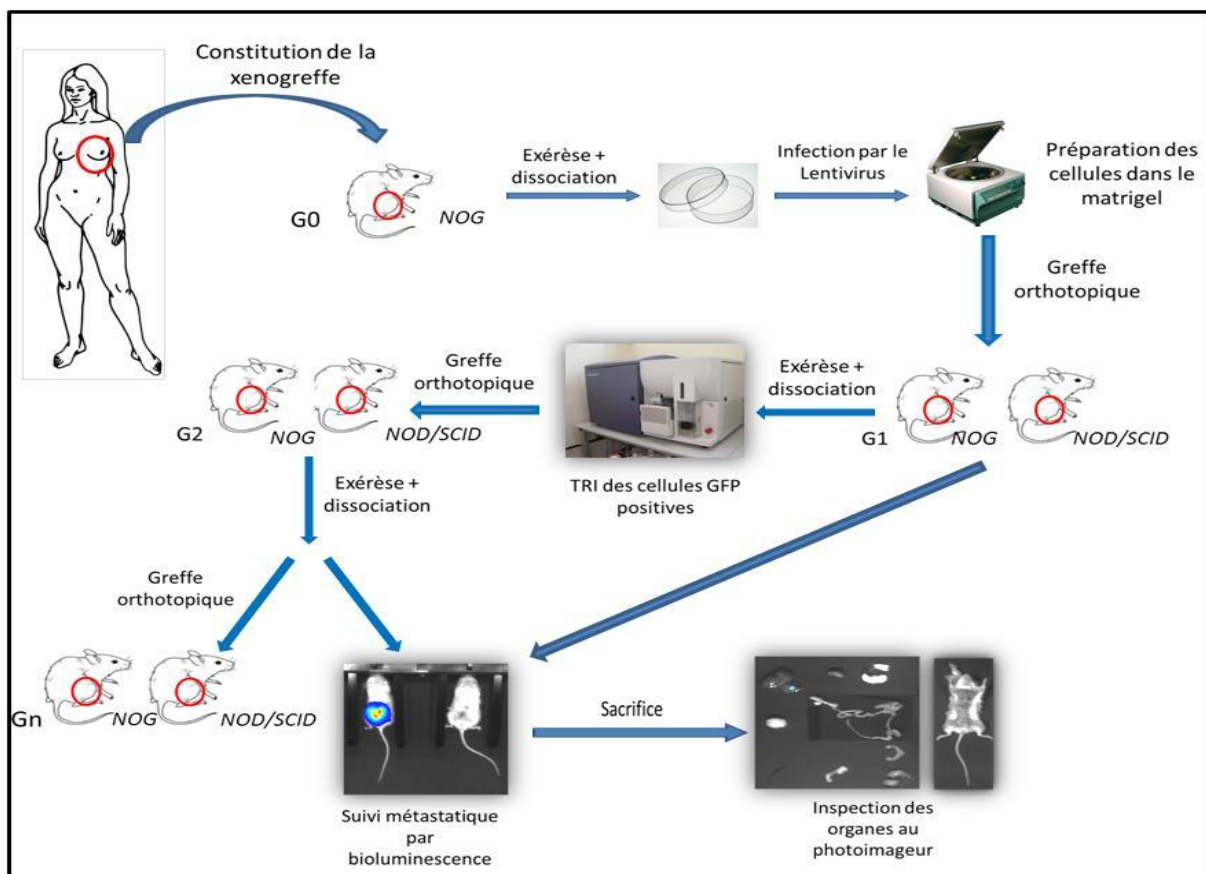
Le site de la greffe est dans la 4<sup>ème</sup> paire de glande mammaire (la plus accessible), côté droit (par convention).

L'exérèse de la tumeur primaire a lieu dans tous les cas avant que la masse n'ait atteint 10 mm de diamètre (limite éthiquement acceptable). Elle peut être pratiquée avant cette limite si l'état général de l'animal l'exige. La prise en charge des animaux pendant l'opération et pendant la phase de réveil nécessite aussi une adaptation à l'état de santé de l'animal.

L'infection par le lentivirus a lieu entre ce que l'on définit comme la génération G0 (état non infecté) et G1 (état primo-infecté). Cette génération G1 est une phase d'expansion des éléments primo-infectés et réinjectés sans tri préalable. La vérification du taux d'infection par le lentivirus est effectuée sur les tumeurs collectées à la suite du G1, et après chaque passage pour vérifier la stabilité du vecteur. Elle est évaluée sur la proportion de cellules

exprimant la GFP. Un tri des cellules tumorales infectées est réalisé par cytométrie (BD FACS Aria III®) sur l'expression de la GFP avant chaque nouveau passage dans la souris. Le tri est jugé non nécessaire si le pourcentage de cellules tumorales GFP+ dans la population humaine est évalué à plus de 90%. Les cellules triées sont resuspendues dans un mélange de matrigel et de sérum bovin pour la réinjection dans l'animal. A la suite de la phase d'expansion G1, au moins 2 souris (NOG et NOD/SCID) sont greffées.

Le suivi du développement métastatique a lieu sur toutes les souris dès une semaine post-exérèse par le photonimageur BiospaceLab®. Les souris retenues pour l'étude du suivi des métastases sont celles jugées comme présentant un pourcentage d'infection satisfaisant pour notre étude ( cf **figure 12**).



**Figure 10 : Protocole d'infection et de suivi métastatique**

Après dissociation de la biopsie de la masse primaire de la patiente, les cellules tumorales sont implantées dans une souris de souche NOG.

Les tumeurs sont prélevées autour de 10 mm de diamètre.

Entre G0 et G1 : la masse est prélevée l'après-midi, dissociée et les cellules tumorales sont infectées par spinoculation par le lentivirus Luc-GFP. Les cellules sont réinjectées le lendemain.

Après G1, pour chaque génération les cellules sont réinjectées dans une souris de souche NOG et une souris de souche NOD/SCID.

A partir de G1, le niveau d'infection dans la population humaine est contrôlé par le FACSriaIII® et les cellules sont triées si l'infection est inférieure à 90% de cellules humaines GFP-positives.

A partir de G1, les souris sont conservées pour le suivi métastatique par bioluminométrie. Il est réalisé chaque semaine à l'aide du photoimager Biospace®.

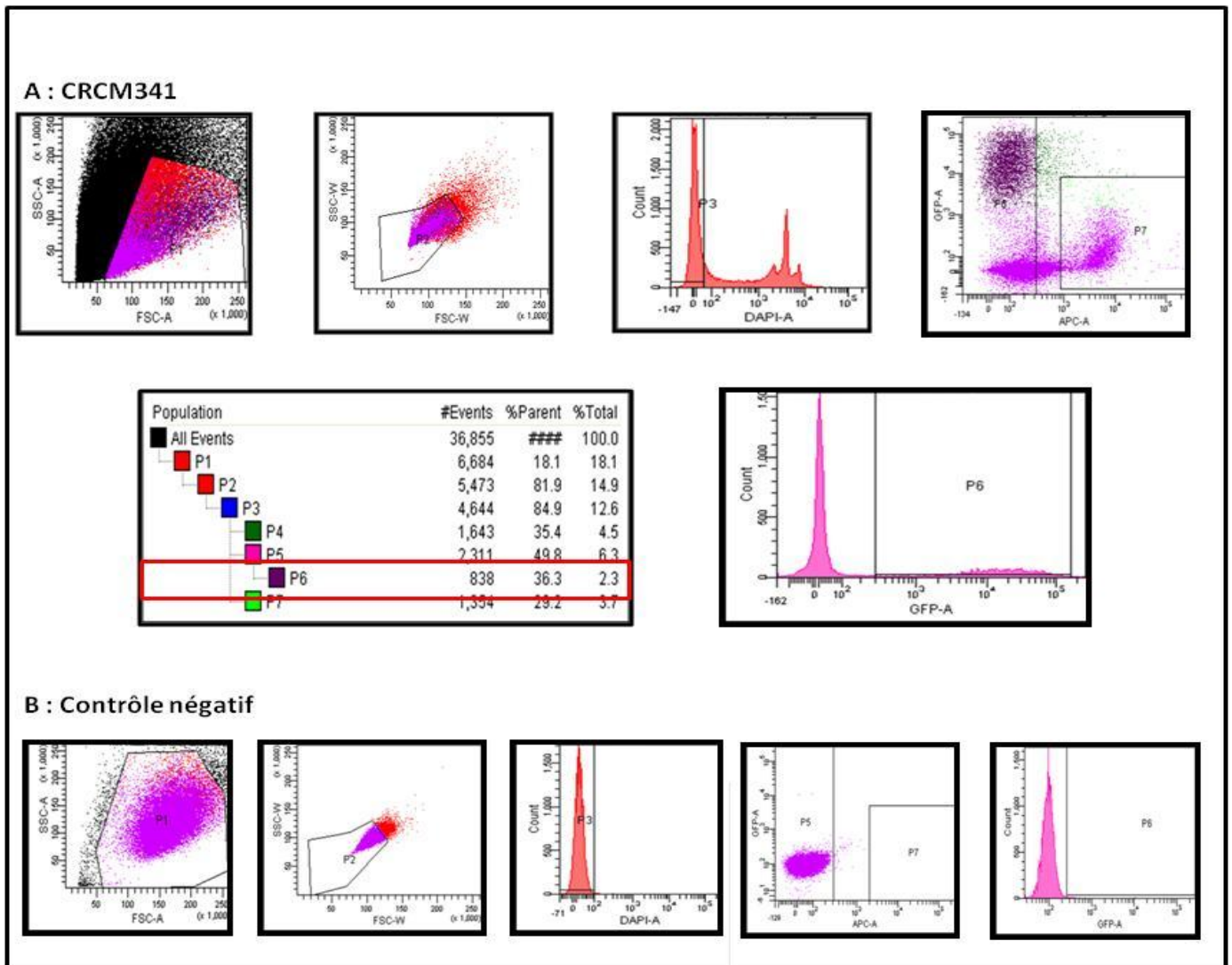
L'inspection des organes au bioluminomètre a lieu après sacrifice de la souris lorsque l'état de l'animal est jugé insuffisant (perte de poids importante, souffrance...).

### 4.3.2 Contrôle de la stabilité du vecteur

La stabilité du signal GFP et luciférase de notre vecteur bi-cistronique ayant déjà été documentée *in vitro* sur de nombreuses lignées cellulaires, il a fallu tout d'abord vérifier la stabilité du signal *in vivo*.

La première étape consiste à étudier l'efficacité du vecteur lentiviral LUC-GFP pour l'infection de cellules issues de xéno greffes et sa stabilité dans le temps. Pour un suivi sur plusieurs semaines à plusieurs mois, comme c'est le cas pour notre modèle de suivi des métastases, l'expression du gène de la luciférase et de la GFP ne doit pas s'éteindre ou se perdre au cours du temps et des passages successifs des xéno greffes.

Afin de quantifier ce signal précisément en le rapportant au nombre de cellules présentes, je me suis intéressée aux tumeurs orthotopiques G1 réséquées pour permettre le suivi du développement métastatique. Les tumeurs générées à partir de cellules infectées par le lentivirus LUC-GFP sont prélevées autour de 10 mm de diamètre et sont systématiquement soumises à un contrôle du signal GFP par cytométrie de flux. Les cellules considérées comme infectées sont les éléments de grande taille, DAPI négatifs, H2kd négatifs et GFP positives. Le marquage au DAPI nous permet d'éliminer les cellules mortes et le marquage à l'H2kd, les cellules murines de la masse tumorale (**figure 11A**). Un contrôle négatif pour la GFP est réalisé à l'aide d'une lignée cellulaire dérivée de CRCM389X non transfectée par le lentivirus LUC-GFP (**figure 11B**). Ce contrôle permet d'évaluer l'auto-fluorescence des cellules tumorales et de définir la population de cellules effectivement GFP-positives (population P6). Seules les cellules GFP-positives sont re-injectées dans l'animal au cours des différents passages.



**Figure 11 : Contrôle du pourcentage d'infection des cellules tumorales**

**A : Exemple de résultats cytométriques pour la xéngreffe CRCM341X, obtenus grâce à BD FACSriaIII® à l'issu du 2<sup>ème</sup> passage dans la souris :**

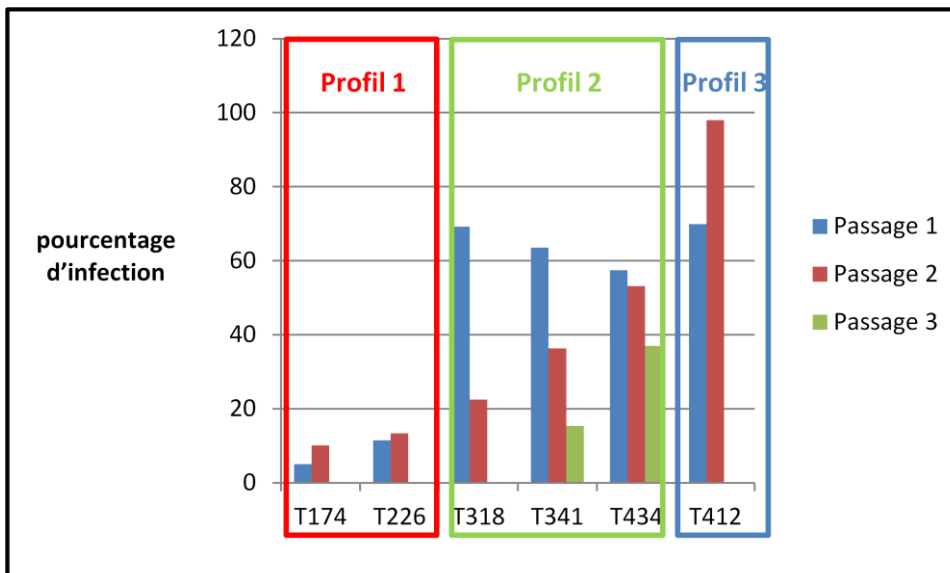
Après exérèse, dissociation mécanique puis chimique de la masse tumorale, les cellules sont marquées puis séparées par cytométrie. La taille permet de séparer les cellules (Population P1 et P2) des débris cellulaires. Le marquage au DAPI sépare les cellules vivantes (population P3) des cellules mortes. Le marquage avec l'anticorps Anti-H2kd couplé à l'APC permet de séparer les cellules murines (population P7) des cellules humaines (population P5). La population P6 correspond aux cellules tumorales GFP-positives dans la population humaine.

**B : Contrôle négatif GFP :**

Les cellules utilisées proviennent d'une lignée cellulaire dérivée de CRCM389X non infectée par le lentivirus Luc-GFP et non marquée par l'anticorps anti-H2Kd-APC. La fenêtre de la population P6 obtenue est celle utilisée pour l'ensemble des xéngreffes triées et correspond aux cellules catégorisées ensuite comme GFP-positives.

Le taux d'infection évalué dans ces conditions est xéno-dépendant. Certaines des xéno greffes présentent des taux supérieurs à 60-70%, 1 mois après l'infection par le lentivirus (CRCM318X, CRCM341X, CRCM412X, et CRCM434X), et d'autres xéno greffes présentent des taux inférieurs à 10% et sont considérées comme réfractaires à l'infection, (CRCM174X, CRCM226X) (**figure 12**). Pour 3 xéno greffes (CRCM318X, CRCM341X et CRCM434X), le taux d'infection diminue rapidement au cours des passages successifs des xéno greffes malgré l'injection de cellules strictement GFP-positives.

Seule pour la xéno greffe CRCM412X, le tri semble présenter un effet bénéfique en permettant de purifier la population de cellules GFP-positives, signe de stabilité du signal GFP lors des différents passages dans la souris.



**Figure 12 : Pourcentage des cellules infectées en fonction des passages pour les xéno greffes CRCM174X, CRCM318X, CRCM341X, et CRCM389X**

Le pourcentage d'infection correspond au rapport du nombre de cellules GFP-positives (population P6) à l'issue du tri sur le nombre de cellules humaines (population P5).

3 comportements sont distingués : profil 1 correspondant aux xéno greffes peu permises à l'infection ; profil 2 correspondant aux xéno greffes fortement permises à la primo-infection mais perdant rapidement l'expression de la GFP ; profil 3 correspondant aux xéno greffes fortement permises et stables pour l'expression de la GFP.



La stabilité du virus dans les cellules tumorales semble donc fortement xéno-dépendante. Afin d'être assuré de pouvoir isoler la totalité des foyers métastatiques, et étant donné la stabilité hétérogène de l'infection, seuls certains modèles de xénogreffes sont inclus dans l'étude :

On distingue trois types de xénogreffes:

- **Profil 1** : Les xénogreffes faiblement permissives à l'infection virale (CRCM174X, CRCM226X). Elles ne permettront pas le suivi métastatique de façon satisfaisante et sont donc exclues de l'étude.
- **Profil 2** : Les xénogreffes fortement permissives à la primo-infection mais dont le taux de cellules GFP-positives chute rapidement au cours des passages (« instables ») (CRCM318X, CRCM341X, CRCM434X). Seules les tumeurs générées à partir de cellules primo-infectées sont incluses dans l'étude.
- **Profil 3** : Les xénogreffes fortement permissives à la primo-infection et stables au cours des passages (CRCM412X). Elles sont prises en compte quel que soit le passage.

### 4.3.3 Inspection des organes et bilan d'extension

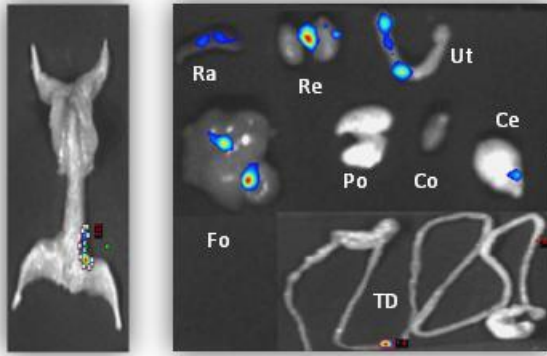
A partir de la 1<sup>ère</sup> semaine post-exérèse, le suivi métastatique est réalisé chaque semaine après injection de luciférine (100µL) par voie intrapéritonéale 5 minutes avant le passage au bioluminomètre Photonimager BiospaceLab®.

Dans la quasi-totalité des modèles de xénogreffe (6/6), on assiste au bout de 20 jours à l'apparition progressive d'un signal luminescent dans la région anatomique qui hébergeait la tumeur primaire. Ce signal correspond à une récurrence locale qui pourrait être due à des exérèses incomplètes, ou à une récurrence locale sur des résidus microscopiques. Compte-tenu du mode de capture de la luminescence par le photonimageur, la présence d'un signal luminescent nettement plus important que les autres focalise la capture du signal sur le signal le plus fort. Ainsi la présence de métastases de petites tailles comparées à la récurrence locale ne peut être mise en évidence sur animal entier. La cartographie précise des localisations métastatiques nécessite donc le sacrifice de l'animal et l'analyse des organes après dissection.

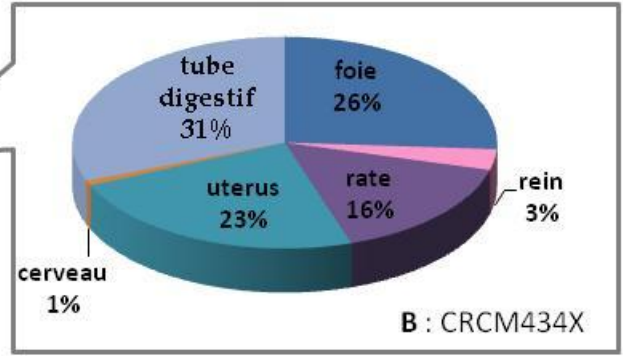
Les animaux sont sacrifiés quand la dégradation de l'état général le nécessite (perte importante de poids, signes évidents de souffrance animale, gêne à la mobilité...).

Sur la durée de mon stage au laboratoire, 4 xénogreffes sont arrivées au stade d'étude du processus métastatique car elles présentaient un taux d'infection correct (« caractère d'inclusion » des cas 2 et 3 définis précédemment) et des souris en état d'être sacrifiées. Sur ces souris où les autopsies ont pu être réalisées, les récurrences locales s'avèrent être des masses infiltrant la paroi abdominale en regard de la 4<sup>ème</sup> paire de glande mammaire, pouvant être considéré comme un signe d'extension locale de la masse primaire.

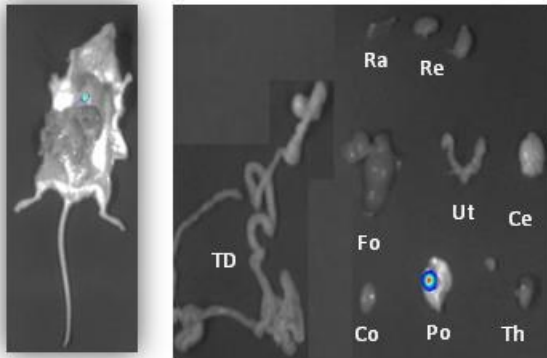
Sur ces 4 xénogreffes, 2 profils peuvent être distingués : les profils « mono-métastatiques » (CRCM389X) et « pluri-métastatiques » (CRCM434X, CRCM318X et CRCM341X) (**figure 13**). Le profil mono-métastatique est défini comme la capacité de la xénogreffe à métastaser uniquement à un seul type d'organe. Concernant le profil CRCM389X, malgré un temps de suivi post exérèse de plus de 2 mois, de nombreux animaux injectés (6 souris) et une « récurrence » locale nécessitant l'euthanasie de l'animal, ce profil montre à la dissection qu'une localisation métastatique unique (les poumons) avec une absence totale de signal sur les autres organes ainsi que sur l'ensemble de la carcasse. Pour les profils « pluri-métastatiques » CRCM318X et CRCM341X, au moins 2 souris pour chaque modèle ont été étudiées ce qui n'est pas le cas pour CRCM434X où seulement une souris a pu être étudiée. La cartographie des organes métastatiques est différente dans ces modèles. Si dans les 3 modèles métastatiques, le tube digestif et l'utérus sont touchés, les autres localisations diffèrent avec dans la cavité abdominale une atteinte du foie dans le cas de CRCM341X et CRCM434X, et l'atteinte du pancréas, des reins et des glandes surrénales dans le cas de CRCM318X. Dans les localisations extra-abdominales, la répartition est aussi différente entre les 3 modèles avec la présence de métastases cérébrales (et osseuses) pour la xénogreffe CRCM341X et CRCM434X et de métastases pulmonaires et ganglionnaires pour CRCM318X. Pour les souris duplicate (NOD/NOG), on retrouve une cartographie semblable avec notamment pour CRCM341X la localisation cérébrale confirmée sur toutes les souris mais pas la localisation osseuse (**figure 14**). De même, pour la xénogreffe CRCM318X, les localisations métastatiques sont strictement identiques pour les souris NOD/SCID et NOG de la même génération G1 (résultats non présentés).



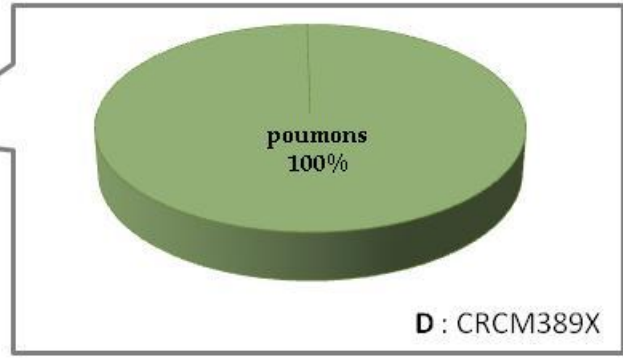
A : CRCM434X



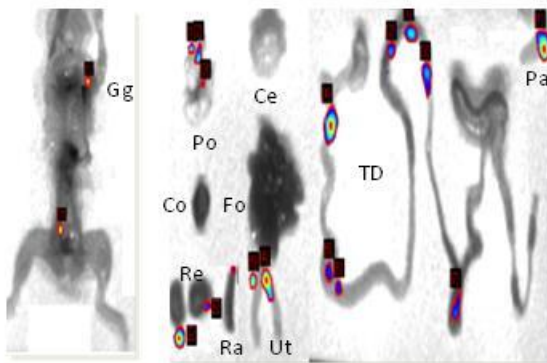
B : CRCM434X



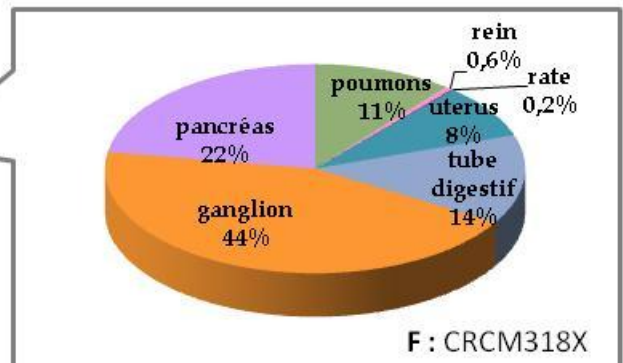
C : CRCM389X



D : CRCM389X



E : CRCM318X



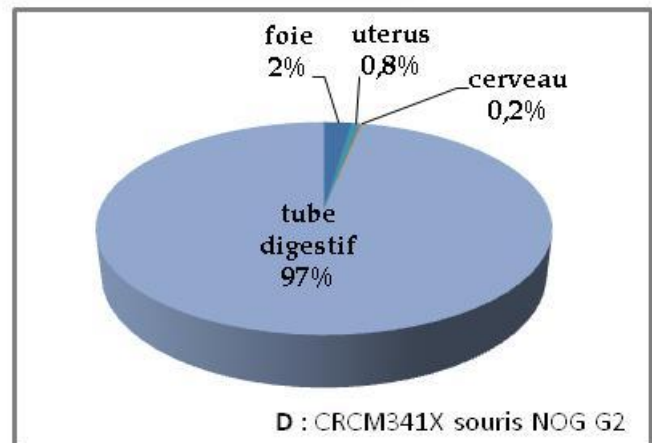
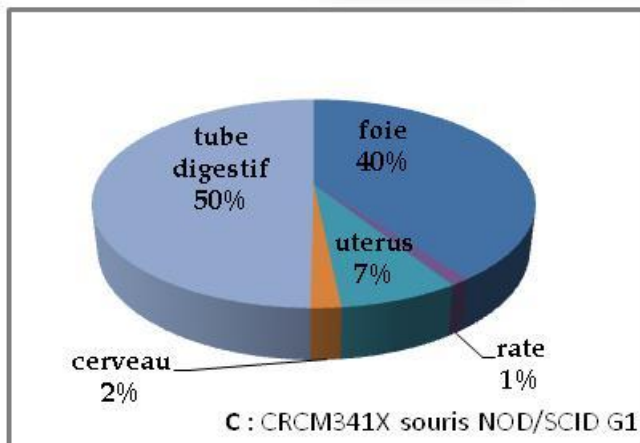
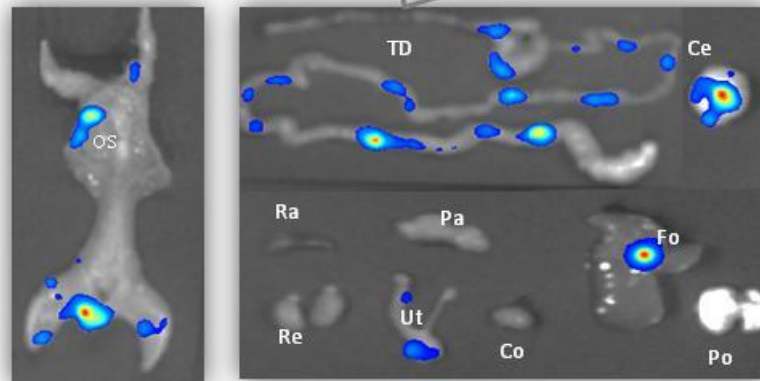
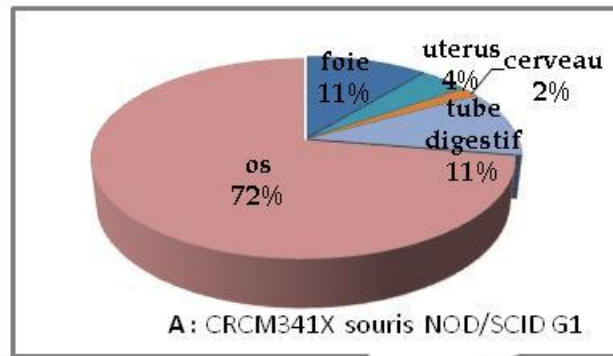
F : CRCM318X

**Figure 13 : suivi du développement métastatique des xénogreffes CRCM434X, CRCM389X, et CRCM318X**

**A, B, C** : visualisation du signal bioluminesométrique des différents organes des souris NOD/SCID greffées par les xénogreffes CRCM434X, CRCM389X et CRCM318X puis traitées par exérèse 10 à 20 jours post-greffe. Le signal est obtenu avec le bio-imageur Biospace®, 5 minutes après injection de 100µl de luciférine par souris et après dissection des souris et isolement des différents organes.

Ce : cerveau ; Co : cœur ; Fo : foie ; Pa : pancréas ; Po : poumons ; Ra : rate ; Re : rein ; TD : tube digestif ; Th : thymus ; Ut : utérus ; Gg : ganglion

**D, E, F** : représentation du profil métastatique des xénogreffes CRCM434X, CRCM389X et CRCM174X implantées à des souris NOD/SCID en pourcentage par organe de signal récolté par le bio-imageur Biospace® : rapport du nombre photons/sec/cm<sup>2</sup>/sr de chaque organe enregistré par l'imageur rapporté à la somme de photons/sec/cm<sup>2</sup>/sr récolté dans tous les organes.



**Figure 14 : Comparaison des profils métastatiques pour le modèle CRCM341X pour les générations G1 et G2**

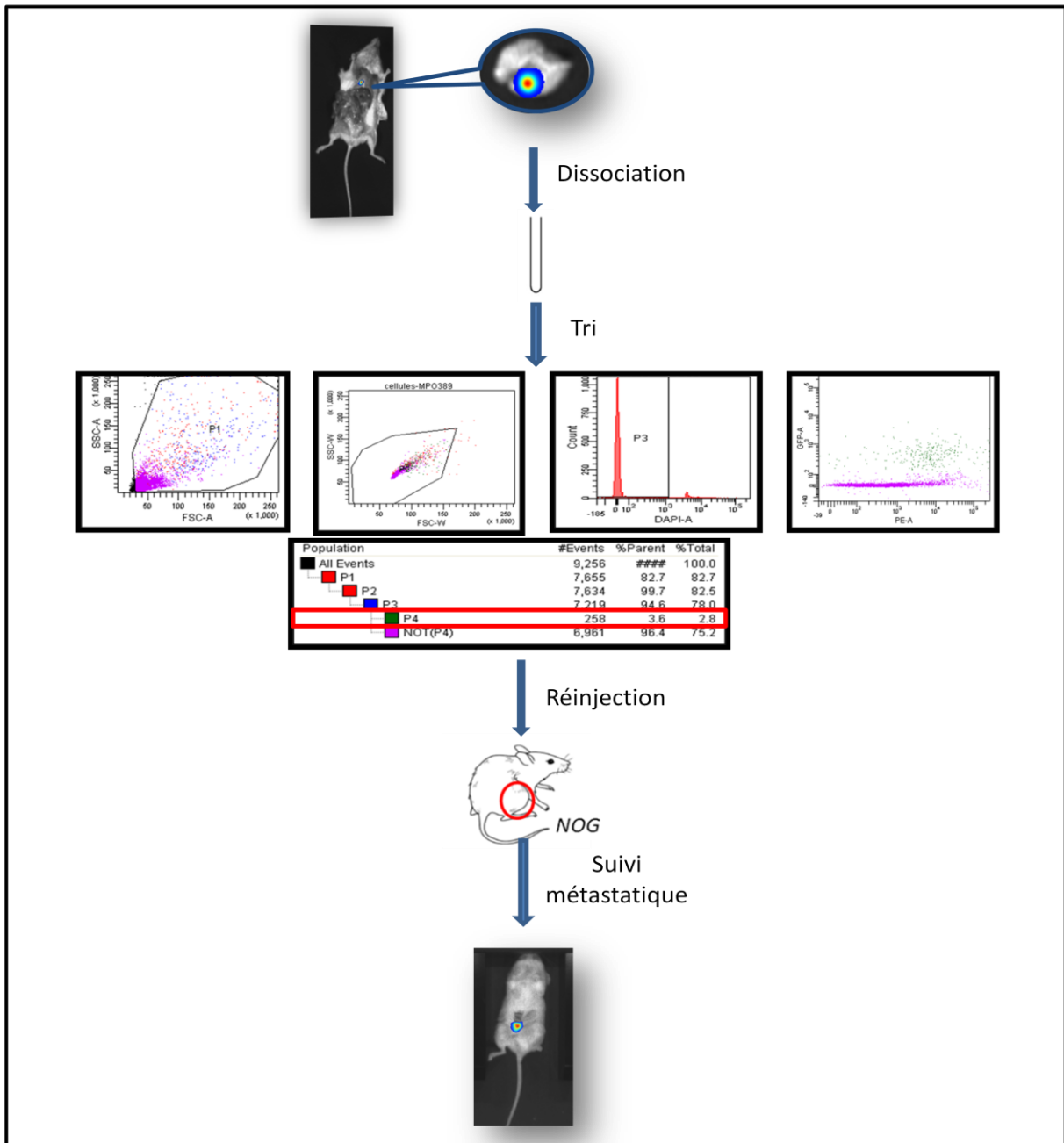
**A,C,D** : représentation du profil métastatique des souris de la xéno greffe CRCM341X à des souris NOD/SCID de la génération G1 (A et C) ou NOG de la génération G2 (D) en pourcentage par organe de signal récolté par le bio-imageur Biospace® : rapport du nombre photons/sec/cm<sup>2</sup>/sr de chaque organe enregistré par l'imageur rapporté à la somme de photons/sec/cm<sup>2</sup>/sr récolté dans tous les organes.

**B** : visualisation du signal bioluminesométrique des différents organes pour une souris NOD/SCID de la génération G1 et greffées par la xéno greffe CRCM341X. La tumeur a été retirée par exérèse 10 à 20 jours post-greffe. Le signal est obtenu avec le bio-imageur Biospace®, 5 minutes après injection de 100µL de luciférine par souris et après dissection des souris.

Ce : cerveau ; Co : cœur ; Fo : foie ; Pa : pancréas ; Po : poumons ; Ra : rate ; Re : rein ; TD : tube digestif ; Th : thymus ; Ut : utérus

#### 4.3.4 Validation d'un processus de « Homing » spécifique en fonction des organes colonisés

Des études réalisées à partir de lignée cellulaire ont permis d'émettre l'hypothèse que l'adressage (« homing ») des cellules métastatiques et la nidation dans un nouvel organe serait un programme cellulaire défini et spécifique selon l'organe colonisé [118] [119]. Afin d'étudier ce phénomène nous avons choisi de tester fonctionnellement l'adressage spécifique des cellules métastatiques vers un seul organe. Ainsi, pour la xéno greffe CRCM389X, il a été possible de localiser précisément la métastase pulmonaire lors de l'imagerie des organes par bioluminescence. Cette métastase a été dissociée selon le même protocole que la tumeur primaire, et triée par cytométrie de flux. Le tri a permis d'isoler la population de cellules GFP-positives (cellules tumorales humaines) des cellules pulmonaires murines. Ces cellules ont été réinjectées dans le tissu adipeux de la glande mammaire d'une souris NOG. Ces cellules ont généré une masse tumorale (**figure 15**) qui pourra être isolée et étudiée par la suite. De plus, nous évaluerons la capacité de ces cellules à recoloniser de façon spécifique le poumon de l'animal. Maintenant que le protocole a été validé sur un de nos modèles de xéno greffes, il pourra être généralisé sur les autres modèles et notamment sur les profils pluri-métastatiques afin d'étudier l'adressage spécifique des cellules métastatiques réimplantées, à un ou plusieurs types d'organe.



**Figure 15 : Protocole de Homing**

Les métastases pulmonaires sont isolées lors de l'inspection bioluminesométrique des organes. Les cellules sont dissociées par le mélange collagénase-hyaluronidase, marquées à l'H2kd et au DAPI puis triées par le BD FACSAriaIII®. La population récupérée correspond à la population DAPI négative, H2kd négative, GFP positive. Après resuspension dans le mélange matrigel-sérum bovin, les cellules sont réinjectées dans le coussinet graisseux de la 4<sup>ème</sup> paire de mamelles d'une souris NOG. La pousse tumorale est mesurée toutes les semaines.

## **4.4 Discussion**

Cette étude a permis la mise en place d'un nouveau modèle murin d'étude du développement métastatique dans le cas du cancer du sein. Des modèles pour l'étude des métastases sont indispensables pour mieux comprendre la maladie métastatique, ce qui est un véritable enjeu médical et scientifique étant donné l'impasse thérapeutique qu'elle représente. Notre modèle présente l'avantage indéniable d'être le plus « physiologique » possible dans la mesure où il étudie le comportement métastatique de tumeurs obtenues à partir d'échantillons de tumeurs primaires humaines greffés en situation orthotopiques dans la glande mammaire. Malgré ces avantages, certains aspects demandent encore à être documentés et améliorés.

### **4.4.1 « Affinité » du vecteur pour certaines greffes et stabilité**

En effet, j'ai constaté que le vecteur utilisé pour notre étude ne semble pas capable d'infecter aussi efficacement tous les modèles de xénogreffes puisque certains modèles présentent à la suite du G1 un taux de cellules exprimant la GFP très faible, relatant la faible proportion de cellules ayant intégré le vecteur, donc infectées. Cependant, une dissociation assez nette étant visible entre la GFP et la luciférase, cette faible expression pourrait être liée à une régulation différentielle de l'expression de gènes xéno-dépendants. D'autres part pour certaines d'entre elles, l'infection ne semble pas assez stable au fur et à mesure des passages dans l'animal. Cette diminution significative de l'expression de la GFP dans certaines xénogreffes restreint le nombre de modèle de xénogreffes exploitables pour notre étude et gêne la mise en place de notre protocole afin d'étudier le « homing ». Cette perte d'expression pourrait s'expliquer par des modifications épigénétiques de notre vecteur au cours du temps (acétylation, méthylation...). La méthylation de vecteurs lentiviraux sur leur site promoteur SFFV a déjà été montrée dans des modèles de cellules souches embryonnaires murines [72]. Dans ce cas, la méthylation entraîne une perte d'expression progressive de la protéine d'intérêt. Cela pourrait être le cas pour l'expression de la GFP dans notre modèle.

Toutefois, je n'ai pas observé lors des passages successifs de corrélation entre la perte d'expression de la GFP et la perte du signal bioluminescent. En effet, les modèles de xénogreffes présentant une perte importante d'expression de la GFP (CRCM 318X, CRCM 341X et CRCM 434X), ont une expression stable de la luciférase. La xénogreffe CRCM341X illustre parfaitement cette dissociation puisque 75% de l'expression de la GFP est perdue

après 2 passages alors que le signal recueilli par le photonimageur entre les différents passages est plutôt stable. Un découplage de l'expression de la GFP et de la luciférase serait donc à évaluer. Ce découplage pourrait d'ailleurs être lié à la construction même de notre vecteur (cf **figure 3**) puisque le promoteur SFFV se situe en amont de la luciférase et qu'un IRES sépare la luciférase de la GFP. Une telle construction pourrait donc être soumise à une modulation épigénétique dissociée des 2 gènes. Ce constat a d'ailleurs déjà été démontré dans une étude à propos d'un autre type de vecteur, l'encéphalomyélite virus (EMCV), où dans les cellules infectées, l'expression du gène situé après l'IRES était nettement plus faible que le gène situé avant l'IRES et ceci quels que soient les gènes impliqués [120].

L'utilisation d'une protéine de fusion entre les 2 protéines pourrait donc limiter cet effet constaté. L'équipe de M.F. Clarke [108] utilise d'ailleurs un vecteur lentiviral comportant un gène de fusion entre leur gène de la luciférase et de la GFP sans ajout de séquence initiatrice de traduction (IRES). Leur vecteur semble relativement stable. Ainsi après 3 passages dans la souris, les cellules tumorales présentent encore un taux de 90 % d'infection. Ce type de construction pourrait donc représenter une alternative pour la stabilité de l'expression du vecteur dans nos modèles de xénogreffe.

#### **4.4.2 Réflexion générale sur le modèle bioluminescent**

Un des objectifs de ce modèle est de pouvoir réaliser un suivi cinétique de la formation de métastases dans les souris vivantes. Cependant, pour des raisons techniques de seuillage de la bioluminescence par le photonimageur, lorsqu'un signal est très fort, il gêne la détection de signaux de plus faible intensité. C'est ce qui se passe en cas de masse volumineuse. En ce sens, l'exérèse de la tumeur primaire facilite encore la lecture bioluminométrique pour l'apparition de signaux métastatiques. Mais les nombreuses récurrences constatées dans le site primaire rendent caduque un suivi cinétique de développement métastatique sitôt que la récurrence a atteint une taille importante. C'est donc sur organes séparés suite au sacrifice des animaux que la recherche des différents sites métastatique s'avère la plus exacte.

L'autre objectif était de pouvoir reproduire par nos xénogreffes toute la diversité des situations cliniques retrouvées chez les patientes atteintes de cancer du sein : de la patiente ne développant aucune métastase à celle développant un profil avec une forte spécificité pour un



type d'organes ou à localisations multiples. L'obtention de 2 types de profils permet déjà d'approcher le comportement des patientes métastatiques. L'exérèse de la tumeur primaire, en permettant de maintenir les animaux en vie plus longtemps, semble favoriser le développement de métastases. En effet, le modèle orthotopique d'implantation de xénogreffe de l'équipe de B.E. et A.L. Welm [51] note l'absence de métastases hépatiques et cérébrales dans leur modèle, localisations pourtant relativement fréquentes chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. Ils expliquent en partie cette absence par un sacrifice trop précoce des souris à l'issue du maximum de pousse éthiquement acceptable de la tumeur primaire, ce qui ne laisserait pas le temps au développement peut-être plus lent de ce type de localisation métastatique. En revanche, notre modèle permet d'obtenir toutes les localisations métastatiques classiquement retrouvées chez les patientes grâce au suivi des animaux post exérèse.

Une des particularités de notre modèle est de générer aussi des métastases dans des organes rarement touchés chez les patientes atteintes de cancer du sein. Ces localisations sont pourtant observées à plusieurs reprises dans notre modèle murin (intestins et utérus notamment). Cette différence de localisation métastatique entre les patientes et le modèle murin pourrait s'expliquer par les différences anatomiques de positionnement de la glande mammaire dans les 2 espèces. L'émergence systématique d'une masse «récidiviste» sur la séreuse abdominale chez les souris autopsiées peut s'expliquer par l'agressivité locale des tumeurs sélectionnées et par la proximité anatomique de la glande mammaire murine avec le péritoine. Cette masse péritonéale peut donc être à l'origine d'un «envahissement» local par continuité par les cellules tumorales des organes intra-abdominaux en contact direct avec le péritoine (intestins, et utérus). On notera d'ailleurs l'atteinte systématique de la partie basale de l'utérus (col et embranchement de la séparation des 2 cornes) non protégée par la masse digestive. La mise en place de ce protocole de greffe dans la première paire de glandes mammaires permettra de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse en se plaçant dans une région anatomique plus proche de celle de la femme. La comparaison des cartographies métastatiques d'une même xénogreffe entre les souris greffées sur la 1<sup>ère</sup> et la 4<sup>ème</sup> paire de glandes mammaires permettra d'établir une liste des organes métastatiques touchés par une dissémination locale «par continuité» versus ceux touchés par une dissémination «métastatique» par voie sanguine ou lymphatique.

Actuellement le nombre de souris sacrifiées par xénogreffe n'est pas suffisant pour affirmer la répétitivité du modèle. Cependant, les résultats présentés pour la xénogreffe CRCM341X montrent une certaine concordance des localisations métastatiques d'une génération sur l'autre et quel que soit le choix du modèle murin (NOD/SCID ou NOG) (**Figure 14**). Même si la localisation osseuse n'est rencontrée que sur une seule des souris de ce modèle, les autres localisations sont systématiquement retrouvées chez les 3 souris. Des résultats similaires sont retrouvés pour les xénogreffes CRCM318X (profil pluri-métastatique avec toujours présence de la localisation cérébrale) et CRCM389X (forte affinité pour la localisation pulmonaire) (résultats non présentés).

En conclusion, le modèle de xénogreffe orthotopique proposé semble répondre à des critères importants pour l'étude des métastases du cancer du sein : il permet de générer l'ensemble des localisations métastatiques les plus fréquemment rencontrés dans le cancer du sein, suggérant un adressage spécifique des éléments tumoraux humain dans ces localisations, il permet une cartographie exhaustive de l'ensemble des localisations métastatique dans la souris, permettant des études plus approfondies du « homing » des éléments tumoraux. Toutefois, le modèle utilisé ne permet pas à l'heure actuelle un monitoring satisfaisant du développement métastatique dans les animaux vigiles, et une amélioration du vecteur lentiviral pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de l'infection et la stabilité de l'expression du vecteur.

## 4.5 Perspectives

Ce modèle pourrait être utilisé pour plusieurs applications. Notamment dans le but d'approfondir le concept prometteur des cellules souches cancéreuses, cette nouvelle approche semble tout à fait adaptée.

La répétitivité des localisations anatomiques métastatiques d'une souris à l'autre provenant d'un même modèle de xélogreffe, ainsi que les différences de cartographie métastatique entre les modèles, pourrait permettre d'identifier les paramètres cellulaires et moléculaires qui mènent à chacun de ces profils (mono-, pluri-, ou non-métastatique ou la présence ou non de certaines localisations métastatiques). L'étude de l'équipe de M.F. Clarke [108] sur un modèle de développement spontané de métastases pulmonaires à partir d'un modèle de greffe orthotopique, montre la relation entre capacité à former des métastases dans ce modèle et la présence de cellules souches cancéreuses (mise en évidence par le marqueur CD44). Dans leur étude, la capacité des cellules métastatiques à reformer une masse dans une nouvelle souris est le reflet de la présence d'une population de cellules souches cancéreuses dans la masse métastatique. Il confirme cette hypothèse par la capacité très supérieure de la population métastatique pulmonaire purifiée en CD44+ à former des métastases à partir de tumeurs orthotopiques comparées à la population CD44-. De plus, il note une conservation du pourcentage de cellules souches entre la tumeur primaire et sa métastase. Au vue de ces résultats, nous proposons d'établir une signature transcriptionnelle des CSC de nos différents modèles en fonction de leur profil (non métastatiques, mono-, pluri-metastatiques). Ces signatures transcriptionnelles pourrait nous permettre d'identifier des cibles thérapeutiques et de prédire l'évolution de la maladie chez les patientes.

La compréhension du processus métastatique ne peut pas se limiter uniquement à l'étude des caractéristiques de la population tumorale métastatique déjà implantée dans un organe. C'est pourquoi de plus en plus d'études s'intéressent aux cellules tumorales avant leur implantation en ciblant leur approche sur les CTC (cellules circulantes cancéreuses). Depuis le milieu des années 2000, l'intérêt clinique de l'étude de ces CTC dans le cancer du sein est démontré. Notamment leur présence semble être corrélée à un mauvais pronostic chez les patientes [31]. L'origine cellulaire de cette population n'est pas encore parfaitement comprise et le marqueur (EpCAM) classiquement utilisé à l'heure actuelle pour les isoler dans le sang est un marqueur épithélial, permettant de les départager des éléments sanguins, endothéliaux

ou mésenchymateux. Cependant, la capacité de ce marqueur à isoler la totalité des CTC est maintenant remise en cause [65] [92]. Certaines équipes en démontrant des caractéristiques proches entre CTC, CSC et des marqueurs d'EMT [95][179] prouve en même temps les limites de l'utilisation de marqueurs épithéliaux comme marqueur ubiquitaire de ces CTC. Notre modèle de greffe va être utilisé pour isoler les cellules GFP positives circulantes dans le sang par ponction sanguine. Ce gène GFP étant exprimé par nos cellules tumorales mais à priori pas par les autres éléments sanguins ou endothéliaux, cette approche nous permettra de nous affranchir de l'utilisation des marqueurs de surface actuellement utilisés pour isoler les CTC. Il pourra donc être étudié par la suite le lien entre CTC et CSC, ainsi que la pertinence de nouveaux marqueurs plus ubiquitaires que le marqueur de référence, l'EpCAM.

Ce modèle de xéno greffe ouvre donc la porte à une étude approfondie du rôle des CSC dans le processus métastatiques. La capacité de cette nouvelle technique à générer tous les types de métastases dans la souris ainsi que différents profils métastatiques, combinée à l'expérience acquise du laboratoire dans la connaissance et le traitement des cellules souches cancéreuses va permettre d'étudier l'existence possible de différentes populations de CSC, et de mieux cerner l'origine de la population de CTC afin d'améliorer son isolement. Les résultats obtenus pourront être confrontés aux données cliniques des patientes dans le but d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein.

En conclusion, ce travail a permis d'exposer les différents modèles murins actuellement employés dans l'étude du cancer du sein et de son évolution. Chacun de ces modèles présentent des limites mais chacun apporte aussi des connaissances complémentaires.

Le premier modèle, le modèle de GEM est une bonne approche pour approfondir les connaissances de l'origine génétique des cancers et du rôle des différents gènes impliqués.

Le deuxième modèle, les xénogreffes de lignée cellulaire, permet quant à lui de se rapprocher des caractéristiques histologiques et génomiques des tumeurs humaines. Il a complété les connaissances cellulaires des cancers du sein et de leur évolution. Il a permis d'éclaircir le rôle des différentes populations tumorales ainsi que les caractéristiques génomiques des cancers métastatiques.

Enfin, le dernier modèle, les xénogreffes de tumeur primaire de patientes, permet maintenant de reproduire sur des modèles murins une grande majorité de toute l'hétérogénéité des cancers du sein. Dans l'avenir, il pourrait jouer un rôle important dans la connaissance des comportements spécifiques et de l'évolution des différents sous-types de cancers du sein. Il pourrait même permettre de distinguer différents comportements au sein d'un même sous-type tumoral, expliquant les réponses variables aux traitements de chimiothérapie chez les patientes atteintes du même sous-type tumoral.

## Bibliographie

- [1] ACERO R, POLENTARUTTI N, BOTTAZZI B, ALBERTI S, RICCI MR, BIZZI A, MANTOVANI A. Effect of hydrocortisone on the macrophage content, growth and metastasis of transplanted murine tumors. *Int J Cancer*. 1984 Jan 15; **33(1):95-105**
- [2] ADELMAN R, SAUL RL, ALES BN. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Apr; **85(8):2706-8**
- [3] ALBERG AJ, HELZLSOUER KJ. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol*. 1997 Nov; **9(6):505-11**
- [4] AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1; **100(7):3983-8**
- [5] AMES BN, SHIGENAGA MK, HAGEN TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1; **90(17):7915-22**
- [6] AN T, SOOD U, PIETRUK T, CUMMINGS G, HASHIMOTO K, CRISSMAN JD. In situ quantitation of inflammatory mononuclear cells in ductal infiltrating breast carcinoma. Relation to prognostic parameters. *Am J Pathol*. 1987 Jul; **128(1):52-60**
- [7] ANDRULIS IL, BULL SB, BLACKSTEIN ME, SUTHERLAND D, MAK C, SIDLOFSKY S, PRITZKER KP, HARTWICK RW, HANNA W, LICKLEY L, WILKINSON R, QIZILBASH A, AMBUS U, LIPA M, WEIZEL H, KATZ A, BAIDA M, MARIZ S, STOIK G, DACAMARA P, STRONGITHARM D, GEDDIE W, MCCREADY D. neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1998 Apr; **16(4):1340-9**
- [8] ARBOLEDA MJ, LYONS JF, KABBINAVAR FF, BRAY MR, SNOW BE, AYALA R, DANINO M, KARLAN BY, SLAMON DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2003 Jan 1; **63(1):196-206**
- [9] ARTANDI SE, CHANG S, LEE SL, ALSON S, GOTTLIEB GJ, CHIN L, DEPINHO RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*. 2000 Aug 10; **406(6796):641-5**
- [10] ATKIN NB. Lack of reciprocal translocations in carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986 Apr 1; **21(3):275-8**
- [11] BACHMAN KE, ARGANI P, SAMUELS Y, SILLIMAN N, PTAK J, SZABO S, KONISHI H, KARAKAS B, BLAIR BG, LIN C, PETERS BA, VELCULESCU VE, PARK BH. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2004 Aug; **3(8):772-5**
- [12] BADENOCH-JONES P, CLAUDIANOS C, RAMSHAW IA. Lectin-binding characteristics of related high- and low-metastatic rat mammary adenocarcinoma cell lines. *Invasion Metastasis*. 1987; **7(5):284-96**
- [13] BANCROFT GJ, KELLY JP. Macrophage activation and innate resistance to infection in SCID mice. *Immunobiology*. 1994 Oct; **191(4-5):424-31**
- [14] BARCELLOS-HOFF MH, RAVANI SA. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res*. 2000 Mar 1; **60(5):1254-60**

- [15] BIÈCHE I, LAURENDEAU I, TOZLU S, OLIVI M, VIDAUD D, LIDEREAU R, VIDAUD M. Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay. *Cancer Res.* 1999 Jun 15; **59(12):2759-65**
- [16] BIÈCHE I, LIDEREAU R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995 Dec; **14(4):227-51**
- [17] BLACK MM, ZACHRAU RE, HANKEY BF, WESLEY M. Skin window reactivity to autologous breast cancer. An index of prognostically significant cell-mediated immunity. *Cancer.* 1988 Jul 1; **62(1):72-83**
- [18] Bonilla F, Alvarez-Mon M, Merino F, de la Hera A, Alés JE, España P, Durántez A. Interleukin-2 induces cytotoxic activity in lymphocytes from regional axillary nodes of breast cancer patients. *Cancer.* 1988 Feb 15; **61(4):629-34**
- [19] BONNET D, DICK JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul; **3(7):730-7**
- [20] BOS PD, ZHANG XH, NADAL C, SHU W, GOMIS RR, NGUYEN DX, MINN AJ, VAN DE VIJVER MJ, GERALD WL, FOEKENS JA, MASSAGUÉ J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009 Jun 18; **459(7249):1005-9**
- [21] BOS PD, NGUYEN DX, MASSAGUÉ J. Modeling metastasis in the mouse. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Oct; **10(5):571-7**
- [22] BOSE S, WANG SI, TERRY MB, HIBSHOOSH H, PARSONS R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene.* 1998 Jul 9; **17(1):123-7**
- [23] BOUGIE O, WEBERPALS JI. Clinical Considerations of BRCA1- and BRCA2-Mutation Carriers. *Int J Surg Oncol.* 2011; **2011:374012**
- [24] BRISON O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 1993 May 25; **1155(1):25-41**
- [25] BRODT P, PARHAR R, SANKAR P, LALA PK. Studies on clonal heterogeneity in two spontaneously metastasizing mammary carcinomas of recent origin. *Int J Cancer.* 1985 Feb 15; **35(2):265-73**
- [26] BRONZERT DA, GREENE GL, LIPPMAN ME. Selection and characterization of a breast cancer cell line resistant to the antiestrogen LY 117018. *Endocrinology.* 1985 Oct; **117(4):1409-17**
- [27] BRUGGE J, HUNG MC, MILLS GB. A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell.* 2007 Aug; **12(2):104-7**
- [28] BRÜNNER N, BOULAY V, FOJO A, FRETER CE, LIPPMAN ME, CLARKE R. Acquisition of hormone-independent growth in MCF-7 cells is accompanied by increased expression of estrogen-regulated genes but without detectable DNA amplifications. *Cancer Res.* 1993 Jan 15; **53(2):283-90**
- [29] BRÜNNER N, FRANDBSEN TL, HOLST-HANSEN C, BEI M, THOMPSON EW, WAKELING AE, LIPPMAN ME, CLARKE R. MCF7/LCC2: a 4-hydroxytamoxifen resistant human breast cancer variant that retains sensitivity to the steroidal antiestrogen ICI 182,780. *Cancer Res.* 1993 Jul 15; **53(14):3229-32**
- [30] BRÜNNER N, THOMPSON EW, SPANG-THOMSEN M, RYGAARD J, DANØ K, ZWIEBEL JA. lacZ transduced human breast cancer xenografts as an in vivo model for the study of invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 1992; **28A(12):1989-95**

- [31] BUDD GT, CRISTOFANILLI M, ELLIS MJ, STOPECK A, BORDEN E, MILLER MC, MATERA J, REPOLLET M, DOYLE GV, TERSTAPPEN LW, HAYES DF. Circulating tumor cells versus imaging--predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Nov 1; **12(21):6403-9**
- [32] CABAUD O, JOSSELIN E, WICINSKI J, BIRNBAUM D, GINESTIER C, CHARAFE-JAUFFRET, Etablissement d'une banque de xénogreffes de tumeurs primaires humaines orthotopique dans la glande mammaire murine humanisée, *STAL*, 2011, **volume 37, 2ème trimestre**
- [33] CALLAHAN R, CROPP CS, MERLO GR, LISCIA DS, CAPP A, LIDEREAU R. Somatic mutations and human breast cancer. A status report. *Cancer*. 1992 Mar 15
- [34] CAMPBELL SL, KHOSRAVI-FAR R, ROSSMAN KL, CLARK GJ, DER CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 1998 Sep 17
- [35] CARDIFF RD, MULLER WJ. Transgenic mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Surv*. 1993; **16:97-113**
- [36] CATTANACH BM, IDDON CA, CHARLTON HM, CHIAPPA SA, FINK G. Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature*. 1977 Sep 22; **269(5626):338-40**
- [37] CHAFFER CL, WEINBERG RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25; **331(6024):1559-64**
- [38] CHARAFE-JAUFFRET E, GINESTIER C, IOVINO F, TARPIN C, DIEBEL M, ESTERNI B, HOUVENAEGHEL G, EXTRA JM, BERTUCCI F, JACQUEMIER J, XERRI L, DONTU G, STASSI G, XIAO Y, BARSKY SH, BIRNBAUM D, VIENS P, WICHA MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 1; **16(1):45-55**
- [39] CHARLTON HM, SPEIGHT A, HALPIN DM, BRAMWELL A, SHEWARD WJ, FINK G. Prolactin measurements in normal and hypogonadal (hpg) mice: developmental and experimental studies. *Endocrinology*. 1983 Aug; **113(2):545-8**
- [40] CHEN J, ROOP DR. Mimicking hair disorders by genetic manipulation of organ-cultured human hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2012 Oct; **132(10):2312-4**
- [41] CHRISTIANSEN JJ, RAJASEKARAN AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006 Sep 1; **66(17):8319-26**
- [42] CLARK EA, SHULTZ LD, POLLACK SB. Mutations in mice that influence natural killer (NK) cell activity. *Immunogenetics*. 1981 Mar 1; **12(5-6):601-13**
- [43] CLARKE R. Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1996; **39(1):69-86**
- [44] CLARKE R, BRÜNNER N, KATZENELLENBOGEN BS, THOMPSON EW, NORMAN MJ, KOPPI C, PAIK S, LIPPMAN ME, DICKSON RB. Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May; **86(10):3649-53**
- [45] CLARKE R, DICKSON RB, LIPPMAN ME. Hormonal aspects of breast cancer. Growth factors, drugs and stromal interactions. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1992 Jan; **12(1):1-23**
- [46] CLARKE R, SKAAR T, BAUMANN K, LEONESSA F, JAMES M, LIPPMAN J, THOMPSON EW, FRETER C, BRUNNER N. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; **31(2-3):237-48**



- [47] COGHLIN C, MURRAY GI. Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol.* 2010 Sep; **222(1):1-15**
- [48] COTTU P, MARANGONI E, ASSAYAG F, DE CREMOUX P, VINCENT-SALOMON A, GUYADER CH, DE PLATER L, ELBAZ C, KARBOUL N, FONTAINE JJ, CHATEAU-JOUBERT S, BOUDOU-ROUQUETTE P, ALRAN S, DANGLES-MARIE V, GENTIEN D, POUPON MF, DECAUDIN D. Modeling of response to endocrine therapy in a panel of human luminal breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun; **133(2):595-606**
- [49] DANKORT DL, MULLER WJ. Signal transduction in mammary tumorigenesis: a transgenic perspective. *Oncogene.* 2000 Feb 21; **19(8):1038-44**
- [50] DE PALMA M, MAZZIERI R, POLITI LS, PUCCI F, ZONARI E, SITIA G, MAZZOLENI S, MOI D, VENNERI MA, INDRACCOLO S, FALINI A, GUIDOTTI LG, GALLI R, NALDINI L. Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell.* 2008 Oct 7; **14(4):299-311**
- [51] DEROSE YS, WANG G, LIN YC, BERNARD PS, BUYS SS, EBBERT MT, FACTOR R, MATSEN C, MILASH BA, NELSON E, NEUMAYER L, RANDALL RL, STIJLEMAN IJ, WELM BE, WELM AL. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med.* 2011 Oct 23; **17(11):1514-20**
- [52] DILLON RL, WHITE DE, MULLER WJ. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene.* 2007 Feb 26; **26(9):1338-45**
- [53] DOLBERG DS, BISSELL MJ. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature.* 1984 Jun 7-13; **309(5968):552-6**
- [54] DONEHOWER LA, GODLEY LA, ALDAZ CM, PYLE R, SHI YP, PINKEL D, GRAY J, BRADLEY A, MEDINA D, VARMUS HE. Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability. *Genes Dev.* 1995 Apr 1; **9(7):882-95**
- [55] DORSHKIND K, KELLER GM, PHILLIPS RA, MILLER RG, BOSMA GC, O'TOOLE M, BOSMA MJ. Functional status of cells from lymphoid and myeloid tissues in mice with severe combined immunodeficiency disease. *J Immunol.* 1984 Apr; **132(4):1804-8**
- [56] DORSHKIND K, POLLACK SB, BOSMA MJ, PHILLIPS RA. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol.* 1985 Jun; **134(6):3798-801**
- [57] EBOS JM, LEE CR, CRUZ-MUNOZ W, BJARNASON GA, CHRISTENSEN JG, KERBEL RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2009 Mar 3; **15(3):232-9**
- [58] ELLEDGE RM, ALLRED DC. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1994; **32(1):39-47**
- [59] ENGEL LW, YOUNG NA, TRALKA TS, LIPPMAN ME, O'BRIEN SJ, JOYCE MJ. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res.* 1978 Oct; **38(10):3352-64**
- [60] FARMER P, BONNEFOI H, ANDERLE P, CAMERON D, WIRAPATI P, BECETTE V, ANDRÉ S, PICCART M, CAMPONE M, BRAIN E, MACGROGAN G, PETIT T, JASSEM J, BIBEAU F, BLOT E, BOGAERTS J, AGUET M, BERGH J, IGGO R, DELORENZI M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med.* 2009 Jan; **15(1):68-74**

- [61] FIDLER IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun; **3(6):453-8**
- [62] GARCIA JM, SILVA JM, DOMINGUEZ G, GONZALEZ R, NAVARRO A, CARRETERO L, PROVENCIO M, ESPAÑA P, BONILLA F. Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 1999 Oct; **57(3):237-43**
- [63] GINESTIER C, CERVERA N, FINETTI P, ESTEYRIES S, ESTERNI B, ADELAÏDE J, XERRI L, VIENS P, JACQUEMIER J, CHARAFE-JAUFFRET E, CHAFFANET M, BIRNBAUM D, BERTUCCI F. Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2006 Aug 1; **12(15):4533-44**
- [64] GORELIK E, WILTROUT RH, OKUMURA K, HABU S, HERBERMAN RB. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer*. 1982 Jul 15; **30(1):107-12**
- [65] GORGES TM, TINHOFFER I, DROSCHE M, ROESE L, ZOLLNER TM, KRAHN T, VON AHSEN O. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012 May 16; **12(1):178**
- [66] GOTTARDIS MM, JORDAN VC. Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration. *Cancer Res*. 1988 Sep 15; **48(18):5183-7**
- [67] GRIMM EA, MAZUMDER A, ZHANG HZ, ROSENBERG SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*. 1982 Jun 1; **155(6):1823-41**
- [68] GUY CT, CARDIFF RD, MULLER WJ. Activated neu induces rapid tumor progression. *J Biol Chem*. 1996 Mar 29; **271(13):7673-8**
- [69] HAMAD NM, ELCONIN JH, KARNOUB AE, BAI W, RICH JN, ABRAHAM RT, DER CJ, COUNTER CM. Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells. *Genes Dev*. 2002 Aug 15; **16(16):2045-57**
- [70] HASUI M, SAIKAWA Y, MIURA M, TAKANO N, UENO Y, YACHIE A, MIYAWAKI T, TANIGUCHI N. Effector and precursor phenotypes of lymphokine-activated killer cells in mice with severe combined immunodeficiency (scid) and athymic (nude)mice. *Cell Immunol*. 1989 Apr 15; **120(1):230-9**
- [71] HERBERMAN RB, NUNN ME, HOLDEN HT, STAAL S, DJEU JY. Augmentation of natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic target cells. *Int J Cancer*. 1977 Apr 15; **19(4):555-64**
- [72] HERBST F, BALL CR, TUORTO F, NOWROUZI A, WANG W, ZAVIDIJ O, DIETER SM, FESSLER S, VAN DER HOEVEN F, KLOZ U, LYKO F, SCHMIDT M, VON KALLE C, GLIMM H. Extensive methylation of promoter sequences silences lentiviral transgene expression during stem cell differentiation in vivo. *Mol Ther*. 2012 May; **20(5):1014-21**
- [73] HOLLIDAY R. Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. *Cancer Surv*. 1996; **28:103-15**
- [74] HORST HA, HORNY HP. Characterization and frequency distribution of lymphoreticular infiltrates in axillary lymph node metastases of invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer*. 1987 Dec 15; **60(12):3001-7**
- [75] HUMPHREY LJ, SINGLA O, VOLENEC FJ. Immunologic responsiveness of the breast cancer patient. *Cancer*. 1980 Aug 15
- [76] HÜSEMANN Y, GEIGL JB, SCHUBERT F, MUSIANI P, MEYER M, BURGHART E, FORNI G, EILS R, FEHM T, RIETHMÜLLER G, KLEIN CA. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*. 2008 Jan; **13(1):58-68**

- [77] HYNES NE, STERN DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Dec 30; **1198(2-3):165-84**
- [78] ITO A, JIPPO T, WAKAYAMA T, MORII E, KOMA Y, ONDA H, NOJIMA H, ISEKI S, KITAMURA Y. SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF. *Blood*. 2003 Apr 1; **101(7):2601-8**
- [79] JOHNSON WJ, BALISH E. Macrophage function in germ-free, athymic (nu/nu), and conventional-flora (nu/+) mice. *J Reticuloendothel Soc*. 1980 Jul; **28(1):55-66**
- [80] JUNTILLA TT, PARSONS K, OLSSON C, LU Y, XIN Y, THERIAULT J, CROCKER L, PABONAN O, BAGINSKI T, MENG G, TOTPAL K, KELLEY RF, SLIWKOWSKI MX. Superior in vivo efficacy of afucosylated trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Cancer Res*. 2010 Jun 1; **70(11):4481-9**
- [81] KANG Y, HE W, TULLEY S, GUPTA GP, SERGANOVA I, CHEN CR, MANOVA-TODOROVA K, BLASBERG R, GERALD WL, MASSAGUÉ J. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 27; **102(39):13909-14**
- [82] KANG Y, SIEGEL PM, SHU W, DROBNJAK M, KAKONEN SM, CORDÓN-CARDO C, GUISE TA, MASSAGUÉ J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 2003 Jun; **3(6):537-49**
- [83] KÄRRE K, KLEIN GO, KIESSLING R, KLEIN G, RODER JC. In vitro NK-activity and in vivo resistance to leukemia: studies of beige, beige/nude and wild-type hosts on C57BL background. *Int J Cancer*. 1980 Dec 15; **26(6):789-97**
- [84] KELLY PM, DAVISON RS, BLISS E, MCGEE JO. Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer*. 1988 Feb; **57(2):174-7**
- [85] KEY ME, HOYER L, BUCANA C, HANNA MG JR. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cytolysis. *Adv Exp Med Biol*. 1982; **146:265-314**
- [86] KEYDAR I, CHEN L, KARBY S, WEISS FR, DELAREA J, RADU M, CHAITCIK S, BRENNER HJ. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*. 1979 May; **15(5):659-70**
- [87] KIESSLING R, KLEIN E, WIGZELL H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 1975 Feb; **5(2):112-7**
- [88] KIM IS, BAEK SH. Mouse models for breast cancer metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 9; **394(3):443-7**
- [89] KIM IS, JEONG SJ, KIM SH, JUNG JH, PARK YG, KIM SH. Special AT-rich sequence-binding protein 2 and its related genes play key roles in the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 13; **417(2):697-703**
- [90] KINDRED B. Can tolerant allogeneic cells restore nude mice? *Cell Immunol*. 1975 Dec; **20(2):241-6**
- [91] KLIJN JG, BERNS PM, BONTENBAL M, ALEXIEVA-FIGUSCH J, FOEKENS JA. Clinical breast cancer, new developments in selection and endocrine treatment of patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992 Sep; **43(1-3):211-21**
- [92] KÖNIGSBERG R, OBERMAYR E, BISES G, PFEILER G, GNEIST M, WRBA F, DE SANTIS M, ZEILLINGER R, HUDEC M, DITTRICH C. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol*. 2011 Jun; **50(5):700-10**

- [93] KOUROS-MEHR H, BECHIS SK, SLORACH EM, LITTLEPAGE LE, EGEBLAD M, EWALD AJ, PAI SY, HO IC, WERB Z. GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer Cell*. 2008 Feb; **13(2):141-52**
- [94] KOZLOWSKI JM, FIDLER IJ, CAMPBELL D, XU ZL, KAIGHN ME, HART IR. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res*. 1984 Aug; **44(8):3522-9**
- [95] KSIĄŻKIEWICZ M, MARKIEWICZ A, ZACZEK AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology*. 2012; **79(4):195-208**
- [96] KUPERWASSER C, DESSAIN S, BIERBAUM BE, GARNET D, SPERANDIO K, GAUVIN GP, NABER SP, WEINBERG RA, ROSENBLATT M. A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone. *Cancer Res*. 2005 Jul 15; **65(14):6130-8**
- [97] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, MURDOCH B, HOANG T, CACERES-CORTES J, MINDEN M, PATERSON B, CALIGIURI MA, DICK JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17; **367(6464):645-8**
- [98] LEDER A, PATTENGAL PK, KUO A, STEWART TA, LEDER P. Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development. *Cell*. 1986 May 23; **45(4):485-95**
- [99] LEE BI, WILSON DM 3rd. The RAD2 domain of human exonuclease 1 exhibits 5' to 3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities. *J Biol Chem*. 1999 Dec 31; **274(53):37763-9**
- [100] LEONESSA F, GREEN D, LICHT T, WRIGHT A, WINGATE-LEGETTE K, LIPPMAN J, GOTTESMAN MM, CLARKE R. MDA435/LCC6 and MDA435/LCC6MDR1: ascites models of human breast cancer. *Br J Cancer*. 1996 Jan; **73(2):154-61**
- [101] LI X, LEWIS MT, HUANG J, GUTIERREZ C, OSBORNE CK, WU MF, HILSENBECK SG, PAVLICK A, ZHANG X, CHAMNESS GC, WONG H, ROSEN J, CHANG JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008 May 7; **100(9):672-9**
- [102] LI Y, BHUIYAN M, MOHAMMAD RM, SARKAR FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA. *Oncogene*. 1998 Dec 3; **17(22):2915-20**
- [103] LI Y, HIVELY WP, VARMUS HE. Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene*. 2000 Feb 21; **19(8):1002-9**
- [104] LIDEREAU R, MATHIEU-MAHUL D, ESCOT C, THEILLET C, CHAMPEME MH, COLE S, MAUCHAUFFE M, ALI I, AMIONE J, CALLAHAN R, et al. Genetic variability of proto-oncogenes for breast cancer risk and prognosis. *Biochimie*. 1988 Jul; **70(7):951-9**
- [105] LIN EY, NGUYEN AV, RUSSELL RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 2001 Mar 19; **193(6):727-40**
- [106] LIN SC, LEE KF, NIKITIN AY, HILSENBECK SG, CARDIFF RD, LI A, KANG KW, FRANK SA, LEE WH, LEE EY. Somatic mutation of p53 leads to estrogen receptor alpha-positive and -negative mouse mammary tumors with high frequency of metastasis. *Cancer Res*. 2004 May 15; **64(10):3525-32**

- [107] LIU CY, FLESKEN-NIKITIN A, LI S, ZENG Y, LEE WH. Inactivation of the mouse *Brcal* gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes Dev.* 1996 Jul 15; **10(14):1835-43**
- [108] LIU H, PATEL MR, PRESCHER JA, PATSIALOU A, QIAN D, LIN J, WEN S, CHANG YF, BACHMANN MH, SHIMONO Y, DALERBA P, ADORNO M, LOBO N, BUENO J, DIRBAS FM, GOSWAMI S, SOMLO G, CONDEELIS J, CONTAG CH, GAMBHIR SS, CLARKE MF. Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 19; **107(42):18115-20**
- [109] LÓPEZ-KNOWLES E, O'TOOLE SA, MCNEIL CM, MILLAR EK, QIU MR, CREA P, DALY RJ, MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer.* 2010 Mar 1; **126(5):1121-31**
- [110] MAGLIONE JE, MOGHANAKI D, YOUNG LJ, MANNER CK, ELLIES LG, JOSEPH SO, NICHOLSON B, CARDIFF RD, MACLEOD CL. Transgenic Polyoma middle-T mice model premalignant mammary disease. *Cancer Res.* 2001 Nov 15; **61(22):8298-305**
- [111] MALLEPELL S, KRUST A, CHAMBON P, BRISKEN C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14; **103(7):2196-201**
- [112] MALYNN BA, BLACKWELL TK, FULOP GM, RATHBUN GA, FURLEY AJ, FERRIER P, HEINKE LB, PHILLIPS RA, YANCOPOULOS GD, ALT FW. The scid defect affects the final step of the immunoglobulin VDJ recombinase mechanism. *Cell.* 1988 Aug 12; **54(4):453-60**
- [113] MANI SA, GUO W, LIAO MJ, EATON EN, AYYANAN A, ZHOU AY, BROOKS M, REINHARD F, ZHANG CC, SHIPITSIN M, CAMPBELL LL, POLYAK K, BRISKEN C, YANG J, WEINBERG RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008 May 16; **133(4):704-15**
- [114] MAROULAKOU IG, OEMLER W, NABER SP, TSICHLIS PN. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res.* 2007 Jan 1; **67(1):167-77**
- [115] MAY CD, SPHYRIS N, EVANS KW, WERDEN SJ, GUO W, MANI SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2011 Feb 8; **13(1):202**
- [116] MCLESKEY SW, ZHANG L, KHARBANDA S, KUREBAYASHI J, LIPPMAN ME, DICKSON RB, KERN FG. Fibroblast growth factor overexpressing breast carcinoma cells as models of angiogenesis and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; **39(1):103-17**
- [117] MEYVISCH C. Influence of implantation site on formation of metastases. *Cancer Metastasis Rev.* 1983; **2(3):295-306**
- [118] MINN AJ, GUPTA GP, SIEGEL PM, BOS PD, SHU W, GIRI DD, VIALE A, OLSHEN AB, GERALD WL, MASSAGUÉ J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005 Jul 28; **436(7050):518-24**
- [119] MINN AJ, KANG Y, SERGANOVA I, GUPTA GP, GIRI DD, DOUBROVIN M, PONOMAREV V, GERALD WL, BLASBERG R, MASSAGUÉ J. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest.* 2005 Jan; **115(1):44-55**
- [120] MIZUGUCHI H, XU Z, ISHII-WATABE A, UCHIDA E, HAYAKAWA T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther.* 2000 Apr; **1(4):376-82**

- [121] MORIKAWA K, WALKER SM, JESSUP JM, FIDLER IJ. In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res.* 1988 Apr 1; **48(7):1943-8**
- [122] NERI A, WELCH D, KAWAGUCHI T, NICOLSON GL. Development and biologic properties of malignant cell sublines and clones of a spontaneously metastasizing rat mammary adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1982 Mar; **68(3):507-17**
- [123] NEWBOLD RF, OVERELL RW, CONNELL JR. Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature.* 1982 Oct 14; **299(5884):633-5**
- [124] O'NEILL K, LYONS SK, GALLAGHER WM, CURRAN KM, BYRNE AT. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J Pathol.* 2010 Feb; **220(3):317-27**
- [125] OSBORNE CK, CORONADO EB, ROBINSON JP. Human breast cancer in the athymic nude mouse: cytostatic effects of long-term antiestrogen therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987 Aug; **23(8):1189-96**
- [126] OUTZEN HC, CUSTER RP. Growth of human normal and neoplastic mammary tissues in the cleared mammary fat pad of the nude mouse. *J Natl Cancer Inst.* 1975 Dec; **55(6):1461-6**
- [127] PÀEZ-RIBES M, ALLEN E, HUDOCK J, TAKEDA T, OKUYAMA H, VIÑALS F, INOUE M, BERGERS G, HANAHAHAN D, CASANOVAS O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell.* 2009 Mar 3; **15(3):220-31**
- [128] PANTEL K, COTE RJ, FODSTAD O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 7; **91(13):1113-24**
- [129] PANTELOURIS EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature.* 1968 Jan 27; **217(5126):370-1**
- [130] PARANGI S, O'REILLY M, CHRISTOFORI G, HOLMGREN L, GROSFELD J, FOLKMAN J, HANAHAHAN D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 5; **93(5):2002-7**
- [131] PATERSON JW. BRCA1: a review of structure and putative functions. *Dis Markers.* 1998 Feb; **13(4):261-74**
- [132] PATTENGAL PK, STEWART TA, LEDER A, SINN E, MULLER W, TEPLER I, SCHMIDT E, LEDER P. Animal models of human disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes. *Am J Pathol.* 1989 Jul; **135(1):39-61**
- [133] PEGRAM MD, PAULETTI G, SLAMON DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; **52(1-3):65-77**
- [134] PÉREZ-POMARES JM, MUÑOZ-CHÁPULI R. Epithelial-mesenchymal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans. *Anat Rec.* 2002 Nov 1; **268(3):343-51**
- [135] PERREN A, WENG LP, BOAG AH, ZIEBOLD U, THAKORE K, DAHIA PL, KOMMINOTH P, LEES JA, MULLIGAN LM, MUTTER GL, ENG C. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol.* 1999 Oct; **155(4):1253-60**
- [136] PETRILLO LA, WOLF DM, KAPOUN AM, WANG NJ, BARCZAK A, XIAO Y, KORKAYA H, BAEHNER F, LEWICKI J, WICHA M, PARK JW, SPELLMAN PT, GRAY JW, VAN'T VEER L, ESSERMAN LJ. Xenografts faithfully recapitulate breast cancer-specific gene expression patterns of parent primary breast tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Oct; **135(3):913-22**

- [137] PIERCE DF JR, GORSKA AE, CHYTIL A, MEISE KS, PAGE DL, COFFEY RJ JR, MOSES HL. Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 9; **92(10):4254-8**
- [138] PODSYPANINA K, DU YC, JECHLINGER M, BEVERLY LJ, HAMBARDZUMYAN D, VARMUS H. Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science*. 2008 Sep 26; **321(5897):1841-4**
- [139] PRICE JE, POLYZOS A, ZHANG RD, DANIELS LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*. 1990 Feb 1; **50(3):717-21**
- [140] PROWSE KR, GREIDER CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 23; **92(11):4818-22**
- [141] RADEVA G, PETROCELLI T, BEHREND E, LEUNG-HAGESTEIJN C, FILMUS J, SLINGERLAND J, DEDHAR S. Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem*. 1997 May 23; **272(21):13937-44**
- [142] RAMPETSREITER P, CASANOVA E, EFERL R. *Drug Discov Today Dis Models*. 2011; **8(2-3):67-74**
- [143] RAVDIN PM, CHAMNESS GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers. *Gene*. 1995 Jun 14; **159(1):19-27**
- [144] REHEMTULLA A, STEGMAN LD, CARDOZO SJ, GUPTA S, HALL DE, CONTAG CH, ROSS BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*. 2000 Nov-Dec; **2(6):491-5**
- [145] RICHIE JP. Abrogation of hematogenous metastases in a murine model by natural killer cells. *Surgery*. 1984 Aug; **96(2):133-8**
- [146] RODER J, DUWE A. The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature*. 1979 Mar 29; **278(5703):451-3**
- [147] RODER JC, KLEIN M. Target-effector interaction in the natural killer cell system. IV. Modulation by cyclic nucleotides. *J Immunol*. 1979 Dec; **123(6):2785-90**
- [148] SAAL LH, JOHANSSON P, HOLM K, GRUVBERGER-SAAL SK, SHE QB, MAURER M, KOUJAK S, FERRANDO AA, MALMSTRÖM P, MEMEO L, ISOLA J, BENDAHL PO, ROSEN N, HIBSHOOSH H, RINGNÉR M, BORG A, PARSONS R. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1; **104(18):7564-9**
- [149] SAUER B. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*. 1998 Apr; **14(4):381-92**
- [150] SCHECHTER AL, STERN DF, VAIDYANATHAN L, DECKER SJ, DREBIN JA, GREENE MI, WEINBERG RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984 Dec 6-12; **312(5994):513-6**
- [151] SCHOENENBERGER CA, ANDRES AC, GRONER B, VAN DER VALK M, LEMEURE M, GERLINGER P. Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J*. 1988 Jan; **7(1):169-75**
- [152] SERRANO M, LIN AW, MCCURRACH ME, BEACH D, LOWE SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997 Mar 7; **88(5):593-602**

- [153] SHEFFIELD LG, WELSCH CW. Transplantation of human breast epithelia to mammary-gland-free fat-pads of athymic nude mice: influence of mammotrophic hormones on growth of breast epithelia. *Int J Cancer*. 1988 May 15; **41(5):713-9**
- [154] SHULTZ LD, ISHIKAWA F, GREINER DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007 Feb; **7(2):118-30**
- [155] SIEGEL PM, RYAN ED, CARDIFF RD, MULLER WJ. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J*. 1999 Apr 15; **18(8):2149-64**
- [156] SILVER DP, LIVINGSTON DM. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discov*. 2012 Aug; **2(8):679-84**
- [157] SIRARD C, LAPIDOT T, VORMOOR J, CASHMAN JD, DOEDENS M, MURDOCH B, JAMAL N, MESSNER H, ADDEY L, MINDEN M, LARAYA P, KEATING A, EAVES A, LANSDORP PM, EAVES CJ, DICK JE. Normal and leukemic SCID-repopulating cells (SRC) coexist in the bone marrow and peripheral blood from CML patients in chronic phase, whereas leukemic SRC are detected in blast crisis. *Blood*. 1996 Feb 15; **87(4):1539-48**
- [158] SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9; **235(4785):177-82**
- [159] SLAMON D, EIERMANN W, ROBERT N, PIENKOWSKI T, MARTIN M, PRESS M, MACKEY J, GLASPY J, CHAN A, PAWLICKI M, PINTER T, VALERO V, LIU MC, SAUTER G, VON MINCKWITZ G, VISCO F, BEE V, BUYSE M, BENDAHMANE B, TABAH-FISCH I, LINDSAY MA, RIVA A, CROWN J. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer, *N Engl J Med*. 2011 Oct 6; **365(14):1273-83**
- [160] SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, HOLT JA, WONG SG, KEITH DE, LEVIN WJ, STUART SG, UDOVE J, ULLRICH A, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12; **244(4905):707-12**
- [161] SOLOMAYER EF, DIEI IJ, MEYBERG GC, GOLLAN C, BASTERT G. Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. *Breast Cancer Res Treat*. 2000 Feb; **59(3):271-8**
- [162] SOULE HD, VAZGUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov; **51(5):1409-16**
- [163] STEWART TA, PATTENGAL PK, LEDER P. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell*. 1984 Oct; **38(3):627-37**
- [164] STÖCKLIN E, BOTTERI F, GRONER B. An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J Cell Biol*. 1993 Jul; **122(1):199-208**
- [165] STRAYER DR, CARTER WA, BRODSKY I. Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity. *Breast Cancer Res Treat*. 1986; **7(3):187-92**
- [166] TALMADGE JE, MEYERS KM, PRIEUR DJ, STARKEY JR. Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature*. 1980 Apr 17; **284(5757):622-4**



- [167] THIERY JP, SLEEMAN JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb; **7(2):131-42**
- [168] THOMPSON EW, BRÜNNER N, TORRI J, JOHNSON MD, BOULAY V, WRIGHT A, LIPPMAN ME, STEEG PS, CLARKE R. The invasive and metastatic properties of hormone-independent but hormone-responsive variants of MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1993 Jan; **11(1):15-26**
- [169] TOMASKOVIC-CROOK E, THOMPSON EW, THIERY JP. Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009; **11(6):213**
- [170] VAN DE VIJVER MJ, HE YD, VAN'T VEER LJ, DAI H, HART AA, VOSKUIL DW, SCHREIBER GJ, PETERSE JL, ROBERTS C, MARTON MJ, PARRISH M, ATMSMA D, WITTEVEEN A, GLAS A, DELAHAYE L, VAN DER VELDE T, BARTELINK H, RODENHUIS S, RUTGERS ET, FRIEND SH, BERNARDS R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19; **347(25):1999-2009**
- [171] VAN DYKE T. p53 and tumor suppression. *N Engl J Med.* 2007 Jan 4; **356(1):79-81**
- [172] VAN'T VEER LJ, DAI H, VAN DE VIJVER MJ, HE YD, HART AA, MAO M, PETERSE HL, VAN DER KOOY K, MARTON MJ, WITTEVEEN AT, SCHREIBER GJ, KERKHOVEN RM, ROBERTS C, LINSLEY PS, BERNARDS R, FRIEND SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002 Jan 31; **415(6871):530-6**
- [173] VARNA M, BOUSQUET G, PLASSA LF, BERTHEAU P, JANIN A. TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2011; **2011:284584**
- [174] VASUDEVAN KM, BARBIE DA, DAVIES MA, RABINOVSKY R, MCNEAR CJ, KIM JJ, HENNESSY BT, TSENG H, POCHANARD P, KIM SY, DUNN IF, SCHINZEL AC, SANDY P, HOERSCH S, SHENG Q, GUPTA PB, BOEHM JS, REILING JH, SILVER S, LU Y, STEMKE-HALE K, DUTTA B, JOY C, SAHIN AA, GONZALEZ-ANGULO AM, LLUCH A, RAMEH LE, JACKS T, ROOT DE, LANDER ES, MILLS GB, HAHN WC, SELLERS WR, GARRAWAY LA. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell.* 2009 Jul 7; **16(1):21-32**
- [175] VICKERS PJ, DICKSON RB, SHOEMAKER R, COWAN KH. A multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line which exhibits cross-resistance to antiestrogens and hormone-independent tumor growth in vivo. *Mol Endocrinol.* 1988 Oct; **2(10):886-92**
- [176] VISONNEAU S, CESANO A, TOROSIAN MH, MILLER EJ, SANTOLI D. Growth characteristics and metastatic properties of human breast cancer xenografts in immunodeficient mice. *Am J Pathol.* 1998 May; **152(5):1299-311**
- [177] VOLPE JP, MILAS L. Influence of tumor transplantation methods on tumor growth rate and metastatic potential of solitary tumors derived from metastases. *Clin Exp Metastasis.* 1990 Jul-Aug; **8(4):381-9**
- [178] VOSE BM, MOORE M. Suppressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumours. *Int J Cancer.* 1979 Nov 15; **24(5):579-85**
- [179] WANG J, CAO MG, YOU CZ, WANG CL, LIU SL, KAI C, DOU J. A preliminary investigation of the relationship between circulating tumor cells and cancer stem cells in patients with breast cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2012 Feb
- [180] WEISZ-CARRINGTON P, SCHRATER AF, LAMM ME, THORBECKE GJ. Immunoglobulin isotypes in plasma cells of normal and athymic mice. *Cell Immunol.* 1979 May; **44(2):343-51**
- [181] WHEELOCK EF, ROBINSON MK. Biology of disease. Endogenous control of the neoplastic process. *Lab Invest.* 1983 Feb; **48(2):120-39**

- [182] XIA TS, WANG J, YIN H, DING Q, ZHANG YF, YANG HW, LIU XA, DONG M, DU Q, LING LJ, ZHA XM, FU W, WANG S. Human tissue-specific microenvironment: an essential requirement for mouse models of breast cancer. *Oncol Rep.* 2010 Jul; **24(1):203-11**
- [183] XIE X, BRÜNNER N, JENSEN G, ALBRECHTSEN J, GOTTHARDESEN B, RYGAARD J. Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin Exp Metastasis.* 1992 May; **10(3):201-10**
- [184] XU X, WAGNER KU, LARSON D, WEAVER Z, LI C, RIED T, HENNIGHAUSEN L, WYNSHAW-BORIS A, DENG CX. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet.* 1999 May; **22(1):37-43**
- [185] ZHAO JJ, GJOERUP OV, SUBRAMANIAN RR, CHENG Y, CHEN W, ROBERTS TM, HAHN WC. Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell.* 2003 May; **3(5):483-95**
- [186] ZINDY F, EISCHEN CM, RANDLE DH, KAMIJO T, CLEVELAND JL, SHERR CJ, ROUSSEL MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 1998 Aug 1; **12(15):2424-33**
- [187] Université de Liège, ULg. *Source de savoirs*, Disponible sur : <http://reflexions.ulg.ac.be> (consulté le : 01/08/2012)

Toulouse, 2012

NOM : Lartigue  
Danaé

Prénom :

TITRE : Les modèles murins de cancer du sein : Synthèse bibliographique et contribution à la constitution d'une banque de xénogreffes de tumeurs primaires dérivées de patientes

RESUME :

Avec 50 000 nouveaux cas par an de cancer du sein en France, cette maladie représente le premier type de cancer chez la femme et présente un enjeu de santé publique majeur. Une bonne connaissance des mécanismes moléculaires et physio-pathologiques est capitale pour essayer d'améliorer le diagnostic précoce, la prise en charge et la survie de ces patientes.

Depuis plus de 40 ans, face aux limites des modèles *in vitro*, l'émergence de modèles animaux ont permis une nouvelle approche et une meilleure compréhension de cette maladie. Ici est donc synthétisé l'intérêt et les limites de chaque type de modèles murins (souris transgénique et xénogreffe) pour contribuer à l'amélioration de nos connaissances sur la progression tumorale la formation des métastases.

Un intérêt particulier est porté sur une technique émergente : les xénogreffes de tumeur primaire de patientes avec la constitution de xéno-banque. Enfin la mise en place expérimentale de ce type d'approche à la modélisation de la maladie métastatique chez les patientes atteintes de cancer du sein est proposée en dernière partie.

MOTS CLES : CANCER, SEIN, XENOGREFFE, MODELE MURIN, XENO-BANQUE

---

ENGLISH TITLE : Mice model of breast cancer : Review and contribution to the constitution of a patient derived tumor xenograft bank.

ABSTRACT:

With 50,000 new breast cancer cases per year in France, this disease is the first category of female human cancer and represents a major public health problem. Good knowledge of molecular and physio-pathologic mechanisms is important to try to improve the early diagnosis, the clinical care and the overall survival of patients.

For 40 years, and considering limits of the *in-vitro* models, the emergence of animal models allows a new approach for a better understanding of the disease. Here are presented the interest and limits of each mice model type (Genetically engineered mice and xenografts) to contribute to improve understanding of tumor progression and the formation of metastasis.

Special attention is paid to an emerging technique: patient derived tumor xenografts and the constitution of a bank of xenografts.

In the last part, we propose the setting up of this experimental approach of patient derived xenografts in order to modelize in mice the metastatic disease in human breast cancer.

KEYWORDS : CANCER, BREAST, XENOGRAFT, MURIN MODEL, XENO-BANK