

TD UE L3 Biologie des cancers - Modèles animaux

Les modèles animaux sont indispensables pour étudier de façon expérimentale les causes des cancers et pour développer des thérapies efficaces et d'une toxicité acceptable pour les patients. Plusieurs types d'animaux sont utilisés ; aucun n'est idéal et ce sont les objectifs à atteindre qui déterminent le choix du modèle. Un des modèles les plus utilisés, de part la grande facilité de manipulation de son génome, est le modèle murin. Les souris sont des vertébrés, mammifères, rongeurs utilisés dans le cadre de trois applications majeures :

- La création de souris transgéniques : introduction d'un gène muté dont on veut connaître l'effet in vivo
- la création de souris Knock-Out : délétion d'un gène afin d'étudier l'impact sur le développement de cancers spontanés ou induits
- la réalisation de greffes de tumeurs humaines sur des souris immunodéprimées (souris PDX, patient derived xenografts).

Par ailleurs, la souris présente de nombreux inconvénients tels qu'une durée de vie courte (6 mois dans la nature, 2 ans en laboratoire), un coût très élevé de leur élevage (animaleries EOPS), un équipement enzymatique et un métabolisme très différents de ceux de l'homme. Il ne s'agit donc pas d'un modèle idéal et unique.

Le zébrafish, poisson vertébré, est un animal également utilisé dans le cadre de la recherche en cancérologie. Son utilisation principale concerne des cribles à haut débit de façon automatisée de molécules d'intérêt thérapeutique qui seront ensuite étudiées en modèle murin puis chez l'homme.

Les PDX, patient-derived xenografts

MOLECULAR ONCOLOGY 7 (2013) 625–636

Patient-derived xenografts recapitulate molecular features of human uveal melanomas

Le mélanome uvéal se développe au dépend des cellules pigmentées issues de la crête neurale et localisées dans la choroïde (réseau vasculaire tapissant le fond de l'oeil) et l'iris. L'analyse de ces tumeurs a permis de montrer que 50% des patients développeront des métastases hépatiques. Deux classes de tumeurs ont pu être identifiées : classe 1 peu métastatique, classe 2 très métastatique. Dans tous les cas et quelle que soit la classe, des mutations activatrices dans les gènes GNAQ et GNA11 (codant les sous unité alpha des protéines G trimériques) sont responsables de l'installation de la tumeur dans l'oeil due à l'activation de la voie de signalisation MAPkinase. Des mutations inactivatrices affectant le gène BAP1 (BRCA1 associated protein et codant une déubiquitine) sont retrouvées dans 80% des tumeurs qui métastasent.

Des cellules provenant de mélanome uvéaux (ou de leurs métastases) sont greffées à des souris immunodéprimées qui permettent la croissance de tumeurs, sans que le système immunitaire n'induisse de rejet de greffe (ce qui pourrait faire croire à tort que les cellules tumorales sont incapables de croître dans un organisme receveur). Les tumeurs observées dans les souris (P1) sont ensuite regreffées dans de nouvelles souris receveuses (jusqu'à 5 passages « souris à souris » : P2 à P5). Au fur et à mesure, la xénogreffe est de plus en plus stable. Le temps de croissance de la tumeur est variable, en moyenne 2 mois après la greffe. Une analyse des mutations existant dans la tumeur du patient (P) et la xénogreffe (X) est réalisée (Table1, le signe - indique une perte, + un gain ; MP tumeur primaire, MM métastase)

Models	Gene mutations					
	GNAQ		GNA11		BAP1	
	P	X	P	X	P	X
MP34	0	0	+	+	0	0
MP38	+	+	0	0	+	+
MP41	0	0	+	+	0	0
MP42	0	0	+	+	+	+
MP47	0	0	+	+	+	+
MP55	0	0	+	+	+	+
MP65	0	0	+	+	+	+
MP71	+	+	0	0	0	0
MP77	0	0	+	+	0	0
MP80	0	0	+	+	0	0
MM26	+	+	0	0	0	0
MM33	+	+	0	0	0	0
MM52	0	0	0	0	+	+
MM66		0		+		0
MM74	0	0	+	+	+	+

Question1 : Quelles conclusions tirez vous de la comparaison des altérations entre les tumeurs de patients et les xénogreffes ?

Les anomalies chromosomiques classiquement reportées dans ces tumeurs ont également été recherchées dans les tumeurs des patients (Figure 1 A) et dans les tumeurs des souris greffées (Figure 1B). Cette analyse est réalisée via des puces à SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) qui permettent de détecter des pertes et gains de nucléotides polymorphes sur tout le génome. Les valeurs indiquent le pourcentage de gains et pertes observés dans 12 tumeurs de patients (7 tumeurs oculaires et 5 métastases hépatiques) et les 23 xénogreffes correspondantes (18 à P1 et 5 à P5). En rouge, les gains, en vert les pertes.

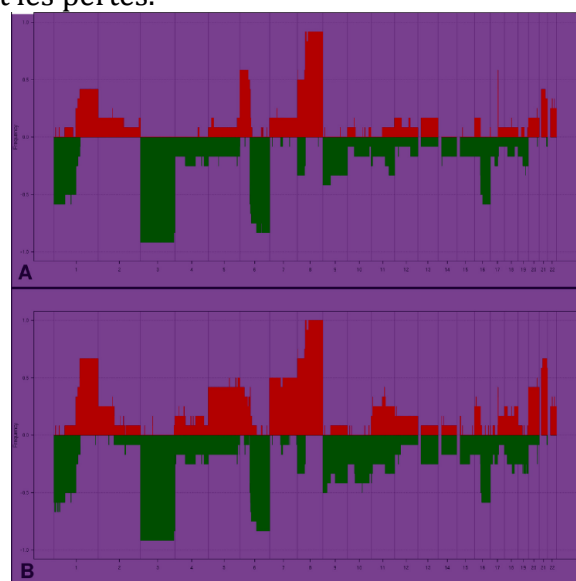


Figure 1

Question 2 : Que pouvez vous dire de la stabilité du génome des tumeurs xénogreffées ?
Assiste t-on à une instabilité génomique dans ces tumeurs ?

Une analyse du transcriptome des ces tumeurs est ensuite réalisée à l'aide de puces Affymetrix et les données d'expression des gènes utilisées pour classer les tumeurs en fonction de leur proximité transcriptionnelle (les tumeurs reliées par les branches sont les plus semblables, voir le code couleur) (Figure 2).

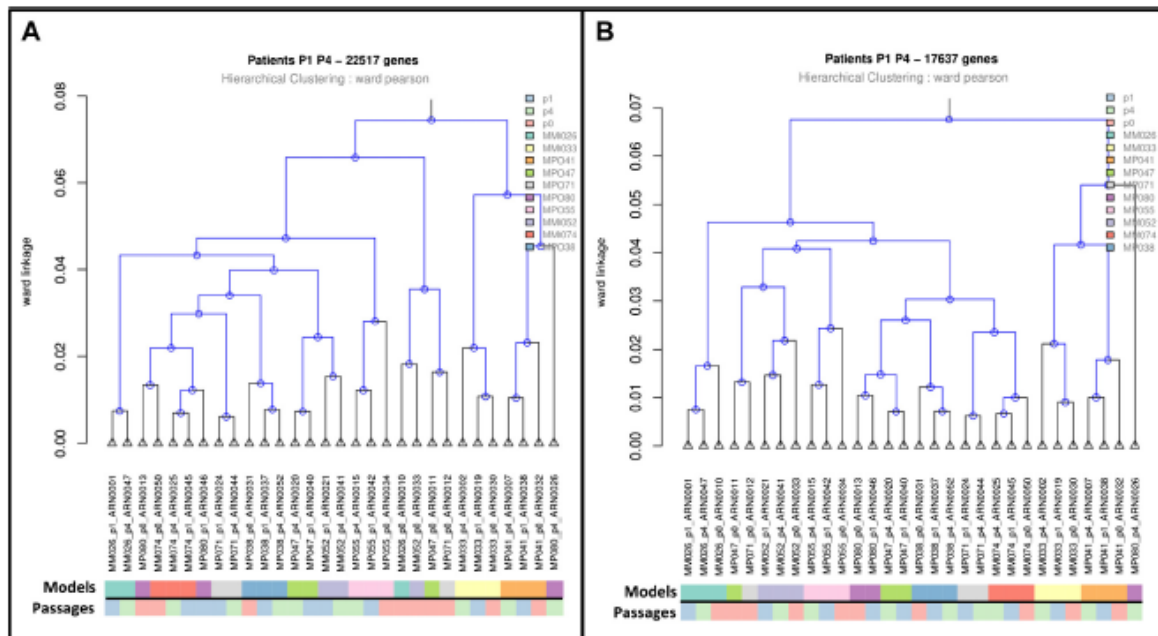
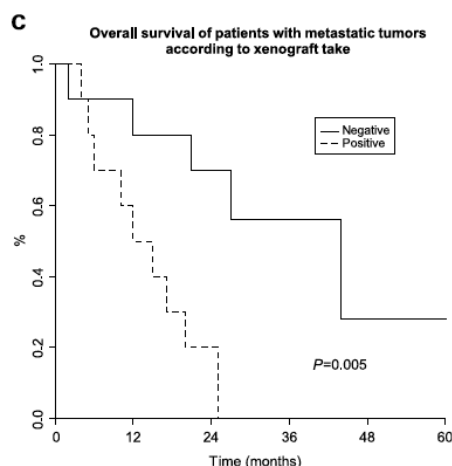


Figure 2 – Gene expression study. A. Hierarchical clustering of paired patient tumors (p0) and corresponding xenografts passages 1 (p1) and 4 (p4). Hierarchical clustering was based on 22,517 genes of array. B. Hierarchical clustering of paired patient tumors (p0) and corresponding xenografts, passages 1 (p1) and 4 (p4). Clustering was based on 17,637 genes (genes remaining after excluding genes from immune system, extracellular matrix and angiogenesis). Pearson's correlation as metric to measure the distance between pairs of observations and Ward's method as linkage criterion to measure the distance between sets of observations as a function of the pairwise distances between observations were used. Samples were cluster together based on transcriptomic profiles. The shorter were the branches the more similar the samples. Color code distinguished models and passages: On the first line, each sample from the same model has the same color code, On the second line, patients (p0) are in orange, xenografts p1 in blue and xenografts p4 in green.

Question 3 : Quelles conclusions pouvez vous tirer de ces résultats concernant la stabilité des xénogreffes?

Afin de savoir si la croissance ou non d'une tumeur greffée à une souris pouvait être un argument pronostic, la survie des patients prélevés est étudiée (Figure 3).



Clin Cancer Res; 16(8) April 15, 2010

Figure 3
Negative : courbe correspondant à la survie des patients dont la tumeur greffée n'a pas grossi
Positive : courbe correspondant à la survie des patients dont la tumeur greffée a grossi

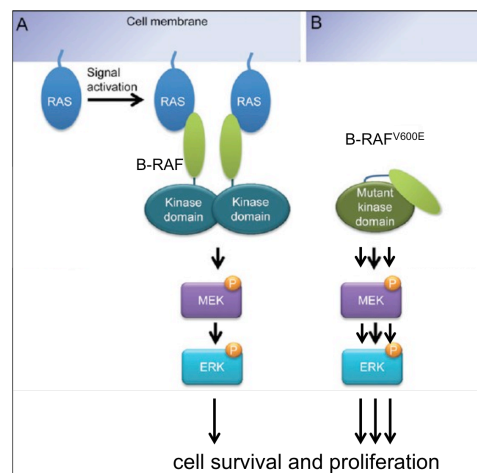
Question 4 : Quelle conclusion générale tirez vous de ces travaux ?

Les modèles transgéniques

GENES & DEVELOPMENT 21:379-384 © 2007

A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of *BRAF*^{V600E}-induced lung tumors

La mutation V600E de la protéine BRAF conduit à l'activation constitutive de la voie MAPkinase et est observée dans de nombreux cancers, spécifiquement dans le développement de cancers du poumon. 3% des tumeurs spontanées de NLCC (non-small cell lung cancer) présentent des mutations dans le gène BRAF.



Afin d'étudier le rôle de *BRAF*^{V600E} in vivo dans les cellules du poumon, des souris sont modifiées par transgénèse, afin d'introduire un allèle compact du gène BRAF (les séquences des exons 15 à 18 provenant d'un cDNA) en amont d'une cassette d'un gène codant un antibiotique (ce qui donne un marqueur dominant), l'ensemble étant flanqué de séquences Lox (triangle noir Targeted allele). La séquence de l'exon 15 donnant lieu à la mutation V600E est insérée en aval (Figure 1B, *BRAF*^{CA}). Ainsi, en utilisant la recombinaise CRE, les séquences nucléotidiques présentes entre les séquences Lox seront délétées et le gène *BRAF*^{V600E} sera exprimé (Figure 1C, *BRAF*^{VE}). En l'absence de la CRE, la protéine issue de l'allèle modifié *BRAF*^{CA} ne présentera pas d'anomalie.

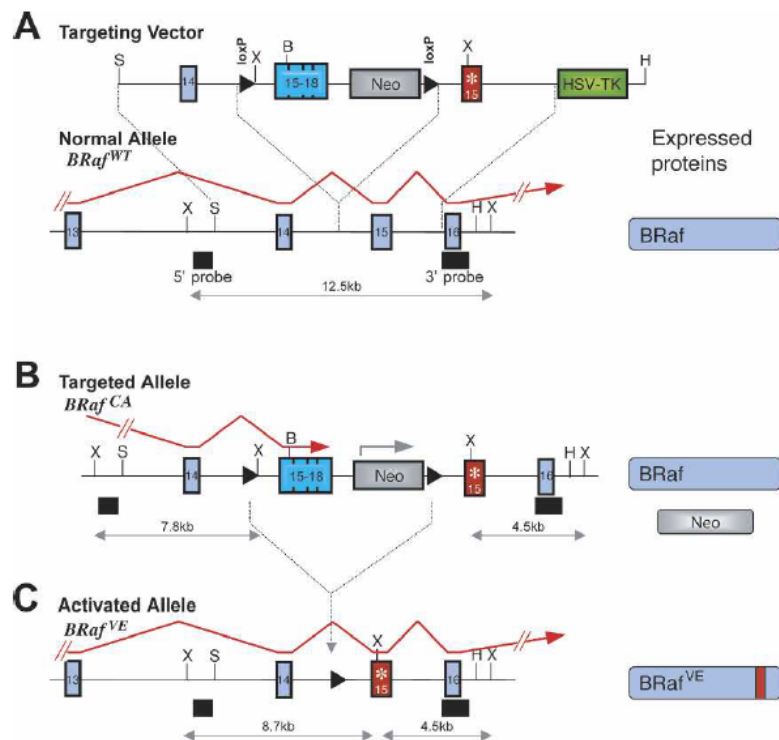


Figure 1

La recombinaise CRE est introduite dans le poumon en faisant inhaler aux souris une solution d'adénovirus infectieux, codant à partir de leur génome la recombinaise CRE. L'introduction de la CRE uniquement dans le poumon, permettra l'expression du gène *BRAF^{V600E}* spécifiquement dans ce tissu. La présence de l'allèle remanié est observée par PCR à l'aide d'oligonucléotides diagnostiques et par l'utilisation d'enzymes de restriction. Les poumons de souris ayant inhalé un adénovirus contrôle (figure 2C, gauche) ou un adénovirus exprimant la recombinaise CRE (Figure 2C, droite et Figure 2D) sont prélevés. Des coupes histologiques des poumons sont effectuées (Figure 2F, adénovirus contrôle ; Figure 2G, adénovirus CRE) et illustrent la densité cellulaire. En G, les amas de cellules colorés sont diagnostiqués comme étant ceux d'un adénome. Un adénome est un état précancéreux, présentant une prolifération cellulaire importante.

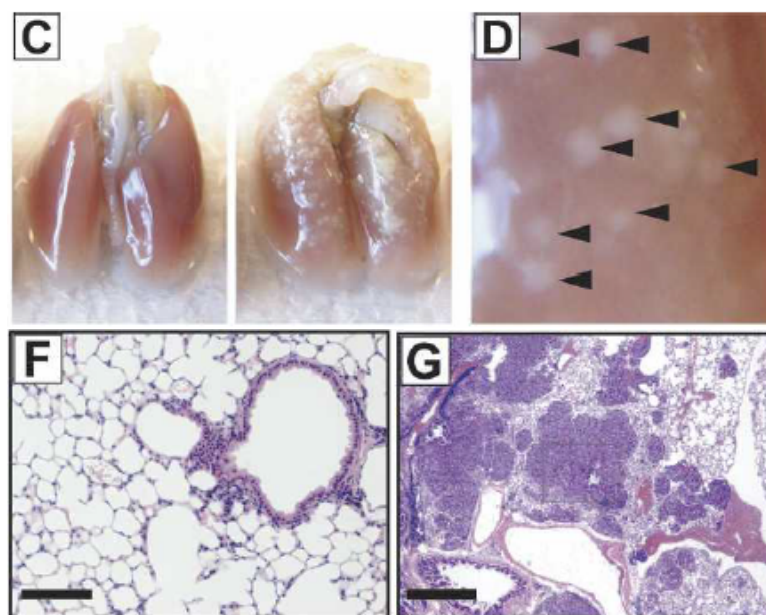


Figure 2

Question 5 : Pourquoi ces zones d'hyperprolifération ne sont elles vues que dans le poumon ?

L'analyse des marqueurs de prolifération indique que, 14 jours après infection par l'adénovirus CRE, les adénomes pulmonaires arrêtent de proliférer et présentent des signes de sénescence. Chez des souris dont le gène codant la protéine p53 est également encadré par des séquences Lox, l'inhalation de l'adénovirus CRE conduit à l'apparition de lésions pulmonaires caractérisées histologiquement comme des carcinomes qui n'arrêtent pas de proliférer (Figure 3).

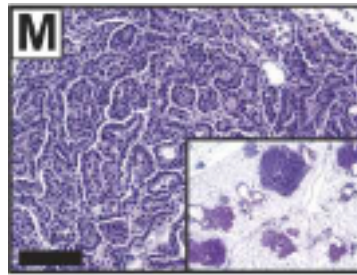


Figure 3

Question 6 : pourquoi des carcinomes ne se développent t-ils pas en présence de p53 ?

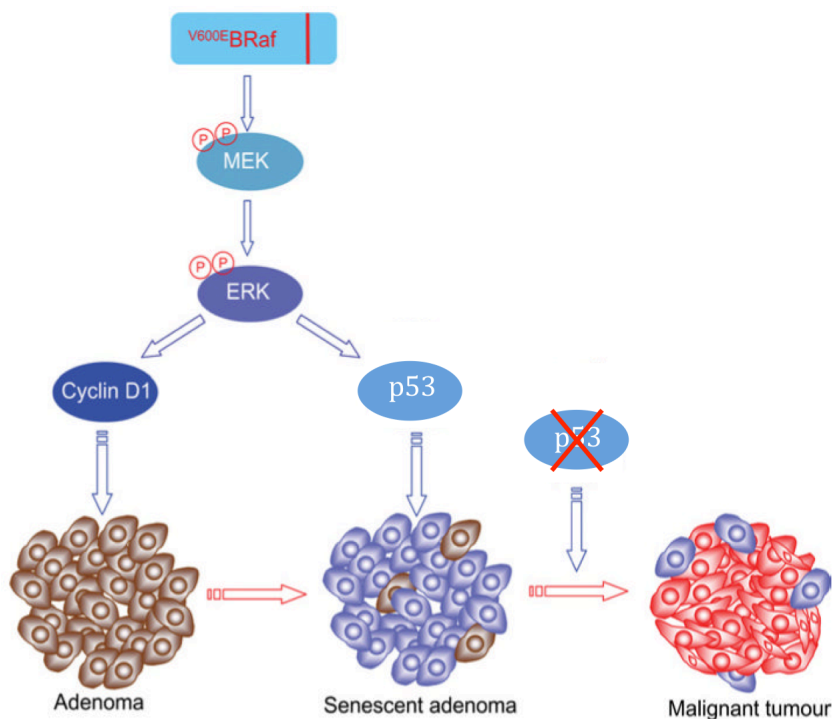


Figure 4

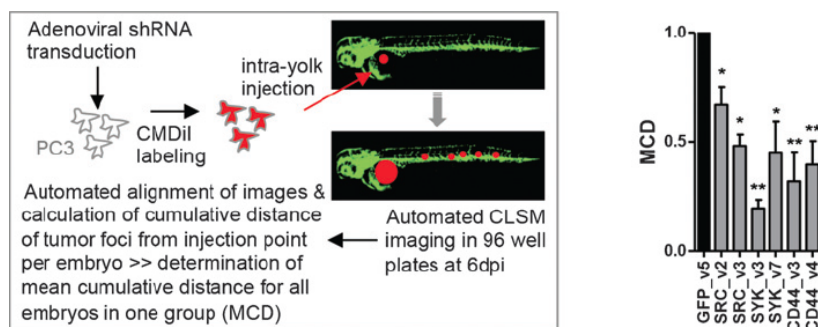
Commentez la figure récapitulative (Figure 4), en présentant l'activité des différents acteurs moléculaires.

Le poisson zèbre

Cancer Res; 75(1) January 1, 2015

SYK Is a Candidate Kinase Target for the Treatment of Advanced Prostate Cancer

Le cancer de la prostate est le plus fréquent chez l'homme et la seconde cause de mortalité. 40% des patients portent des micrométastases indétectables qui vont se révéler par la suite, donc l'identification des protéines impliquées dans la migration de des cellules de ce cancer pourrait apporter un avantage thérapeutique. Une expérience d'analyse à haut débit automatisée est réalisée sur un modèle animal, le poisson zèbre. Le modèle expérimental consiste à introduire dans le vitellus du poisson les cellules cancéreuses marquées par un traceur fluorescent et de suivre leur migration en microscopie à fluorescence (le poisson est transparent). Parallèlement, une banque de vecteurs codant des siRNA dirigés contre de nombreux gènes d'intérêt est co-injectée dans les poissons. L'objectif est d'identifier un siRNA réduisant la migration cellulaire. Les poissons sont élevés dans des plaques 96 puits, et chaque puits reçoit un vecteur codant un siRNA différent. La mean cumulative distance (MCD) mesure l'effet de l'expression du siRNA sur la migration cellulaire (Figure 1B).



Un exemple des résultats expérimentaux obtenus est présenté ci-dessous.

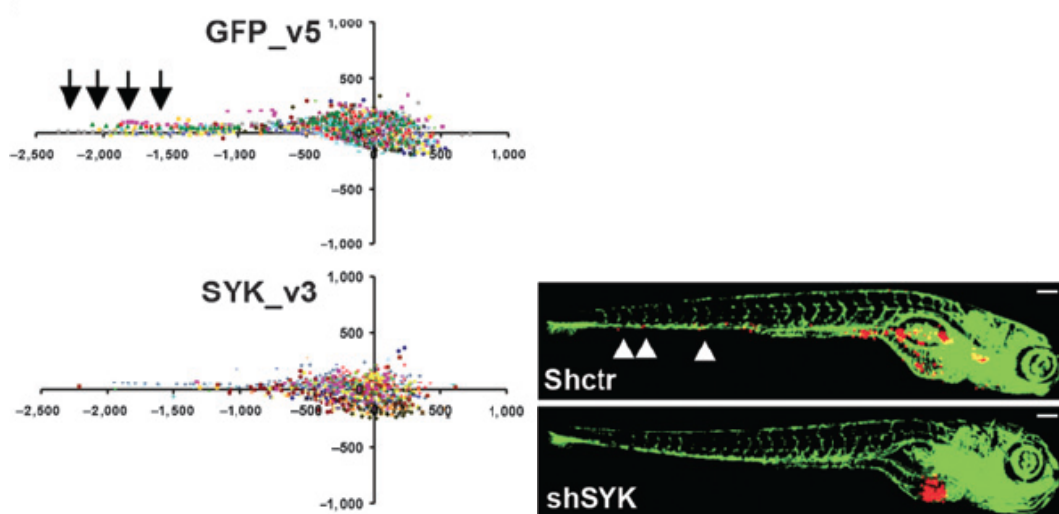


Figure 1

Question 7 : Qu'observez vous ? Que concluez vous concernant la protéine SYK (tyrosine kinase) ?

Les cellules de cancer de la prostate et leurs métastases expriment la protéine SYK, ce qui peut être montré par immunohistochimie.

Afin de s'assurer dans un modèle mammifère que l'extinction du gène SYK pouvait également affecter la migration des cellules de cancer de la prostate, des cellules tumorales exprimant le gène de la luciférase sont injectées à des souris immunodéprimées. L'administration de luciférine et l'émission de lumière en résultant permet de visualiser et quantifier les cellules cancéreuses in vivo. L'intensité lumineuse émise est donc proportionnelle à la taille de la tumeur. Les cellules cancéreuses injectées étaient par ailleurs transfectées par un vecteur codant pour les éléments suivants :

- soit un shRNA contrôle (shCTR)
- soit un shRNA dirigé contre SYK (shSYK)
- soit un shRNA dirigé contre SYK + la protéine SYK dont les séquences régulatrices du 5'UTR avaient été modifiées afin que le shSYK ne puisse pas inhiber sa traduction.

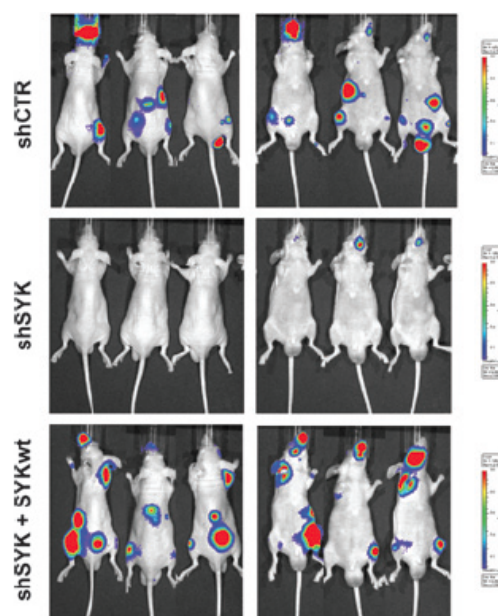


Figure 2

Question 8 : Que déduisez vous de ces résultats ?

Afin de progresser dans le développement d'un traitement, une molécule (BAY 61-360) développée pour traiter des maladies auto-immunes (la kinase SYK est importante dans la fonction des cellules du système immunitaire) est utilisée dans le modèle du poisson zèbre afin d'étudier son efficacité sur la dispersion métastatique.

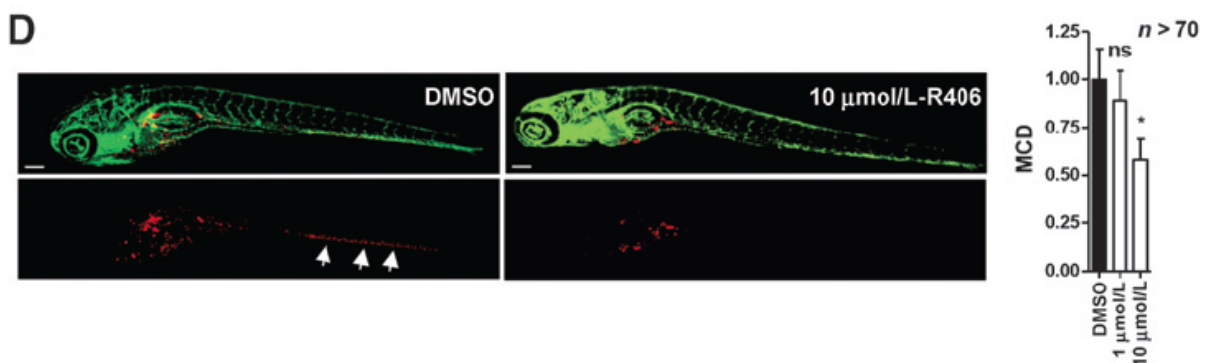


Figure 3

Question 9: Que suggèrent ces résultats ?