

► Le développement de drogues anti-cancéreuses à visée thérapeutique nécessite leur évaluation. Ces drogues candidates sont généralement testées *in vitro*, sur des lignées cellulaires ou sur des cellules isolées à partir de patients, et, *in vivo*, dans des modèles de xéno greffe chez la souris immunodéprimée. Depuis quelques années, les contraintes réglementaires (règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer) imposent de mettre en place des modèles alternatifs qui se substituent aux modèles murins ou, au moins, en limitent l'utilisation. Parmi les modèles alternatifs proposés, la greffe sur membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poule semble performante. Elle permet de suivre et de quantifier la croissance tumorale et d'autres paramètres associés, comme la néo-angiogenèse, l'invasion et la migration tumorales. Elle permet aussi le criblage de drogues. Ce modèle semble également adapté à la médecine personnalisée en cancérologie. Nous présentons dans cette revue la technique et ses avantages. ◀

Le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poule

Intérêt du modèle en cancérologie

Les premières greffes de cellules cancéreuses *in vivo* sur membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poule ont été décrites au début du XX^e siècle par James B. Murphy et Francis P. Rous¹ [1]. Rous, avec l'aide de son assistant Murphy, à l'Institut Rockefeller aux États-Unis, réussirent à obtenir des tumeurs solides des tissus conjonctifs (sarcomes) chez des poulets sains à partir d'un filtrat acellulaire d'une tumeur aviaire.

Vignette (© Brigitte Sola)

¹ 1966, soit cinquante-sept ans après sa découverte, le prix Nobel de physiologie ou médecine est attribué à Francis P. Rous.

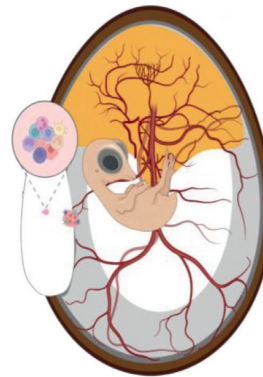
Modèles alternatifs (11)

Une série animée par Thierry Jouault

L'embryon de poule

Un modèle préclinique alternatif en cancérologie

Brigitte Sola, Mélody Caillot



Normandie Univ, Inserm U1245, université de Caen, F-14000, Caen, France.

brigitte.sola@unicaen.fr

Ce n'est que beaucoup plus tard, au cours des années 1980, que la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) a recommencé à être utilisée par les chercheurs, mais comme modèle d'étude *in vivo* du développement des vaisseaux sanguins. Ce modèle permet en effet d'analyser les propriétés pro- ou anti-angiogéniques de certaines drogues [2]. Il a par ailleurs été utilisé dans de nombreux autres domaines : la bio-ingénierie tissulaire, les biomatériaux, les maladies vasculaires, la pharmacologie (études de pharmacocinétique, de biodistribution, de pénétration, etc.) et en infectiologie. Mais ce n'est que récemment que cette technique a trouvé un nouvel essor dans le domaine de la biologie du cancer. Elle est en effet de plus en plus utilisée comme modèle préclinique pour le criblage de drogues, administrées de façon conventionnelle, ou vectorisées [3-7].

Le principe de la technique est simple. Il repose sur la greffe de cellules tumorales humaines (issues de lignées cellulaires ou de cellules primaires isolées de patients) sur la CAM supérieure de l'œuf de poule, un tissu extra-embryonnaire entourant l'embryon en cours de développement. La CAM est richement vascularisée ; elle permet l'apport de nutriments et les échanges gazeux de l'embryon. Elle favorise ainsi la croissance des cellules tumorales qui y ont été greffées [8]. Le réseau vasculaire de la CAM supérieure permet aussi la dissémination des cellules tumorales hors de cette dernière. L'embryon de poule est en effet immunodéficient. Son système immunitaire ne se met en place qu'à partir du dixième jour de développement (J10) et n'est complètement opérationnel qu'au dix-huitième jour (J18) [9, 10], ce qui permet de greffer des tumeurs solides et hématologiques au cours de cette période, sans induire de réponse immunitaire. Ce modèle reproduit par ailleurs fidèlement les étapes du processus métastatique que sont l'invasion, la migration, la néo-angiogenèse et la colonisation à

distance [11, 12]. Il permet en outre la croissance de la tumeur au sein d'un microenvironnement tumoral dont on connaît l'importance dans les processus de transformation et dans la dynamique de croissance de la cellule tumorale elle-même.

Le protocole

Le protocole suivi généralement par les laboratoires est présenté dans la *Figure 1*. Ce protocole est simple à appliquer et peu coûteux. Des œufs fertilisés de poule sont incubés à 37,5°C dans une atmosphère humide, pendant neuf jours, ce qui permet le développement de l'embryon et la maturation de la CAM. L'expérimentateur découpe alors la coquille de l'œuf et abaisse légèrement la CAM afin de former une petite niche susceptible de recevoir les cellules tumorales qu'il souhaite implanter. Les cellules cancéreuses sont déposées sur la membrane, soit directement, soit après avoir été mélangées à un milieu semi-solide matriciel (de type *Matrigel*). Deux jours après la greffe, les cellules tumorales sont parfaitement visibles et la croissance tumorale est engagée. Les expériences sont généralement arrêtées à J18, avant l'éclosion des poussins, qui a lieu à J21. Selon les analyses qui seront effectuées, soit seule la tumeur sera prélevée et analysée, soit l'embryon sera isolé et autopsié. Certains de ses organes seront alors prélevés (la rate, le foie, la moelle osseuse), ainsi que la CAM inférieure, afin d'être analysés. Les techniques habituelles dédiées à l'analyse des tumeurs obtenues *in vivo* peuvent être mises en œuvre dans ce modèle : l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence, la cytométrie en flux, les analyses génétiques par PCR (*polymerase chain reaction*) ou les analyses de protéines par *western blot* ; des techniques à haut débit, dites « omiques » peuvent également être employées. Les cellules tumorales peuvent aussi être marquées, avant leur greffe, par des sondes fluorescentes à longue durée de vie (l'expérience durant un certain temps), ce qui permet l'imagerie de la greffe au cours du temps, par vidéomicroscopie [13]. Les cellules greffées peuvent aussi être transfectées par des plasmides ou infectées par des lentivirus exprimant le gène codant la luciférase afin de suivre la croissance de la tumeur par bioluminescence [14]. L'imagerie par ultrasons permet le suivi en trois dimensions (3D) de la croissance tumorale mais aussi des processus angiogéniques [15]. L'institut Roslin, à l'université d'Édimbourg (Écosse, Royaume-Uni), a d'ailleurs créé des lignées de poule génétiquement modifiées dans lesquelles les cellules expriment de façon ubiquitaire des formes cytoplasmiques ou membranaires de protéines fluorescentes, comme la *green fluorescent protein* (GFP) ou la *red FP* (*TdTomato*)². De fait, de nombreuses techniques sont utilisables dans ce modèle pour analyser les tumeurs greffées, y compris au cours du temps, afin d'examiner leur évolution.

Un modèle d'étude de l'efficacité des drogues

En dépit de remarquables avancées dans la compréhension des événements moléculaires, en particulier des mutations somatiques, responsables de la prolifération et de la progression tumorales, certaines thérapies en développement se révèlent malheureusement souvent inefficaces

lors des essais cliniques chez les malades. En effet, les biomarqueurs qui sont utilisés ne permettent pas encore une stratification de ces patients qui soit adéquate selon leur susceptibilité aux traitements et donc de prédire leur réponse. Ces dernières années, les données expérimentales, accumulées grâce aux techniques de biologie moléculaire à haut débit, ont confirmé l'hétérogénéité tumorale au sein d'un même sous-type de tumeur et de la tumeur elle-même, expliquant certains échecs thérapeutiques et la survenue de mécanismes de résistance des tumeurs aux traitements. En reproduisant l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale ainsi que les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement tumoral, les modèles de xénogreffe de tumeur dérivée de patients (PDX pour *patient-derived xenograft*) favorisent en fait la dynamique clonale de la tumeur d'origine. Les PDX conservent en effet leur architecture 3D et reproduisent les interactions (coopération et compétition) entre cellules tumorales, cellules stromales et microenvironnement [16, 17]. Le modèle CAM apparaît comme parfaitement adapté à la greffe de PDX provenant de cancers solides et d'hémopathies malignes [18-20]. Les données de la littérature confirment en effet que les greffes de cellules primaires dérivées de patients sur les CAM sont aussi efficaces que les greffes de lignées cellulaires, les tumeurs qui se développent sur la CAM conservant les caractéristiques de la tumeur initiale, en particulier leur hétérogénéité. Comme chez la souris, les tumeurs issues des PDX peuvent être prélevées à partir des greffes originales puis greffées sur de nouvelles CAM. Cela permet de reproduire la dynamique clonale de l'évolution de la tumeur. La longévité des PDX après plusieurs greffes sur de nouvelles CAM (c'est-à-dire le nombre de passages des PDX) reste néanmoins inconnue et la durée de chaque expérience étant courte (sept jours), elle pourrait ne pas être suffisante pour observer la survenue de mécanismes secondaires permettant une sélection clonale (de type darwinien) des cellules tumorales. En revanche, l'hétérogénéité intra-tumorale peut être reproduite sur les CAM. Différentes biopsies provenant de la même tumeur peuvent en effet être greffées indépendamment et simultanément, et suivies au cours du temps [18]. Cultivées de façon indépendantes, ces xénogreffes sur CAM permettent ainsi de tester des drogues, en monothérapie ou en associations, qui peuvent être adaptées à l'hétérogénéité de la tumeur elle-même, dans la perspective d'une médecine personnalisée. La courte durée de ces expériences est un atout et des banques de PDX réalisées sur des CAM, similaires à celles qui existent chez la souris, pourraient être développées et ainsi aider la recherche³.

² <https://www.ed.ac.uk/roslin/national-avian-research-facility/avian-resources/>

³ *PDX Finder: A portal for patient-derived tumor xenograft model discovery.* <https://doi.org/10.1101/291443>.

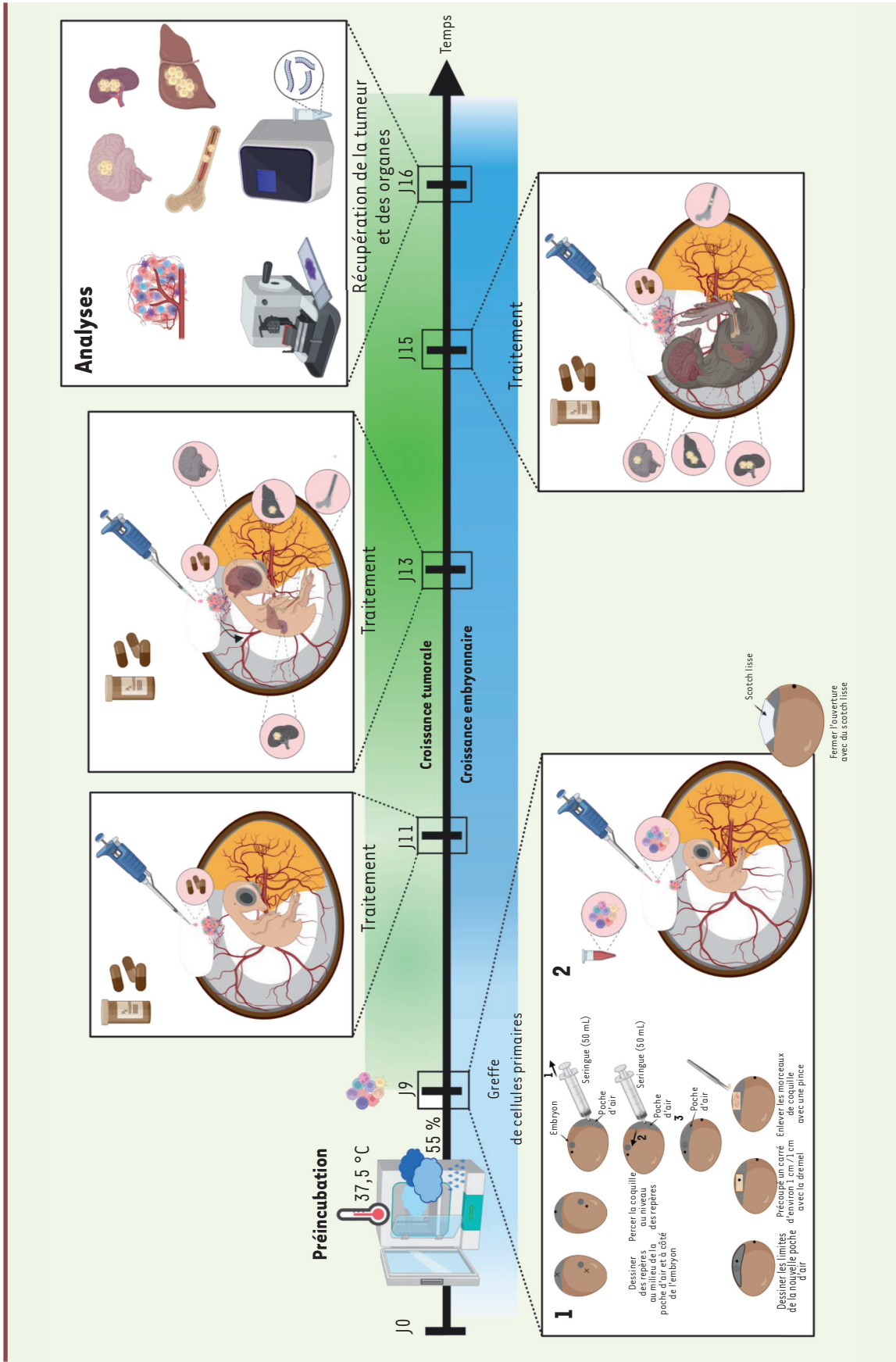


Figure 1. Protocole de greffe sur CAM et test de l'efficacité d'une drogue. Les œufs de poule fécondés sont incubés pendant une période de neuf jours dans une couveuse à 37,5 °C, avec un degré d'humidité de 55 % et sous agitation constante et douce. Au J9 de développement, la coquille est découpée soigneusement afin de découvrir la CAM sur laquelle sont déposées directement les cellules tumorales, seules ou mélangées à du Matrigel. Dès J11, la tumeur est visible et les drogues à tester peuvent être déposées directement dessus, tous les deux jours jusqu'à J15. À J16, la tumeur est prélevée pour être analysée par les techniques habituelles ; si nécessaire, certains organes de l'embryon et la CAM inférieure peuvent être prélevés et analysés.

Un modèle d'étude de l'efficacité des drogues ciblant le système immunitaire

Les tumeurs sont des écosystèmes complexes dans lesquels les cellules cancéreuses établissent un dialogue dynamique avec leur microenvironnement constitué de matrice extracellulaire et de plusieurs types de cellules, dont les cellules stromales et les cellules immunitaires [21]. Ce microenvironnement tumoral complexe module la croissance de la tumeur et sa réponse aux drogues anti-tumorales [22]. Une des limitations majeures des modèles de xénogreffe chez la souris immunodéprimée est la difficulté de tester l'effet d'immunomodulateurs ou d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Le recours à des souris humanisées, dans lesquelles on rétablit un système immunitaire par injection de cellules souches CD34⁺ dérivées de sang de cordon (hu-CD34-NSG), ou de cellules mononucléées de sang périphérique (hu-PBMC-NSG), est très contraignant, pour des raisons de temps et de coût. Cette technique ne règle pas, de plus, les problèmes éthiques liés à l'utilisation de mammifères [23]. Peu de données sont disponibles concernant les effets de drogues ciblant le système immunitaire (immunomodulateurs ou inhibiteurs de points de contrôle immunitaire) dans le modèle de CAM [24]. Cependant, la cinétique de la maturation du système immunitaire chez l'embryon de poule et les différences et similitudes des systèmes immunitaires humain et aviaire sont connus [25]. Le thymus (impliqué dans la maturation des lymphocytes T) et la bourse de Fabricius (responsable de la lymphopoïèse des lymphocytes B chez l'oiseau)⁴ ne se mettent en place, chez la poule, qu'à partir des J3 et J4 du développement, et ne sont fonctionnels, respectivement, qu'à J13 et J18. Parallèlement, les lymphocytes T apparaissent à J10. Mais ils ne sont immunocompétents qu'à partir de J18. Les lymphocytes B apparaissent à J12 et, comme les lymphocytes T, ne sont immunocompétents qu'à J18. Cette immunoincompétence permet donc la greffe des cellules humaines et ainsi la croissance des tumeurs provenant des patients. Mais aux jours J10-15 du développement embryonnaire de l'oiseau, les cellules hétérophiles (les analogues aviaires des neutrophiles) et les monocytes, les cellules inflammatoires présentes et susceptibles d'infiltrer les xénogreffes, pourraient provoquer des réactions inflammatoires non spécifiques [26]. Ces différentes cellules peuvent mimer ce qui survient dans le compartiment non tumoral de la tumeur (son microenvironnement), c'est-à-dire l'infiltration de la tumeur par des cellules immunitaires, notamment par des macrophages, par des cellules mésenchymateuses, et par des fibroblastes [21]. Dans le système de xénogreffe de cellules de lymphome de Burkitt réalisée sur la CAM, les tumeurs qui se développent sont infiltrées par des macrophages, des lymphocytes et des hétérophiles aviaires [27], ce qui reproduit les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement tumoral. Comme cela a été suggéré par l'étude du développement du système immunitaire de l'embryon de poule [25], le modèle CAM serait donc probablement pertinent pour étudier l'efficacité des drogues ciblant le système immunitaire et des immunomodulateurs.

⁴ Chez l'homme, la lymphopoïèse B a lieu dans la moelle osseuse, comme la lymphopoïèse T.

Conclusion

Le modèle CAM semble un modèle alternatif puissant capable de se substituer, au moins en partie, aux modèles murins. En effet, il peut facilement être utilisé pour mettre en place de véritables plateformes de tests diagnostiques et théranostiques, en association avec des techniques à haut débit (transcriptomique, protéomique, métabolomique, etc.) qui semblent actuellement indispensables à la caractérisation des tumeurs. Seule la durée courte des expériences, qui est par ailleurs un atout dans la perspective d'une médecine personnalisée, limite l'étude de l'évolution des tumeurs dans le temps, ainsi que la réponse à long-terme des tumeurs aux drogues. En revanche, il permet d'obtenir rapidement des données quantifiables sur l'efficacité des drogues, leur toxicité sur les organes embryonnaires, et leur bio-distribution. Certes, des données complémentaires restent nécessaires à acquérir pour mieux connaître : (1) les interactions des tumeurs avec leur microenvironnement, interactions qui se mettent en place lors de la croissance de la greffe, ainsi que (2) les remaniements de la membrane chorio-allantoïdienne lorsque celle-ci est au contact de la tumeur.

Le modèle CAM reste peu coûteux et simple à mettre en œuvre, puisqu'il ne nécessite pas d'animalerie dédiée et que, au moins en France et en Europe, les protocoles expérimentaux faisant appel aux œufs de poule ne doivent pas être approuvés par un comité d'éthique... ♦

SUMMARY

The hen embryo: An alternative preclinical model in cancer

For therapeutic purposes, the development of new anti-cancer drugs requires their evaluation in terms of activity, cytotoxicity and pharmacokinetics. The candidate drugs are tested *in vitro* on cell lines and primary cells isolated from patients, and *in vivo*, often, using xenografts in immuno-compromised mice. In recent years, administrative constraints have become increasingly stringent and the 3R rule (reduce, refine, replace) requires the elaboration of alternative models capable to replace mouse models or at least to limit their use. Among them, xenograft on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM assay) seems particularly efficient. It makes it possible to monitor and quantify tumor growth and tumor-associated parameters such as neoangiogenesis, invasion and migration. It allows the screening of drugs effective both on tumor cells and their microenvironment. Finally, the model seems adapted to the development of personalized medicine to which current research in cancerology is tending. In this context, this review focuses on the technique itself and its advantages. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Murphy JB, Rous P. The behaviour of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *J Exp Med* 1912 ; 15 : 119-32.
2. Chen L, Wang S, Feng Y, et al. Utilisation of chick embryo chorioallantoic membrane as a model platform for imaging-navigated biomedical research. *Cells* 2021 ; 10 : 463.
3. Fraguas-Sánchez AI, Martín-Sabroso C, Torres-Suárez AI. The chick embryo chorioallantoic membrane model : a research approach for ex vivo and in vivo experiments. *Curr Med Chem* 2022 ; 29 : 1702-17.
4. Leupold JH, Patil N, Allgayer H. The chicken egg chorioallantoic membrane (CAM) model as an in vivo method for the investigation of the invasion and metastasis cascade of malignant tumor cells. *Methods Mol Biol* 2021 ; 2294 : 17-26.
5. Pawlikowska P, Tayoun T, Oulhen M, et al. Exploitation of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) as a platform for anti-metastatic drug testing. *Sci Rep* 2020 ; 10 : 16876.
6. Schneider-Stock R, Ribatti D. The CAM assay as an alternative in vivo model for drug testing. *Handb Exp Pharmacol* 2021 ; 265 : 303-23.
7. Mapanao AK, Che PP, Sarogni P, et al. Tumor grafted - chick chorioallantoic membrane as an alternative model for biological cancer research and conventional/nanomaterial-based theranostics evaluation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2021 ; 17 : 947-68.
8. Mangir N, Raza A, Haycock JW, et al. An improved in vivo methodology to visualise tumour induced changes in vasculature using the chick chorionic allantoic membrane assay. *In vivo* 2018 ; 32 : 461-72.
9. Janković BD, Isaković K, Lukić ML, et al. Immunological capacity of the chicken embryo. I. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo. *Immunology* 1975 ; 29 : 497-508.
10. Fellah JS, Jaffredo T, Nagy N, Dunon N. In : Chapter 3 - Development of the Avian Immune System. Editors: Schat KA, Kaspers B, Kaiser P. *Avian Immunology* (Second Edition). Cambridge (États-Unis) : Academic Press, 2014 : pp 45-63.
11. Maacha S, Saule S. Evaluation of tumor cell invasiveness in vivo: The chick chorioallantoic membrane assay. *Methods Mol Biol* 2018 ; 1749 : 71-7.
12. Ribatti D. The CAM assay in the study of the metastatic process. *Exp Cell Res* 2021 ; 400 : 112510.
13. Rovithi M, Avan A, Funel N, et al. Development of bioluminescent chick chorioallantoic membrane (CAM) models for primary pancreatic cancer cells: a platform for drug testing. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 44686.
14. Jefferies B, Lenze F, Sathe A, et al. Non-invasive imaging of engineered human tumors in the living chicken embryo. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 4991.
15. Eckrich J, Kugler P, Buhr CR, et al. Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Sci Rep* 2020 ; 10 : 18585.
16. Cassidy JW, Caldas C, Bruna A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts. *Cancer Res* 2015 ; 75 : 2963-8.
17. Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo murine-specific tumor evolution. *Nat Genet* 2017 ; 49 : 1567-75.
18. DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res* 2018 ; 8 : 1642-60.
19. Komatsu A, Matsumoto T, Saito T, et al. Patient derived chicken egg tumor model (PDcE Model): Current status and critical issues. *Cells* 2019 ; 8 : 440.
20. Chu PY, Pei-Fern Koh A, Antony J, Yun-Ju Huang R. Applications of the chick chorioallantoic membrane as an alternative model for cancer studies. *Cells Tissues Organs* 2022 ; 211 : 222-37.
21. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012 ; 21 : 309-22.
22. Tyner JW, Haderk F, Kumaraswamy A, et al. Understanding drug sensitivity and tackling resistance in cancer. *Cancer Res* 2022 ; 82 : 1448-60.
23. Ireson CR, Alavijeh MS, Palmer AM, Fowler ER, Jones HJ. The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *Br J Cancer* 2019 ; 121 : 101-8.
24. Al-Asmakh M, Bawadi H, Hamdan M, et al. Dasatinib and PD-L1 inhibitors provoke toxicity and inhibit angiogenesis in the embryo. *Biomed Pharmacother* 2021 ; 134 : 111134.
25. Garcia P, Wang Y, Viallet J, Macek Jilkova Z. The chicken embryo model: A novel and relevant model for immune-based studies. *Front Immunol* 2021 ; 12 : 791081.
26. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* 2016 ; 141 : 70-7.
27. Klingenberg M, Becker J, Eberth S, et al. The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer* 2014 ; 14 : 339.

TIRÉS À PART

B. Sola



Avec **m/s**, vivez en direct
les progrès et débats
de la biologie et de la médecine

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE M/S
CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Abonnez-vous sur
www.medecinesciences.org

