

**BONNES PRATIQUES À METTRE EN PLACE DANS LA CONCEPTION ET LA RÉALISATION DES
MODÈLES TUMORAUX HÉTÉROTOPIQUES, ORTHOTOPIQUES ET MÉTASTATIQUES DANS UN
CONTEXTE D'ÉTUDE D'EFFICACITÉ THÉRAPEUTIQUE À L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL**

(Recommandations vétérinaires entérinées par le CIIPA le 28 avril 2023)

Table des matières

1. DÉFINITIONS	2
2. GÉNÉRALITÉS	2
3. EXIGENCES ET RECOMMANDATIONS POUR LE DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES ANIMAUX EN CANCÉROLOGIE	3
3.1 Vérification de la lignée cellulaire et caractérisation moléculaire	3
3.2 Réalisation d'études pilotes préalables à l'optimisation du protocole expérimental final	4
3.3 Sélection des composés thérapeutiques, leur dosage et formulation	6
3.4 Procédure de transplantation de cellules tumorales	6
3.4.1 Modèles sous-cutanés hétérotopiques	6
3.4.2 Modèles orthotopiques	7
3.4.3 Modèles métastatiques	7
RÉFÉRENCES	8
ÉMISSION ET ENTÉRINEMENT	8

Un des piliers de la recherche biomédicale fondamentale et translationnelle consiste en la réalisation d'études rigoureuses et reproductibles. De même, la rigueur et la reproductibilité des projets *in vivo* permet d'augmenter la validité et la robustesse des données expérimentales obtenues ce qui s'inscrit dans une utilisation éthique des animaux en sciences en focalisant sur l'implémentation des 3Rs (remplacement, réduction et raffinement).

À la suite d'une demande du Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal, le Regroupement des vétérinaires responsables des animaux utilisés en recherche et enseignement à l'Université de Montréal (RVRARE) a produit ici une recommandation au sujet des bonnes pratiques à adopter lors de la conception et la réalisation de modèles tumoraux sous-cutanés (hétérotopiques), orthotopiques et métastatiques dans un contexte d'étude d'efficacité thérapeutique. Cette recommandation s'applique autant aux modèles de xénogreffe (incluant les xénogreffes dérivées d'un patient humain (PDX)) qu'aux modèles de greffes syngéniques.

Ces bonnes pratiques doivent être utilisées conjointement aux procédures localisées de fonctionnement (PNF) locales et aux recommandations de la direction de la prévention et de la sécurité-division SST dans chacune des installations des trois animaleries de l'Université de Montréal (DANI, FANI, PBIV), et cela, dans le cadre d'un protocole d'utilisation animale révisé et autorisé par le comité de protection animal local (CDEA ou CÉUA).

1. DÉFINITIONS

Modèles tumoraux hétérotopiques : Modèle impliquant l'implantation de cellules tumorales dans un site différent de leur site d'origine, le plus souvent dans l'espace sous-cutané.

Modèles tumoraux orthotopiques : Modèle impliquant l'implantation de cellules tumorales dans un tissu correspondant à leur site d'origine (ex : foie, prostate, cerveau, etc.).

Greffes syngéniques : Greffes dont les cellules tumorales sont implantées dans un animal ayant le même background génétique.

Xénogreffes : Greffe où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur.

Xénogreffe dérivée de la tumeur du patient (patient-derived xenograft) ou modèle PDX :

Cellules tumorales provenant du patient humain et qui sont greffées chez des souris immunodéprimées.

2. GÉNÉRALITÉS

L'objectif principal des expériences précliniques d'efficacité thérapeutique est d'évaluer l'efficacité potentielle d'un ou des composés dans différents types de cancers. Les modèles sous-cutanés hétérotopiques chez les rongeurs sont les plus fréquemment utilisés pour étudier l'efficacité thérapeutique de nouveaux agents anticancéreux. L'avantage des **modèles hétérotopiques** repose sur le fait que ceux-ci sont simples et

rapides à réaliser. Ils permettent l'implantation de tumeurs assez volumineuses et facilitent le suivi de la croissance tumorale via la mesure du volume tumoral par un simple pied à coulisse.

Malgré cela, ce type de modèle présente quelques désavantages à prendre en considération. Notamment, la tumeur étant localisée en sous-cutané, ce genre de modèle ne représente généralement pas avec fidélité l'interaction des cellules tumorales avec le stroma et le microenvironnement dans un contexte de maladie. Pour répondre à ces inconvénients, il existe également des **modèles animaux de tumeurs orthotopiques** qui ont l'avantage de représenter plus fidèlement le microenvironnement tumoral. Certains de ces modèles évoluent naturellement en métastases. Dans certains contextes de recherche (notamment si c'est le processus métastatique qui est étudié), un **modèle de métastases** peut être choisi ce qui implique généralement de disséminer une dose de cellules tumorales dans une cavité ou un espace circulatoire (intrapéritonéal, intraveineux ou intraosseux). L'imagerie médicale est souvent utilisée pour suivre l'évolution des tumeurs dans un modèle métastatique.

Deux grandes catégories de tumeurs peuvent être implantées : les tumeurs syngéniques et xénogéniques. Les **tumeurs syngéniques** ont l'avantage d'être facilement implantables chez des modèles de souris comme il s'agit de lignée tumorale de souris. Elles sont moins représentatives toutefois que les **tumeurs xénogéniques** qui elles proviennent la plupart du temps de patients humains. Ce type de tumeur requiert l'utilisation d'animaux immunodéficients qui sont coûteux et empêchent une analyse complète des processus immunologiques impliqués dans la réponse antitumorale.

Lorsque bien planifiés et réalisés dans les règles de l'art, ces types de modèles permettent d'obtenir des données robustes et reproductibles. De plus, il existe une grande variété de lignées cellulaires tumorales et lignées de souris disponibles et une base de données (littérature scientifique, données de l'industrie) facilement accessible.

3. EXIGENCES ET RECOMMANDATIONS POUR LE DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES ANIMAUX EN CANCÉROLOGIE

3.1 Vérification de la lignée cellulaire et caractérisation moléculaire

Objectifs :

1. Remplacement d'utilisation d'animaux par des analyses in vitro.
2. Maintenir des hauts standards de qualité des résultats de recherche.
3. Protéger le statut sanitaire des colonies d'animaux présentes au sein de l'Université de Montréal.

Moyens :

1. **Analyses in vitro préalables obligatoires** afin de vérifier les effets cytotoxiques (cible thérapeutique ou mécanisme d'action anticipé) du ou des composés thérapeutiques sur la lignée cellulaire sélectionnée pour l'implantation in vivo.
2. Toutes les lignées cellulaires doivent être rigoureusement **contrôlées pour leur provenance et leur identité génétique**.
3. Toutes les lignées cellulaires à implanter sur des animaux doivent être **testées pour certifier qu'elles sont exemptes de pathogènes murins** qui pourraient poser un risque pour la biosécurité des installations. La présence de pathogènes et particulièrement de mycoplasmes, un des contaminants les plus fréquents, peut causer une altération du métabolisme cellulaire, ralentir la prolifération et produire des aberrations chromosomiques ce qui a un lien direct et dévastateur sur la croissance

tumorale et par conséquent sur la validité et la reproductibilité des résultats expérimentaux. Lorsqu'en culture, les cellules doivent être testées régulièrement pour la présence de mycoplasmes. Un test précédant l'utilisation des cellules dans un modèle in vivo doit être fait de routine.

3.2 Réalisation d'études pilotes préalables à l'optimisation du protocole expérimental final

Objectifs :

1. Réduction et raffinement de l'utilisation des animaux (établir les suivis de santé et les points limites d'interventions éthiques).
2. Choisir la lignée de souris la plus adéquate pour un modèle donné.
3. Évaluer la cinétique de croissance des tumeurs dans les conditions du laboratoire.
4. Tester l'efficacité de la stratégie thérapeutique choisie.

Moyens :

1. Il est **obligatoire de réaliser un projet pilote préalable** à tout projet d'efficacité thérapeutique lorsqu'un nouveau modèle animal en cancérologie est utilisé par un laboratoire. En effet, bien qu'il existe une littérature abondante des différentes lignées cellulaires, des variations en condition d'hébergement (diète, luminosité, température, etc.), la lignée des souris (immunocompétente, immunosupprimée, humanisée, inbred, outbred ou congénique) ou même la provenance des animaux peuvent influencer la cinétique de croissance des tumeurs et l'efficacité de la stratégie thérapeutique étudiée.
2. Le projet pilote doit être réalisé de manière à tester différentes doses cellulaires (avec et sans matrice de support cellulaire) sur des groupes de cinq à dix souris. La croissance tumorale devrait être suivie sur une période de 30-60 jours de manière à caractériser la cinétique de la lignée tumorale et sa reproductibilité dans le contexte d'utilisation du laboratoire. Le projet pilote devrait aussi permettre de vérifier, voire quantifier la possibilité de régression tumorale spontanée. Lorsque détectée et fréquente, la présence de régression spontanée pourrait faire en sorte que la lignée cellulaire ne puisse pas être utilisée dans un contexte d'évaluation de l'efficacité thérapeutique.
3. L'utilisation d'un groupe contrôle positif lors de la réalisation du projet pilote pourrait être envisagée afin de confirmer la réponse au traitement potentielle dans le contexte expérimental proposé.
4. La réalisation d'un projet pilote permettra également d'établir la liste des effets indésirables observés et leur fréquence/cinétique d'apparition de manière à établir une liste exhaustive de points limites d'intervention éthique pour la réalisation des études subséquentes. En effet, certaines lignées tumorales ont tendance à croître rapidement, à nécroser ou à produire des lésions ulcéraives plus rapidement que d'autres. En plus des résultats du projet pilote, les PNF locales devront être respectées relativement au suivi des animaux et à la détermination des points limites d'intervention éthique.
5. L'ensemble de ces observations permettront de faire un choix éclairé de la fenêtre thérapeutique pour le traitement, en particulier, le début et la durée du traitement lors de la conception de l'étude d'efficacité subséquente.

- a. **Modèle de tumeur sous-cutanée** : Le design expérimental le plus courant implique d'injecter les cellules tumorales puis d'entreprendre un traitement expérimental lorsque la tumeur atteint une taille prédéterminée (généralement comprise entre 100 et 300 mm³). Le traitement à l'étude est généralement administré sur une période de deux à quatre semaines puis les animaux sont observés pour une à trois semaines supplémentaires pour caractériser la présence et la fréquence de récurrence tumorale. La réponse aux traitements est vérifiée par un changement du volume tumoral et doit être faite deux à trois fois par semaine à l'aide d'un outil de type pied à coulisse, de préférence par le même expérimentateur et à l'aveugle. Autant que possible, le même pied à coulisse devrait être utilisé tout au long de l'étude.
 - b. **Modèle de tumeur orthotopique** : La variété de sites d'implantation tumorale permet d'étudier l'efficacité thérapeutique dans un modèle préclinique similaire à la maladie originale. Pour les tumeurs internes, l'étude pilote préalable permet aussi de réaliser une évaluation cinétique de la croissance tumorale en procédant à l'euthanasie et l'analyse histopathologique de la tumeur à différents temps. Cette information servira à mieux planifier l'étude d'efficacité subséquente (début de l'administration du composé à l'étude et temps de suivi maximal des animaux). Le suivi de ce type de modèle repose principalement sur l'utilisation de techniques d'imagerie médicale, et de signes cliniques particuliers (ex : signes cliniques neurologiques dans un modèle de tumeur cérébrale).
 - c. **Modèle de tumeur métastatique** : Le design le plus fréquent implique d'administrer une dose de cellules tumorales dans le système sanguin puis de suivre dans le temps le développement tumoral (incidence et cinétique de croissance) sous l'influence de différents composés thérapeutiques. Lors de l'étude pilote préalable, l'euthanasie des animaux à différents temps et l'analyse histopathologique et le dénombrement des métastases permettent d'établir le design expérimental le plus approprié. Le suivi des animaux peut aussi impliquer des techniques d'imagerie médicale et divers tests permettant d'évaluer la charge tumorale. Par exemple, lors de modèles intraveineux dans une veine périphérique (produit des métastases pulmonaires), le test PAAM (évaluation pulmonaire des métastases avancées) doit être effectué de manière bi hebdomadaire. D'autres modèles existent et pourraient être mieux adaptés pour répondre à des objectifs scientifiques précis.
6. Le nombre d'animaux par groupe à l'étude doit être obtenu par un calcul statistique (analyse de puissance) de manière à être suffisant pour détecter les effets significatifs sur la croissance tumorale des composés à l'étude. Un nombre suffisant sera gage d'une robustesse et d'une validité des résultats obtenus tout en étant alignés avec le principe des 3Rs sur l'utilisation des animaux en sciences. L'étude doit inclure des groupes contrôles appropriés.
 7. **Un rapport de projet pilote doit être soumis au CDEA/CÉUA** après la réalisation de celui-ci. Le rapport de projet pilote doit rapporter la méthodologie utilisée, les résultats obtenus, une brève explication du modèle sélectionné pour l'étude principale, le nombre d'animaux nécessaires (calcul statistique) et quels points limites d'intervention éthiques supplémentaires ont été identifiés. **Le CDEA/CÉUA doit donner son accord avant que l'étude principale puisse être réalisée.**

3.3 Sélection des composés thérapeutiques, leur dosage et formulation

Objectifs :

1. Raffinement de l'utilisation des animaux (dosage, volume, propriétés physicochimiques des formulations en lien avec la voie d'administration, tolérabilité des composés).
2. Meilleure performance translationnelle des données expérimentales.

Moyens :

1. La formulation, la dose, le volume, la voie d'administration et la fréquence d'administration des composés à tester ainsi que les contrôles positifs doivent avoir été préalablement validés par le CDEA/CÉUA comme étant tolérables pour les animaux à l'étude. C'est-à-dire qui ne représente pas un risque pour la santé des animaux. Les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques en lien avec la cible et le mécanisme thérapeutiques doivent également avoir été déterminées au préalable. De plus, le véhicule utilisé dans la formulation doit causer le moins d'effets secondaires possibles.
2. Dans le cas d'un traitement comprenant une administration basée sur le poids des animaux, l'ajustement des doses en fonction des variations de poids est aussi un élément essentiel pour des études échelonnées sur plusieurs semaines. Dans ce cas, le volume des doses devrait être ajusté au moins une fois par semaine et sera assuré par une prise de poids en conséquence. D'autres points limites d'intervention en lien avec l'administration (dose, volume, voie d'administration, etc.) de composés antinéoplasiques connus ou à l'étude doivent être identifiés et rigoureusement suivis.

3.4 Procédure de transplantation de cellules tumorales

Objectifs :

1. Réduction du nombre d'animaux requis par groupe d'étude.
2. Raffinement de l'utilisation animale (réduction des risques d'infection, du stress et de la souffrance animale).
3. Meilleure performance translationnelle des données expérimentales.

Moyens :

3.4.1 Modèles sous-cutanés hétérotopiques

1. Une implantation tumorale soignée et minutieuse est requise pour toute étude d'évaluation de l'efficacité thérapeutique de composés antitumoraux dans un modèle préclinique hétérotopique sous-cutané. En effet, la détection de résultats significatifs repose sur l'obtention de tumeurs de forme sphériques identiques pour chaque animal à l'étude. Une localisation non standardisée dans le tissu sous-cutané (à une profondeur variable ou avec une pénétration du plan intradermique ou musculaire adjacent) peut avoir des effets importants sur la cinétique des tumeurs en modifiant l'environnement micro tumoral et/ou l'angiogenèse.

2. Bien qu'il soit suspecté que les anesthésiques peuvent avoir des effets sur la croissance tumorale, **l'utilisation d'une courte anesthésie gazeuse (moins de 5 minutes) lors de l'injection tumorale sous-cutanée constitue un raffinement important et doit être utilisée dans le contexte d'une étude portant sur l'efficacité thérapeutique de composés.** En effet, l'anesthésie permet de diminuer le stress pour le manipulateur et l'animal, facilite le rasage et la désinfection des sites d'injections et le positionnement des tumeurs afin d'en faciliter le suivi et prévenir une interférence avec une fonction normale du corps. De plus, la formation de tumeurs sphériques nécessite de procéder à une injection lente et standardisée, dans un espace sous-cutané en forme de poche créé par un soulèvement léger de la peau de manière à assurer que toute la solution cellulaire soit déposée dans l'espace sous-cutané en évitant de la disperser ou d'envahir le derme ou le muscle adjacent. Le succès de ces injections dépend aussi de la profondeur de pénétration de l'aiguille lors de l'administration, une anesthésie assure un meilleur contrôle de ce paramètre.
3. Une fois l'injection terminée, il est important de retirer l'aiguille doucement pour éviter de retirer une portion de la solution cellulaire injectée, ce qui risquerait de créer des tumeurs en forme de poires plutôt que sphéroïdes et affecterait grandement la détermination du volume tumoral par la suite.
4. Le volume d'injection est habituellement compris entre 100 et 200uL. Le site d'injection le plus courant est le flanc, car cette localisation facilite le suivi de la croissance tumoral par la suite. L'injection interscapulaire est parfois aussi réalisée. Toute injection dans la région du membre (incluant les coussinets plantaires) est habituellement à proscrire compte tenu du risque d'effet néfaste au bien-être de l'animal qui verrait sa locomotion affectée. Une justification expérimentale devra être soumise au CDEA/CÉUA si cette localisation est requise pour répondre aux objectifs de l'étude.

3.4.2 Modèles orthotopiques

1. L'utilisation de modèles orthotopiques requiert habituellement une procédure chirurgicale plus invasive. Conséquemment, **les principes chirurgicaux de base doivent être suivis : préparation chirurgicale, technique aseptique, utilisation de protocole anesthésique et analgésique adéquat.** Dépendamment du site d'implantation tumoral choisi, le risque d'infection, de métastases ou d'invasion des tissus adjacents au site d'implantation sont à prendre en compte pour le de suivi des animaux. L'utilisation de technique d'imagerie médicale pourrait être requise pour certains types de tumeurs.

3.4.3 Modèles métastatiques

1. Les modèles métastatiques induits les plus courants impliquent l'injection dans une veine périphérique de cellules tumorales. La procédure d'injection requiert un expérimentateur formé pour ce genre de technique.

RÉFÉRENCES

- Carlson, P.M. et al. (2021). Depth of tumor implantation affects response to in situ vaccination in a syngeneic murine melanoma model. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9: 1-8.
- CCPA. (2021). Lignes directrices du CCPA: Les souris.
- Dubrot, J. EXPERIMENTAL PROTOCOL: Cell prep and *in vivo* tumor inoculation (subcutaneous). Ciberonc, Immuno Oncology.
- Errington, T. M. et al. (2021). Investigating the replicability of preclinical cancer biology. *eLife* 21;10:e71601: 1-30.
- Inoue, A. et al. (2019). Current and Future Horizons of Patient-Derived Xenograft Models in Colorectal Cancer Translational Research. *Cancers*, 11, 1321: 1-24.
- Mayo Clinic. Mayo Clinic Brain Tumor Patient-Derived Xenograft National Resource, Flank Tumor implantation.
- Mendoza, A. et al. (2013). A Novel Noninvasive Method for Evaluating Experimental Lung Metastasis in Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Vol 52, No 5, September 2013: 584–589.
- Ohashi, K. et al. (2014). Methods for Implantation of Corning® Matrigel® Matrix into Mice and Tissue Fixation. *Technical Bulletin #455*.
- Reuter, J. (2011). Subcutaneous Injection of Tumor Cells. *Bio-Protocols*, Vol 1, Iss 24, Dec 20.
- Ribatti, D. (2016). Tumor angiogenesis assays, methods and protocols. *Humana Press*, ISBN 978-1-4939-3999-2 (ebook): 129-137.
- Stribbling, S.M. and Ryan, A.J. (2022). The cell-lined-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nature Protocol*, vol 17, September 2022: 2108-2128.
- Université du Québec à Montréal, Services des Animaleries. (2020). Implantation sous-cutanée des cellules tumorales chez la souris immunodéficiente. *PNF-CHX-2* : 1-3.
- Valcourt, D.M. (2020). Best Practices for Preclinical In Vivo Testing of Cancer Nanomedicines. *Advanced Health Care Materials*. 2000110: 1-15.
- Wang Y et al. (2017). Patients Derived Xenografts Models of Humane Cancer. *Humana Press*. ISBN 978-3-319-55825-7 (eBook).
- Workman, P. et al. (2010). Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*, 102: 1555-1577.

ÉMISSION ET ENTÉRINEMENT

- Le document *Recommandations vétérinaires au sujet des bonnes pratiques à mettre en place dans la conception et la réalisation des modèles tumoraux hétérotopiques, orthotopiques et métastatiques dans un contexte d'étude d'efficacité thérapeutique à l'Université de Montréal* est émis par l'équipe du Regroupement des vétérinaires responsables des animaux utilisés en recherche et enseignement à l'Université de Montréal (RVRARE) le 13 mars 2023.
- Le document est entériné par le Comité institutionnel d'intégration de protection des animaux le 28 avril 2023.