



**HAL**  
open science

## La transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre : de la recherche translationnelle à la médecine personnalisée

Ludivine Raby, Pamela Völkel, Xuefen Le Bourhis, Pierre-Olivier Angrand

### ► To cite this version:

Ludivine Raby, Pamela Völkel, Xuefen Le Bourhis, Pierre-Olivier Angrand. La transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre : de la recherche translationnelle à la médecine personnalisée. Bulletin du Cancer, 2020, 107, pp.30 - 40. 10.1016/j.bulcan.2019.06.005 . hal-03489501

**HAL Id: hal-03489501**

**<https://hal.science/hal-03489501>**

Submitted on 7 Mar 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

# LA TRANSPLANTATION DE CELLULES TUMORALES CHEZ LE POISSON ZEBRE : DE LA RECHERCHE TRANSLATIONNELLE A LA MEDECINE PERSONNALISEE

---

## *CANCER CELL TRANSPLANTATION IN ZEBRAFISH: FROM TRANSLATIONAL RESEARCH TO PERSONALIZED MEDICINE*

**Ludivine Raby<sup>1,2</sup>, Pamela Völkel<sup>1,2,3</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1,2</sup> et  
Pierre-Olivier Angrand<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup> Inserm U908, Cell Plasticity & Cancer, Lille, France

<sup>2</sup> University of Lille, Lille, France

<sup>3</sup> CNRS, Lille, France

\* Correspondance : Pierre-Olivier Angrand

Cell Plasticity & Cancer, Inserm U908 / University of Lille, Bâtiment SN3, Cité Scientifique, F-59655  
Villeneuve d'Ascq, France.

E-mail: pierre-olivier.angrand@univ-lille.fr

# LA TRANSPLANTATION DE CELLULES TUMORALES CHEZ LE POISSON ZÈBRE : DE LA RECHERCHE TRANSLATIONNELLE A LA MÉDECINE PERSONNALISÉE

---

## **CANCER CELL TRANSPLANTATION IN ZEBRAFISH: FROM TRANSLATIONAL RESEARCH TO PERSONALIZED MEDICINE**

### RÉSUMÉ

D'abord utilisé pour l'étude du développement, le modèle poisson zèbre prend maintenant une importance capitale dans la lutte contre le cancer. La transplantation de cellules cancéreuses chez le poisson zèbre est un outil clé dans la recherche préclinique car elle permet d'étudier les événements cellulaires et moléculaires responsables du développement tumoral et permet d'évaluer l'action de molécules thérapeutiques *in vivo*. Appliquée aux cellules cancéreuses dérivées de patients, la xénotransplantation permet d'identifier les protocoles thérapeutiques les plus efficaces dans le cadre de la médecine personnalisée. Cette revue fait le point sur les apports de la transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre dans la lutte contre le cancer.

**Mots clés :** Poisson zèbre – Cancer – Transplantation – Xénogreffes dérivées de patients – Cribles de molécules

### SUMMARY

Primarily used in genetic studies of development, the zebrafish (*Danio rerio*) has rapidly emerged as a promising animal model of human cancer. Cancer cell transplantation in zebrafish constitutes a key platform for clinical research since it allows to study cellular and molecular events involved in various aspects of tumorigenesis and to evaluate the efficacy of therapeutic molecules *in vivo*. Applied to patient-derived cells, the xenotransplantation approach in zebrafish permits to define the most appropriate therapeutic strategies for specific alterations found in patients in the context of personalized medicine. This review discusses the zebrafish transplantation model for the study of cancer development and drug discovery.

**Keywords:** Zebrafish – Cancer – Transplantation – Patient-derived xenografts – Molecule screens

Le cancer est actuellement une des causes majeures de morbidité et de mortalité chez l'homme. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de nouveaux cas de cancers est estimé à 18,1 millions en 2018 alors que le nombre de décès par cancers était de 9,6 millions [1]. C'est en général la capacité des cellules tumorales à se propager dans l'organisme et coloniser des tissus distants aboutissant à la formation de métastases, qui va déterminer l'évolution et l'issue de la maladie. La métastase est un processus complexe qui implique le détachement de la tumeur primaire, l'invasion du tissu environnant, l'intravasation dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques, l'extravasation dans des

tissus secondaires déterminés, l'enracinement dans un nouvel environnement cellulaire puis la prolifération tumorale. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la formation des métastases est essentielle à la lutte contre la progression tumorale [2]. Dans ce contexte, la transplantation de cellules cancéreuses est un outil de choix pour la recherche préclinique en cancérologie car elle permet d'étudier de nombreux événements cellulaires responsables du développement tumoral et de sa dissémination *in vivo*. Historiquement, la souris est l'organisme modèle le plus utilisé dans les expériences de xénotransplantation de cellules cancéreuses humaines [3], mais le poisson zèbre (*Danio rerio*) apparaît maintenant également comme un modèle expérimental particulièrement attractif.

Notamment, (i) le poisson zèbre possède une large descendance, environ 200 œufs par femelle et par semaine, qui offre une grande confiance dans les analyses statistiques ; (ii) l'homme et le poisson zèbre partagent de grandes similarités puisque 70 % des protéines humaines et 82 % des protéines impliquées dans des pathologies humaines ont un orthologue chez le poisson zèbre ; (iii) de nombreux processus cellulaires peuvent être observés chez le poisson zèbre en raison de la transparence des embryons ou chez des poissons adultes dépourvus de pigmentation ; (iv) les techniques de génétique inverse telles que la transgénése ou l'édition du génome par les TALEN et le système CRISPR/Cas9 sont facilement applicables au poisson zèbre ; (v) le poisson zèbre absorbe les molécules qui sont dissoutes dans l'eau ; (vi) enfin, les coûts d'élevage du poisson zèbre sont très inférieurs à ceux des autres vertébrés modèles.

Le poisson zèbre est utilisé en recherche depuis le début des années 1980, principalement dans le domaine de la biologie du développement. Cependant, ses caractéristiques en font aussi un modèle émergent particulièrement intéressant pour la recherche en cancérologie [4] et notamment pour l'étude du comportement des cellules cancéreuses après transplantation lors d'expériences d'allogreffe ou de xéno greffe.

## Étude de la cancérogenèse par l'allotransplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre peut développer de nombreux types de cancers, tels que des leucémies à cellules B et T [5, 6], des leucémies myéloïdes aiguës [7], des mélanomes [8], des neuroblastomes [9], des cancers hépatiques [10], des cancers pancréatiques [11], des tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques [12], des tumeurs de la lignée germinale [13] ou des sarcomes [14] suite à l'expression d'oncogènes par transgénése ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Beaucoup des cancers du poisson zèbre obtenus par manipulation d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs altérés dans les cancers humains sont similaires sur les plans histologique et moléculaire aux tumeurs

humaines, témoignant ainsi de la conservation évolutive des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse [15]. L'allogreffe de ces cancers chez le poisson zèbre offre la possibilité d'étudier de nombreux aspects de la tumorigenèse comme la métastase, les cellules propagatrices de tumeurs, l'hétérogénéité tumorale ou l'écotaxie (*homing*) des cellules tumorales.

### Modèles de poisson zèbre utilisés en transplantation allogénique de cellules cancéreuses

Dans les expériences de transplantations, le système immunitaire des vertébrés fait obstacle au développement des cellules cancéreuses injectées. Chez le poisson zèbre, le système immunitaire adaptatif commence à être pleinement fonctionnel vers les jours 21 à 28 [16, 17] et les études de transplantations nécessitent donc que les poissons adultes hôtes soient immunosupprimés ou immunotolérants. Pour cela, plusieurs approches sont possibles. La suppression du système immunitaire peut être obtenue par traitements aux rayons  $\gamma$  ou à la dexaméthasone. Une irradiation du poisson zèbre adulte par une dose de rayons  $\gamma$  de 20-25 Gy induit la suppression du système immunitaire qui sera complètement restauré 20 jours plus tard [18]. Cependant, cette immunosuppression rend possible les études transitoires de transplantation [5, 18, 19]. En revanche, le traitement par la dexaméthasone permet des études de transplantation sur des périodes plus longues si le traitement est maintenu [20]. La dexaméthasone est responsable de l'ablation des cellules B et T et permet la transplantation de cellules de tumeurs solides mais pas de leucémies lymphoïdes [21, 22]. Une approche alternative consiste à utiliser des poissons zèbres receveurs porteurs de mutations qui altèrent la fonction des cellules du système immunitaire. C'est ainsi que l'équipe de David Langenau a généré par édition du génome, une lignée de poissons zèbres porteurs d'une mutation dans le gène *rag2* [23]. Cette mutation dans *rag2* altère la recombinaison V(D)J et empêche la maturation des cellules B et T sans affecter la viabilité des poissons qui peuvent être transplantés par divers types de cellules cancéreuses [24]. Cependant, les poissons porteurs de la mutation *rag2* présentent des taux variables de cellules B qui affectent les analyses de xenotransplantation et de plus, la lignée ne peut pas être maintenue à l'état homozygote. Pour pallier ces limitations, une lignée de poissons zèbres porteurs d'une mutation dans le gène *prkdc* a été générée par édition génomique [25]. Cette lignée ne possède pas de lymphocytes T et B matures, mais peut se reproduire à l'état homozygote et permet le suivi des cellules tumorales après transplantation.

L'immunosuppression par irradiation, par traitement chimique ou par manipulations génétiques ne permet pas d'étudier les relations entre les cellules tumorales et le système immunitaire. Aussi, la transplantation de cellules tumorales d'un poisson donneur vers un receveur génétiquement identique (clonal ou syngénique) est une alternative qui permet l'étude du comportement des cellules cancéreuses en présence d'un système immunitaire pleinement fonctionnel [19, 26, 27]. Mais dans ce

cas, seules les tumeurs générées dans les lignées syngéniques peuvent être transplantées, restreignant ainsi le champ d'application de cette méthodologie.

Une limitation au suivi des cellules cancéreuses transplantées est également liée à la difficulté de visualisation de ces cellules dans le poisson zèbre receveur. Pour cela, une souche de poisson zèbre, *casper* (**Figure 1A**), a été générée par le croisement entre deux souches mutantes, la souche *nacre* et la souche *roy orbison* [28]. La souche *nacre* possède une mutation dans le gène *mitfa* et ne possède pas de mélanocytes absorbant la lumière incidente, alors que la souche *roy orbison* n'a pas les iridophores qui réfléchissent la lumière. L'absence de mélanocytes et d'iridophores chez les poissons zèbres *casper* les rend relativement transparent et permet une bonne détection des cellules transplantées, et tout particulièrement si ces cellules cancéreuses expriment des marqueurs fluorescents. Les approches de transgénèse offrent par ailleurs de multiples possibilités d'expression de protéines fluorescentes chez les poissons donneurs qui permettront de suivre ces cellules cancéreuses après leur transplantation [5, 14, 24, 28, 29].

L'utilisation de poissons zèbres transgéniques en tant que receveurs dans les expériences de transplantation de cellules tumorales peut également permettre l'analyse d'aspects particuliers liés à la cancérogenèse. C'est ainsi par exemple, que la lignée transgénique Tg(*fli1*:GFP) qui exprime la protéine fluorescente verte GFP sous le contrôle du promoteur *fli1* dans les vaisseaux sanguins [30] favorise l'étude des phénomènes métastatiques. En effet, la transplantation de cellules de lymphomes qui expriment la protéine fluorescente rouge mCherry dans des poissons transgéniques Tg(*fli1*:GFP) de fond génétique *casper* permet de visualiser la manière dont les cellules tumorales s'intravasent dans le système vasculaire [31].

#### [Allotransplantation comme mesure du pouvoir tumorigène des cellules cancéreuses.](#)

Les premières expériences d'allogreffes de cellules cancéreuses chez le poisson zèbre datent de 2003 [5]. Dans cette étude, l'oncogène murin *Myc* est fusionné au gène de la GFP (*green fluorescent protein*) et exprimé sous le contrôle du promoteur du gène *rag2* dans les lymphocytes T. Les cellules qui expriment *Myc* (GFP<sup>+</sup>) émergent du thymus, colonisent les muscles squelettiques et d'autres organes voisins pour provoquer la mort des poissons transgéniques avant l'âge de trois mois. Après transplantation dans la cavité péritonéale d'un poisson receveur, ces cellules conservent leur phénotype leucémique et présentent un phénomène d'écotaxie vers le thymus. De la même façon, les cellules tumorales qui proviennent de leucémies à cellules B, de mélanomes, de rhabdomyosarcomes, de neuroblastomes, de carcinomes hépatiques ou pancréatiques se développent après allotransplantation chez le poisson zèbre [6, 24, 26, 28, 29]. En revanche, les cellules de syndromes myéloprolifératifs ou de lésions pré-malignes ne se maintiennent pas dans les poissons receveurs après

transplantation [32, 33]. Ainsi, l'allotransplantation permet d'évaluer le pouvoir tumorigène des cellules transplantées.

### Allotransplantation pour caractériser l'hétérogénéité et la progression tumorale.

Lors de la progression tumorale, la transformation d'une hyperplasie bénigne en tumeur cancéreuse est un processus stochastique qui implique des changements génomiques et épigénétiques et conduit l'apparition de clones génétiquement distincts au sein de la tumeur. Si l'allotransplantation chez le poisson zèbre permet d'imager la croissance tumorale au cours du temps [28], elle permet également d'étudier l'hétérogénéité cellulaire au sein des tumeurs [19, 33]. Ainsi, des cellules uniques issues d'une même tumeur primaire chez un modèle de poisson zèbre transgénique qui développe une leucémie lymphoblastique T aiguë, forment après transplantation, des leucémies distinctes en termes de nombre de cellules propagatrices de leucémie, d'activation de voies de signalisation, de latence ou de réponse aux drogues. De même, les caractéristiques fonctionnelles des cellules tumorales peuvent changer suite à une évolution clonale au cours de transplantations successives.

Un modèle de poisson zèbre transgénique Tg(*rag2*:*KRAS*<sup>G12D</sup>) qui exprime l'oncogène *KRAS*<sup>Asp12</sup> sous le contrôle du promoteur *rag2*, développe des rhabdomyosarcomes embryonnaires qui possèdent les mêmes caractéristiques histologiques et moléculaires que celles observées dans la pathologie humaine [14]. L'injection dans les poissons porteurs de rhabdomyosarcomes, de marqueurs fluorescents sous le contrôle de promoteurs dont l'activité dépend du stade de différenciation musculaire permet la visualisation de populations cellulaires distinctes et de degré de différenciation différents, au sein de ces tumeurs [29]. Le tri et des dilutions successives de ces cellules tumorales avant transplantation montrent que ce sont les cellules les moins différenciées *myf5*<sup>+</sup> qui possèdent le pouvoir de propagation tumorale. Ainsi, l'allotransplantation de cellules cancéreuses chez le poisson zèbre se révèle être un outil de choix pour la caractérisation des cellules propagatrices de tumeur (CPT) qui sont impliquées dans la récurrence des cancers. Cette approche combinée à l'utilisation de molécules chimiques permet d'identifier des stratégies thérapeutiques de lutte contre les CPT [34]. Si les CPT *myf5*<sup>+</sup> possède un fort pouvoir prolifératif, elles restent incapables d'entrer dans la circulation sanguine. À l'inverse, les cellules de rhabdomyosarcome plus différenciées qui expriment le marqueur *myog* (myogénine) ont une faible capacité proliférative mais un fort pouvoir d'intravasation [29].

En utilisant l'expression de protéines fluorescentes sous le contrôle de promoteurs choisis comme marqueurs de différenciation dans des expériences d'allotransplantation chez le poisson zèbre, il est donc possible d'étudier de nombreux aspects liés à la tumorigénèse, tels que l'investigation fonctionnelle de l'hétérogénéité tumorale, la caractérisation des cellules propagatrices de tumeurs, l'étude de l'évolution clonale ou de la résistance aux thérapies (Figure 1B-D).

## Xénotransplantation de cellules tumorales humaines chez l'embryon de poisson zèbre

Les premiers essais de xénotransplantation de cellules tumorales humaines ont été publiés en 2005 par Lisa Lee et collaborateurs [35]. Entre une et cent cellules de mélanome métastatique humain qui présentent un phénotype dédifférencié, ont été transplantées dans des embryons de poisson zèbre au stade blastula (3,5 – 4,5 heures après fécondation). Ces cellules survivent, présentent une importante motilité et se divisent dans l'hôte en maintenant leur état de dédifférenciation. Cette étude fut suivie par de nombreuses autres qui montraient que de nombreux types de cellules cancéreuses humaines peuvent être transplantés dans des embryons de poisson zèbre afin d'en étudier les propriétés [36,37].

### Paramètres de la xénotransplantation.

Si les premières transplantations de cellules cancéreuses humaines ont été effectuées sur des embryons au stade blastula [35] et même si elles peuvent être pratiquées sur des poissons immunodéprimés d'un mois [38], la très grande majorité des expériences de xénotransplantations chez le poisson zèbre se fait en réalité sur des embryons âgés de deux jours. À ce stade, les organes et le système vasculaire du poisson zèbre sont développés et les chances que la transplantation des cellules cancéreuses induise des anomalies du développement restent faibles. En revanche, le système immunitaire adaptatif des poissons zèbres n'est pas encore développé à cet âge [17] évitant ainsi le rejet des cellules injectées.

Le site d'injection des cellules cancéreuses dans l'embryon de poisson zèbre de deux jours est un paramètre associé à la xénotransplantation (**Figure 2A**). Les cellules de glioblastomes ou de rétinoblastomes peuvent être injectées dans le cerveau [39, 40] ou la cavité oculaire [41, 42] et les cellules leucémiques dans la veine caudale [43]. En revanche, la transplantation orthotopique n'est pas possible pour les cellules issues de cancers du sein, du poumon ou de la prostate. Aussi, la xénotransplantation de cellules tumorales humaines est souvent effectuée de manière hétérotopique. Le site d'injection le plus utilisé est alors le sac vitellin [36]. Le sac vitellin est une structure acellulaire suffisamment large qui permet d'envisager des expériences de xénotransplantation à relativement large échelle. Il fournit également un environnement riche en nutriments, favorable à la croissance et à la migration des cellules cancéreuses. Pour suivre les étapes plus tardives de la progression tumorale, la transplantation des cellules cancéreuses peut se faire dans l'espace périvitellin (l'espace entre la peau et la membrane externe du sac vitellin) [44]. Ce site permet l'injection de quantité de cellules relativement grande et se trouve à proximité de vaisseaux sanguins majeurs. L'injection directe dans la circulation au niveau du canal de Cuvier (veine cardinale commune) est également très utilisée pour les expériences de xénotransplantation [45-48]. Alors que l'injection de cellules dans l'espace périvitellin permet de suivre l'efficacité de l'intravasation, l'injection dans le canal de Cuvier permet



l'étude de l'invasion et des micométastases [45]. Dans le cas de poissons âgés de plus d'un mois, la xénotransplantation hétérotopique se fera dans la cavité péritonéale [38].

Une des problématiques liée à la xénotransplantation de cellules humaines chez le poisson zèbre est associée au fait que le poisson zèbre est un organisme poïkilotherme vivant à 26-28 °C alors que les cellules humaines sont maintenues à 37 °C. Toutefois, plusieurs équipes ont montré qu'il était possible de garder les embryons de poisson zèbre de deux jours à 35 °C sans affecter leur développement tout en maintenant des conditions de température acceptable pour les cellules humaines transplantées [36, 43, 49].

Si les embryons et larves de poissons zèbres sont relativement transparents, quelques groupes de cellules pigmentées peuvent cependant altérer la visualisation des cellules tumorales transplantées. Aussi, le traitement des embryons par un inhibiteur de la mélanogénèse, la 1-phényl 2-thiourée (PTU) [50], ou l'utilisation de poissons de la souche *casper* [28] permettent d'obtenir des embryons receveurs parfaitement transparents. L'emploi de lignées transgéniques peut également faciliter les études d'interaction entre les cellules humaines et celles du poisson hôte dans les expériences de xénotransplantation. L'utilisation de la lignée Tg(fli1:GFP) [30] permet ainsi d'étudier les relations entre les cellules tumorales et l'environnement vasculaire, alors que la lignée Tg(mpx:GFP) permet d'examiner la métastase induite par les neutrophiles [45]. D'autres lignées, telle que la lignée transgénique Tg(mpeg1:GFP) qui marque les macrophages, pourront être utilisées pour suivre la réaction du système immunitaire inné de l'hôte en réponse à l'injection des cellules tumorales [51-52]. Le suivi des cellules humaines transplantées peut se faire en les marquant à l'aide de molécules lipophiles fluorescentes (**Figure 2B-C**). Ces molécules se diluent au cours des divisions cellulaires et une alternative à cette approche est la transformation des cellules tumorales de façon à ce qu'elles expriment des protéines fluorescentes. La manipulation génétique des cellules avant leur transplantation peut en outre, permettre d'étudier de nombreux aspects de la cancérogenèse.

### Xénotransplantation chez le poisson zèbre et cancérogenèse.

De nombreuses études ont montré que la xénotransplantation de cellules tumorales de différentes origines dans le poisson zèbre permet l'analyse *in vivo* de divers phénomènes cancéreux comme l'invasion et la métastase [35, 53, 54], la néoangiogenèse [36, 37, 44, 55] ou la réponse aux thérapies anticancéreuses [43, 49, 54, 56, 57].

L'utilité du modèle de xénotransplantation chez le poisson zèbre pour l'étude de l'invasion est clairement illustrée par les travaux de l'équipe de Christoph Bagowski qui a transplanté deux lignées de cellules de cancer pancréatique qui présentaient un fort (cellules PaTu8988-T n'exprimant pas la cadhérine E) ou un faible (cellules PaTu8988-S exprimant la cadhérine E) pouvoir invasif [54]. Deux jours après transplantation dans le sac vitellin d'embryons de deux jours, les cellules PaTu8988-T

migraient dans la partie caudale de l'embryon alors que les cellules PaTu8988-S restaient au niveau du site d'injection. Le micro-ARN miR-10a apparaît comme un modulateur clé du comportement métastatique de ces cellules cancéreuses pancréatiques [57]. En effet, alors que les cellules PaTu8988-T à fort pouvoir invasif expriment le miR-10a, son expression n'est pas détectée dans les cellules PaTu8988-S qui migrent peu. L'inhibition de l'expression du miR-10a à l'aide d'un oligonucléotide complémentaire bloque le pouvoir invasif et métastatique des cellules PaTu8988-T transplantées dans l'embryon de poisson zèbre. De façon similaire, les antagonistes de l'acide rétinoïque, un activateur de l'expression de miR-10a, empêchent le développement des métastases. À l'inverse, la surexpression du miR-10a augmente les capacités invasives des cellules PaTu8988-S dans ce modèle de xénotransplantation. Enfin, la dissémination des cellules tumorales dépend du système vasculaire puisque les cellules PaTu8988-T transplantées dans des embryons de poissons zèbres mutants *clochent*, dépourvus de système vasculaire fonctionnel, restent localisées à leur site d'injection malgré leur fort pouvoir invasif [54].

L'intravasation des cellules tumorales dans la circulation peut être visualisée et étudiée lors d'expériences de xénotransplantation. C'est ainsi que Stoletov et collaborateurs [38] ont injecté des cellules cancéreuses humaines dans la cavité péritonéale de poissons zèbres transgéniques Tg(fli1:GFP) d'un mois. Les cellules transplantées forment des microtumeurs responsables d'un remodelage et d'une perméabilisation vasculaire locale. Ce sont les cellules qui surexpriment le gène pro-métastatique *RHOC* qui intravasent préférentiellement au niveau de ces sites. Ce phénomène est la conséquence de la sécrétion de VEGF par les cellules qui expriment *RHOC* [38]. De la même manière, la xénotransplantation chez le poisson zèbre permet l'étude de l'extravasation. Ainsi, moins d'un jour après l'injection de cellules cancéreuses dans la circulation (canal de Cuvier) d'embryons de poissons zèbres transgéniques Tg(fli1:GFP) de deux jours, les cellules forment des embolies au niveau de l'artère caudale et sortent de la circulation. Alors que certaines cellules s'extravasent activement en s'insérant dans la paroi endothéliale, d'autres forment des amas cellulaires à l'intérieur des vaisseaux. Ces amas sont progressivement recouverts de cellules endothéliales puis sont exclus de la circulation vers les tissus environnants [58]. L'utilisation de méthodes d'inhibition de l'expression génique à l'aide de petits ARN interférents ou de surexpression dans les cellules tumorales humaines avant transplantation, a permis de montrer que l'intégrine  $\beta 1$  (ITGB1), le VEGFA et le facteur pro-métastatique TWIST1 sont impliqués dans la locomotion et l'extravasation des cellules cancéreuses [58]. Si les propriétés intrinsèques des cellules contrôlent le développement des métastases, les conditions environnementales comme les pressions mécaniques liées à la force du débit sanguin sont également des paramètres importants dans le développement des métastases. L'équipe de Jacky Goetz a suivi le mouvement et l'extravasation de cellules tumorales murines transplantées dans le canal de Cuvier d'embryons de poissons zèbres transgéniques Tg(fli1:GFP) de deux jours. Les mesures

de vélocité de la circulation sanguine et sa modulation à l'aide de molécules qui altèrent l'activité cardiaque montrent que le flux sanguin contrôle l'arrêt des cellules tumorales circulantes dans les vaisseaux ainsi que leur extravasation [59].

De nombreuses données indiquent que les tumeurs contiennent une petite sous-population de cellules souches cancéreuses (CSC) capables de se renouveler, résister aux thérapies, former une tumeur primaire et des métastases [60]. Plusieurs études montrent que le modèle de xénotransplantation chez le poisson zèbre permet de caractériser les CSC de cancers du sein, de leucémies, de gliomes, de cancers du foie ou de la prostate [61-66]. En effet, après transplantation, les CSC forment des masses tumorales et migrent à une fréquence plus élevée que les cellules cancéreuses non-souches [61-65]. La xénotransplantation de CSC dans les embryons de poissons zèbres de deux jours constitue donc une excellente plateforme expérimentale pour la recherche de molécules ciblant spécifiquement ces cellules [62-64].

L'angiogenèse permettant la croissance de tumeurs primaires et la formation de tumeurs secondaires [67] peut être étudiée à l'aide du modèle de xénotransplantation dans les embryons de poissons zèbres de deux jours [36, 44, 55, 68, 69]. Les cellules cancéreuses transplantées se regroupent rapidement et recrutent les cellules endothéliales de l'hôte qui sont capables d'infiltrer ces masses cellulaires et former des vaisseaux [36]. Ces vaisseaux néoformés expriment les marqueurs endothéliaux comme *fli1*, *kdrl* (*vegfr2*) ou la VE-cadhérine (*cdh5*), et leur formation dépend de la production de FGF ou VEGF par les cellules transplantées [37]. Dans ce contexte, la manipulation génétique des cellules cancéreuses avant transplantation couplée à l'utilisation de poissons zèbres transgéniques Tg(*fli1:GFP*) receveurs est une approche efficace pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la néoangiogenèse induite par les cellules tumorales. Par exemple, l'inactivation à l'aide de petits ARN interférants, des kinases LIMK1 et LIMK2 impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, réduit la néovascularisation induite par les cellules pancréatiques tumorales [55]. Ainsi, la xénotransplantation de cellules tumorales humaines dans le poisson zèbre permet d'aborder de nombreuses étapes de la cancérogenèse et montre également que les cellules humaines communiquent parfaitement avec les tissus du poisson receveur [70].

## Xénotransplantation pour la recherche de molécules anticancéreuses

Le modèle de transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre est un outil qui possède un fort potentiel dans la recherche de molécules anticancéreuses [43, 49, 71, 72]. L'environnement aquatique du poisson zèbre fait que beaucoup de molécules (selon leur solubilité) ajoutées dans l'eau seront absorbées par le poisson, évitant ainsi la pratique de l'injection à chaque animal. Par ailleurs, le poisson zèbre possède le complément complet des cytochromes P450 responsables du métabolisme

des drogues [73, 74]. Des études montrent également les grandes similitudes en termes de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique entre poisson zèbre et vertébrés supérieurs [75]. Ainsi, le poisson zèbre apparaît comme un modèle pertinent pour l'identification et l'étude des propriétés pharmacologiques de molécules anticancéreuses. C'est à la fois, l'efficacité et l'éventuelle toxicité des molécules qui peut être testée chez ce modèle.

De nombreuses molécules ont été testées en utilisant le modèle de xénotransplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre de deux jours [43, 56, 64, 72, 76-79]. Par exemple, le traitement par divers agents anti-leucémiques (imatinib, cyclophosphamide, dasatinib ou parthénolide) réduit la charge leucémique sans affecter le développement d'embryons de deux jours transplantés par des cellules leucémiques [43, 64]. Dans un modèle de xénotransplantation orthotopique, Welker et collaborateurs [79] ont même montré que le témozolomide pouvait affecter l'hétérogénéité tumorale de glioblastomes.

Bien que l'injection des cellules tumorales dans les embryons de poisson zèbre reste un processus manuel, l'automatisation et l'imagerie rapide à haute résolution des embryons injectés [80] et la taille des embryons qui peuvent être placés dans des plaques à 96 puits permettent d'envisager le criblage de molécules chimiques afin d'identifier de nouveaux agents anticancéreux plus efficaces [63, 72].

### Xénotransplantation de cellules tumorales dérivées de patients pour une prise en charge personnalisée

Le fait que la xénotransplantation chez l'embryon de poisson zèbre ne nécessite qu'un nombre limité de cellules tumorales (1 à 500) pour un résultat rapide (quelques jours) en termes d'évaluation du pouvoir tumorigène ou angiogénique, permet l'application de cette méthodologie aux cellules dérivées de patients (*PDX, patient-derived xenograft*) [43, 54, 57, 71, 81-84]. L'utilisation de tumeurs primaires dans les expériences de xénotransplantation chez le poisson zèbre s'applique à la fois aux leucémies dont les cellules sont plus faciles à obtenir et injecter [43, 71] et aux tumeurs solides telles que les cancers du pancréas [54, 57], les métastases osseuses [81], des carcinomes des glandes salivaires [83], les tumeurs neuroendocrines [84] ou de l'appareil digestif [54, 82] dont les cellules doivent être dissociées avant injection. La transplantation des cellules issues de patients montre que celles-ci ont des capacités prolifératives et invasives dans le poisson zèbre receveur. Ainsi, cette approche montre que la xénotransplantation de cellules tumorales de patients peut être utilisée pour étudier leur comportement *in vivo*, mais plus important encore l'approche permet également d'évaluer la réponse des cellules aux molécules anticancéreuses [43, 57, 71, 82, 83] dans le but d'identifier la thérapie individuelle la plus appropriée en préclinique.

La pertinence du modèle de xénotransplantation chez le poisson zèbre en tant que plateforme préclinique pour une thérapie personnalisée a été démontrée par Bentley et collaborateurs [71]. Les cellules d'un patient de trois ans et demi atteint d'une leucémie lymphoblastique T aiguë ne répondent pas à la rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR, mais fortement à un inhibiteur de la  $\gamma$ -secrétase suggérant une altération dans la voie NOTCH. L'altération de cette voie est confirmée par l'identification d'une mutation ponctuelle dans le gène *NOTCH1* [71]. De manière similaire, Fior et collaborateurs [82] ont étudié la réponse de cellules tumorales de cancers colorectaux issues de patients au FOLFOX (5-fluorouracile, oxaliplatine, acide folinique) après xénotransplantation chez le poisson zèbre. Dans la plupart des cas, la réponse des différents prélèvements au traitement était en corrélation avec les résultats de rechute observés en clinique 3 à 6 mois après chirurgie. De plus, les prélèvements de patients qui ne répondaient pas au Cétuximab présentaient tous comme attendu, des mutations dans les oncogènes *KRAS* ou *BRAF* [82].

Ces différentes études sont des preuves de concept qui démontrent qu'il est possible de prédire la réponse des cellules tumorales de patients aux différents protocoles thérapeutiques dans une période d'une semaine suivant la biopsie, dans le cadre d'une médecine personnalisée.

### Conclusion : Avantages et limites de l'utilisation du modèle poisson zèbre

Le modèle poisson zèbre a émergé en tant qu'outil puissant pour l'étude génétique du développement chez les vertébrés. Les propriétés de ce modèle sont multiples et font que le poisson zèbre se place maintenant comme un acteur novateur dans la recherche sur le cancer (**Figure 3**). Bien qu'elle en soit encore à ses débuts, l'approche de transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre tire partie des nombreux avantages inhérents à ce modèle et offre la possibilité d'étudier la formation de la tumeur, son évolution, la formation de métastases et d'évaluer l'effet de molécules thérapeutiques anticancéreuses. Appliquée aux cellules dérivées de patients, la xénotransplantation chez l'embryon de poisson zèbre de deux jours pourrait éclairer les décisions relatives au choix du traitement optimal dans un délai relativement rapide.

Toutefois, comme tous les modèles expérimentaux, le modèle poisson zèbre possède un certain nombre de limitations. En particulier, les transplantations de cellules tumorales dérivées de patients sont effectuées dans des embryons de deux jours dépourvus du système immunitaire adaptatif, masquant ainsi en partie l'influence de la réaction immunitaire dans la progression tumorale. L'absence de tissus spécifiques comme le sein, les poumons ou la prostate fait que certaines cellules tumorales ne trouveront pas leur niche physiologique après xénotransplantation. Il existe également des différences génétiques notables entre le poisson zèbre et l'homme. Au cours de l'évolution, l'apparition des poissons téléostéens s'est accompagnée d'une duplication entière du génome suivie

d'une perte massive de gènes qui fait qu'il existe environ 26 000 gènes codants chez le poisson zèbre pour environ 20 000 chez l'homme [85]. Cette duplication fait que certains gènes impliqués dans le cancer, comme *NF1* ou *PTEN*, sont présents chez le poisson zèbre sous forme de deux orthologues, À l'inverse, la perte massive de gènes associée à cette duplication fait que d'autres gènes tels *BRCA1*, *CDKN2A*, *LIF*, *OSM* ou *IL6*, sont absents chez le poisson. En ce qui concerne le métabolisme des drogues dans le cadre de la recherche de molécules anticancéreuses, les analyses protéomiques et transcriptomiques montrent un fort degré de conservation des enzymes métaboliques entre l'homme et le poisson zèbre. Cependant, l'étude du métabolisme de la testostérone montre qu'il existe plus d'enzymes métaboliques chez le poisson adulte que chez l'embryon. De plus la comparaison entre l'homme et le poisson zèbre adulte révèle que si les métabolites majeurs de la testostérone sont identiques, des différences sont tout de même détectées pour les métabolismes mineurs [86]. Cependant malgré ses limites, le modèle poisson zèbre a montré son utilité dans la recherche contre le cancer, offrant des opportunités uniques qui sont complémentaires aux approches réalisées à l'aide des modèles murins ou cellulaires. La demande clinique pour une médecine personnalisée d'une part, et la volonté de l'industrie pharmaceutique à utiliser des outils de présélection moins onéreux pour identifier ou repositionner des molécules thérapeutiques d'autre part, font que la popularité du modèle de xénotransplantation chez le poisson zèbre va très vraisemblablement augmenter à l'avenir pour devenir un outil particulièrement puissant dans la lutte contre le cancer.

## Financements.

Ce travail est supporté par l'Université de Lille, l'Inserm, la Ligue Contre le Cancer et le Cancéropôle Nord-Ouest.

## Déclaration de liens d'intérêts.

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

## Références

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 394-424.
- [2] Pascussi JM, Giraud J, Samalin E, Grillet F, Pannequin J. Bases fondamentales du processus métastatique. *Bull Cancer.* 2016; 103: S39-47.
- [3] Sharpless NE, Depinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 741-54.

- [4] Völkel P, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand PO. Le modèle poisson zèbre dans la lutte contre le cancer. *Med Sci (Paris)*. 2018; 34: 345-53.
- [5] Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*. 2003; 299: 887-90.
- [6] Sabaawy HE, Azuma M, Embree LJ, Tsai HJ, Starost MF, Hickstein DD. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 15166-71.
- [7] Zhuravleva J, Paggetti J, Martin L, Hammann A, Solary E et al. MOZ/TIF2-induced acute myeloid leukaemia in transgenic fish. *Br J Haematol*. 2008; 143: 378-82.
- [8] Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*. 2005; 15: 249-54.
- [9] Zhu S, Lee JS, Guo F, Shin J, Perez-Atayde AR et al. Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell*. 2012; 21: 362-73.
- [10] Nguyen AT, Emelyanov A, Koh CH, Spitsbergen JM, Lam SH et al. A high level of liver-specific expression of oncogenic Kras(V12) drives robust liver tumorigenesis in transgenic zebrafish. *Dis Model Mech*. 2011; 4: 801-13.
- [11] Park SW, Davison JM, Rhee J, Hruban RH, Maitra A, Leach SD. Oncogenic KRAS induces progenitor cell expansion and malignant transformation in zebrafish exocrine pancreas. *Gastroenterology*. 2008; 134: 2080-90.
- [12] Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL et al. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 407-12.
- [13] Gill JA, Lowe L, Nguyen J, Liu PP, Blake T et al. Enforced expression of Simian virus 40 large T-antigen leads to testicular germ cell tumors in zebrafish. *Zebrafish*. 2010; 7: 333-41.
- [14] Langenau DM, Keefe MD, Storer NY, Guyon JR, Kutok JL et al. Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Dev*. 2007; 21: 1382-95.
- [15] Lam SH, Wu YL, Vega VB, Miller LD, Spitsbergen J et al. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat Biotechnol*. 2006; 24: 73-5.
- [16] Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004; 20: 367-79.
- [17] Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin YM. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol*. 2004; 28: 9-28.
- [18] Traver D, Winzeler A, Stern HM, Mayhall EA, Langenau DM et al. Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004; 104: 1298-305.

- [19] Smith AC, Raimondi AR, Salthouse CD, Ignatius MS, Blackburn JS et al. High-throughput cell transplantation establishes that tumor-initiating cells are abundant in zebrafish T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010; 115: 3296-303.
- [20] Moore JC, Langenau DM. Allograft Cancer Cell Transplantation in Zebrafish. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 916: 265-87.
- [21] Langenau DM, Ferrando AA, Traver D, Kutok JL, Hezel JP et al. In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 7369-74.
- [22] Blackburn JS, Liu S, Wilder JL, Dobrinski KP, Lobbardi R, Moore FE et al. Clonal evolution enhances leukemia-propagating cell frequency in T cell acute lymphoblastic leukemia through Akt/mTORC1 pathway activation. *Cancer Cell*. 2014; 25: 366-78.
- [23] Tang Q, Abdelfattah NS, Blackburn JS, Moore JC, Martinez SA et al. Optimized cell transplantation using adult rag2 mutant zebrafish. *Nat Methods*. 2014; 11: 821-4.
- [24] Tang Q, Moore JC, Ignatius MS, Tenente IM, Hayes MN et al. Imaging tumour cell heterogeneity following cell transplantation into optically clear immune-deficient zebrafish. *Nat Commun*. 2016; 7: 10358.
- [25] Moore JC, Tang Q, Yordán NT, Moore FE, Garcia EG et al. Single-cell imaging of normal and malignant cell engraftment into optically clear prkdc-null SCID zebrafish. *J Exp Med*. 2016; 213: 2575-89.
- [26] Mizgirev I, Revskoy SY. Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafish. *Cancer Res*. 2006; 66: 3120-5.
- [27] Mizgirev I, Revskoy S. Generation of clonal zebrafish lines and transplantable hepatic tumors. *Nat Protoc*. 2010; 5: 383-94.
- [28] White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 183-9.
- [29] Ignatius MS, Chen E, Elpek NM, Fuller AZ, Tenente IM et al. In vivo imaging of tumor-propagating cells, regional tumor heterogeneity, and dynamic cell movements in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell*. 2012; 21: 680-93.
- [30] Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2002; 248: 307-18.
- [31] Feng H, Stachura DL, White RM, Gutierrez A, Zhang L et al. T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell*. 2010; 18: 353-66.
- [32] Le X, Langenau DM, Keefe MD, Kutok JL, Neuberger DS, Zon LI. Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 9410-5.



- [33] Blackburn JS, Liu S, Raiser DM, Martinez SA, Feng H et al. Notch signaling expands a pre-malignant pool of T-cell acute lymphoblastic leukemia clones without affecting leukemia-propagating cell frequency. *Leukemia*. 2012; 26: 2069-78.
- [34] Chen EY, DeRan MT, Ignatius MS, Grandinetti KB, Clagg R et al. Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 5349-54.
- [35] Lee LM, Seftor EA, Bonde G, Cornell RA, Hendrix MJ. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn*. 2005; 233: 1560-70.
- [36] Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*. 2006; 9: 139-51.
- [37] Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F, Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res*. 2007; 67: 2927-31.
- [38] Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 17406-11.
- [39] Wehmas LC, Tanguay RL, Punnoose A, Greenwood JA. Developing a Novel Embryo-Larval Zebrafish Xenograft Assay to Prioritize Human Glioblastoma Therapeutics. *Zebrafish*. 2016; 13: 317-29.
- [40] Welker AM, Jaros BD, Pudevalli VK, Imitola J, Kaur B, Beattie CE. Standardized orthotopic xenografts in zebrafish reveal glioma cell-line-specific characteristics and tumor cell heterogeneity. *Dis Model Mech*. 2016; 9: 199-210.
- [41] Jo DH, Son D, Na Y, Jang M, Choi JH et al. Orthotopic transplantation of retinoblastoma cells into vitreous cavity of zebrafish for screening of anticancer drugs. *Mol Cancer*. 2013; 12: 71.
- [42] Chen X, Wang J, Cao Z, Hosaka K, Jensen L et al. Invasiveness and metastasis of retinoblastoma in an orthotopic zebrafish tumor model. *Sci Rep*. 2015; 5: 10351.
- [43] Pruvot B, Jacquelin A, Droin N, Auberger P, Bouscary D et al. Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *Haematologica*. 2011; 96: 612-6.
- [44] Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc*. 2007; 2: 2918-23.
- [45] He S, Lamers GE, Beenakker JW, Cui C, Ghotra VP et al. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *J Pathol*. 2012; 227: 431-45.
- [46] Drabsch Y, He S, Zhang L, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P. Transforming growth factor- $\beta$  signalling controls human breast cancer metastasis in a zebrafish xenograft model. *Breast Cancer Res*. 2013; 15: R106.
- [47] Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P, van Laar T. Snail and Slug, key regulators of TGF- $\beta$ -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 435: 58-63.

- [48] de Boeck M, Cui C, Mulder AA, Jost CR, Ikeno S, Ten Dijke P. Smad6 determines BMP-regulated invasive behaviour of breast cancer cells in a zebrafish xenograft model. *Sci Rep*. 2016; 6: 24968.
- [49] Corkery DP, Dellaire G, Berman JN. Leukaemia xenotransplantation in zebrafish--chemotherapy response assay in vivo. *Br J Haematol*. 2011; 153: 786-9.
- [50] Karlsson J, von Hofsten J, Olsson PE. Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar Biotechnol (NY)*. 2001; 3: 522-7.
- [51] Hamilton L, Astell KR, Velikova G, Sieger D. A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells In Vivo. *Zebrafish*. 2016; 13: 523-34.
- [52] Britto DD, Wyroba B, Chen W, Lockwood RA, Tran KB et al. Macrophages enhance Vegfa-driven angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft model. *Dis Model Mech*. 2018; 11: pii: dmm035998.
- [53] Zhao H, Tang C, Cui K, Ang BT, Wong ST. A screening platform for glioma growth and invasion using bioluminescence imaging. *Laboratory investigation. J Neurosurg*. 2009; 111: 238-46.
- [54] Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, Nitsche C, Bakkers J et al. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer*. 2009; 9: 128.
- [55] Vlecken DH, Bagowski CP. LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Zebrafish*. 2009; 6: 433-9.
- [56] Harfouche R, Basu S, Soni S, Hentschel DM, Mashelkar RA, Sengupta S. Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis. *Angiogenesis*. 2009; 12: 325-38.
- [57] Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A et al. Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2009; 137: 2136-45.
- [58] Stoletov K, Kato H, Zardoujian E, Kelber J, Yang J et al. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci*. 2010; 123: 2332-41.
- [59] Follain G, Osmani N, Azevedo AS, Allio G, Mercier L et al. Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Dev Cell*. 2018; 45: 33-52.
- [60] Turdo A, Veschi V, Gaggianesi M, Chinnici A, Bianca P et al. Meeting the Challenge of Targeting Cancer Stem Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2019; 7: 16.
- [61] Eguiara A, Holgado O, Beloqui I, Abalde L, Sanchez Y et al. Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification. *Cell Cycle* 2011; 10: 3751-7.
- [62] Yang XJ, Cui W, Gu A, Xu C, Yu SC et al. A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion. *PLoS One*. 2013; 8: e61801.
- [63] Zhang B, Shimada Y, Kuroyanagi J, Nishimura Y, Umemoto N et al. Zebrafish xenotransplantation model for cancer stem-like cell study and high-throughput screening of inhibitors. *Tumour Biol* 2014a; 35: 11861-9.

- [64] Zhang B, Shimada Y, Kuroyanagi J, Umemoto N, Nishimura Y, Tanaka T. Quantitative phenotyping-based in vivo chemical screening in a zebrafish model of leukemia stem cell xenotransplantation. *PLoS One*. 2014b; 9: e85439.
- [65] Zoni E, van der Horst G, van de Merbel AF, Chen L, Rane JK et al. miR-25 Modulates Invasiveness and Dissemination of Human Prostate Cancer Cells via Regulation of  $\alpha$ v $\beta$ 3- and  $\alpha$ 6-Integrin Expression. *Cancer Res* 2015; 75: 2326-36.
- [66] Wenger A, Larsson S, Danielsson A, Elbæk KJ, Kettunen P et al. Stem cell cultures derived from pediatric brain tumors accurately model the originating tumors. *Oncotarget*. 2017; 8: 18626-39.
- [67] Mittal K, Ebos J, Rini B. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Semin Oncol*. 2014; 41: 235-51.
- [68] Moshal KS, Ferri-Lagneau KF, Haider J, Pardhanani P, Leung T. Discriminating different cancer cells using a zebrafish in vivo assay. *Cancers (Basel)*. 2011; 3: 4102-13.
- [69] Li D, Li XP, Wang HX, Shen QY, Li XP et al. VEGF induces angiogenesis in a zebrafish embryo glioma model established by transplantation of human glioma cells. *Oncol Rep*. 2012; 28: 937-42.
- [70] Tulotta C, Stefanescu C, Beletkaia E, Bussmann J, Tarbashevich K et al. Inhibition of signaling between human CXCR4 and zebrafish ligands by the small molecule IT1t impairs the formation of triple-negative breast cancer early metastases in a zebrafish xenograft model. *Dis Model Mech*. 2016; 9: 141-53.
- [71] Bentley VL, Veinotte CJ, Corkery DP, Pinder JB, LeBlanc MA et al. Focused chemical genomics using zebrafish xenotransplantation as a pre-clinical therapeutic platform for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015; 100: 70-6.
- [72] Jung DW, Oh ES, Park SH, Chang YT, Kim CH et al. A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. *Mol Biosyst*. 2012; 8: 1930-9.
- [73] Alderton W, Berghmans S, Butler P, Chassaing H, Fleming A et al. Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica*. 2010; 40: 547-57.
- [74] Goldstone JV, McArthur AG, Kubota A, Zanette J, Parente T et al. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics*. 2010; 11: 643.
- [75] Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH et al. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull*. 2008; 75: 619-28.
- [76] van der Ent W, Burrello C, Teunisse AF, Ksander BR, van der Velden PA et al. Modeling of human uveal melanoma in zebrafish xenograft embryos. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 6612-22.
- [77] Zhang S, Cao Z, Tian H, Shen G, Ma Y et al. SKLB1002, a novel potent inhibitor of VEGF receptor 2 signaling, inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 4439-50.
- [78] Ghotra VP, He S, van der Horst G, Nijhoff S, de Bont H et al. SYK is a candidate kinase target for the treatment of advanced prostate cancer. *Cancer Res*. 2015; 75: 230-40.

- [79] Welker AM, Jaros BD, An M, Beattie CE. Changes in tumor cell heterogeneity after chemotherapy treatment in a xenograft model of glioblastoma. *Neuroscience*. 2017; 356: 35-43.
- [80] Ghotra VP, He S, de Bont H, van der Ent W, Spaik HP et al. Automated whole animal bio-imaging assay for human cancer dissemination. *PLoS One*. 2012; 7: e31281.
- [81] Mercatali L, La Manna F, Groenewoud A, Casadei R, Recine F et al. Development of a Patient-Derived Xenograft (PDX) of Breast Cancer Bone Metastasis in a Zebrafish Model. *Int J Mol Sci*. 2016; 17: 1375.
- [82] Fior R, Póvoa V, Mendes RV, Carvalho T, Gomes A et al. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114: E8234-E8243.
- [83] Chen C, Choudhury S, Wangsa D, Lescott CJ, Wilkins DJ et al. A multiplex preclinical model for adenoid cystic carcinoma of the salivary gland identifies regorafenib as a potential therapeutic drug. *Sci Rep*. 2017; 7: 11410.
- [84] Gaudenzi G, Albertelli M, Dicitore A, Würth R, Gatto F et al. Patient-derived xenograft in zebrafish embryos: a new platform for translational research in neuroendocrine tumors. *Endocrine*. 2017; 57: 214-219.
- [85] Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013; 496: 498-503.
- [86] Chng HT, Ho HK, Yap CW, Lam SH, Chan EC. An investigation of the bioactivation potential and metabolism profile of Zebrafish versus human. *J Biomol Screen*. 2012; 17: 974-86.
- [87] Blackburn JS, Langenau DM. Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. *Dis Model Mech*. 2014; 7: 755-62.

## LEGENDES DES FIGURES.

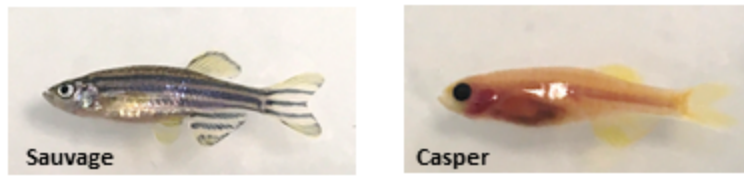
**Figure 1. L'allotransplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre.** (A) La lignée de poisson zèbre *casper* dépourvue mélanocytes et d'iridophores, permet le suivi des cellules cancéreuses transplantées. (B) Evaluation de l'hétérogénéité tumorale. Des cellules uniques isolées à partir d'une tumeur primaire hétérogène sont transplantées dans des poissons zèbres receveurs permettant ainsi l'évaluation du pouvoir tumorigène des clones tumoraux. (C) Suivi de l'évolution tumorale. Des transplantations successives permettent l'étude de l'évolution des tumeurs. (D) Test de molécules anticancéreuses. L'exposition de poissons zèbres transplantés permet d'évaluer l'action antitumorale de molécules et d'identifier des clones résistants. (B), (C) et (D) sont adaptés de Blackburn et Langenau [87].

**Figure 2. La xénotransplantation de cellules tumorales dans des embryons de poissons zèbres de deux jours.** (A) Localisation des principaux sites de transplantation dans les expériences de xéno greffe. (B) Illustration du pouvoir invasif de cellules tumorales humaines (marquées en rouge) dans un embryon de poisson zèbre, 4 jours après transplantation. (C) Visualisation des cellules tumorales humaines

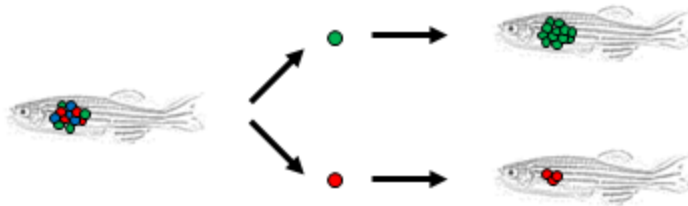
(marquées en rouge) dans un embryons de poisson zèbre Tg(fli1:GFP) dont les vaisseaux sanguins apparaissent en vert.

**Figure 3. Le modèle poisson zèbre dans la lutte contre le cancer. (Partie gauche)** Les analyses génomiques permettent d'identifier les altérations génétiques associées aux cancers humains. Les approches par génétique inverse (édition du génome, transgénése) permettent de modéliser ces altérations chez le poisson zèbre alors que l'allotransplantation des cellules tumorales permet d'étudier les caractéristiques de ces cancers. **(Partie droite)** La xénotransplantation de cellules tumorales issues de patients permet d'établir le choix des protocoles thérapeutiques adaptés dans le cadre d'une médecine personnalisée.

A



B



C



D

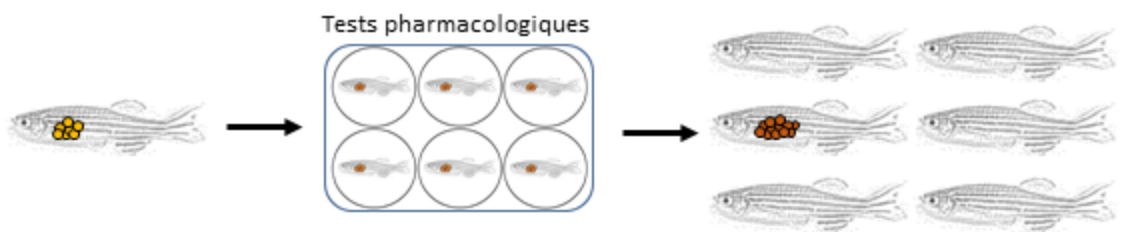
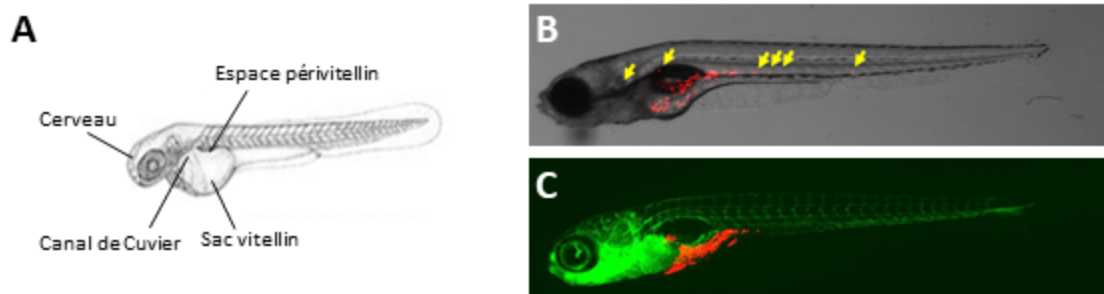


Figure 1.



**Figure 2.**

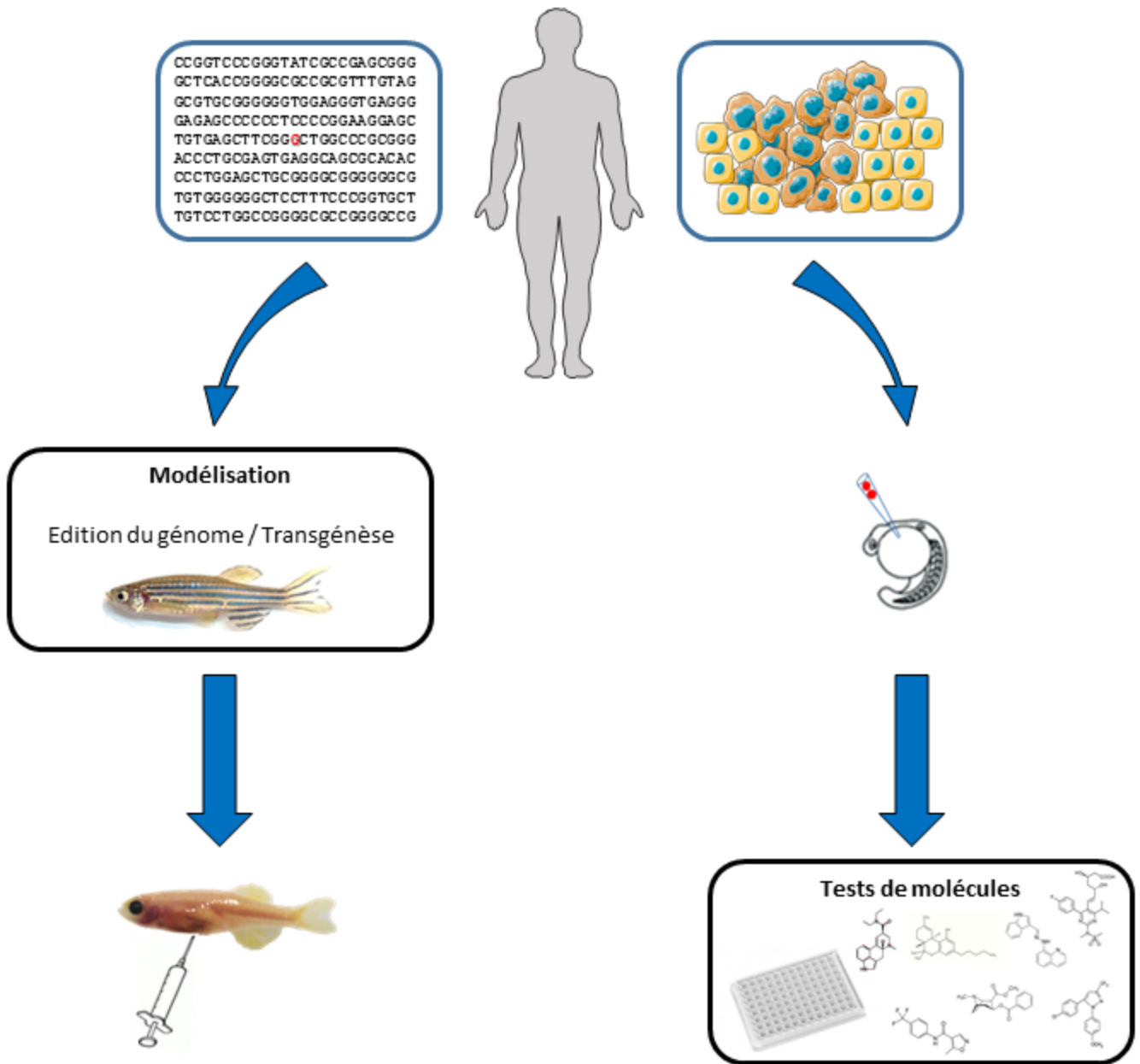


Figure 3.