

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité : Biochimie Fondamentale



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du Diplôme

MASTER

Thème

**Utilisation et développement d'une nouvelle
technique de culture cellulaire *in vitro* des
cellules cancéreuses**

Présenté par :

AKKOUCHE Bachir et ABDELLI Mazigh

Soutenu le : 15 Septembre 2022

Devant le jury composé de :

Mme MOULAOUI K.	MCB	Présidente
Mr GHIDOUCHE A.	MCA	Promoteur
Mme BOUDJOUAN A.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Tout d'abord, nous rendons grâce à DIEU le Tout-Puissant pour nous avoir guidés vers le bon chemin et pour nous avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

*Nos sincères et chaleureux remerciements s'adressent à notre promoteur **M^r GHIDOUCHE A**, pour sa confiance, sa gentillesse, ses précieuses orientations notamment ses valeureux conseils, ainsi que pour sa présence durant toute la durée de notre stage et pour nous avoir offert les meilleurs conditions de travail. C'est bien plus qu'un enseignant ou un promoteur à nos yeux, c'est devenu notre exemple, nous sommes très honorés d'avoir été ses étudiants.*

*Nous remercions **M^{lle} AIT ALI D.** pour son soutien, ses conseils dans les moments de besoin.*

*Nos vifs remerciements vont à **M^{lle} MOULAOUI K.** en sa qualité d'adjoint de chef de département, pour avoir été à notre écoute durant ces 3 années de formation au sein du département de BPC.*

*Un grand merci à l'équipe du laboratoire de génie biologique des cancers du campus Aboudaou, **MADAOUI M, MEHELEB D, LAHDIRI N**, pour leur accueil, leurs présences avec nous à tous les moments.*

*Nous tenons également à remercier les membres du laboratoire d'anatomopathologie de la faculté de médecine d'Aboudaou **M^{me} MEZHOUD L.** et **M^{me} BOUGANDOURA L.** pour leurs valeureuses aides.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements aux membres du jury **M^{lle} MOULAOUI.K** pour bien vouloir présider ce jury et à **M^{me} BOUDJOUAN.A** pour bien vouloir examiner ce travail de mémoire.*

Finalement, nous présentons nos sentiments de reconnaissance et nos chaleureux remerciements pour nos enseignants qui ont pu nous transférer leur savoir qui sans lui nous n'aurions pas pu arriver à ce niveau.

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, ainsi qu'à mes frères et à ma sœur

A mon grand-père pour ses conseils et son aide

A ma Bibouche pour sa présence, ses encouragements, elle était stressée plus que moi

A mowgli pour la force qu'il me donnait dans les moments difficiles ...

A mon binôme, mon ami El-hadj Mazigh, pour sa détermination, sa persévérance même dans les coups durs et bien sûr pour les délicieux plats qu'il nous ramène tous les jours

A mes amies et camarades, «la team Aokas» Yousra et Nesrine pour leurs encouragements et pour leur compagnie tout au long de mon stage

A nos microbiologistes préférés, Yanis et Mokrane pour leurs ondes positives, leurs bonnes blagues et histoires qu'on partageait autour de la table à manger

Au plus brillant des doctorants que je connaisse, Mennad MADAOUI, pour sa présence, sa gentillesse, ainsi que pour tous ses conseils.

A Nadja MILOUDI, pour son aide et son sens de partage

A mes potes, Belaid, Azedine, Adel, Mohamed, Syphax et Nassim pour tous les beaux moments et galères qu'on avait vécues ensemble.

A mes camarades de ma promo, pour leurs réactions sur les memes que je faisais dans notre groupe messenger.

Non sérieux, merci pour tous ces beaux moments qu'on a partagé ensemble, ils sont ancrés dans mon cerveau tel des phospholipides dans une membrane cytoplasmique.

Bachir

Je dédie ce présent travail

À mes très chers parents la source de ma vie ; ma mère ma source du bonheur et mon père ma raison de réussite. Quoi que je fasse je ne pourrai jamais vous rendre le prix de vos sacrifices et efforts.

*A ma sœur **Hanane** et mon frère **Oualid**.*

*A tous les membres de ma famille ; mes **oncles**, mes **tantes**, mes **cousins** et **cousines**.*

*A Mr **A.GHIDOUCHE** pour son soutien, ses conseils, il essayait toujours de nous offrir les meilleures conditions du travail et Mme **D.AIT ALI** qui était présente avec nous aux moments difficiles.*

*A tous mes amis et camarades que j'ai la chance de rencontrer durant le long de mon parcours : **Haroune, Ali, Mehdi, Yacine, Massinissa, Sabrina, Amina**.*

*A toute la promotion de Biochimie Fondamentale 2021/2022, surtout à **Hanane HAMMOUI** pour ses valeureux services.*

*A mon très cher voisin et frère **Yacine BAKOURI** pour être présent avec moi durant les moments difficiles, pour ses valeureux aides et ses encouragements.*

*A mon binôme **Bachir**, nous avons passé des moments inoubliables de rigolade pendant plusieurs années, des moments du travail et du sérieux. Malgré les difficultés que nous avons trouvé vis-à-vis la réalisation de ce mémoire, sous la grâce du dieu, nous sommes arrivés à surpasser ensemble.*

*A **Mennad MADAoui**, présent à tout moment, en plus de tous les bons moments il est une bibliothèque mobile d'information et d'idées.*

*A **Dalila MEHELEB**, qui ne laisse rien nous manquer, et **Nassim LAHDIRI** pour tous ses renseignements et encouragements.*

*A tous mes camarades de stages : **Youssra** et **Nesrine**, pour tous les agréables moments. **Yanis** et **Mokrane**, malgré que la période était courte mais, les souvenirs sont indéfinis, des rigolades, de l'ambiance surtout au moment du déjeuner, des moments du sérieux et de solidarité pendant les difficultés. Et bien sûr **Liza** qui se déplaçait à chaque fois à l'hôpital pour nous ramener les échantillons.*

Mazigh

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	3
I.1 Culture cellulaire animale.....	3
I.1.1 Généralités.....	3
I.1.2 Milieux de cultures	3
I.1.3 Développement de la culture cellulaire.....	5
I.1.4 Les modèles de culture 3D <i>in vitro</i> les plus utilisés.....	7
I.2 Développement tumoral	9
I.2.1 La cellule cancéreuse.....	9
I.2.2 La carcinogenèse	11
I.3 Les tumeurs cérébrales.....	12
I.3.1 Généralités.....	12
I.3.2 Epidémiologie des tumeurs cérébrales	12
I.3.3 Classification des tumeurs cérébrales.....	13
I.4 Les Glioblastomes.....	14
I.4.1 Généralités.....	14
I.4.2 Origine des glioblastomes.....	15
I.4.3 Histologie des glioblastomes.....	15
I.5 Développement embryonnaire	16
I.5.1 L'embryogenèse.....	16
I.5.2 La poule et la composition de son œuf	17
I.6 La membrane chorioallantoïque (CAM)	18
I.6.1 Généralités.....	18
I.6.2 Historique	18
I.6.3 Structure et développement du CAM.....	20
I.6.4 Avantages et inconvénients du modèle CAM	21
II. Matériels et méthodes.....	28
II.1 Matériel biologique.....	28
II.1.1 Œufs fécondés.....	28
II.1.2 Tissus tumoraux	28
II.1.3 Tissus sains	28

II.2	Méthodes.....	29
II.2.1	Suivi du développement embryonnaire	29
II.2.2	Observation <i>in vivo</i> des embryons	31
II.2.3	Réalisation des xénogreffes	32
II.2.4	Mise en culture	37
II.2.5	Récupérations des échantillons	39
II.2.6	Réalisation des coupes histopathologiques	40
II.2.7	Coloration des lames	43
II.2.8	Montage permanent entre lame et lamelle	43
II.2.9	Observation sous microscope	44
III.	Résultats	46
III.1	Suivi du développement embryonnaire.....	46
III.2	Effectifs des œufs et d’embryons de la poule	46
III.3	Récupération des échantillons	46
III.4	Révélation macroscopique.....	47
III.5	Révélation histopathologique	48
IV.	Discussion	50
	Conclusion	55
	Références bibliographiques	57
	Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : Appareillage et matériaux utilisés en culture cellulaire.....	5
Figure 2 : Protocole de prélèvement d'une tumeur par biopsie et sa culture	7
Figure 3 : Illustration de la culture cellulaire multicouche.....	8
Figure 4 : Formation des sphéroïdes sur des micropatterns de fibrinogène.	9
Figure 5 : Illustration de la théorie de Knudson.....	10
Figure 6 : Caractéristiques des cellules tumorales.	10
Figure 7 : Les différentes étapes de la cancérogenèse.....	11
Figure 8 : Aspects histologiques d'un glioblastome au grossissement X20	16
Figure 9 : Principales étapes de l'embryogenèse animale.	16
Figure 10 : Représentation des différentes structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf de poule non fertilisé ou fertilisé.	17
Figure 11 : Structures extra-embryonnaires d'embryon du poulet.....	18
Figure 12 : Maturation de la vascularisation de la membrane chorioallantoïque	20
Figure 13 : Coupe transversale de la CAM observé par la méthode immunohistochimique .	21
Figure 14 : Matériels biologique utilisés.	28
Figure 15 : Positionnement des œufs horizontalement.....	29
Figure 16 : Œufs de poules incubés dans un incubateur à gaz.....	30
Figure 17 : Le retournement des œufs.	30
Figure 18 : Technique de mirage des œufs.	31
Figure 19 : Etapes d'ouverture d'une fenêtre à la surface de l'œuf.	32
Figure 20 : Dissection et peser du tissu sain.	33
Figure 21 : Fragmentation du tissu sain dans du RPMI	33
Figure 22 : Première centrifugation.....	34
Figure 23 : Le culot dans la solution EDTA-Trypsine 0.5%.	34
Figure 24 : Deuxième centrifugation.....	34
Figure 25 : Ajout de RPMI et filtration à l'aide de 2 bandes à gaz.....	35
Figure 26 : Potter-Elvehjem contenant le glioblastome dans du RPMI.	36
Figure 27 : Le glioblastome et le RPMI en suspension homogène.	36
Figure 28 : Liquide CéphaloRachédien tumoral	37
Figure 29 : Dépôt de l'œuf sur un support en plastique.	37
Figure 30 : Dépôt de la suspension cellulaire sur la CAM.....	38
Figure 31 : Refermeture de l'œuf avec du parafilm.....	38

Figure 32 : Dépôt des fragments tissulaires sur la CAM.....	39
Figure 33 : Remises des œufs dans l'incubateur	39
Figure 34 : Etapes de la récupération des échantillons.....	40
Figure 35 : Prélèvement de l'échantillon et sa mise dans une histocassette.	40
Figure 36 : Etape de déshydratation des prélèvements	41
Figure 37 : Enrobage à la paraffine.	41
Figure 38 : Coupure des blocs au microtome	42
Figure 39 : Matériel utilisés durant le montage des coupes.....	42
Figure 40 : Produits utilisés lors de la coloration des lames.....	43
Figure 41 : Lames prêtes pour l'observation microscopique	43
Figure 42 : Observation finale des lames	44
Figure 43 : Les différentes formes cellulaires obtenues	47
Figure 44 : Résultats d'observation de différents échantillons sous microscope ZEISS.....	48
Figure 45 : Observation microscopique d'une coupe histopathologique réalisée après récupération du transplant de glioblastome..	49
Figure 46 : Coupes histologiques des échantillons issues de la greffe de tissu sain. SF : tissu sain sous forme de fragments.....	50

Liste des tableaux

Tableau I : Comparaison entre les deux techniques de culture cellulaire 2D et 3D.	6
Tableau II : Définition selon l’OMS des grades de tumeurs intracrâniennes (tumeurs des cellules gliales).....	14
Tableau III : Les différents travaux d’implantation de tissus tumoraux sur la CAM.....	19
Tableau IV : Effectifs des œufs et des embryons.	46
Tableau V : Répartition des échantillons récupérés après 17 jours d’incubation.....	47

Liste des abréviations et acronymes

A

ACVR1: Activin A Receptor Type 1

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique

AKT1: Alpha serine/threonine kinase 1

ARID1A: AT-Rich Interactive Domain-containing protein 1A

ATCC: American Type Culture Collection

ATRX: Alpha Thalassemia Mental Retardation X linked

APC: Adenomatous Polyposis Coli

B

BAP: Biofilm-associated Protein

BCOR: Bcl-6 Corepressor

C

CAM: Chorio Allantoic Membrane

CDKN2A: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor

CIC: Cap-I-Cua transcriptional repressor

CMRL: Connaught Medical Research Laboratories

CO₂: Dioxyde de Carbone

CREB: C-AMP Response Element-Binding protein

CTNNB1: Catenin (cadherin-associated protein) Beta 1

CYSLTR2: Cysteinyl Leukotriene Receptor 2

C19MC: Chromosome 19 MicroRNA Cluster

D

DGCR8: DiGeorge Critical Region 8

DROSHA: class 2 ribonuclease III enzyme

DUX4: Double homeobox 4

E

EBSS: Earle's Balanced Saline Solution

EED: Embryonic Ectoderm Development

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EWS: Ewing Sarcoma breakpoint region

EZH1P: Enhancer of Zest Homologs Inhibitory Protein

F

FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor 1

FGFβ: Fibroblast Growth Factor beta

FLI: Friend Leukemia Integration transcription factor

FOXR2: Forkhead **box** Regulating protein

2

FUBP1: Far Upstream element Binding Protein **1**

G

GNAQ: Guanine Nucleotide-binding protein subunit Alpha **q**

GNA11: Guanine Nucleotide-binding protein subunit Alpha **11**

H

HEY1 : Hairry/enhancer-of-split related with YRPW motif protein

HOXB13 : Homeobox **B13**

HRAS : Harvey **Rat** Sarcoma virus

H3G34 : Mutation de la guanine (**G**) en position **34** dans les gènes des histones **H3**

H3K27 : mutation de la lysine (**K**) en position **27** dans les gènes des histones **H3**

I

IDH: Isocitrate **D**ehydrogenase

INI1 : Integrase Interactor **1**

IRM : Imagerie par **R**ésonance Magnétique

K

KDM : Lysine-specific **D**emethylase

KIR7.1 : Pottasium **I**nwardly-rectifying channel subfamily **7** type **1**

KLF4 : Kruppel-like Factor **4**

M

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase

MCC: Multilayer Cell Culture (Culture Cellulaire Multicouches)

MDM2 : Murine Double Minute **2**

MEC : Membrane ExtraCellulaire

MEN1 : Multiple Endocrine Neoplasma type **1**

miR : microRNA

MMP9 : Matrix Metallopeptidase **9**

MN1 : Meningioma **1**

N

NAB2 : NGFI-A-Binding Protein **2**

NCOA2 : Nuclear receptor Coactivator **2**

NF2 : Neurofibrome **2**

NOTCH1 : Neurogenic locus notch homolog protein **1**

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

O₂: dioxygène

P

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor **1**

PDGFRA: Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha

pH: potentiel d'Hydrogène

PIK3CA: Phosphatidylinositol-3,4-biphosphate Kinase **3C** Alpha

PLCB4: Phospholipase C beta 4
PRAME: Preferentially Expressed Antigen in Melanoma
PRDM6: PR Domain zinc finger protein 6
PRKAR1A: Protein Kinase cAmp-dependent type 1 regulatory subunit Alpha
PRKCA : Protein Kinase C Alpha
PSM: Poste de Sécurité Microbiologique
PTCH1: Patched Homolog protein 1
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

R

RB1: Retinoblastoma tumor suppressor protein 1
RPMI: Roswell Park Memorial Institute

S

SDHB : Succinate Dehydrogenase complex iron sulfur subunit B
SF3B1: Splicing Factor 3 subunit 1
SMARC: SWI/SNF-related Matrix-associated Actin-dependent Regulatory of Chromatin
SMO : Smoothed
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Système Nerveux Périphérique
STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6
SUFU: Suppressor of Fused homolog

T

TACC: Transforming Acidic Coiled-coil Containing protein
TERT: Telomerase Reverse Transcriptase
TEP : Tomographie par Emission de Positrons
TGFβ: Transforming Growth Factor beta
TP53 (P53): Tumor suppressor Protein 53
TRAF: TNF Receptor-associated Factor
TSC: Tuberous Sclerosis Complex
TTF1: Transcription Termination Factor1

U

USP8: Ubiquitin Specific Peptidase 8

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VHL: Von Hippel-Lindeau tumor suppressor

W

WHO: World Health Organization

Y

YAP1: Yes-associated Protein 1

Z

ZFTA (C11orf95): Zinc Finger Translocation Associated

2D: 2 Dimensions

3D : 3 Dimensions

Introduction

Actuellement, le cancer représente l'un des problèmes majeurs de santé publique à l'échelle planétaire tant dans les pays développés que ceux en voie de développement. Il est l'une des principales causes de mortalité au niveau du globe selon l'OMS (**WHO, 2008**).

Le cancer est caractérisé par une prolifération incontrôlée des cellules résultant d'un échappement aux mécanismes de contrôle. Ces cellules se développent de façon anarchique jusqu'à former une masse, qui va envahir l'organe dans lequel elles se trouvent (**Globocon, 2012**).

Dans le cas du cerveau, le terme « cancer » peut être en partie nuancé. En effet, la plupart des cancers ont la propriété de former des métastases qui vont se disséminer dans le corps et s'attaquer à d'autres organes. Les tumeurs cérébrales n'ont pas cette capacité, ou alors d'une manière très réduite. Il est donc approprié de parler de « tumeurs cérébrales » plutôt que de « cancer de cerveau ». Si ces tumeurs ne sont pas les plus fréquentes, certains types n'en sont pas moins agressifs et mortels. C'est plus particulièrement le cas du glioblastome, la tumeur la plus agressive et résistante aux traitements du système nerveux centrale, du fait de ses capacités d'adaptations et sa récurrence quasi systématique (**Blay Y et al., 2004**).

C'est ce qui a poussé les chercheurs à exploiter tous les outils qui permettraient d'améliorer la compréhension des mécanismes et des conséquences du développement des cellules cancéreuses. De ce fait, ils ont essayé de simuler et de reproduire la cancérisation qui se déroule dans l'organisme humain dans d'autres environnements, naturels ou artificiels, pour avoir un accès illimité à ce processus et un suivi en temps réel, c'est la culture cellulaire.

Les véritables cultures apparaissent en 1952, lorsque **George Otto Gey** réalise la première culture *in-vitro* de cellules cancéreuses (carcinome cervical humain) qui donna la lignée HeLa (**Gey et al., 1952**). Des modèles de culture cellulaire 2D et 3D ont ensuite été développés, sans tenir compte de leurs coûts très élevés, ils ne reproduisent pas fidèlement le microenvironnement tumoral, par conséquent, un changement dans le phénotype malin de la tumeur.

Afin de fournir les signaux microenvironnementaux, il est donc essentiel d'étudier les cellules souches cancéreuses dans un contexte *in vivo*. De ce fait, pour évaluer la capacité tumorale, les cellules cancéreuses sont traditionnellement transplantées dans des souris immunodéficientes, présentant une absence ou une atrophie du thymus, pour éviter le rejet de greffe. Toutefois, cette méthode est très coûteuse et ne permet pas de suivre la cinétique tumorale.

En revanche, la membrane chorioallantoïque de poulet (CAM) est un modèle peu coûteux, reproductible et fiable, utilisé pour étudier plusieurs caractéristiques fonctionnelles de la biologie tumorale, telles que la capacité des cellules à être tumorigènes, à envahir et à métastaser l'embryon.

La CAM est une membrane extra-embryonnaire hautement vascularisée, fournissant ainsi des conditions nutritives riches pour la croissance spontanée des cellules tumorales humaines, avec une réponse immunologique et inflammatoire déficiente (**Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014**). Ce modèle a été utilisé pour soutenir la croissance de nombreux types de tumeur, dont l'ostéosarcome (cancer osseux) (**Kunz *et al.*, 2019**). De plus, il a été utilisé comme plateforme pour analyser les valeurs des médicaments anticancéreux (**Vu *et al.*, 2018**).

L'objectif de notre travail était de confirmer la possibilité de l'utilisation du modèle CAM comme un milieu de culture pour les cellules cancéreuses. Pour cela, nous avons réalisés des xénogreffes de cellules tumorales du sous type histologique le plus agressif des tumeurs cérébrales, à savoir le glioblastome et des xénogreffes de cellules nerveuses saines sur la membrane chorioallantoïque de poulet. Une étude histopathologique a été effectuée après la récupération des échantillons pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1 Culture cellulaire animale

I.1.1 Généralités

La culture cellulaire animale désigne l'ensemble des techniques permettant le prélèvement de cellules, de tissus ou d'organes à partir d'un organisme animal et leur dépôt dans un nouvel environnement en dehors de leur milieu de vie naturel permettant leur développement. Cet environnement est généralement un milieu liquide ou semi-solide contenu dans des récipients en verre ou en plastique (*in vitro*) ou encore sur un autre organisme vivant d'une même espèce (*in vivo*) ou d'une espèce différente (*ex-vivo*) qui confère les nutriments nécessaires à leur survie et à leur croissance et permet leur reproduction (**Eagle, 1955**).

Ces procédés doivent être réalisés dans des conditions de sécurité et de stérilité particulières. De ce fait, les manipulations sont faites généralement sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM).

I.1.2 Milieux de cultures

a)- Définition

Un milieu de culture est un support naturel, un fluide biologique ou synthétique. Ils peuvent être aussi une préparation à partir des poudres et/ou solutions, permettant la culture de cellules, de tissus, de bactéries ou de levures dans le but de permettre leur étude (**Morgan J et al., 1950**).

b)-Composants de base des milieux de culture humaine et animale

Comme indiqué précédemment dans la partie historique, de nombreux chercheurs se sont intéressés au développement de milieux de culture pour les cellules humaines et animales. Ainsi, actuellement un milieu de culture est défini comme étant une substance contenant un mélange d'acides aminés, de glucose, de sels, de vitamines et d'autres nutriments.

Ils peuvent être préparés directement au sein du laboratoire ou bien procurés sous forme de poudre ou de liquide auprès de fournisseurs commerciaux. Les besoins pour ces composants varient selon les lignées cellulaires, et ces différences sont en partie responsables du grand nombre de formulations de milieux. ATCC (American Type Culture Collection) fait l'exemple d'un fournisseur confirmé, c'est un centre de matériaux biologiques dont on offre non

seulement les lignées cellulaires et leurs milieux de culture mais aussi toutes les normes, références et conditions liées à leurs culture (**Earle, 1943**) (**Morgan J et al., 1950**).

c)- Types de milieux de culture

Selon leur source, on distingue deux types de milieux de culture : milieux artificiels et milieux naturels.

- Milieux artificiels

Les milieux artificiels ou synthétiques sont préparés à partir de poudres ou de solutions synthétiques en ajoutant des nutriments (organiques et inorganiques), des vitamines, des sels, des phases gazeuses d'O₂ et de CO₂, des protéines sériques, des glucides et des cofacteurs (**Morgan et al., 1950**). Ils sont classifiés selon plusieurs critères, parmi ceux, le but de la culture :

- Survie immédiate (une solution saline équilibrée, avec un pH et une pression osmotique spécifiques) ; exemple : la solution saline équilibrée d'Earle (EBSS) (**Earle et al., 1943**).
- Survie prolongée (une solution saline équilibrée complétée par diverses formulations de composés organiques et/ou de sérum) ; exemple : RPMI (Roswell Park Memorial Institute).
- Croissance indéfinie ; exemple : le milieu de William (**clinisciences.com**).

- Milieux naturels

Les milieux naturels sont constitués uniquement de fluides biologiques d'origine naturelle. Ils sont très utiles et pratiques pour une large gamme de cultures de cellules animales. Le principal inconvénient des milieux naturels est leur faible disponibilité et la difficulté de leur maintien et leur entretien.

d)- Matériels et appareillages

La culture cellulaire ne se réduit pas uniquement au milieu de culture. Car l'une des principales interférences lors du processus de culture cellulaire humaine/animale, c'est les contaminations par les différents micro-organismes.

C'est pour cette raison, un environnement totalement stérile est une condition primordiale pour la réussite d'un processus de culture cellulaire.

Ainsi, les outils nécessaires pour la culture cellulaire sont représentés dans la **Figure 1** :

- Un environnement stérile pour manipuler les cellules sans risques de contaminations, ce dernier est offert par un PSM ou une Hotte stérile.
- Un incubateur : appareil disposant des conditions physiques (température, humidité) et des conditions d'aérobie (O₂) ou d'anaérobie (CO₂) nécessaires à la survie des cellules.
- Milieux de culture, qui comme indiqués précédemment varient selon le type cellulaire et l'objectif de la manipulation.



Figure 1: Appareillage et matériaux utilisés en culture cellulaire (**Originale**). **A gauche**, Incubateur à CO₂. **Au milieu**, Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). **A droite**, milieu de culture.

I.1.3 Développement de la culture cellulaire

a)- Culture cellulaire 2D

Dans les cultures adhérentes en 2D, les cellules se développent en monocouche dans un flacon de culture ou dans une boîte de Pétri plate, fixée à une surface en plastique.

Les avantages des cultures 2D sont associés à la rapidité de croissance cellulaire, à son coût minime, une simple maintenance des cultures et à la réalisation de tests fonctionnels.

Malheureusement, les cultures adhérentes présentent également de nombreux inconvénients. Premièrement, les cellules cultivées en 2D n'imitent pas les structures naturelles des tissus ou des tumeurs. De plus, les interactions cellule-cellule et cellule-environnement extracellulaire ne sont pas représentées comme elles le seraient dans la masse tumorale. Ces interactions sont responsables de la différenciation, de la prolifération et de la vitalité des cellules, de l'expression des gènes et des protéines, de la réactivité aux stimuli, du métabolisme des médicaments et d'autres fonctions cellulaires (**Pampaloni *et al.*, 2007**).

En outre, après l'isolement du tissu et le transfert dans le modèle 2D, la morphologie des cellules est altérée, tout comme le mode de division cellulaire. La perte de phénotypes divers est également un résultat de la culture en 2D, car la modification de la morphologie des cellules peut affecter leur fonction, l'organisation des structures internes, la sécrétion et la signalisation cellulaire. En raison des perturbations dans les interactions avec le milieu extérieur, les cellules qui se développent de manière adhérente perdent leur polarité, ce qui modifie la réponse de ces cellules à divers phénomènes, comme les signaux apoptotiques (**Weaver *et al.*, 2002**).

Un autre inconvénient de la culture en 2D est que les cellules de la monocouche ont un accès illimité aux ingrédients du milieu tels que l'oxygène, les nutriments, les métabolites et les molécules de signalisation. Pour les cellules cancéreuses *in vivo*, la disponibilité des nutriments, de l'oxygène, etc., est plus variable en raison de l'architecture naturelle de la masse tumorale (**Pampaloni *et al.*, 2007**).

En raison des nombreux inconvénients des systèmes 2D, il était nécessaire de trouver des modèles alternatifs, meilleurs qui imitent une masse tumorale naturelle, tels que les systèmes de culture 3D.

b)- Culture cellulaire 3D

L'une des premières cultures tridimensionnelles a été réalisée dans une solution de Soft Agar, par Hamburger et Salmon dans les années 1970 (**Hamburger et Salmon, 1977**). Depuis lors, des similitudes frappantes entre la morphologie et le comportement des cellules se développant dans une masse tumorale et dans des cellules cultivées dans des conditions 3D ont été bien décrites et documentées (**Pampaloni *et al.*, 2007**).

Les systèmes de culture en suspension 3D sont largement utilisés comme modèle dans les études, par exemple pour augmenter la population des cellules souches cancéreuses.

Le tableau suivant illustre les différences principales entre ces deux techniques :

Tableau I : Comparaison entre les deux techniques de culture cellulaire 2D et 3D.

Type de culture	2D	3D	Bibliographie
Durée de développement de la culture	De quelques minutes à quelques heures	De quelques heures à quelques jours	Chen <i>et al.</i>, 2012
Imitation des conditions <i>in vivo</i>	Faible imitation	Forte imitation	Griffith et Swartz, 2006

Interactions cellulaires	Absence des interactions cellule-cellule et cellule-environnement	Conservation de toutes les interactions	Gilbert <i>et al.</i>, 2010
Accès aux composants du milieu	Accès illimité aux nutriments, oxygène et métabolites	Accès contrôlable aux différents ingrédients	Breslin et O'Driscoll, 2013
Coût	15-50 € (moins cher)	60-1000 € (plus cher)	

I.1.4 Les modèles de culture 3D *in vitro* les plus utilisés

a)- Cultures *ex vivo*

Le terme *ex vivo* (**Figure 2**) signifie que les échantillons à tester ont été extraits de l'organisme par biopsie. Il s'agit du plus ancien modèle de tumeur *in vitro* en 3D, cultivé sous forme de suspension, qui a été utilisé pour tester des médicaments avant l'apparition des lignées cellulaire immortalisées. Il implique non seulement des cellules tumorales, mais aussi des cellules du stroma et des protéines de la matrice extracellulaire (**Centenera *et al.*, 2013**).

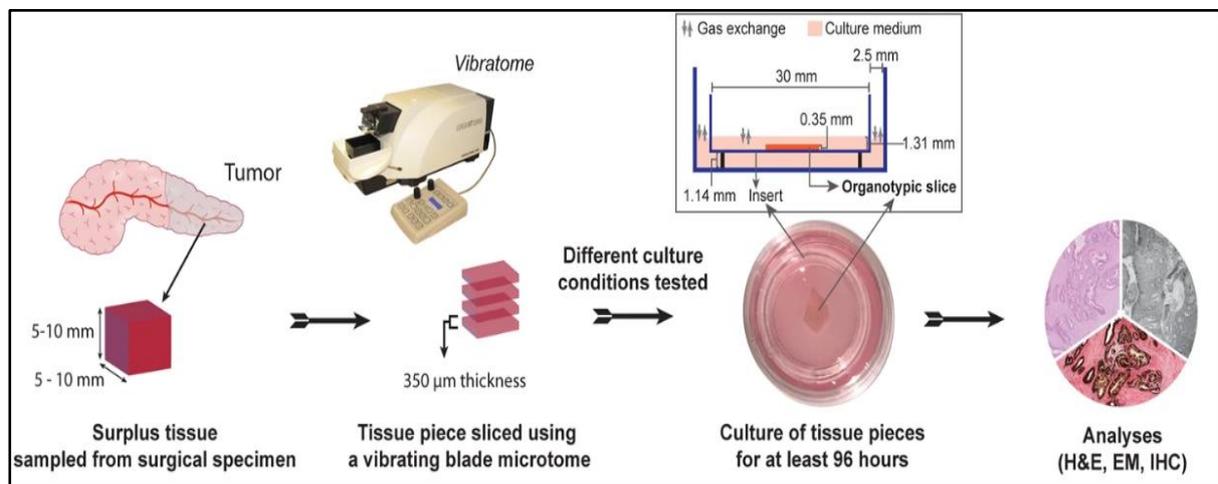


Figure 2: Protocole de prélèvement d'une tumeur par biopsie et sa culture (**Misra *et al.*, 2019**).

b)- Cultures cellulaires multicouches (MCC)

La formation de cultures cellulaires multicouches est l'approche la plus simple pour l'élaboration d'un modèle tumoral 3D *in vitro*. A cette fin, les cellules sont cultivées dans des chambres semi-perméables recouvertes de protéines de la membrane extracellulaire. Plus il y'a de cellules dans la chambre, plus la couche cellulaire est plus épaisse (**Figure 3**).

La MCC de cellules cancéreuses humaines a été utilisée avec succès pour étudier la pharmacocinétique tissulaire des médicaments anticancéreux (**Pruijn *et al.*, 2005**).



Figure 3: Illustration de la culture cellulaire multicouche (www.dutscher.com).

c)- Matrices tridimensionnelles

Elles sont utilisées dans l'ingénierie tissulaire comme un outil permettant la croissance cellulaire dans le microenvironnement natif (**Burdett *et al.*, 2010**). En d'autres termes, ces matrices permettent de reproduire l'environnement cellulaire de chaque organe.

Il s'agit généralement d'hydrogels fabriqués à partir de polymères naturels (Matrigel[®], collagène, poly D-Lysine) ou de matériaux synthétiques (**Burdett *et al.*, 2010**).

C'est le plus répandu et connu d'entre eux, le Matrigel[®] est le nom commercial d'un mélange protéique gélatineux sécrété par les cellules de sarcome de souris. Il s'agit de la matrice la plus courante pour la culture de cellules cancéreuses.

Nous citons aussi le poly D-Lysine qui est une matrice synthétisée à partir de polymères organiques composés de l'acide aminé lysine, elle facilite l'adhésion des cellules et donc leur développement.

L'utilisation de biopolymères naturels comme le Matrigel[®] ou le collagène permet de reproduire l'environnement extracellulaire complexe qui existe dans les tumeurs *in vivo*.

d)- Sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MTS)

Les MTS sont des agrégats sphériques denses (50-1000 μm de diamètre) qui imitent les tumeurs solides en termes de simulations des interactions cellule-cellule et du microenvironnement des tumeurs. Toutefois, contrairement aux cultures *ex vivo*, ils sont générés à partir de lignées cellulaires immortalisées bien établies.

Or, les MTS ont une organisation sphérique similaire à l'architecture des tumeurs *in vivo* (Figure 4) (Weiswald *et al.*, 2015).

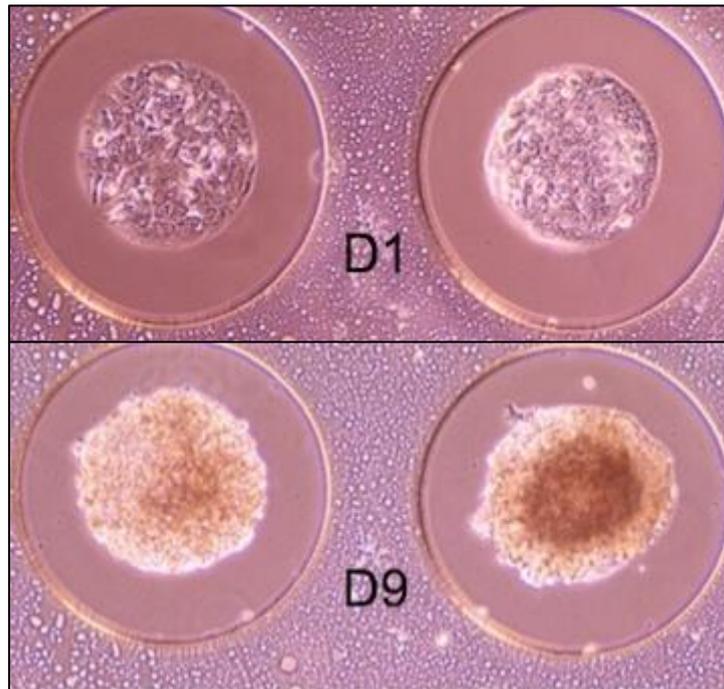


Figure 4 : Formation des sphéroïdes sur des micropatterns de fibrinogène. **D1:** Premier jour d'incubation. **D9:** Les sphéroïdes après 9 jours d'incubation (www.alveolelab.com).

Ce modèle a été adopté dans la recherche sur le cancer par Sutherland au milieu des années 1970 (Sutherland *et al.*, 1971). Actuellement, les sphéroïdes tumoraux sont considérés comme une plateforme rationnelle pour prédire l'efficacité des médicaments *in vivo*.

I.2 Développement tumoral

I.2.1 La cellule cancéreuse

Une tumeur, ou néoplasme, est une masse tissulaire composée par une accumulation incontrôlée de cellules anormales à prolifération excessive. Ces cellules subissent des mutations successives et s'échappent aux mécanismes régulateurs du développement.

Selon la théorie de Knudson : une seule mutation n'est pas capable de développer la carcinogénèse, mais elle est toujours initiée par deux altérations génétiques, c'est la « Knudson's Two-Hit hypothesis ». Un cancer apparaît chez un individu d'un jeune âge (10 à 30 ans) quand la première mutation est héritée, et donc quelques années plus tard suffisent pour que la deuxième altération aura lieu et déclencher l'oncogénèse (Knudson, 1971).

La **Figure 5** illustre la théorie de Knudson.

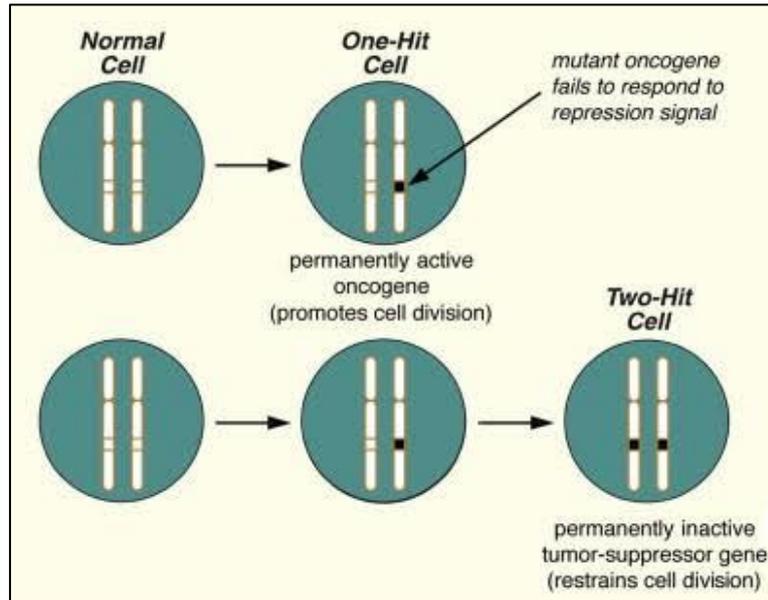


Figure 5 : Illustration de la théorie de Knudson (**Knudson, 1971**).

Les cellules tumorales envahissent l'organe dans lequel elles se trouvent et deviennent indépendantes des signaux grâce à leur acquisition de nouvelles fonctions et la formation de leur propre réseau vasculaire durant la tumorigenèse (c'est la néoangiogenèse).

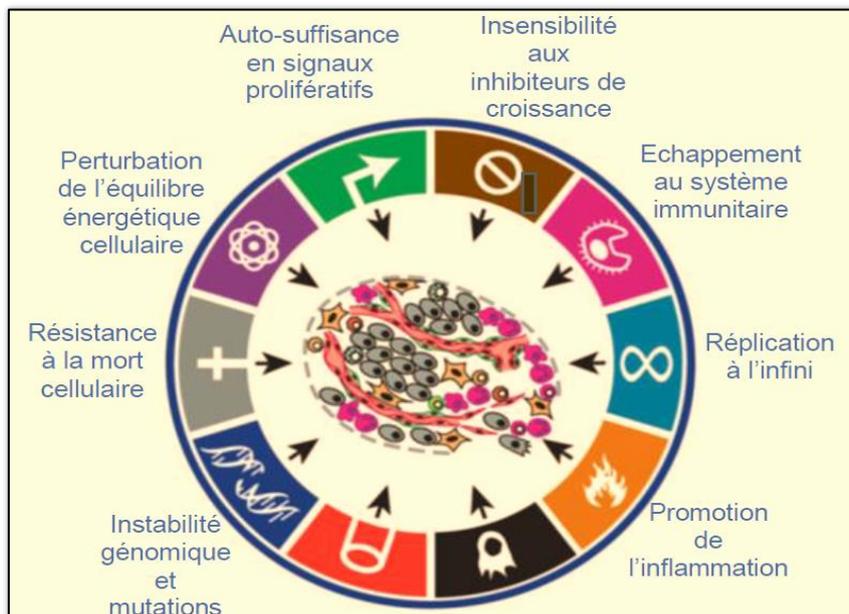


Figure 6 : Caractéristiques des cellules tumorales (**Hanahan et Weinberg, 2011**).

Comme il est indiqué précédemment, les cancers sont des maladies qui découlent d'anomalies génétiques ou épigénétiques et finissent par perturber la régulation entre la croissance, la division et la mort des cellules dans l'organisme (**Willman et Hromas, 2006**).

I.2.2 La carcinogénèse

Désigne une succession d'étapes se déroulant plus ou moins lentement en fonction du type de cellules concernées, qui résultent d'un déséquilibre entre la division et l'apoptose suite à des altérations génétiques, sur deux types de gènes les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs connus pour leur implication dans ce processus (**Blay et al. 2004**). En fonction du gène touché et du type tissulaire, certains cancers apparaissent en quelques mois tandis que, d'autres ne sont détectables que plusieurs années après le début du processus.

Les phases de la carcinogénèse (illustrés dans la **Figure 7**):

- **Initiation** : une exposition à un carcinogène chimique, physique ou biologique, se traduit par des modifications irréversibles de l'ADN qui amènent les cellules normales à acquérir la capacité de prolifération indéfinie et non-contrôlée. La période de latence est inversement proportionnelle à la dose en composé cancérigène, en effet, l'augmentation de cette dernière augmente l'incidence des foyers néoplasiques et diminue la phase de latence (**Vogelstein et Kinzler, 2004**)

- **Promotion** : caractérisée par une forte instabilité génomique qui résulte de la multiplication incontrôlée des cellules initiées stimulées par les carcinogènes (**Vogelstein et Kinzler, 2004**)

- **Progression** : au cours de cette phase, les cellules, désormais malignes, acquièrent de nouvelles fonctions telles que l'invasion locale et métastatiques, une croissance cellulaire très rapide, et deviennent indépendantes, c.-à-d., prolifèrent même en absence du stimulus extérieur et produisent l'énergie nécessaire pour leur développement par fermentation (effet Warburg). La formation d'un nouveau réseau sanguin (néoangiogénèse) qui crée une interface entre la tumeur et les tissus voisins (**Vogelstein et Kinzler, 2004**).

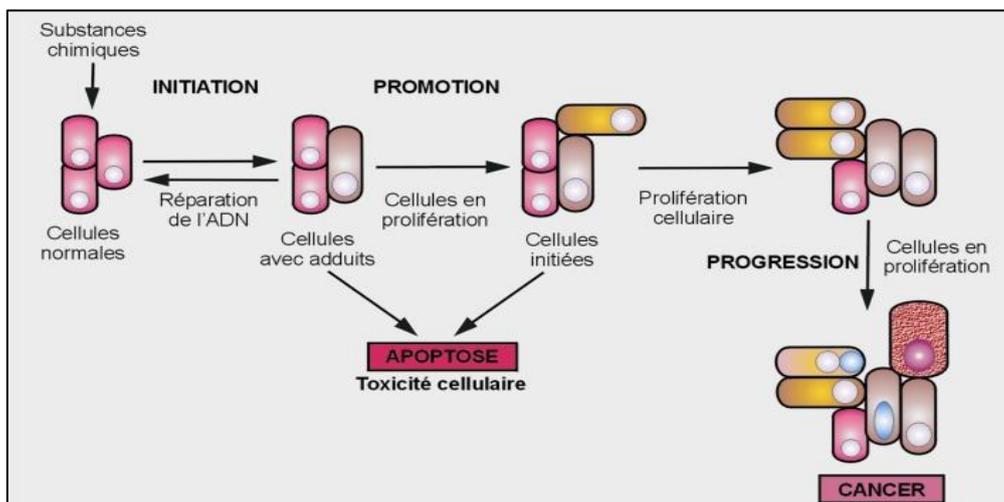


Figure 7: Les différentes étapes de la cancérogenèse (**Oliveira et al., 2007**).

I.3 Les tumeurs cérébrales

I.3.1 Généralités

Ce sont l'ensemble des pathologies cancéreuses se développant dans le SNC. Elles peuvent toucher les cellules nerveuses, en parle dans ce cas du Neurinome, ou les cellules gliales : les oligodendrocytes donnant un Oligodendrogliome, les cellules de Schwann donnant un Schannome, ou les astrocytes formant un Astrocytome. Les différents grades et dénominations sont récapitulés dans le **Tableau II**.

La plupart des cancers forment des métastases qui s'attaquent à d'autres organes du corps, les tumeurs cérébrales n'ont pas cette capacité, il est donc plus approprié de parler de « tumeurs cérébrales » plutôt que « cancer du cerveau ». Loin d'être les plus fréquentes, elles sont malheureusement les plus graves et touchent les deux sexes d'une façon équitable sur toutes les tranches d'âge (**WHO, 2008**).

I.3.2 Epidémiologie des tumeurs cérébrales

L'épidémiologie est l'étude des facteurs influant sur les maladies des populations humaines, la répartition, la fréquence et la gravité des états pathologiques. Elle prend en considération le nombre de cas souffrant de la pathologie, le sexe, l'âge et le type histologique que touche la pathologie.

A l'échelle mondiale, les tumeurs cérébrales sont classées au 18^{ème} rang selon le nombre des cas enregistrés, et elles sont réparties ainsi :

a)- L'âge : l'incidence des tumeurs cérébrales est directement proportionnelle à l'avancement d'âge où à la fréquence d'atteinte chez la personne mûre est environ quatre fois plus élevée que chez l'enfant, avec un taux de 24 pour 100000 personnes chez les adultes et 6 par 100000 chez les enfants (**Loiseau et Huchet, 2009**).

b)- Le sexe : l'incidence des tumeurs cérébrales diffère chez les deux sexes en fonction du type tissulaire. Les méningiomes dominant chez le sexe féminin, tandis qu'on observe la prédominance des gliomes chez le sexe masculin, le glioblastome est la classe la plus fréquente (**Loiseau et Huchet, 2009**).

c)- Le type histologique : prenant compte des types de tumeurs cérébrales, les Glioblastomes et les Méningiomes sont les prédominants puis les Astrocytomes en troisième position (**Loiseau et Huchet, 2009**).

Les facteurs de risque :

- L'immunodépression : les patients présentant une immunodépression et les malades du SIDA ont un risque plus élevé de formation d'un lymphome cérébral (**Loiseau et Huchet, 2009**).
- Les syndromes héréditaires : comme la neurofibromatose de type 1 et 2, la maladie de VonHippel-Lindau, la sclérose tubéreuse de Bourneville augmentent le risque de survenue d'une tumeur cérébrale (**Loiseau et Huchet, 2009**).
- Les radiations ionisantes : elles sont considérées parmi les causes principales des tumeurs cérébrales notamment les lymphomes et les méningiomes (**Loiseau et Huchet, 2009**).
- D'autres facteurs environnementaux peuvent être sur la liste, on cite les pesticides, l'utilisation excessive des téléphones portables, l'exposition aux champs électromagnétiques, le tabac et les aliments riches en nitrates.

I.3.3 Classification des tumeurs cérébrales

Il existe de nombreuses classifications des tumeurs cérébrales, chacune d'entre elles se basent sur plusieurs paramètres. Néanmoins, la classification la plus répandue est la classification de l'OMS (**Louis et al., 2007**), Celle-ci s'appuie sur des critères histologiques ainsi que sur le grade de malignité et plus récemment sur l'aspect moléculaire. Les critères histologiques tiennent compte du type cellulaire de l'origine et du grade, allant de I (moins agressif) jusqu'au IV (plus agressif) qui est défini par la vitesse d'évolution et l'agressivité.

Selon la localisation de la tumeur et l'origine de la cellule, on distingue :

- **Les tumeurs des méninges (méningiomes)** : touchent les méninges qui sont les couches enveloppant le SNC (pie-mère, dure-mère, arachnoïdes) (**Leh, 2011**).
- **Les tumeurs des nerfs crâniens et spinaux** : on appelle neurinome une tumeur se développant à partir du nerf crânien, un adénome est une tumeur provenant d'une glande cérébrale (**Leh, 2011**).
- **Les tumeurs neuro-épithéliales (les gliomes)** : se développent des cellules gliales qui sont divisées en plusieurs types, le mécanisme cancéreux peut être initié par chaque classe, et présente des caractéristiques et un niveau de malignité différents (**Leh, 2011**).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a élaboré une classification des tumeurs cérébrales en fonction de leur malignité, voici un récapitulatif :

Tableau II : Définition selon l’OMS des grades de tumeurs intracrâniennes (tumeurs des cellules gliales) (De Tribolet, 2008).

Tumeur gliale :	Caractéristiques :
Astrocytome pilocytique (de grade I)	Bénin, stable
Astocytome de grade II Oligodendrogliome de grade II	Pré-malins, évolution vers la malignité
Astocytome anaplasique (grade III) Oligodendrogliome anaplasique (grade III)	Malins
Astrocytome de grade IV (Glioblastome)	Très malin

Le grade est défini par référence à quatre critères histologiques qui sont :

- Le taux de divisions cellulaires (mitoses)
- Les clones cellulaires, c.-à-d., les différents types cellulaires
- La capacité à développer la vascularisation, caractéristique du 3^{ème} grade
- Le taux de la nécrose, c.-à-d., la proportion des cellules mortes (Louis *et al.*, 2007).

L’émergence d’une nouvelle classification basée sur les critères moléculaires a permis l’amélioration des moyens de diagnostic et de pronostic et donc une meilleure prise en charge des tumeurs cérébrales. A cet effet, nous avons réalisé une classification histomoléculaire détaillée des tumeurs cérébrales en nous référant à celle de l’OMS de 2021, les gènes et le profil moléculaire altéré ont été mis en avant (voir la partie annexes). L’un des principaux marqueurs moléculaires intégrés dans cette classification est les marqueurs IDH, un marqueur caractéristique des gliomes.

I.4 Les Glioblastomes

I.4.1 Généralités

Considérés comme étant des astrocytomes de grade IV, les glioblastomes ou glioblastomes multiformes (GBM), sont des tumeurs cérébrales malignes représentant plus de 50% des gliomes, faisant de lui le sous type histologique gliale le plus fréquent (Laws *et al.*, 2003).

Le GBM est la classe des tumeurs cérébrales la plus agressive car il grandit et s'étend rapidement. Il peut se former dans la substance blanche ou la substance grise puis s'infiltrer rapidement vers le cerveau. On enregistre une courte durée de vie des sujets atteints de cette tumeur, avec un intervalle de survie d'un patient avec traitement de 8 à 18 mois et un taux de survie de moins de 10 % au-delà de 5 ans (**Laws et al., 2003**).

Cette tumeur exerce une pression sur les tissus en voisinage et induit l'inflammation du tissu cérébral qui provoque un œdème. Ses symptômes se manifestent par une hypertension intracrânienne, nausées, vomissements, céphalées, troubles du comportement ou de la vision et perte de mémoire. Ils varient selon la localisation de la tumeur : lobes temporaux ou frontaux (**Laws et al., 2003**).

I.4.2 Origine des glioblastomes

Dès 1990, l'étude des altérations moléculaires observées dans les glioblastomes a permis de proposer deux modèles de progression.

La plupart des GBM (90% des cas) se développent d'une manière très rapide chez les patients les plus âgés, 62 ans en moyenne, avec un délai inférieur à 3 mois, entre l'apparition des premiers symptômes et le diagnostic, ce sont des glioblastomes primaires ou appelé également « *de novo* ». Les glioblastomes secondaires sont beaucoup moins répandus (10% des cas) et touchent les patients plus jeunes (45 ans en moyenne). Ces derniers résultent de la transformation anaplasique d'un astrocytome de plus bas grade, l'astrocytome diffus de grade II, puis de l'astrocytome anaplasique de grade III (**Fève, 2012**).

I.4.3 Histologie des glioblastomes

Les GBM regroupent un ensemble de tumeurs particulièrement hétérogènes, ils sont caractérisés par une forte densité cellulaire avec de nombreuses mitoses et atypiques cellulaires, associés à la présence d'astrocytes pléomorphes peu différenciés (**Louis et al., 2007**). Ils présentent des centres nécrotiques entourés de palissades cellulaires péri-nécrotiques (**Figure 8, droite**). Ce sont des tumeurs invasives, à leur périphérie des cellules tumorales isolées infiltrent le parenchyme adjacent sain.

Enfin, une croissance anormales de cellules endothéliales de type pseudoglomérulaire témoigne de leur caractère très angiogénique (**Figure 8, gauche**)

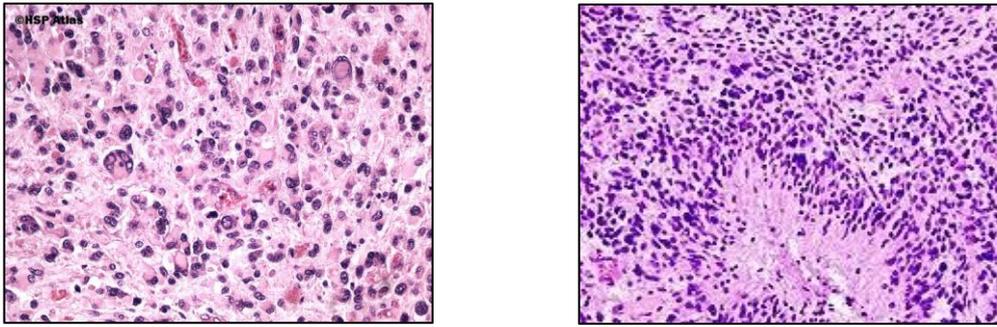


Figure 8: Aspects histologiques d'un glioblastome au grossissement X20 (Louis *et al.*, 2007)

Comme indiqué précédemment, l'objectif de notre travail est d'induire le développement de masse tumorale de Glioblastomes dans des œufs fécondés, ainsi la partie suivante abordera la notion théorique du développement embryonnaire chez le poulet, précisément chez la poule domestique *Gallus gallus domesticus*.

I.5 Développement embryonnaire

I.5.1 L'embryogenèse

L'embryogenèse consiste à la formation d'un organisme pluricellulaire animal, à partir de la cellule œuf issue de la fusion de deux gamètes mâle et femelle parentaux. Elle comprend trois grandes étapes : segmentation, gastrulation et organogenèse, la **Figure 9** résume ce processus :

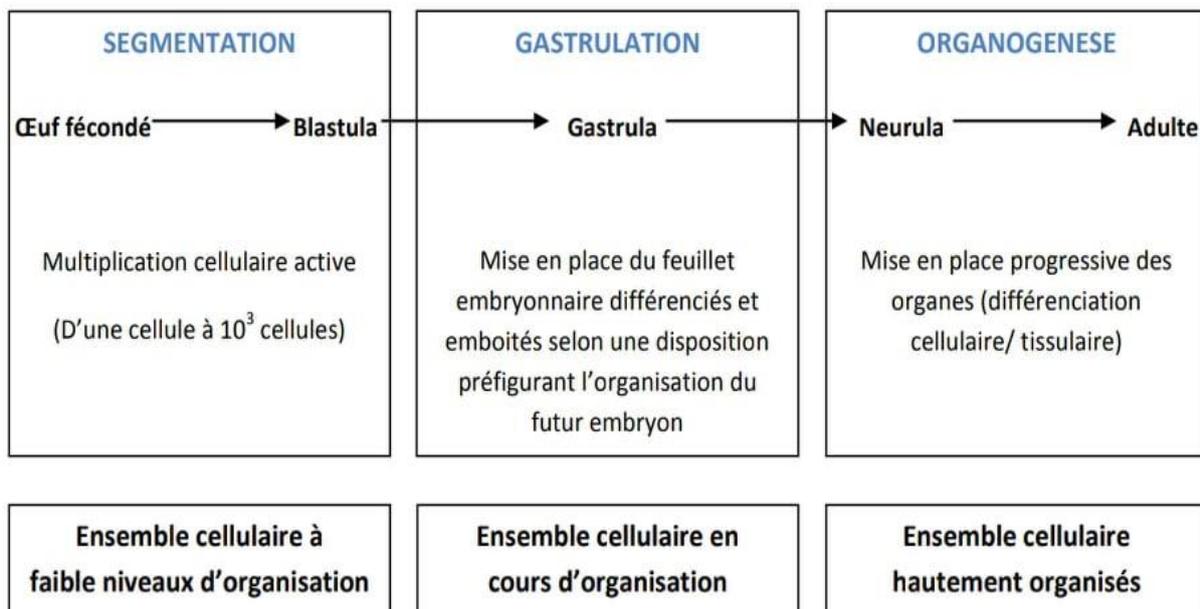


Figure 9 : Principales étapes de l'embryogenèse animale (Fourcier et Fraquinet, 2003).

I.5.2 La poule et la composition de son œuf

Les poulets sont des vertébrés supérieurs ovipares, caractérisés par la production d'œufs téloécithes avec un volume très important de vitellus et une coquille protectrice, ce qui confère à l'embryon un milieu sécurisé et plein de nutriments (Blesbois, 2011).

a)- Composition de l'œuf

Comme représenté dans la **Figure 10**, l'œuf de la poule est constitué de :

- **La coquille** : formée par le calcaire et représente environ 10 % du poids total de l'œuf, joue le rôle d'une couche protectrice naturelle pour les nutriments et permet les échanges de l'embryon avec le milieu extérieur (Blesbois, 2011).
- **Le vitellus (le jaune)** : représente 30 % de l'œuf, riche en graisses et en pigments. A sa surface se trouve la cicatricule, disque germinatif de 3 mm qui marque le pôle animal de l'œuf, composée d'un cytoplasme dépourvu de réserves dans lequel se trouve le pronucléus femelle, c'est à son niveau qu'a lieu la fécondation et là où le développement embryonnaire débute. Entouré par la membrane vitelline qui enveloppe primitivement l'ovule, elle est présente même en absence de fécondation (Blesbois, 2011).
- **L'albumen (le blanc)** : constitue deux tiers de l'œuf, composé de 87 % d'eau et 12 % d'albumine (Blesbois, 2011).

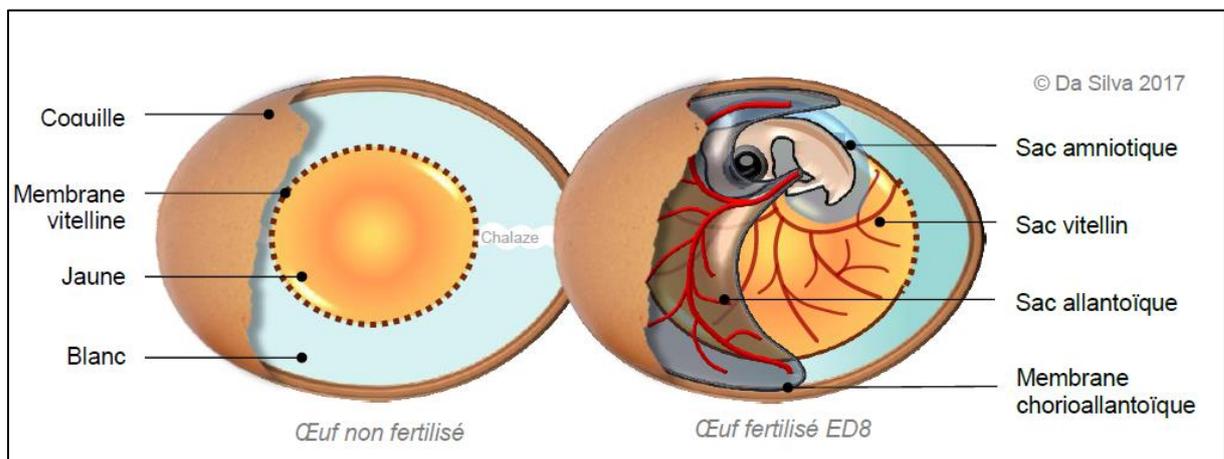


Figure 10 : Représentation des différentes structures basiques et extra-embryonnaires de l'œuf de poule non fertilisé ou fertilisé (Da Silva, 2017).

Il est important de signaler qu'au cours du développement de l'embryon du poulet, il y'a formation d'une membrane particulière par fusion des mésodermes du chorion avec ceux de l'allantoïde, c'est la membrane chorioallantoïque (CAM).

I.6 La membrane chorioallantoïque (CAM)

I.6.1 Généralités

La CAM est une membrane extra-embryonnaire transparente hautement vascularisée et non innervée qui sert de couverture à l'allantoïde (**Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014**), voir la **Figure 11**. Elle se développe dans l'œuf fécondé à partir du 3^{ème} jour d'incubation à partir de la paroi ventrale de l'intestin postérieur de l'embryon du poulet. Elle assure plusieurs fonctions au cours du développement embryonnaire telles que les échanges respiratoires, l'absorption des minéraux provenant de la coquille et leurs transferts à l'embryon (**Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014**).

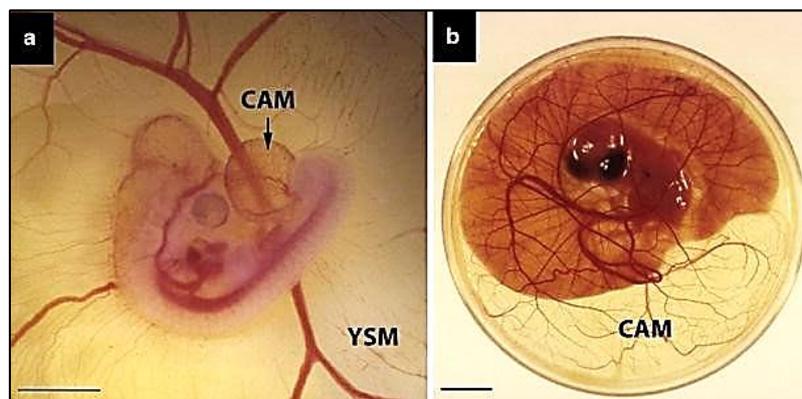


Figure 11: Structures extra-embryonnaires d'embryon du poulet. **(a):** Embryon à son troisième jour d'incubation et formation de la CAM, YSM : Yolk Sac Membrane (membrane vitelline). **(b):** Embryon après 12 jours d'incubation dans une boîte de pétri (**Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014**).

I.6.2 Historique

En 1911, **Peyton Rous** et **Djames Murphy** ont utilisé ce système et ont démontré la croissance de tumeurs de sarcome de poulet transplantées sur la CAM (**Rous et Murphy, 1911**). Un an plus tard, Murphy a réussi à réaliser des transplantations hétérologues de tumeurs de sarcome de rat dans ce modèle (**Murphy, 1912**). Plus tard dans les trentaines, on assiste à l'utilisation fréquente de la CAM pour culture de virus et le développement des vaccins (vaccin antigrippal, vaccin contre la variole,...) (**Goodpasture *et al.*, 1931**), aussi pour la culture des bactéries (*Liptospira* : bactérie Gram négatif cause l'ictère, fièvre atteinte pulmonaire,...) (**Morrow *et al.*, 1938**).

L'application de ce modèle en cancérologie a gagné en popularité au début des années 2000, ce qui a coïncidé avec les progrès de l'imagerie cellulaire et tissulaire en 3D et en direct, qui peut être directement appliquée aux modèles de tumeurs. Son utilisation a augmenté après qu'il a été démontré qu'elle constituait une bonne plateforme de croissance pour un large

éventail de lignées cellulaires cancéreuses, le **Tableau III** regroupe les travaux de cultures de cellules cancéreuses de différents types de lignées cellulaires :

Tableau III : Les différents travaux d'implantation de tissus tumoraux sur la CAM.

Type de cancer	Réalisateur de la culture	Année de réalisation	Réussite de la manipulation	Référence
Carcinome hépatocellulaire	Marzullo A, Vacca A, Roncali L, <i>et al</i>	1998	Oui	Marzullo <i>et al.</i>, 1998
Adénocarcinome ovarien	Ismail MS, Torsten U, Dressler C, <i>et al</i>	1998	Oui	Ismail <i>et al.</i>, 1999
Myélome multiple	Ribatti D, De Falco G, Nico B, <i>et al</i>	2003	Oui	Ribatti <i>et al.</i>, 2003
Cancer du côlon	Subauste MC, Kupriyanova TA, Conn EM, <i>et al</i>	2009	Réussie dans le cas de la tumeur primitive, et échouée dans le suivi de métastase	Subauste <i>et al.</i>, 2009
Mélanome humain	Lugassy C, Torres-Munoz JE, Kleinman HK, <i>et al</i>	2009	Oui	Lugassy <i>et al.</i>, 2009
Glioblastome	Balciuniene N, Tamasauskas A, Valanciute A, Deltuva V, <i>et al</i>	2008	Survie des tumeurs greffées pendant 6 jours seulement après la greffe	Balciuniene <i>et al.</i>, 2009
Glioblastome	Strojnik T, Kavalar R, Barone TA, Plunkett RJ	2010	Oui	Strojnik <i>et al.</i>, 2010
Glioblastome	Ribatti D	2022	Oui	Ribatti D, 2022

Carcinome rénal	Ferician O, Cimpean AM, Avram S, <i>et al</i>	2015	Oui	Ferician <i>et al.</i>, 2015
Ostéosarcome (cancer osseux)	Kunz P, Schenker A, Sahr H, <i>et al</i>	2019	Oui	Kunz <i>et al.</i>, 2019

I.6.3 Structure et développement du CAM

La CAM apparaît à partir du jour 3 du développement embryonnaire de la même manière que l’allantoïde chez les mammifères, en effet elle s’étend de manière extra embryonnaire à partir de la paroi ventrale de l’intestin postérieur endodermique (**Figure 12**).

Cependant, chez le poulet elle fusionne avec le chorion pour former la membrane chorioallantoïque. Initialement avasculaire, elle acquiert rapidement un riche plexus vasculaire (**Figure 12a, b**) qui se complexe avec l’émergence d’artères et de veines (**Figure 12c**). Sa différenciation s’achève au 13^{ème} jour et nécessite des taux importants de divisions cellulaires (**Hamburger et Hamilton, 1951**).

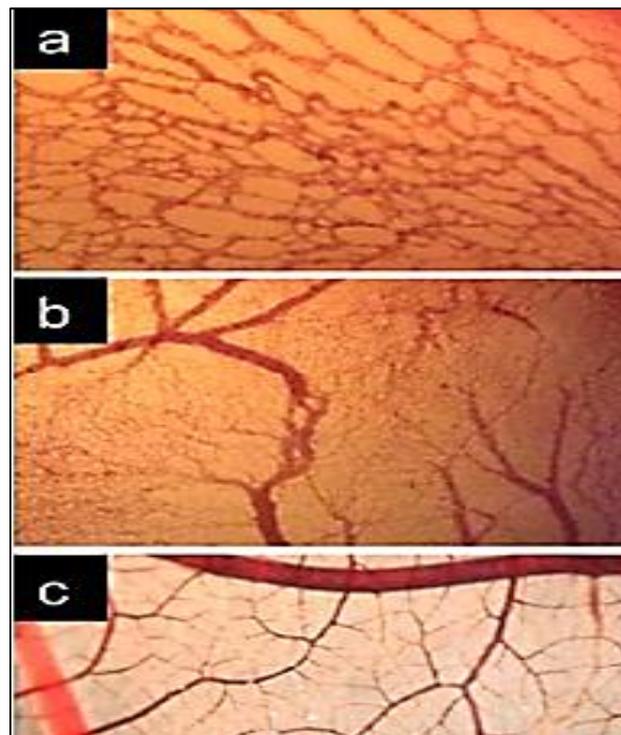


Figure 12: Maturation de la vascularisation de la membrane chorioallantoïque. **(a)** : plexus vasculaire primitif d’un embryon au 3^{ème} jour d’incubation. **(b)** : Le réseau vasculaire au 7^{ème} jour d’incubation. **(c)** : la complexité hiérarchique de la CAM (**Nowak-Sliwinska *et al.*, 2014**).

Histologiquement, la CAM est constituée de deux feuillets épithéliaux qui limitent une fine couche de stroma (**Figure 13**). L’épithélium supérieur provient de l’ectoderme, tandis que

le stroma et l'épithélium inférieur sont d'origine mésodermique et endodermique respectivement. C'est dans le stroma que résident le système vasculaire sanguin et lymphatique. De cette manière, il est important de réaliser que tout composé délivré à la surface du CAM doit traverser l'épithélium de surface et atteindre les vaisseaux du stroma (Merckx *et al.*, 2020).

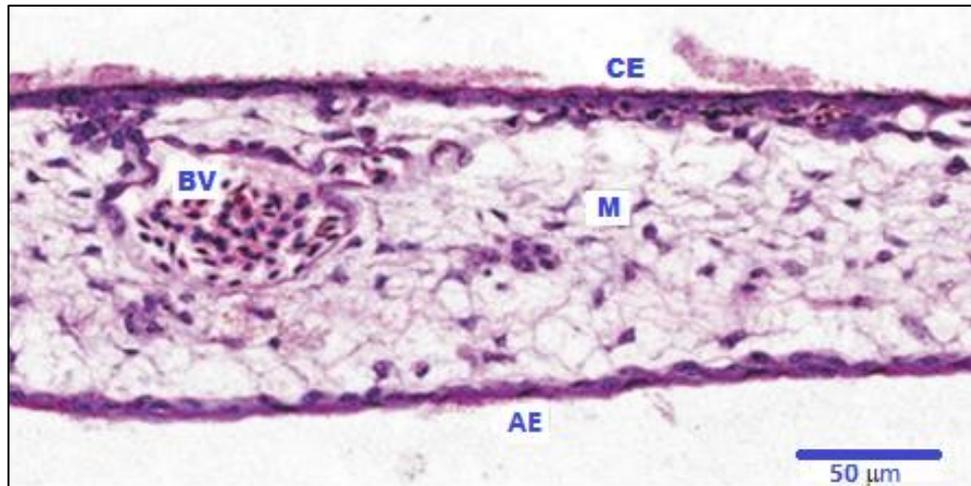


Figure 13: Coupe transversale de la CAM observé par la méthode immunohistochimique. CE : ectoderme chorionique. BV : vaisseaux sanguins. M : mésenchyme. AE : endoderme allantoïque (Merckx *et al.*, 2020).

Après 4 à 5 jours d'incubation, la CAM se fixe à la surface de la coquille de l'œuf éliminant ainsi le calcium et assurant l'apport de l'oxygène à travers les pores.

De ce fait, d'un point de vue pratique, l'ouverture des œufs fécondés pour la culture doit être réalisée au 3^{ème} jour, car après ce temps, la rupture de la coquille induit la rupture et la perte de cette membrane. De plus, lors de l'ouverture de petites fenêtres pour l'application de composés à des points temporels ultérieurs, une dissection méticuleuse de la coquille et de sa membrane sous-jacente est nécessaire pour exposer la CAM vasculaire sans endommager les petits vaisseaux.

I.6.4 Avantages et inconvénients du modèle CAM

Le modèle CAM offre de multiples avantages, pour étudier l'angiogenèse et la biologie vasculaire, par rapport aux autres modèles *in vivo* utilisés :

- Le coût minime, en effet, le prix d'un œuf fécondé est 100 fois inférieur à celui d'une souris d'une souche commune prenant compte des frais du maintien et d'entretien.
- La rentabilité et la facilité d'utilisation.
- Surveillance et visualisation en temps réel des essais.
- La croissance rapide : elle se développe dans une courte durée du temps de seulement 7 jours (du 3^{ème} au 10^{ème} jour d'incubation) à partir d'une petite membrane avasculaire

en une structure qui couvre toute la surface interne de la coquille affichant un réseau vasculaire densément organisé. C'est cet énorme coup de pouce angiogénique qui fournit une mine d'informations liées aux voies de développement requises.

- L'accessibilité complète au système circulatoire et la transparence de ses couches superficielles facilitent l'application de différentes modalités d'imagerie allant de la microscopie à la résonance magnétique en passant par l'imagerie par tomographie par émission de positons (IRM et TEP), en outre, presque toutes les longueurs d'onde de la partie visible du spectre électromagnétique peuvent être utilisées pour l'imagerie par fluorescence (**Ribatti, 2010**).
- Ce modèle peut également être utilisé pour étudier les processus pathologiques par simple exposition à des cytokines, des hormones ou des médicaments, ou par transplantation de tissus, de cellules isolées ou de matériaux (**Ribatti, 2010**).
- La lenteur de développement du système immunitaire, qui n'atteint l'activité physiologique qu'au 17^{ème} jour après la fécondation, réduit les réactions immunologiques indésirables, ce qui facilite la transplantation de tissus xénogéniques, par exemple des tumeurs humaines (**Ribatti, 2010**).
- Vu la différence d'espèce (la poule est une espèce aviaire) et donc l'hétérologie tissulaire, il n'y a pas de risque de confondre les résultats d'un test avec les composants du milieu. Par exemple, l'évaluation de l'effet des anticorps anti OV-90 (cancer des ovaires) par implantation des cellules tumorales sur la CAM, ces anticorps reconnaissent seulement leurs récepteurs (OV-90) et ne reconnaissent pas l'œuf.

Néanmoins, la CAM présente des limitations, le plus important peut-être la non-compatibilité tissulaire ce qui peut influencer négativement l'accrochage des xéno greffes. De plus, les expériences se prolongent après 17 jours, une réaction inflammatoire non spécifique peut se produire et détruit la greffe. Ces réactions peuvent provoquer des réponses angiogéniques difficiles à distinguer d'une activité angiogénique du greffon (**Ribatti, 2010**).

Chapitre II
Matériel et méthodes

II. Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de génie biologique des cancers de la faculté de médecine, campus Aboudaou de l'Université Abderrahmane MIRA de Béjaïa (UAM-Béjaïa).

II.1 Matériel biologique

II.1.1 Œufs fécondés

34 œufs de la poule *Gallus gallus domesticus* (poule domestique) naturellement fécondés ont été utilisés, procurés d'un éleveur expérimenté (**Figure 14a**).

II.1.2 Tissus tumoraux

Les cellules tumorales utilisées lors de la xénogreffe correspondent à un fragment tissulaire de type tumoral et plus précisément à un glioblastome récupéré suite à une exérèse sur un patient de sexe féminin âgée de 43 ans, opérée le 14 Juin 2022 au niveau du service de neurochirurgie du CHU de Béjaïa (**Figure 14b**).

II.1.3 Tissus sains

En parallèle, des cellules non-tumorales sont utilisées dans une autre xénogreffe pour vérifier la corrélation entre l'agressivité et la survie, elles sont issues d'une cervelle fraîche de veau, récupérée 1h après la mise à mort de l'animal (**Figure 14c**).

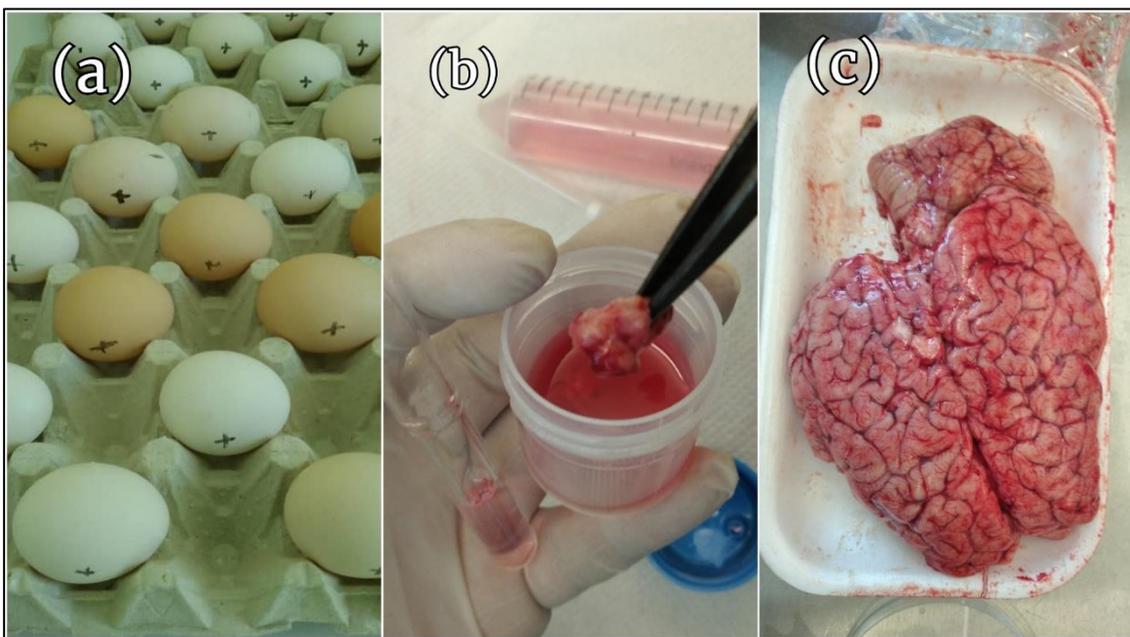


Figure 14: Matériels biologiques utilisés (**Originale**). **a** : œufs fécondés. **b** : Glioblastome. **c** : cervelle de veau.

II.2 Méthodes

La présente étude s'est basée sur le suivi du développement embryonnaire des œufs fécondés selon **Vu et al. (2018)** en effectuant quelques modifications et adaptations. Au 10^{ème} jour, des xénogreffes de tumeurs et de tissus sains ont été réalisées sur les embryons qui se sont développés, plus exactement sur la membrane chorioallantoïque. Ceci permettra de suivre le développement tumoral et la croissance cellulaire dans le but de confirmer l'utilisation des embryons de poules comme un modèle de culture cellulaire *in vitro*. Pour cela, nous procéderons à l'observation des coupes histopathologiques faites à partir du 17^{ème} jour.

II.2.1 Suivi du développement embryonnaire

a)- Conservation des œufs

Pour garantir le bon déroulement du développement embryonnaire, il est primordial de sélectionner les œufs à incuber. En effet, ils ont été triés en éliminant ceux qui sont sujet de malformations et de saleté excessive.

Les œufs sélectionnés ont été mis sur des supports en papier, en position horizontale, le petit bout à droite (**Figure 15**), puis conservés à température ambiante entre 13 et 15°C, dans un endroit sombre et aéré (**Castaing, 1979**).

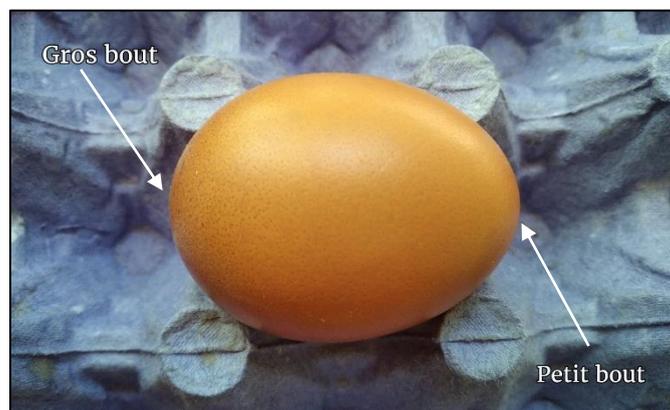


Figure 15 : Positionnement des œufs horizontalement (**Originale**).

b)- Incubation des œufs

L'incubation est réalisée dans un incubateur à CO₂ ventilé avec une température de 37.5°C (**Figure 16**), un bac d'eau a été mis à l'intérieur afin de garantir le taux indiqué d'humidité (40-50 % aux premiers jours, et 60-70 % en fin d'incubation) (**Castaing, 1979**).



Figure 16 : Œufs de poules incubés dans un incubateur à gaz (**Originale**).

A partir du 2^{ème} jour d'incubation, il est indispensable de retourner les œufs pour leur assurer une bonne aération et pour éviter que l'embryon ne se colle à la coquille. Le retournement est effectué à la moyenne d'un demi-tour 2 fois par jours avec des mains bien propres, comme est indiqué dans la figure 17 et cela jusqu'au 14^{ème} jour (**Castaing, 1979**).

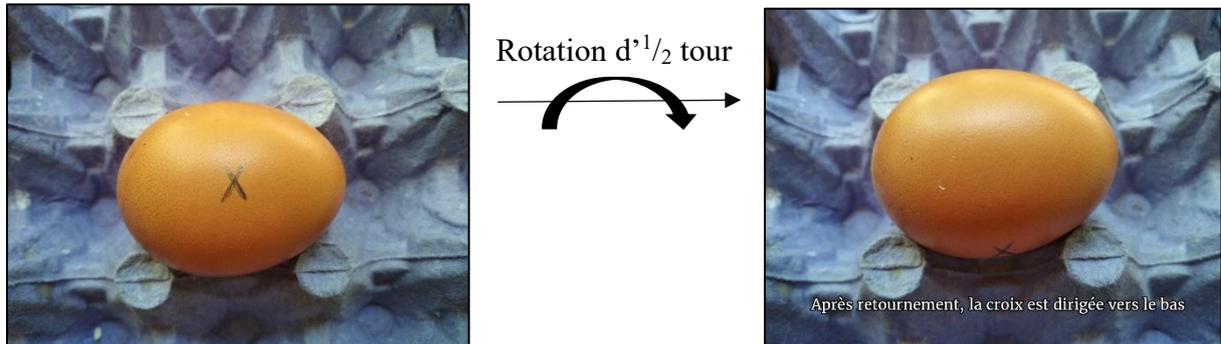


Figure 17 : Le retournement des œufs (**Originale**).

c)- Mirage des œufs

Il s'agit d'observer à l'intérieur de l'œuf par transparence de la coquille à l'aide d'un mire-œufs que nous avons mis au point (**Figure 18**). Cette technique effectuée à partir du 5^{ème} jour d'incubation permet de détecter les œufs infertiles et les embryons morts et s'en débarrasser car ils génèrent des gaz toxiques. De plus, elle permet de suivre le développement de la chambre à air. Elle consiste à placer l'œuf à mirer sur le site de dépôt du mire-œufs qui est, de préférence, dans une pièce sombre (**Wageningen et al., 2004**).

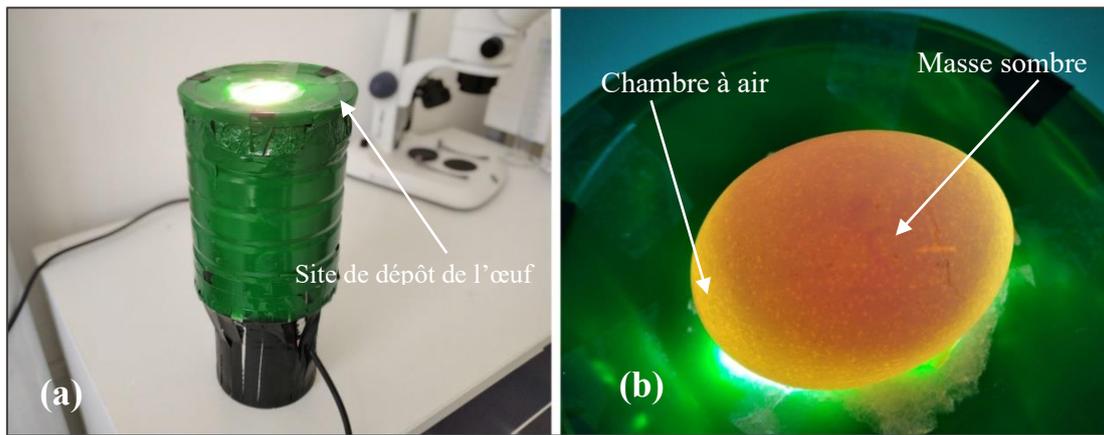


Figure 18 : Technique de mirage des œufs (**Originale**). **a** : Mire-œufs artisanal. **b** : Mirage d'un œuf de poule.

II.2.2 Observation *in vivo* des embryons

Le suivi du développement des embryons est effectué par observation de ces derniers sous la loupe binoculaire à des stades précoces de leur genèse grâce à des petites fenêtres ouvertes à la surface des coquilles.

Protocole d'ouverture des fenêtres à la surface de la coquille

- Retirer l'œuf de l'incubateur et le mettre sur un support tout en gardant la même position et en évitant de trop le secouer
- En utilisant une aiguille à pointe fine stérilisée, effectuer un petit trou dans le petit bout de l'œuf puis avec une micropipette prélever 1ml d'albumine, cela sert à faire descendre l'embryon qui se trouve directement sous la coquille
- Reboucher le trou avec du parafilm
- Trouer la surface de la coquille avec l'aiguille, puis à l'aide d'une pince et un ciseau stériles découper délicatement une fenêtre
- Observer l'embryon à l'œil nu ou sous la loupe binoculaire, puis recouvrir la fenêtre avec le parafilm.

Les étapes sont illustrées dans la **Figure 19**.

En raison de la sensibilité des embryons et la fragilité des œufs et pour éviter leur perte, la manipulation ; l'observation et la prise des photos, ont été réalisés rapidement et surtout avec délicatesse.

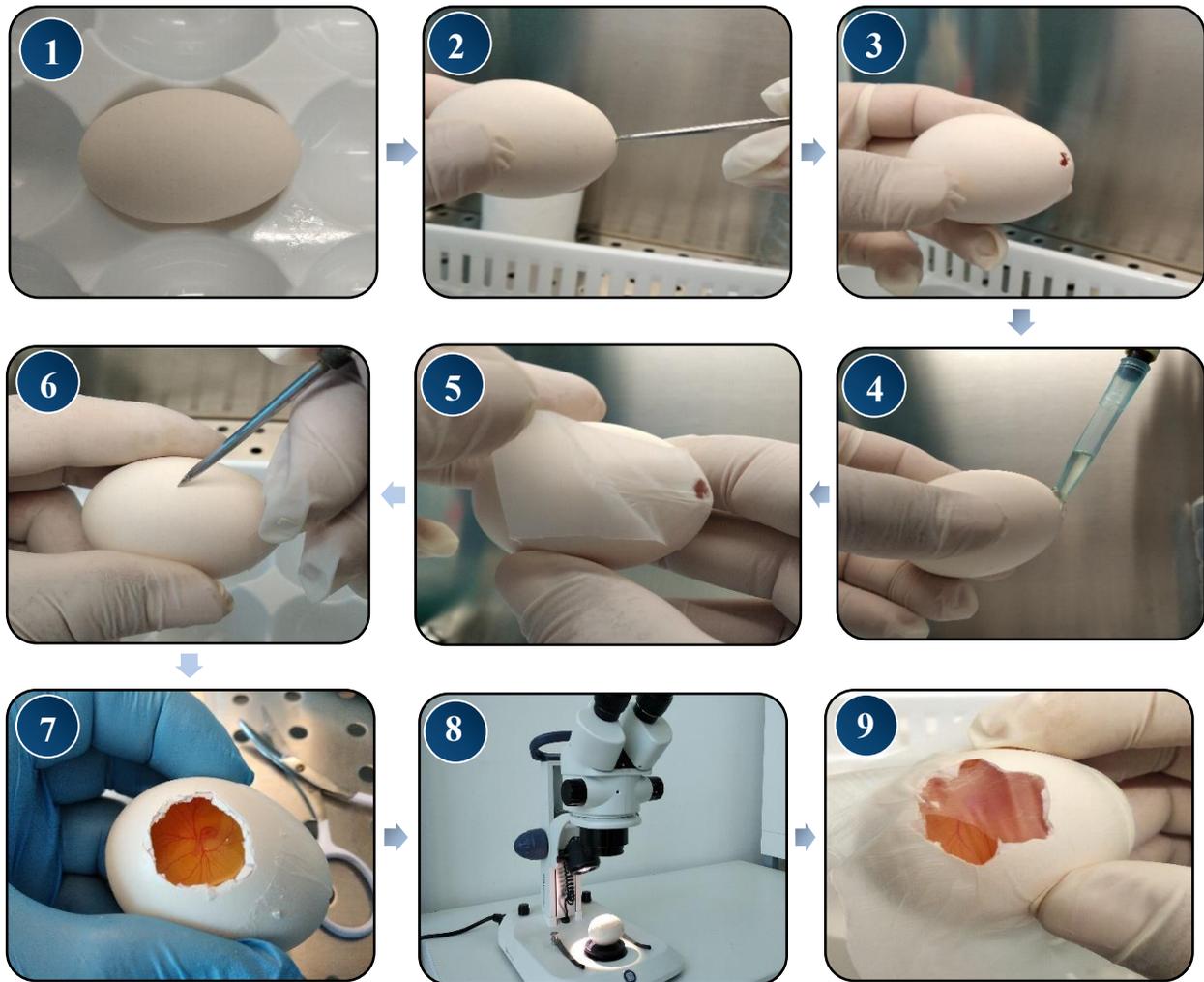


Figure 19 : Etapes d'ouverture d'une fenêtre à la surface de l'œuf (Originale).

II.2.3 Réalisation des xénogreffes

a)- Préparation des greffons

La préparation des greffes est faite sous PSM et les œufs ont été répartis en 3 lots : 2 lots pour la culture du tissu sain sous deux formes (sous forme de suspension cellulaire et sous forme de fragments) et le troisième lot est utilisé pour la greffe du tissu tumoral sous forme de suspension.

b)- Protocole de préparation des greffons à partir du tissu sain

Sous forme suspension cellulaire (Premier lot)

- Peser 2g de la cervelle de veau dans une boîte de pétri et les mettre dans 2 ml de milieu de culture (RPMI) (**Figure 20**).



Figure 20 : Dissection et peser du tissu sain (**Originale**).

- Découper la masse tissulaire en petits fragments à l'aide d'une pince et d'une lame à bistouri (**Figure 21**).

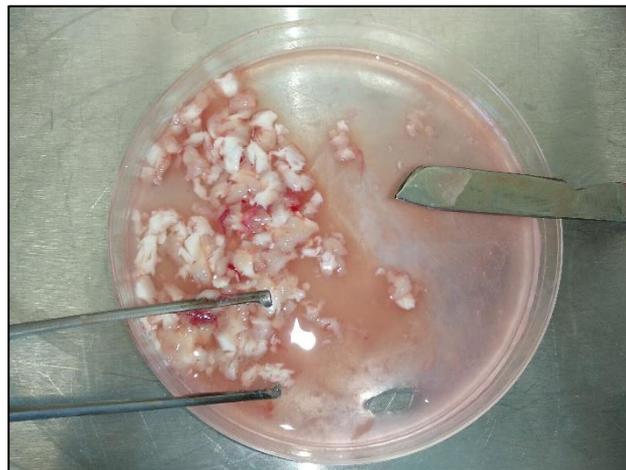


Figure 21 : Fragmentation du tissu sain dans du RPMI (**Originale**).

- Ajouter 5 ml de la solution EDTA-Trypsine 0.5% et laisser agir pendant 5 min.

La trypsine est un agent enzymatique de dissociation cellulaire, elle est utilisée en culture cellulaire pour détacher des cellules adhérentes sur les flasques de culture ou boîte de pétri. En, effet, cette enzyme clive les protéines membranaires d'adhésion, et les cellules se retrouvent alors en suspension. La présence d'EDTA dans la solution de trypsine augmente son efficacité en isolant les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , qui sont des médiateurs de l'adhésion cellulaire.

- Continuer le découpage pendant 2 min, en ajoutant 1 ou 2 ml de RPMI en cas de nécessité.
- Vider le contenu de la boîte de pétri dans un tube à centrifugation (Eppendorf de 50 ml).

- Centrifuger à 3000g pendant 5 min (**Figure 22**).



Figure 22 : Première centrifugation (**Originale**).

- Après la centrifugation, éliminer le surnageant puis remettre le culot dans la boîte de pétri et ajouter 10 ml de la solution EDTA-Trypsine 0.5% et laisser agir pendant 5 min puis continuer la dissection pour les 2 min qui suivent.



Figure 23 : Le culot dans la solution EDTA-Trypsine 0.5% (**Originale**).

- Verser de nouveau le contenu de la boîte de pétri dans un tube à centrifugation
- Centrifuger une deuxième fois à 3000g/5min.



Figure 24 : Deuxième centrifugation (**Originale**).

- Eliminer le surnageant puis ajouter 5 ml de milieu de culture (**Figure 25a**) au culot puis filtrer à l'aide de 2 bandes à gaz vers un autre tube à centrifugation (**Figure 25b**).

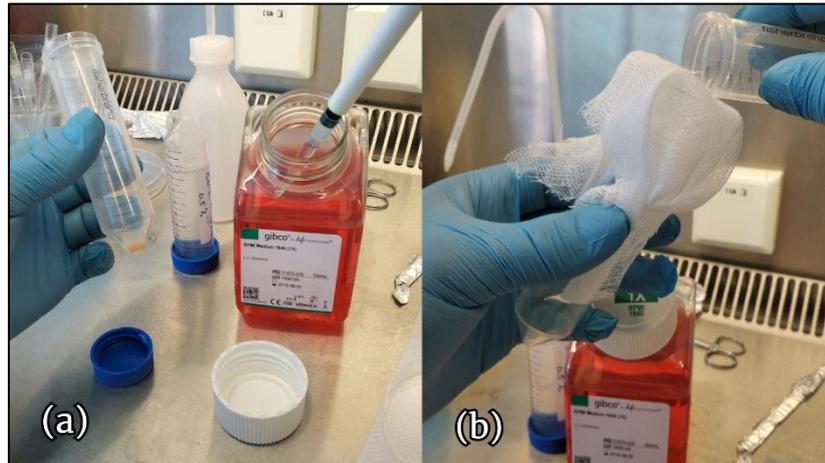


Figure 25 : Ajout de RPMI et filtration à l'aide de 2 bandes à gaz (**Originale**).

- Centrifuger une troisième fois à 3000g/5min puis éliminer le surnageant
- Enfin, ajouter un volume de milieu de culture (RPMI) qui dépendra du nombre d'œufs et il est calculé ainsi :

$$V = [n + 2] \times 20$$

D'où :

V : Volume en μl de RPMI à ajouter au culot

n : Nombre d'œufs du 1^{er} lot

2 : Marge d'erreur

20 : Volume en μl de RPMI à ajouter pour chaque œuf

- Dans notre cas, on a 10 œufs appartenant au premier lot donc on a ajouté 240 μl de milieu de culture (RPMI) pour avoir notre suspension cellulaire, qui est prête pour l'utilisation.

Sous forme de fragments tissulaire (Deuxième lot)

- Peser 2g de tissu dans une boîte de pétri avec 2 ml de milieu de culture (RPMI)
- Découper la masse tissulaire en petits fragments (2-3 mm) à l'aide d'une pince et d'une lame à bistouri
- Ajouter 1 ml de RPMI en cas de nécessité

II.2.3.1 Protocole de préparation des greffons à partir du tissu tumoral (Troisième lot)

- Mettre le tissu cancéreux (glioblastome) dans un broyeur Potter-Elvehjem en ajoutant 1 à 2 ml du milieu de culture

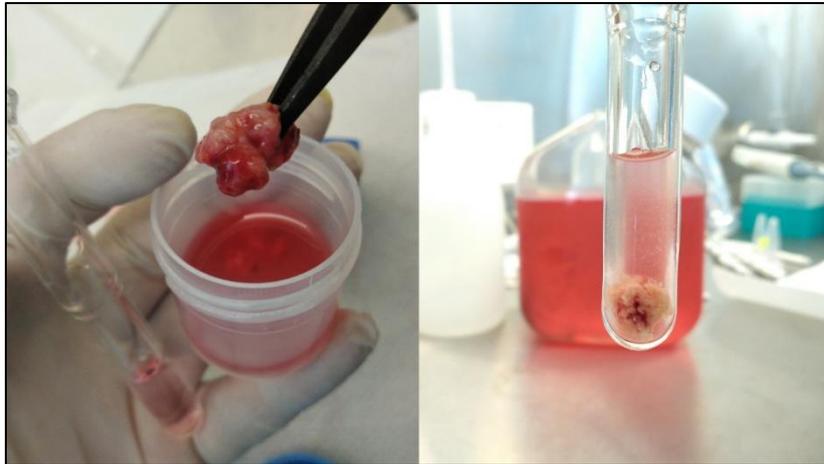


Figure 26: Potter-Elvehjem contenant le glioblastome dans du RPMI (**Originale**).

- Broyer progressivement le tissu jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

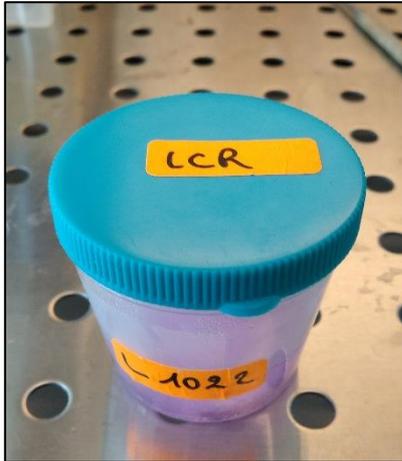


Figure 27 : Le glioblastome et le RPMI en suspension homogène (**Originale**).

- Remettre dans le Potter afin de broyer et éliminer tous les débris.
- Puis, verser tout le contenu dans un Eppendorf et le centrifuger à 3000g pendant 5min.
- Après la centrifugation, récupérer le culot dans une boîte de pétri en ajoutant 10ml de la solution de trypsination 0.5% et laisser agir pour 5 min.
- Verser dans un Eppendorf et centrifuger à 3000g pour 5min.
- Récupérer le culot dans 5ml de milieu de culture (**Figure 18**) et filtrer avec 2 bandes à gaz dans un autre tube (Eppendorf) qui sera centrifugé à 3000g/5min, à la fin le surnageant sera jeté.

- Un volume du LCR tumoral (Liquide CéphaloRachédien) est ajouté au culot, il est calculé comme suit :

$$V = [n + 2] \times 20$$



D'où :

V : Volume en μl de LCR à ajouter au culot

n : Nombre d'œufs

2 : Marge d'erreur

20 : Volume en μl de LCR à ajouter pour chaque œuf

Figure 28: Liquide CéphaloRachédien tumoral (**Originale**).

- Dans notre cas, 240 μl ont été ajouté (pour 10 œufs).

II.2.4 Mise en culture

Pour réduire au maximum le temps passé en dehors de l'incubateur, et afin d'éviter de provoquer un choc thermique pour les œufs, il est préférable de les manipuler un par un.

a)- Suspension cellulaire

- Retirer l'œuf de l'incubateur avec délicatesse sur un support en gardant le même positionnement (gros bout à gauche).



Figure 29 : Dépôt de l'œuf sur un support en plastique (**Originale**).

- Déposer, avec une micropipette, 20 μ l de la suspension cellulaire à l'intérieur de chaque œuf via l'ouverture qui a été faite au 3^{ème} jour, sur la membrane chorioallantoïque en effectuant une petite pression sur cette dernière.



Figure 30 : Dépôt de la suspension cellulaire sur la CAM (Originale).

- Déposer également 20 μ l de pénicilline-streptomycine 10 000 U/ml sur chaque œuf en guise de prévention à la contamination bactérienne en raison de l'efficacité de leur action combinée contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.
- Refermer l'œuf avec du parafilm et le remettre dans l'incubateur.



Figure 31 : Refermeture de l'œuf avec du parafilm (Originale).

NB : Les œufs du 1^{er} lot ont reçu la suspension cellulaire saine (cervelle de veau) tandis que les œufs du 3^{ème} lot ont été greffés par la suspension tumorale (glioblastome).

b)- Sous forme de fragments

- L'œuf est retiré de l'incubateur avec délicatesse sur un support en gardant le même positionnement (gros bout à gauche)

- Avec une pince stérile, déposer 4 à 5 fragments tissulaires à l'intérieur de chaque œuf sur la membrane chorioallantoïque.



Figure 32 : Dépôt des fragments tissulaires sur la CAM (Originale).

- Refermer l'œuf avec du parafilm et le remettre dans l'incubateur.



Figure 33 : Remises des œufs dans l'incubateur (Originale).

- Les œufs sont remis dans l'incubateur après avoir fini la manipulation pour suivre leur développement, ils subissent un retournement à la même cadence (un demi-tour deux fois par jour), le taux d'humidité du milieu est augmenté dès le 10^{ème} jour vers 50%.

II.2.5 Récupérations des échantillons

Au 17^{ème} jour, les œufs ont été retirés de l'incubateur pour récupérer les échantillons.

a)- Procédé

- Casser l'œuf dans une boîte de pétri contenant de l'eau physiologique 9% (Figure 34a).
- Avec une pince stérile, retenir toute masse ou croissance suspecte être d'origine tumoral ou du tissu sain et la mettre dans un Eppendorf de 50ml (Figure 34b).
- Ajouter un volume (10 à 20 ml) du formol 10% pour fixer l'échantillon (Figure 34c).

- Tous les œufs ont été traités de la même manière et les tubes ont été conservés à une température de 4°C pendant au-moins 72h.

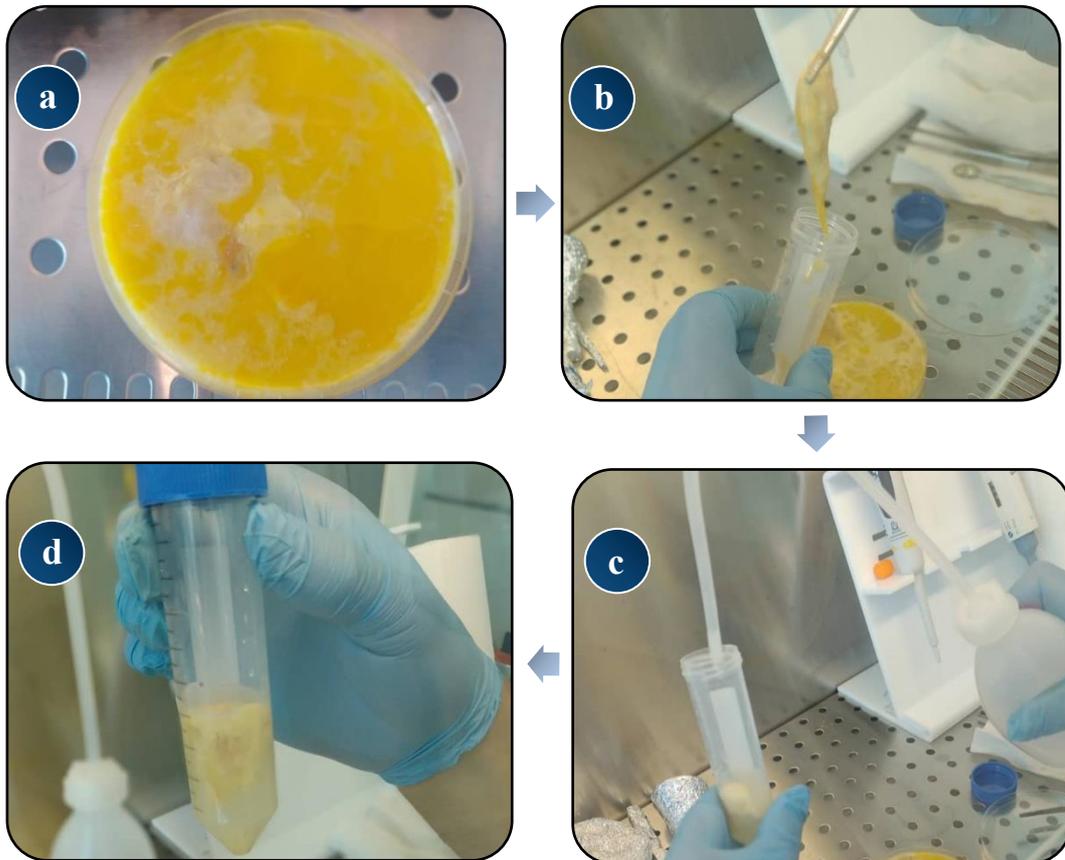


Figure 34 : Étapes de la récupération des échantillons (Originale).

II.2.6 Réalisation des coupes histopathologiques

a)- Protocole

- Après passage de 72h sous formol 10% et à 4°C, avec une pince stérile, prélever chaque échantillon et le remettre dans une histocassette

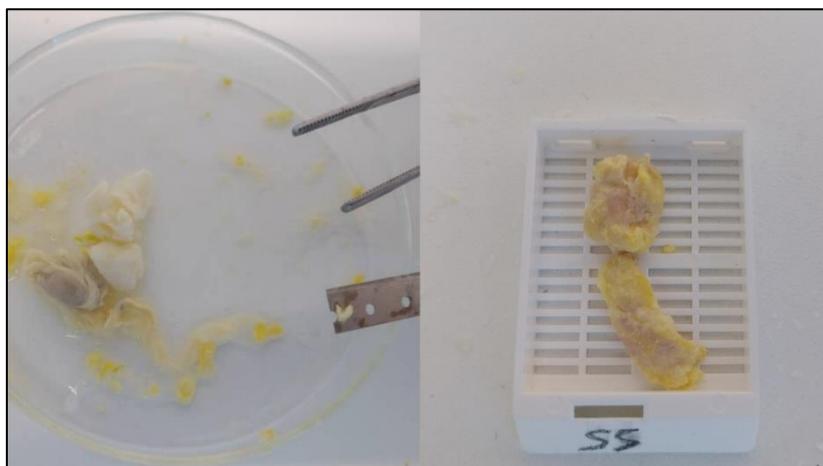


Figure 35 : Prélèvement de l'échantillon et sa mise dans une histocassette (Originale).

- Mettre les histocassettes dans un support et le placer dans un automate de déshydratation, c'est l'étape de déshydratation des prélèvements : cet automate comprend 3 bains successifs concentrés d'éthanol, suivis, de la même façon, de 3 bains de xylène qui ont servi à éliminer toute trace d'alcool. Ce procédé dure 1h et 30min.

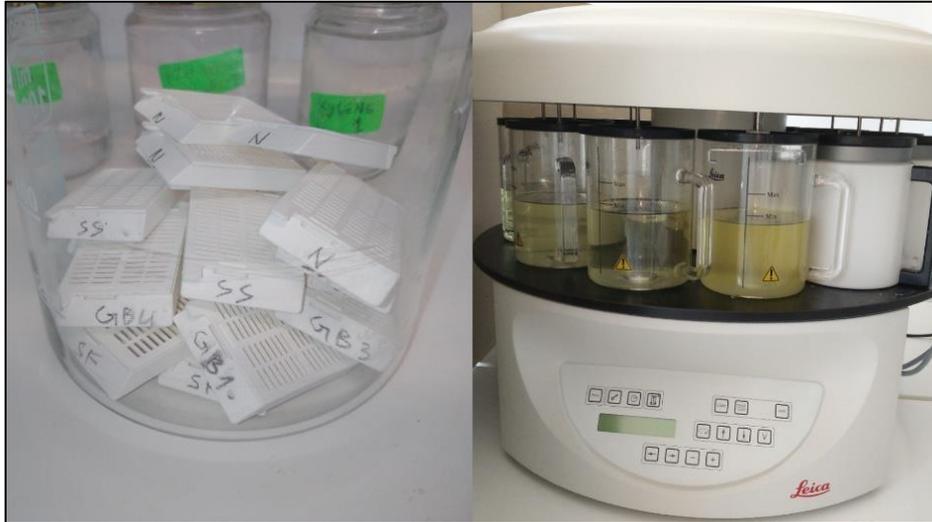


Figure 36 : Etape de déshydratation des prélèvements (**Originale**). **A gauche :** histocassettes dans un support. **A droite :** automate de déshydratation.

- Une fois les échantillons ont été séchés, passer vers leur enrobage à la paraffine : cette étape consiste à déposer les échantillons dans des moules en inox avant de les remplir de paraffine liquide.



Figure 37 : Enrobage à la paraffine (**Originale**).

- Une fois refroidie, nous obtenons des blocs facilement tranchés avec le microtome.



Figure 38: Coupure des blocs au microtome (**Originale**).

- Placer le bloc à la base du microtome commencer le tranchage (un appareil muni d'une lame tranchante, un mécanisme d'avancement, et un réglage pour l'épaisseur désirée des coupes), régler l'épaisseur sur $4\mu\text{m}$, et commencer le tranchage (**Figure 38**).
- Monter les rubans obtenus sur des lames en verre marquées et recouvertes au préalable d'une fine couche d'eau physiologique, ensuite immerger ces dernières durant un court instant dans un bain marie de 69°C .
- Plonger rapidement les lames dans un bain de xylène afin de les déparaffiner puis les conserver dans un incubateur à 70°C dans le but de les sécher.
- Après le séchage, replonger les lames dans un autre bain de xylène pour 30 min afin d'éliminer toute trace de la paraffine et ainsi permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.
- Immerger les ensuite dans un bain d'éthanol pour 10 min, et enfin dans un bain d' H_2O pendant 5 min, cette étape a pour but de réhydrater les lames.



Figure 39 : Matériel utilisés durant le montage des coupes (**Originale**). **A gauche :** Bain-marie, **Au milieu :** Xylène, **A droite :** Incubateur

II.2.7 Coloration des lames

Après la réhydratation des lames, vient l'étape de coloration, et elle est réalisée comme suit :

- Plonger les lames dans un bain d'hématoxyline basique pendant 5 min, ce dernier colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet.
- Immerger ensuite les lames dans le bain du deuxième colorant, l'éosine acide pendant 3 min, il colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose (**Figure 40**).
- Après chaque coloration, rincer les lames à l'eau distillée.



Figure 40 : Produits utilisés lors de la coloration des lames (**Originale**).

II.2.8 Montage permanent entre lame et lamelle

Ce montage sert à conserver les coupes colorées intactes pour un usage ultérieur, il a été réalisé en déposant une à deux gouttes du baume d'inclusion l'EUKITT (fixateur) sur la lamelle, cette dernière a été prise avec une certaine inclinaison et déposée délicatement sur la lame en évitant la formation des bulles d'air. Laisser sécher à l'air libre.

Ainsi, les lames sont prêtes pour l'observation (**Figure 41**).

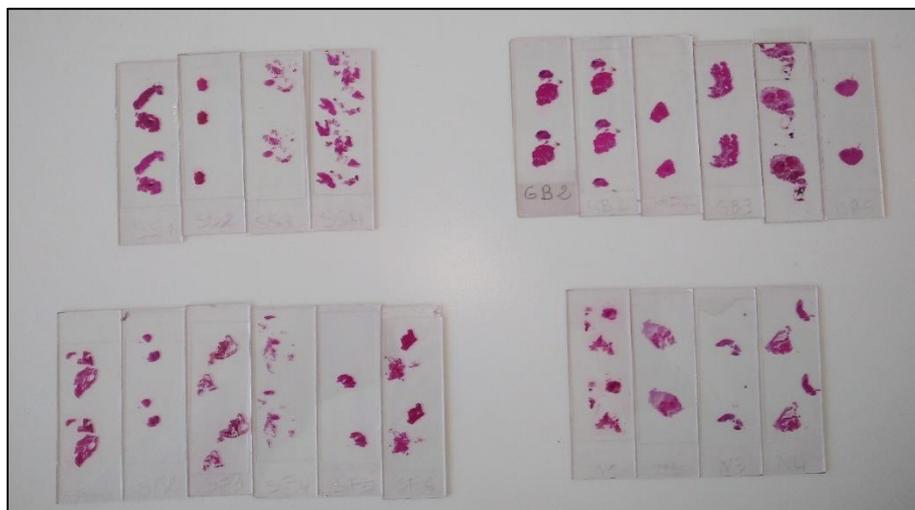


Figure 41 : Lames prêtes pour l'observation microscopique (**Originale**).

II.2.9 Observation sous microscope

L'observation microscopique a été réalisée à l'aide d'un microscope optique de type Leica DM1000LED muni d'une caméra Leica MC170HD ZEISS (**Figure 42**).

Ce microscope est couplé à une unité centrale de traitement d'informations et un ordinateur doté d'un logiciel d'imagerie Leica Application EZ (LAZER) permettant d'acquérir, de traiter et d'analyser les images à différentes dimensions.

Pour cela, placer la lame à la base du microscope, avec l'appareil photographique, prendre des images de différentes zones et à différents grossissements.

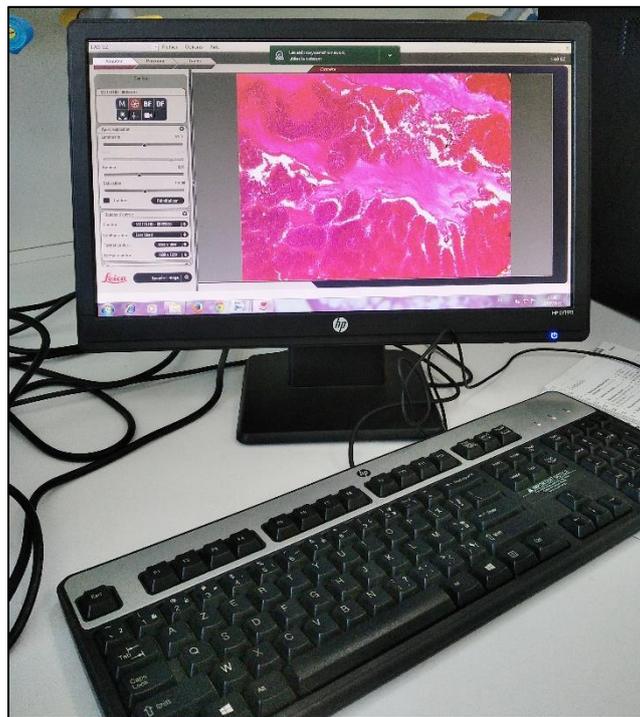


Figure 42 : Observation finale des lames (**Originale**).

Chapitre III
Résultats et discussion

III. Résultats

III.1 Suivi du développement embryonnaire

Tout au long de la période d'incubation, les œufs ont été soigneusement entretenus en veillant à ce que l'environnement leur soit favorable, en effet, un hygromètre a été déposé à l'intérieur de l'incubateur pour surveiller le taux d'humidité. La cadence et la fréquence de retournement ont été bien respectées, même les weekends.

III.2 Effectifs des œufs et d'embryons de la poule

Sur un total de 34 œufs de poule domestique *Gallus gallus domesticus*, nous avons réussi à maintenir en vie plusieurs embryons et nous avons réalisé plusieurs transplantations de cellules que ce soit du tissu sain ou du tissu tumoral au 10^{ème} jour du développement embryonnaire.

Le **Tableau IV** illustre l'effectif des échantillons récupérés après 17 jours d'incubation.

Tableau IV : Effectifs des œufs et des embryons.

Nombre d'œufs total (initial)	34
Nombre d'œufs non-fertiles	4
Nombre d'œufs transplantés	30
Nombre d'embryons récupérés	19
Nombre d'embryons morts	11

Le nombre d'embryons récupérés est un peu faible devant le nombre initial d'œufs, cela revient à plusieurs facteurs, parmi ceux-là, les coupures d'électricité qui déséquilibre les paramètres physiques (T et H) de l'incubateur ; le manque de ventilation à l'intérieur de l'incubateur ce qui a engendré un taux d'humidité très élevé (il a atteint 90 % à certains moments) ce qui a induit la formation d'eau dans l'œuf et a provoqué la mort de l'embryon.

III.3 Récupération des échantillons

Malgré toutes les conditions défavorables, nous avons réussi à maintenir en vie plusieurs embryons du poulet dont lesquels nous avons effectué la transplantation des cellules et nous avons récupéré plusieurs échantillons (19 échantillons).

Tableau V : Répartition des échantillons récupérés après 17 jours d'incubation.

Type de tissu	Forme de greffe	Nombre d'échantillons
Sain : cerveau du veau	Suspension cellulaire	6
	Fragments	7
Tumoral : glioblastome	Suspension cellulaire	6

III.4 Révélation macroscopique

Comme représenté dans la **Figure 43**, lors de la récupération des échantillons sur les boîtes de pétri, nous avons observé la formation de masses cellulaires solides sous forme de boules parfois sphériques sur la CAM des œufs greffés par les cellules du glioblastome, par contre, ces masses étaient absentes dans le cas des œufs greffés par les cellules du tissu sain (cervelle de veau).

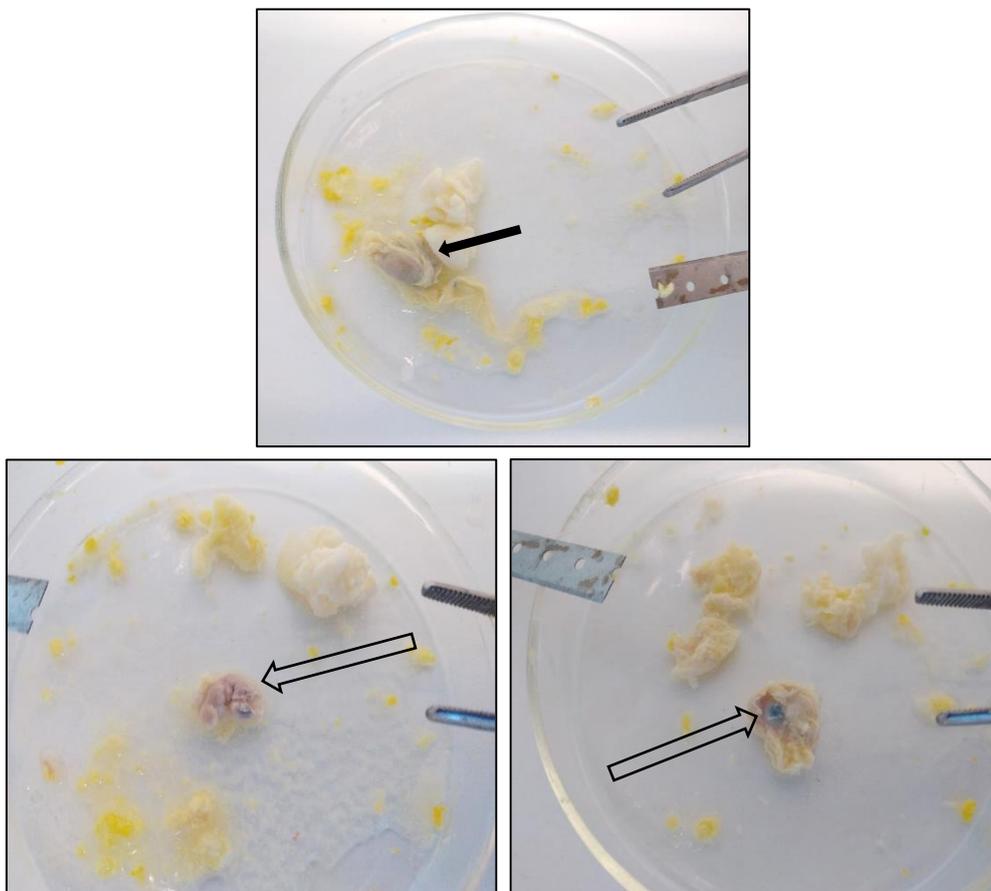


Figure 43 : Les différentes formes cellulaires obtenues. **En haut**, une masse tumorale indiquée par une flèche complète. **En bas**, embryons sains (indiqués par des demi-flèches) sans formation de masses ou de boules.

III.5 Révélation histopathologique

L'observation microscopique des lames obtenues par réalisation des coupes histopathologiques à partir de ces échantillons a révélé :

- Une forte croissance des cellules cancéreuses issues du Glioblastome.
- Une absence de croissance cellulaire dans le cas de greffe du tissu sain (les cellules de la cervelle de veau ne se sont pas développées) et ce, pour les deux méthodes d'inoculation.

Les résultats des observations sont illustrés dans la **Figure 44**.

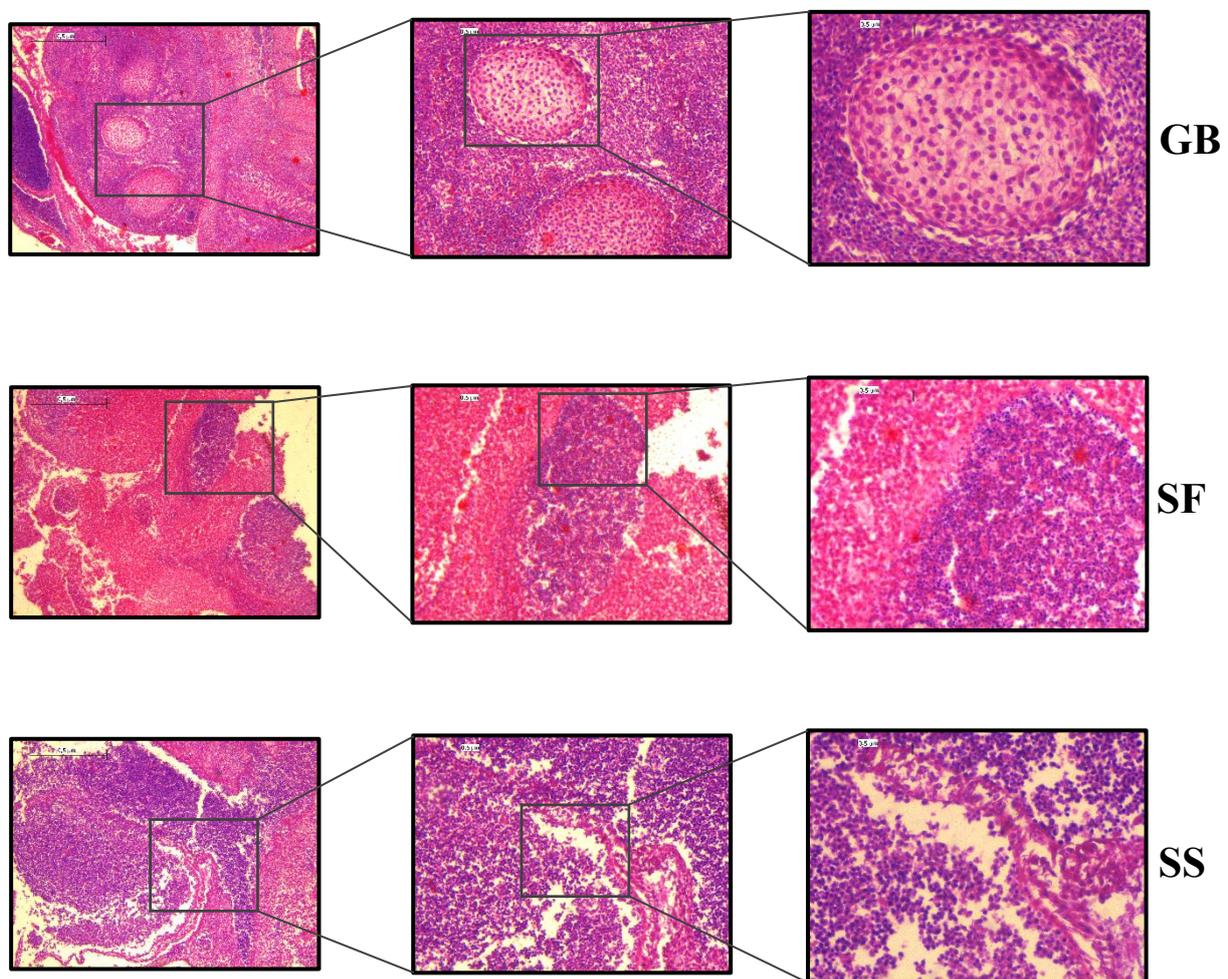


Figure 44 : Résultats d'observation de différents échantillons sous microscope ZEISS. **GB** pour Glioblastome. **SF** pour tissu sain sous forme de fragments. **SS** pour tissu sain sous forme de suspension. A gauche, l'observation est faite au grossissement **4**. Au milieu, le grossissement utilisé est le **10**. A droite, observation au grossissement **20**.

Comme illustré dans la **Figure 44**, nous avons observé un développement excessif des cellules du Glioblastome qui préservent toujours leurs caractéristiques de cellules cancéreuses: fusiformes ou polygonales avec des noyaux hyperchromatiques ronds ou ovales avec des

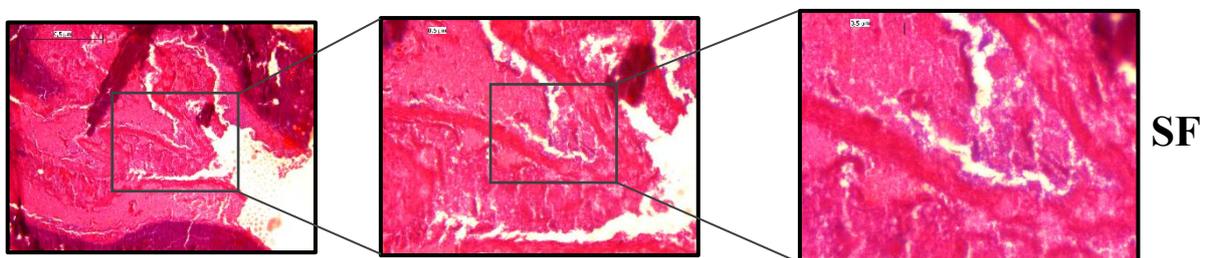
nucléoles, et parfois, nous remarquons des cellules binoclées. Elles avaient tendance à se regrouper en tourbillons et en ruisseaux. De petites cellules anaplasiques et géantes ont été également observées.

Nous noterons aussi la formation d'un nouveau réseau sanguin spécifique aux cellules tumorales (néoangiogenèse), qui crée une interface entre les cellules du glioblastome et les organes en développement de l'embryon (**Figure 45**).



Figure 45 : Observation microscopique d'une coupe histopathologique réalisée après récupération du transplant de glioblastome. La flèche est dirigée vers un vaisseau sanguin.

Par contre, l'observation microscopique des coupes histopathologiques des échantillons issus de la transplantation des cellules saines (cervelle de veau) n'a révélée aucune croissance cellulaire (**Figure 46**), signifiant ainsi une absence totale de développement pour les deux formes d'implantation (suspension cellulaire ou de fragments).



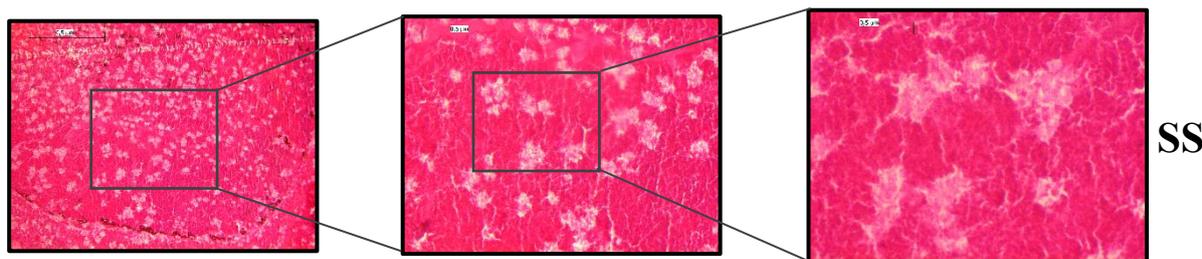


Figure 46 : Coupes histologiques des échantillons issues de la greffe de tissu sain. **SF** : tissu sain sous forme de fragments. **SS** : tissu sain sous forme de suspension. A gauche, l'observation est faite au grossissement 4. Au milieu, le grossissement utilisé est le 10. A droite, observation au grossissement 20.

Toutefois, des cellules ont été observées dans certaines lames. Cependant, elles ne présentent guère les caractéristiques histologiques retrouvées dans les cellules nerveuses (**Figure 46, SF/SS**).

IV. Discussion

Les cancers existent dans une variété extraordinaire de types et de sous-types, ce qui rend chaque cancer individuellement unique. Les tumeurs sont considérées comme étant des hétérogènes et de nombreuses populations de cellules cancéreuses, possédant des caractéristiques moléculaires distinctes, sont présentes dans la même pièce tumorale. Ainsi, des développements supplémentaires dans la mise en place de nouveaux modèles précliniques de culture sont nécessaires pour accroître les connaissances sur l'ensemencement des tumeurs et offrir de nouvelles perspectives sur les stratégies thérapeutiques.

Le glioblastome est une tumeur cérébrale développée très rarement sur la CAM de poulet, contrairement à d'autres néoplasmes humains qui y sont le plus souvent transplanté (**tableau III**).

Le développement de l'embryon de poulet dure 21 jours. Le système immunitaire inné commence à se développer au début de l'incubation des œufs fécondés, à partir du jour embryonnaire (ED) 3 jusqu'à ED16 lorsqu'il est bien développé. L'immunité adaptative quant à elle se développe plus tard aux environs de ED10 à ED18, c'est-à-dire qu'au-delà de cet intervalle, les embryons de poulet sont immunocompétents pour réagir aux agents pathogènes via les systèmes immunitaires inné et adaptatif (**Hincke et al., 2019**). Par conséquent, l'embryon de poulet en développement est considéré comme étant un environnement naturel immunodéficient jusqu'au jour embryonnaire 18. Ce dernier est donc en faveur de ces expériences de xénogreffe, en effet, le risque de rejet est totalement mis de côté. Contrairement

à ce que nous pouvons observer chez des modèles de rongeurs, hormis les transgéniquement immunodéficients, mais dont le prix est très élevé et nécessite des conditions d'hébergement très particulières.

D'après les résultats de notre étude, les cellules tumorales du glioblastome transplantées sur la CAM du poulet âgée de 10 jours ont survécu et elles se sont développées jusqu'au moment de la récupération des échantillons (au 17^{ème} jour d'incubation). En effet, dans cette expérience, les vaisseaux de poulet n'envahissent pas les tumeurs transplantées, contrairement aux expériences sur les lignées cellulaires suggérant que le glioblastome survit mais ne se développe pas (**Tereseviciute *et al.*, 2007**).

Dans un premier temps, il a fallu s'assurer que les caractéristiques cytologiques et histologiques du glioblastome (**Figure 44, GB**) après la fin de l'incubation restent les mêmes que celles du glioblastome d'origine au moment de la mise en culture. D'après notre investigation histopathologique, les cellules tumorales du glioblastome explantées durant le 17^{ème} jour ont conservées leurs caractéristiques cytologiques originales (variété cellulaire, densité cellulaire élevé, pléomorphisme nucléaire et de très nombreuses mitoses,...).

Tereseviciute *et al.* (2007) et **Balciuniene *et al.* (2009)** ont évalué l'histologie et la survie des tumeurs du glioblastome humain transplantées dans la CAM du poulet. Les études ont montrés que les cellules de glioblastome ont non seulement survécu dans la CAM, mais sont également apparues histologiquement similaires au glioblastome d'origine. Cependant, **Tereseviciute *et al.* (2007)** ont observé une invasion de vaisseaux aviaires dans la xénogreffe, cette dernière a seulement survécu. Par contre, chez **Balciuniene *et al.* (2009)**, le glioblastome transplanté sur la CAM est resté histologiquement isolé tout en continuant son développement, cela signifie qu'il n'envahit pas l'hôte et que ce dernier n'envahit pas le greffon. Dans la plupart des cas, seule la prolifération de l'épithélium de l'embryon a été observée avec seulement quelques cellules tumorales envahissant la membrane. La seule action de l'hôte semble être de fournir la nourriture et l'oxygène au transplant.

Dans notre cas, sur les 10 œufs greffés au départ par les cellules tumorales du glioblastome, nous avons récupérés 6 échantillons ayant une croissance tumorale observable et seulement 3 embryons sont restés vivant en continuant leur développement embryonnaire de façon normale, tandis que chez les 3 autres embryons, la croissance s'est arrêtée au jour embryonnaire 10, ce dernier coïncide avec le jour de la mise en culture des cellules tumorales. La mort de 50% des embryons pourrait s'expliquer par le fait que les œufs sont restés un peu

trop longtemps en dehors de l'incubateur lors des manipulations. De plus, le changement brusque de l'environnement est un facteur qui nuie à la survie des embryons.

Il est souhaitable de recourir à l'immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques du glioblastome, à savoir, EGFR, P53 et IDH-1 pour une meilleure investigation histologique.

Par ailleurs, les observations microscopiques effectuées au niveau de certaines zones des lames histologiques, préparées suite à la récupération des échantillons issues des xénogreffes de cellules saines de la cervelle de veau, ont révélé la présence de petites cellules de forme régulière et ronde (**Figure 44, SF-SS**). Ces dernières sont dépourvues de toute caractéristiques histologiques et cytologiques de cellules nerveuses ou de cellules gliales. En effet, la caractéristique morphologique particulièrement saillante des neurones est l'arborisation élaborée des dendrites qui proviennent du corps cellulaire neuronal. Or, les cellules observées n'ont visiblement pas cette caractéristique, ce qui veut dire qu'il s'agit donc de cellules embryonnaires du poulet.

D'une manière générale, l'investigation microscopique faite au niveau de ces lames, n'a révélée aucune trace de croissance ou de développement des cellules saines, et ce, sur les deux formes de xénogreffes (sous forme de suspension cellulaire et sous forme de fragments tissulaires) (**Figure 46, SF-SS**). Cela signifie que les cellules saines de la cervelle de veau implantées sur la CAM n'ont pas pu survivre malgré la présence des nutriments et la réalisation des échanges gazeux par l'embryon du poulet en développement. Contrairement à elles, les cellules tumorales du glioblastome implantées sur la CAM ont survécu et elles se sont proliférées. Notons le fait que les xénogreffes des deux types cellulaires et l'incubation de tous les œufs ont été réalisés au même moment suivant des protocoles identiques.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant de discuter les raisons pour lesquelles les cellules saines n'ont pas réussi à survivre ou à se développer, à l'inverse des cellules tumorales du glioblastome.

Premièrement, Les cellules tumorales stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux sanguins capillaires préexistants dans l'environnement (**Folkman *et al.*, 1971**), ce processus est connu sous le nom de « la néoangiogenèse », ce qui permet de fournir des nutriments et des produits chimiques pour aider et maintenir la croissance tumorale.

La vascularisation tumorale se produit par plusieurs processus biologiques distincts. Les cellules malignes ont besoin d'oxygène et de nutriments pour proliférer, et doivent donc résider à proximité des vaisseaux sanguins pour accéder au système de circulation sanguine. Les premières observations histologiques ont montré une forte vascularisation chez les tumeurs malignes contrairement aux tumeurs bénignes, c'est ce qui a conduit Judah Folkman à proposer que l'initiation de l'angiogenèse tumorale est nécessaire à la croissance tumorale (**Folkman, 1971**).

Différentes recherches ont suggéré que la progression tumorale dépendrait de l'angiogenèse (**Folkman, 1990 ; Gasparini et Harris, 1995**). La densité de la vascularisation tumorale est associée à la malignité de la tumeur quantifiée par la diminution de l'espérance de vie des patients. Les résultats obtenus sur la vascularisation des cancers de haut grade (cancer du sein, du poumon, des ovaires, mélanomes malins et les tumeurs du SNC) ont tous montré une forte corrélation entre le niveau de vascularisation et le potentiel d'agressivité (**Weidner, 1995**).

En 2003, un essai a démontré la survie prolongée des patients atteints d'un cancer colorectal lorsqu'une chimiothérapie était administrée en association avec des anticorps humains neutralisants ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui est un facteur activateur de la néoangiogenèse. En effet, les VEGFs et leurs récepteurs régulent à la fois la vasculogénèse et le développement de vaisseaux sanguins à partir de cellules précurseurs au début de l'embryogénèse. L'inhibition de ce facteur a induit un arrêt de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (**Ellis, 2003**). Par conséquent, une diminution de la malignité des tumeurs. Cela apporte une nouvelle preuve en confirmant que l'agressivité tumorale est en forte relation avec la vascularisation.

La néoangiogenèse semble donc être un phénomène essentiel et spécifique aux cellules cancéreuses, intervenant dans le processus de croissance et de développement tumorales, alors qu'il est inexistant chez les cellules saines (mis à part les cellules embryonnaire). Par conséquent, elles ne pourront pas s'approprier en nutriments et en oxygène qui sont essentiels à leur survie.

Deuxièmement, les cellules normales ne prolifèrent que si elles reçoivent les signaux de proliférations extérieurs adéquats, par contre, les cellules cancéreuses deviennent autonomes et indépendantes des signaux extérieurs qui régulent la prolifération et la croissance cellulaire.

Les tissus normaux contrôlent soigneusement la production et la libération de signaux favorisant la croissance qui ordonnent l'entrée et la progression dans le cycle de croissance et de division cellulaire, assurant ainsi une homéostasie du nombre de cellules et donc le maintien de l'architecture et de la fonction normale des tissus. Les signaux d'activation sont transmis en grande partie par des facteurs de croissance qui se lient aux récepteurs de surface cellulaire, contenant généralement des domaines intracellulaires de tyrosine kinase. Ces derniers émettent des signaux via des voies de signalisation intracellulaires ramifiées qui régulent la progression dans le cycle cellulaire ainsi que la croissance cellulaire en augmentant la taille de la cellule et donc sa préparation à rentrer en division. Une telle signalisation paracrine est difficilement accessible expérimentalement. De plus, la biodisponibilité des facteurs de croissance est régulée par la séquestration dans l'espace péricellulaire et la matrice extracellulaire, et par des actions d'un réseau complexe de protéases et de sulfatases (**Hanahan et Weinberg, 2011**). Donc, le changement de l'environnement naturel de ces cellules normales aboutira à l'absence de ces signaux extérieurs, par conséquent, un arrêt dans la prolifération et division cellulaire, chose qui a été bien confirmé suite à l'implantation de ces cellules sur la CAM.

Par contre, les cellules cancéreuses, en dérégulant ces signaux, deviennent maîtresses de leur destin. En effet, elles acquièrent la capacité de maintenir la signalisation proliférative de plusieurs manières alternatives, par exemple, par la production autonome des ligands de facteur de croissance, auxquels elles peuvent répondre via l'expression de récepteurs apparentés, entraînant une stimulation proliférative autocrine. La signalisation des récepteurs peut également être dérégulée en élevant les niveaux de protéines réceptrices affichées à la surface des cellules cancéreuses, rendant ces cellules hypersensibles à une quantité très faible de ligand du facteur de croissance (**Hanahan et Weinberg, 2011**). C'est ce qui explique la croissance des cellules tumorales du glioblastome malgré le changement radical de leur environnement. De plus, elles sont caractérisées par une forte activité mitotique, favorisant ainsi leur prolifération.

Notre travail qui est une première expérience de ce genre en Algérie, nous a permis de démontrer la capacité de faire croître des cellules de glioblastomes dans des œufs de poulet, ce qui nous ouvre de nombreuses perspectives de développement à l'avenir.

*Conclusion et
perspectives*

Ce travail a eu pour objectif de confirmer l'utilisation de la membrane chorioallantoïque (CAM) de la poule comme milieu de culture avantageux destiné aux cellules cancéreuses. La méthode consistait à la réalisation de xénogreffes de cellules tumorales du glioblastome humain et de cellules saines de la cervelle de veau sur la CAM de la poule *Gallus gallus domesticus* durant le dixième jour embryonnaire.

L'investigation macroscopique, effectuée après la récupération des embryons, a révélé la formation de masses cellulaires ayant une forme et une apparence semblable à celle de la tumeur initiale, et ce, uniquement dans les œufs greffés par les cellules du glioblastome. D'un autre côté, l'investigation microscopique, réalisée sur les coupes histopathologiques, a montré la survie et la prolifération des cellules tumorales en gardant leurs caractéristiques histologiques et cytologiques originales, et une absence totale de la croissance des cellules saines.

Cette différence est due à la capacité des cellules malignes à stimuler la néoangiogenèse, par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ce processus leur permet de s'approvisionner en nutriments et en oxygène essentiels pour maintenir leur croissance tumorale. Cette étude a également permis de confirmer la forte corrélation qu'il y'a entre la malignité et l'angiogenèse tumorale. De plus, l'indépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis des signaux extérieurs de prolifération est un facteur important pour assurer la continuité du développement tumoral, contrairement aux cellules normales qui se divisent seulement lorsqu'elles reçoivent les signaux de proliférations extérieurs adéquats se trouvant dans son environnement naturel.

Ces résultats confirment la possibilité d'utilisation de la CAM du poulet comme plateforme appropriée et très flexible dans la culture des cellules cancéreuses, et par extension, dans l'étude du cancer. Grâce à ses nombreux avantages ; coût assez faible, la possibilité de suivre en tant réelle le développement tumorale à l'aide des techniques d'imageries, l'environnement immunodéficient, la membrane chorioallantoïque du poulet constitue un microenvironnement biologique unique pour établir un modèle expérimental dérivé du patient.

Malgré les résultats significatifs obtenus dans notre étude, il serait souhaitable de poursuivre les recherches et les expériences sur un plus grand nombre d'œufs en utilisant le matrigel pour une adhérence cellulaire plus forte et des tests immunohistochimiques pour une détection plus précise. La relation entre l'agressivité d'une tumeur et sa capacité à stimuler la néoangiogenèse doit être étudiée d'avantage en utilisant des tumeurs de différents grades.

Il serait également intéressant de passer à des œufs plus gros comme par exemple ceux de la dinde, ces derniers sont plus solides et offriront sans doute une meilleure observation et pourront recevoir une plus grande quantité de xénogreffes.

Ce modèle de culture cellulaire offre une multitude d'opportunités et de perspectives pour atteindre l'objectif de parvenir à une médecine de précision. En effet, il offre l'avantage de tester des molécules anti-cancéreuses qu'elles soient déjà existantes ou nouvellement découvertes. De plus, chaque tumeur sera implantée et suivie sur plusieurs groupes de CAM pour que chaque patient puisse profiter d'un diagnostic et d'un traitement spécifique compatible avec son cas, c'est la médecine personnalisée.

Aussi, ce modèle expérimental pourrait servir de facteur prédictif contre le risque de récurrence. En effet, la prolongation de la période expérimentale, obtenue en greffant les cellules implantées sur une CAM vers un autre œuf, permettra de suivre au fil du temps les changements fonctionnels touchant ces cellules suite aux mutations excessives et permanentes qu'elles subissent.

*Références
bibliographiques*

A

- **Aggarwal, B., Danda, D., Gupta, S. et Gehlot, P., (2009).** Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochemical Pharmacology*, 78: 1083-94.
- **Ahmad, O., Chapman, R., Storer, L.C., Luo, L., Heath, P.R, Resar, L., Cohen, K.J., Grundy, R.G. et Lourdusamy, A., (2021).** Caractérisation moléculaire intégrative de l'épendymome spinal pédiatrique: étude du groupe britannique sur le cancer et la leucémie des enfants, *Neuro-Oncology*. Adv.3:vdab043.
- **Alexiev, B.A., Chou, P.M. et Jennings, L.J., (2018).** Pathology of Melanotic Schwannoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 142(12), 1517–1523.

B

- **Balciuniene, N., Tamasauskas, A., Valanciute, A., Deltuva ,V., Vaitiekaitis, G., Gudnaviciene, I., Weis, J. et von Keyserlingk, DG., (2009).** Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane. *Medicina (kaunas)*,45 (2).
- **Blay, J. Y., et Ray-Coguard, I., (2004).** Cancer: Épidémiologie, cancérogenèse, développement tumoral, classification. *La Revue du praticien*, 54(17), 1935-1942.
- **Blesbois E. (2011).** Gamètes et fécondation chez les oiseaux. *INRAE Production Animales*, 24, 259-272.
- **Brohl, A. S., Kahen, E., Yoder, S. J., Teer, J. K. et Reed, D. R. (2017).** The genomic landscape of malignant peripheral nerve sheath tumors: diverse drivers of Ras pathway activation. *Scientific reports*, 7(1), 14992.
- **Burdett, E., Kasper, F.K. et Mikos, A.G. 2010.** Engineering Tumors: A Tissue Engineering Perspective in Cancer Biology. *Tissue Engineering*, 16 (3), 351 30.

C

- **Carter, J. M., Wu, Y., Blessing, M. M., Folpe, A. L., Thorland, E. C., Spinner, R. J., Jentoft, M. E., Wang, C., Baheti, S., Niu, Z., Mauermann, M. L. et Klein, C. J. (2018).** Recurrent Genomic Alterations in Soft Tissue Perineuriomas. *The American journal of surgical pathology*, 42(12), 1708–1714.
- **Catapano, D., Muscarella, L. A., Guarnieri, V., Zelante, L., D'Angelo, V. A. et D'Agruma, L. (2005).** Hemangioblastomas of central nervous system: molecular genetic analysis and clinical management. *Neurosurgery*, 56(6), 1215–1221.
- **Centenera, M.M., Raj G. V. et Knudsen, K.E.(2013).** *Ex vivo* culture of human prostate tissueand drug development. *Nature reviews urology*, 10 (8.), 483 – 487.

- **Chen, S., Chang, Y. et Nieh, S. (2012).** Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *Public library of science One*, 7: e31864.

D

- **De Tribolet, N. (2008).** Livre de Neurochirurgie - Les tumeurs gliales de l'adulte. URL <http://campus.neurochirurgie.fr>. 12

E

- **Earle, H., Wilton, R., Edward, L., Thomas, H., Straus Nancy, P., Brown Mary, F. et Shelton E. (1943).** Production de malignité *in vitro*. Les cultures de fibroblastes de souris et les changements observés dans les cellules vivantes. *Journal de l'Institut National du Cancer*. 4 (2), 165-212.

- **Ellis, L. M. (2003).** A targeted approach for antiangiogenic therapy of metastatic human colon cancer. *The American surgeon*, 69(1), 3–10.

F

- **Ferician, O., Cimpean, A.M. et Avram, S. (2015).** Endostatin effects on tumor cells and vascular network of human renal cell carcinoma implanted on chick embryo chorioallantoic membrane. *Anticancer Research*, 35(12), 6521–8.

- **Fischer, S. B., Attenhofer, M., Gultekin, S. H., Ross, D. A. et Heinemann, K. (2017).** TRPS1 gene alterations in human subependymoma. *Journal of neuro-oncology*, 134(1), 133–138.

- **Folkman, J. (1971).** Angiogenèse tumorale: implications thérapeutiques. *The New England Journal of Medicine*. 285 (21), 1182–1186.

- **Folkman, J. (1990).** What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. (82), 4-6.

- **Foucrier, J. et Franquinet, R., (2003).** Embryologie descriptive Broché --1 janvier 2003.

G

- **Gasparini, G. et Harris, A.L. (1995).** Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *Journal of Clinical Oncology*, 13, 765-82

- **Gey, G., Coffman, W. et Kubicek, M. (1952).** Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 12, 264–265.

- **Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L, et Magnusson, K.E. (2010).** Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*. 329, 1078-81.
- **Goodpasture, E.W., Woodruff ,A.M. et Buddingh, GJ. (1919).** The Cultivation of Vaccine and Other Viruses in the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos. *Science*. 1931; 74371–372.
- **Griffith, L.G. et Swartz, M.A. (2006).** Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 211-24.
- **Guseva, N. V., Tanas, M. R., Stence, A. A., Sompallae, R., Schade, J. C., Bossler, A. D., Bellizzi, A. M. et Ma, D. (2016).** The NAB2-STAT6 gene fusion in solitary fibrous tumor can be reliably detected by anchored multiplexed PCR for targeted next-generation sequencing. *Cancer genetics*, 209(7-8), 303–312.

H

- **Hanahan, D. et Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- **Hamburger, A. et Salmon S.E. (1977).** Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-3.
- **Heim, S., Sill, M., Jones, D. T., Vasiljevic, A., Jouvet, A., Fèvre-Montange, M., Wesseling, P., Beschorner, R., Mittelbronn, M., Kohlhof, P. et Hasselblatt, M. (2016).** Papillary Tumor of the Pineal Region: A Distinct Molecular Entity. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 26(2), 199–205.

K

- **Knudson, A. (1971).** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceeding National Academy of Science of the USA*, 68 (4), 820-823.
- **Kunz, P., Schenker, A. et Sahr, H. (2019).** Optimization of the chicken chorioallantoic membrane assay as reliable *in vivo* model for the analysis of osteosarcoma. *Public Library of science One*, 14(4).

L

- **Lee, S. J., Bui, T. T., Chen, C. H., Lagman, C., Chung, L. K., Sidhu, S., Seo, D. J., Yong, W. H., Siegal, T. L., Kim, M. et Yang, I. (2016).** Central Neurocytoma: A Review of Clinical Management and Histopathologic Features. *Brain tumor research and treatment*, 4(2), 49–57.

- **Leh, B. (2011).** Caractérisation par autofluorescence de tissus cérébraux tumoraux : Mesures sur fantômes et modèle animal. Université Paris Sud XI. Ecole Doctorale 534 MIPEGE, Sciences Physiques Appliquées à l’Imagerie Médicale.
- **Loiseau, A., et Huchet, B. (2009).** Epidemiology of primary brain tumor. *Revue neurologique* 165, 650-670
- **Li, B. K., Vasiljevic, A., Dufour, C., Yao, F., Ho, B., Lu, M., Hwang, E. I., Gururangan, S., Hansford, J. R., Fouladi, M., Nobusawa, S., Laquerriere, A., Delisle, M. B., Fangusaro, J., Forest, F., Toledano, H., Solano-Paez, P., Leary, S., Birks, D., Hoffman, L. M. et Jouvett, A. (2020).** Pineoblastoma segregates into molecular sub-groups with distinct clinico-pathologic features: a Rare Brain Tumor Consortium registry study. *Acta neuropathologica*, 139(2), 223–241.
- **Louis, D. N., Hiroko, O., Otmar, D W., Webster, K.C., Peter, C.B., Anne J., Bernd W S. et Paul K. (2007).** The 2007 who classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97-109.
- **Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., , Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., H. K. Ng, Pfister, S.M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A. et Ellison, D.W. (2021).** The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251.
- **Lugassy, C., Torres-Munoz, JE. et Kleinman, HK. (2009).** Overexpression of malignancy-associated laminins and laminin receptors by angiotropic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. *Journal Cutaneous Pathology*. 36(12), 1237–43.

M

- **Marzullo, A., Vacca, A. et Roncali, L. (1998).** Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: An experimental study in the chick embryo chorioallantoic membrane. *International Journal of Oncology*, 13(1), 17–21.
- **Merckx, G., Tay H, Lo Monaco, M., Van Zandvoort, M., De Spiegelaere, W., Lambrechts I. et Branckaers, A. (2020).** Chorioallantoic membrane assay as model for angiogenesis in tissue engineering: Focus on stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society*, 26(6).
- **Merino, D. M., Shlien, A., Villani, A., Pienkowska, M., Mack, S., Ramaswamy, V., Shih, D., Tatevossian, R., Novokmet, A., Choufani, S., Dvir, R., Ben-Arush, M., Harris, B. T., Hwang, E. I., Lulla, R., Pfister, S. M., Achatz, M. I., Jabado, N., Finlay, J. L., Weksberg,**

R. et Malkin, D. (2015). Molecular characterization of choroid plexus tumors reveals novel clinically relevant subgroups. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(1), 184–192.

- **Mete, O., Lopes, M. B. et Asa, S. L. (2013).** Spindle cell oncocytomas and granular cell tumors of the pituitary are variants of pituicytoma. *The American journal of surgical pathology*, 37(11), 1694–1699.

- **Misra, S., Moro, C.F. et Del Chiaro, M. (2019).** *Ex vivo* organotypic culture system of precision-cut slices of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 9, 2133.

- **Morrow, G., Syverton, J.T. et Stiles, W.W. (1938).** The growth of leptospira icterohemorrhagiae on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Science*; 88(2286), 384–5.

- **Murphy, J.B. (1912).** Transplantability of malignant tumors to embryos of a foreign species. *Journal of the American Medical Association*, 59,874.

N

- **Nadaf, J., de Kock, L., Chong, A. S., Korbonits, M., Thorner, P., Benlimame, N., Fu, L., Peet, A., Warner, J., Ploner, O., Shuangshoti, S., Albrecht, S., Hamel, N., Priest, J. R., Rivera, B., Ragoussis, J. et Foulkes, W. D. (2021).** Molecular characterization of DICER1-mutated pituitary blastoma. *Acta neuropathologica*, 141(6), 929–944.

- **Nakata, K., Konsei, S., Hamada, M., Mae, T., Miyama, T., Shinjo, H., Horibe, S., Tada, K., Takahiro, O. et Yoshikawa H. (2001).** Cellule ménisque humaine: caractérisation de la culture primaire et utilisation pour l'ingénierie tissulaire. *Orthopédie Clinique et recherches connexe (1976-2007)* 391, 208-218.

- **Nowak-Sliwinska, P., Segura, T. et Iruela-Arispe, M.L. (2014).** The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 17(4), 779–804.

O

- **Oliveira, P.A., Colaáo,A., Chaves, R., Guedes-pinto, H., De-la-cruz, P. et Lopes C. (2007).** Chemical carcinogenesis. *Academia Brasileira De Ciencias*, 79,593-616.

P

- **Pampaloni, F., Reynaud, E.G. et Stelzer, E.H. (2007).** The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8,839-45.

- **Peculis, R., Niedra, H. et Rovite, V. (2021).** Large Scale Molecular Studies of Pituitary Neuroendocrine Tumors: Novel Markers, Mechanisms and Translational Perspectives. *Cancers*, 13(6), 1395.

- **Pruijn, F.B., Sturman, J.R. et Liyanage, H.D.S. (2005).** Extravascular Transport of Drugs in Tumor Tissue: Effect of Lipophilicity on Diffusion of Tirapazamine Analogues in Multicellular Layer Cultures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 (4), 1079-1087.

R

- **Ribatti, D., De Falco, G. et Nico B. (2003).** *In vivo* time-course of the angiogenic response induced by multiple myeloma plasma cells in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Journal of Anatomy*, 203(3), 323–8.

- **Ribatti, D. (2012).** Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Methods in Molecular Biology*, 843, 47–57.

- **Ribatti, D. (2022).** The chick embryo chorioallantoic membrane as an experimental model to study *in vivo* angiogenesis in glioblastome multiforme. *Brain Research Bulletin*, Elsevier

- **Richter, G. T. et Friedman, A. B. (2012).** Hemangiomas and vascular malformations: current theory and management. *International journal of pediatrics*, 645678.

- **Rous, P. et Murphy, J.B. (1911).** Tumor implantations in the developing embryo. *Journal of the American Medical Association*, 56:741–741.

S

- **Schweizer, L., Thierfelder, F. et Thomas, C. (2020).** La caractérisation moléculaire des paragangliomes du SNC identifie les paragangliomes de la queue de cheval comme une entité tumorale distincte. *Acta Neuropathologica*, 140, 893–906.

- **Stahn, V., Nagel, I., Fischer-Huchzermeyer, S., Oyen, F., Schneppenheim, R., Gesk, S., Bohring, A., Chikobava, L., Young, P., Gess, B., Werner, M., Senner, V. et Harder, A. (2016).** Molecular Analysis of Hybrid Neurofibroma/Schwannoma Identifies Common Monosomy 22 and α -T-Catenin/CTNNA3 as a Novel Candidate Tumor Suppressor. *The American Journal of Pathology*, 186(12), 3285-3296.

- **Strojnik, T., Kavalari, R., Barone, T.A. et Plunkett, R.J. (2010).** Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenograft on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. *Anticancer research* 30 (12), 4851-4860.

- **Subauste, M.C., Kupriyanova, T.A. et Conn, E.M. (2009).** Evaluation of metastatic and angiogenic potentials of human colon carcinoma cells in chick embryo model systems. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(8), 1033–47.
- **Sun, X., Hornicek, F. et Schwab, JH. (2015).** Chordome: une mise à jour sur la physiopathologie et les mécanismes moléculaires. *Revue actuelle en médecine musculo-squelettique*, 8 (4), 344–352.
- **Sutherland, R.M., McCredie, J.A. et Inch, W.R. (1971).** Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46 (1), 113-120.

T

- **Takami, H., Mukasa, A., et Ikemura, M. (2015).** Résultats de la tomographie par émission de positrons et des analyses génétiques pour le liponeurocytome cérébelleux. *Brain Tumor Pathology*, 32, 210-215.
- **Tarpey, P. S., Behjati, S., Cooke, S. L., Van Loo, P., Wedge, D. C., Pillay, N., Marshall, J., O'Meara, S., Davies, H., Nik-Zainal, S., Beare, D., Butler, A., Gamble, J., Hardy, C., Hinton, J., Jia, M. M., Jayakumar, A., Jones, D., Latimer, C., Maddison, M. et Futreal, P. A. (2013).** Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. *Nature genetics*, 45(8), 923–926.
- **Tereseviciūte, N., Tamasauskas, A., Valanciūte, A., Deltuva, V. et von graf, K. D. (2007).** Evaluation of morphological issues of central nervous system glioblastoma on chicken embryo chorioallantoic membrane. *Polish journal of veterinary sciences*, 10(3), 173–178.
- **Toomey, E. C., Schiffman, J. D. et Lessnick, S. L. (2010).** Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene*, 29(32), 4504–4516.

V

- **Vogelstein B., Kinzler, KW. (2004).** Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 10(8).
- **Vu, B.R.T., Shahine, S.A. et Croissant, J. (2018).** Chick chorioallantoic membrane assay as an *in vivo* model to study the effect of nanoparticle-based anticancer drugs in ovarian cancer. *Scientific Reports*, 8, 8524.

W

- **Wang, L., Motoi, T., Khanin, R., Olshen, A., Mertens, F., Bridge, J., Dal Cin, P., Antonescu, C. R., Singer, S., Hameed, M., Bovee, J. V., Hogendoorn, P. C., Socci, N. et Ladanyi, M. (2012).** Identification of a novel, recurrent HEY1-NCOA2 fusion in mesenchymal

chondrosarcoma based on a genome-wide screen of exon-level expression data. *Genes, chromosomes & cancer*, 51(2), 127–139.

- **Weaver V., Lelievre S. et Lakins JN. (2002).** Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell*; 2, 205-16.

- **Weidner, N. (1995).** Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *The American Journal of Pathology*, 147, 9-19.

- **Weiswald, L.B., Bellet, D. et Dangles-Marie, V. (2015).** Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*. 17(1), 1-15.

- **Willman, C. et Hromas, R. (2006).** Genomic Alterations and Chromosomal Abberations in Human Cancer. In: *Cancer Medicine*. (Ed. BC Decker Inc); 7e: 104-134.

X

- **Xu, J., Li, D., Xie, L., Tang, S. et Guo, W. (2015).** Mesenchymal chondrosarcoma of bone and soft tissue: a systematic review of 107 patients in the past 20 years. *Public Library of Science one*, 10(4), e0122216.

Liens hypertextes

- <https://www.clinisciences.com/achat/cat-milieu-de-william-1790.html?searchid=61b49d3012ec41699ffe3f7d>

- <https://www.dutscher.com/frontoffice/product?produitId=0A-25-01>

- <https://www.alveolelab.com/fr/applications/formation-spheroides/>

- <https://www.dutscher.com/frontoffice/product?produitId=0A-25-01>

- World Health Organization WHO. [Http: //globocan.iarc.fr](http://globocan.iarc.fr): 2008. URL <http://globocan.iarc.fr/.1,6,11>

Annexes

Annexe 1

La réalisation de ce travail a nécessité un certain nombre d'appareils et de produits chimiques

➤ **Appareils utilisés :**

- Incubateur à CO₂
- Poste de Sécurité Microbiologique
- Hotte à flux laminaire
- Autoclave
- Balance de précision
- Centrifugeuse
- Vortex
- Microscope optique NexiusZoom d'Euromex
- Congélateur -80°C
- TEC2900-1 Main Console (Module d'inclusion de paraffine)
- TEC2900-2 Cryo Console (Plaque froide)
- Automate de déshydratation des tissus Leica TP1020
- Leica RM2265 microtome
- Microscope optique Leica DM1000LED
- Caméra Leica MC170HD ZEISS
- Plaque chauffante Leica HI1220

➤ **Produits utilisés :**

- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Bleu de trypan
- Eau physiologique
- Eau distillée
- EDTA (acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique)
- Ethanol 100% et 70%
- DMSO (diméthylsulfoxyde)
- Pénicilline-streptomycine
- RPMI
- Trypsine en poudre

Annexe 2

- **Protocole de préparation de la solution EDTA-Trypsine 0.5% (pour 50 ml)**
 - Peser 0,2g de Trypsine et 0,05g d'EDTA dans un récipient.
 - Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre les 50 ml.
 - Homogénéiser à l'aide d'un vortex.

Annexe 3

- **Protocole de préparation de la solution DMSO 20% - BSA 4% (pour 10 ml)**
 - ✓ BSA à 4%
 - Dissoudre 1,6 g d'albumine dans 40 ml d'eau physiologique, une manipulation à réaliser sous PSM.
 - ✓ DMSO à 20%
 - Mélanger 1 ml de DMSO 100% avec 4 ml d'eau distillée.
 - ✓ DMSO 20% - BSA 4%
 - Ajouter en goutte à goutte 2 ml du DMSO 20% à 8 ml de BSA 4%

Annexe 4

- **Protocole de préparation de la solution du bleu de trypan 4%**
 - Faire dissoudre 0,4 g de bleu de trypan en poudre dans 10 ml d'eau distillée.
 - Homogénéiser à l'aide d'un vortex.

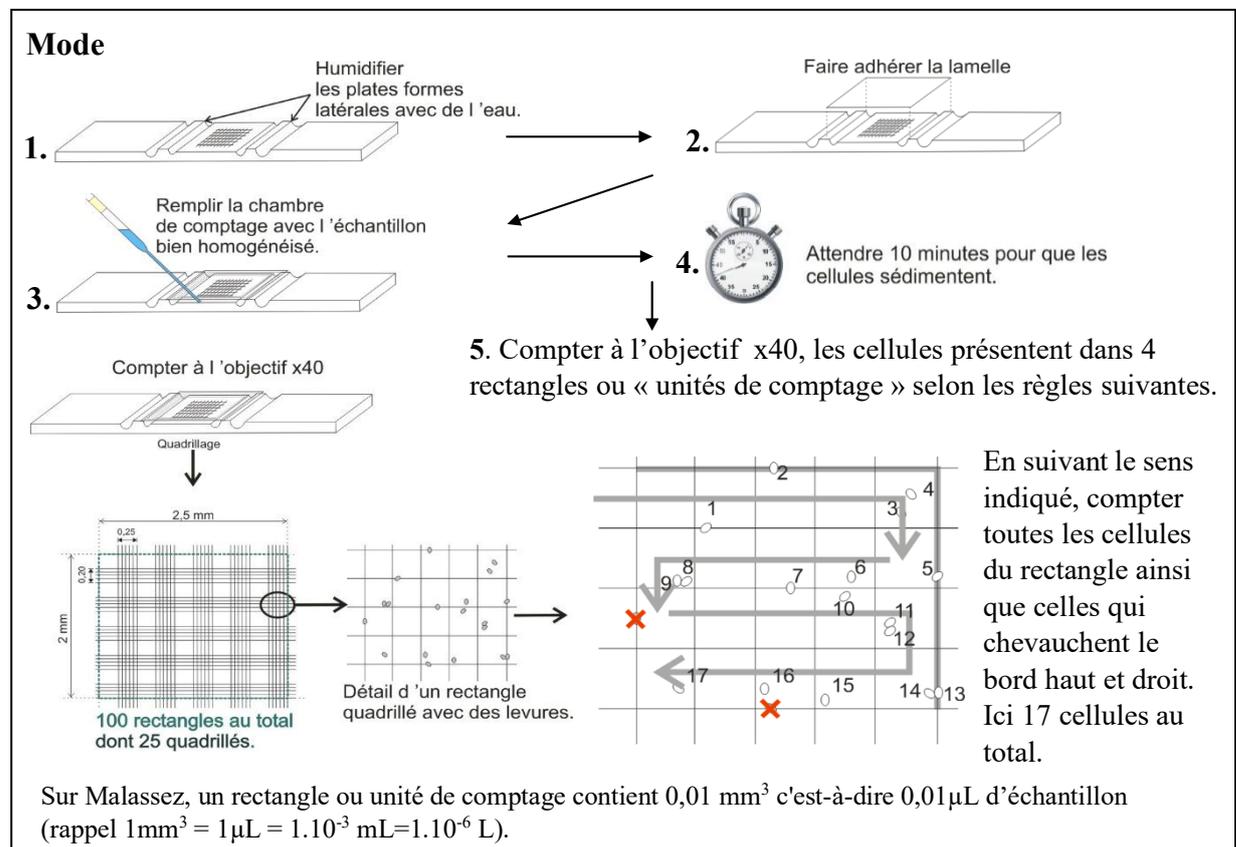
Annexe 5

- **Protocole du comptage cellulaire à l'aide d'une lame de malassez**



Le comptage de nos cellules en suspension est primordial pour connaître la densité cellulaire de nos préparations, et par conséquent, greffer le nombre qu'on souhaite.

La lame de Malassez (ou hématimètre) est une lame spéciale, contenant un quadrillage, qui permet de dénombrer les cellules en suspension dans une solution, à l'objectif 40 du microscope.



Notre échantillon est formé de la suspension cellulaire (qu'elle soit saine ou tumorale) et du bleu de trypan (4%) ; le mélange et le remplissage de la chambre de comptage a été fait sous PSM.

Formule à appliquer :

$$N = \frac{n}{av} \times Fd$$

Après calculs, on a dénombré :

- 8,2 millions de cellules dans 1ml de la suspension cellulaire saine (cerveau de veau).
- 5,6 millions de cellules dans 1ml de la suspension cellulaire tumorale (glioblastome)

Avec :

N : Nombre de cellules par unité de volume

n : Nombre de cellules comptées

a : Nombre d'unités de comptage dénombrées

v : Nombre d'unités de comptage

Annexe 6

➤ **Protocole (Abrégé) de congélation des cellules**

- Réalisation de la dissection mécanique et chimique de la tumeur jusqu'à l'obtention d'une suspension cellulaire.
- Transfert vers un eppendorf de 15 ou de 50 ml (selon la quantité de la suspension obtenue).
- Centrifugation à 2000 rpm pendant 6 minutes puis élimination du surnageant.
- Resuspension du culot cellulaire avec de l'eau physiologique.
- Centrifugation à 2000 rpm pendant 6 minutes puis élimination du surnageant.
- Resuspension du culot cellulaire avec 5 ml de RPMI.
- Comptage cellulaire
- Centrifugation de la suspension cellulaire puis élimination du surnagent.
- Resuspension du culot dans une solution de BSA à 4%.
- Ajout d'un volume de la solution de DMSO 20% -BSA 4% à la suspension cellulaire.
- Mettre 1ml de la suspension dans des cryo-tubes.
- Congélation à -80°C.

Annexe 7

- Classification histomoléculaire des tumeurs cérébrales selon la 5^{ème} édition de la classification OMS (2021). Référence de la répartition des tumeurs **Louis D et al., 2021**

1. Gliomes, tumeurs glioneuronales et tumeurs neuronales

Classe de tumeur	Sous-classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Gliomes diffus de type adulte	Astrocytome, IDH muté	2, 3, 4	IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B. (Louis D et al., 2021).
	Oligodendrogliome, IDH muté et codéleté 1p/19q	2, 3	IDH1, IDH2, 1p/19q, promoteur TERT, CIC, FUBP1, NOTCH1. (Louis D et al., 2021).
	Glioblastome, IDH type-sauvage	4	IDH-type sauvage, promoteur TERT, chromosomes 7/10, EGFR. (Louis D et al., 2021).
Gliomes diffus de bas grade de type pédiatrique	Astrocytome diffus	1	Altération de MYB ou MYBL1. (Louis D et al., 2021).
	Gliome angiocentrique	1	MYB. (Louis D et al., 2021).
	Tumeur neuroépithéliale polymorphe de bas grade	1	BRAF, famille de FGFR. (Louis D et al., 2021).
	Gliome diffus de bas grade, voie MAPK altérée	Non attribué	FGFR1, BRAF. (Louis D et al., 2021).
Gliomes diffus de haut grade de type pédiatrique	Gliome médian diffus, H3 K27- altéré	4	H3 K27, TP53, ACVR1, PDGFRA, EGFR, EZHIP. (Louis D et al., 2021).
	Gliome hémisphérique diffus, H3 G34-muté	4	H3 G34, TP53, ATRX. (Louis D et al., 2021).
	Gliome diffus de haut grade de type pédiatrique, H3-sauvage et IDH-sauvage	4	IDH-type sauvage, H3-type sauvage, PDGFRA, MYCN, EGFR (méthylome) . (Louis D et al., 2021).
	Gliome hémisphérique de type infantile	4	Famille de MYCN. (Louis D et al., 2021).
Gliomes astrocytaires circonscrits	Astrocytome pilocytique	1	KIAA1549-BRAF, BRAF ^{V600e} , NF1. (Louis D et al., 2021).
	Astrocytome de haut grade à caractéristiques piloïdes	Non attribué	BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B (méthylome) . (Louis D et al., 2021).
	Xanthoastrocytome pléomorphe	2, 3	BRAF ^{V600e} , CDKN2A/B. (Louis D et al., 2021).
	Astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes	1	TSC1, TSC2. (Louis D et al., 2021).

	Gliome chordoïde	2	PRKCA. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Astroblastome, altération MN1	Non attribué	MN1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
Tumeurs glioneuronales et neuronales	Gangliogliome	1, 3	BRAF ^{V600e} . (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Gangliogliome infantile desmoplasique/astrocytome infantile desmoplasique	1	BRAF ^{V600e} et BRAF ^{v600d} . (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	1	FGFR1, BRAF ^{V600e} , FGFR1-TACC1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur glioneuronale diffuse avec des caractéristiques de type oligodendrogliome et des amas nucléaires	1	Chromosome 14, (methylome) (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur glioneuronale papillaire	1	PRKCA. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur glioneuronale formant une rosette	1	FGFR1, PIK3CA, NF1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur glioneuronale myxoïde	1	PDFGRA. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse	1	KIAA1549-BRAF fusion, 1p (methylome) . (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Gangliocytome	1	TP53. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Tumeur neuronale multinodulaire et vacuolante	1	MAPK pathway. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Gangliocytome cérébelleux dysplasique (maladie de Lhermitte-Duclos)	1	PTEN. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Neurocytome central	2	MIB-1, N-MYC. (Lee S <i>et al.</i> , 2016).
	Neurocytome extraventriculaire	2	FGFR (FGFR1-TACC1 fusion), IDH-type sauvage. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Liponeurocytome cérébelleux	1, 2	Double perte 1p/19q. (Takami H <i>et al.</i> , 2015).
Ependymome supratentorial	2, 3	C11orf95. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).	
Ependymome supratentorial, ZFTA fusion-positif	2, 3	ZFTA. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).	
Ependymome supratentorial, YAPI fusion-positif	2, 3	YAPI. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).	
Ependymome de la fosse postérieure	2,3	H3 K27me3, EZHIP (méthylome) . (Louis D <i>et al.</i> , 2021).	

Tumeurs épendymaires	Ependymome de la fosse postérieure, groupe PFA	2,3	Hypométhylées avec perte de la triméthylation en H3K27. (Louis D et al., 2021).
	Ependymome de la fosse postérieure, groupe PFB	2,3	Hypométhylées et expression nucléaire conservée de la protéine H3K27me3. (Louis D et al., 2021).
	Ependymome spinal	2,3	NF2, MYCN. (Louis D et al., 2021).
	Ependymome spinal, amplifié par MYCN	2,3	MYCN dans le chromosome 2p24.3. (Louis D et al., 2021).
	Ependymome myxopapillaire	2	HOWB13. (Ahmed O et al., 2021).
	Sous-épendymome	1	TPRS1. (Fischer S et al., 2017).

2. Tumeurs du plexus choroïde

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Tumeurs du plexus choroïde	Papillome du plexus choroïde	1	KIR7.1, Stanniocalcine-1, PDGFR. (Merino D et al., 2015).
	Papillome atypique du plexus choroïde	2	PDGFR. (Merino D et al., 2015).
	Carcinome du plexus choroïde	3	P53, TP53, PDGFR, TWIST1. (Merino D et al., 2015).

3. Tumeurs embryonnaires

Classe de tumeur	Sous-classe de tumeur	Famille de la tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Médulloblastome	Médulloblastomes, moléculairement définis	Médulloblastome, activé par le WNT	4	CTNNB1, APC. (Louis D et al., 2021).
		Médulloblastome, activé par SHH et TP53-type sauvage	4	TP53, PTCH1, SUFU, SMO, MYCN, GLI2 (methylome). (Louis D et al., 2021).
		Médulloblastome, activé par SHH et TP53 muté	4	PTCH1, SUFU, SMO, MYCN, GLI2 (methylome). (Louis D et al., 2021).

		Médulloblastome, non-WNT/non-SHH	4	MYC, MYCN, PRDM6, KDM6A (methylome). (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Médulloblastomes, histologiquement définis	4	/
Autres tumeurs embryonnaires du SNC		Tumeur térétoïde/rhabdoïde atypique	4	SMARCB1, SMARCA4. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Tumeur neuroépithéliale cribriforme	Non attribué	SMARCB1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Tumeur embryonnaire avec rosettes multicouches	4	C19MC, DICER1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Neuroblastome du SNC, activé par FOXR2	4	FOXR2. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Tumeur du SNC avec duplication en tandem interne BCOR	4	BCOR. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).

4. Tumeurs pinéales

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Tumeurs pinéales	Pinéocytome	1	/
	Tumeur parenchymateuse pinéale de différenciation intermédiaire	2, 3	DICER1, ARID1A, KDM5C. (Gupte A <i>et al.</i> , 2022).
	Pinéoblastome	4	DICER1, DROSHA, DGCR8, perte du chromosome 16q, altération dans MYC-miR-17/92, RB1. (Li M <i>et al.</i> , 2020).
	Tumeur papillaire de la région pinéale	2, 3	Pertes dans le chr 10 et 3 et 22q, gains dans des chr 8q, PTEN. (Heim S <i>et al.</i> , 2016).
	Tumeur myxoïde desmoplastique de la région pinéale, SMARCB1-muté	Non attribué	SMARCB1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).

5. Tumeurs des nerfs crâniens et paraspiniaux

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Tumeurs pinéales	Schwannome	1	NF2, SMARCB1. (Stahn V <i>et al.</i> , 2016).
	Neurofibrome	1	NF1. (Stahn V <i>et al.</i> , 2016).
	Périneuriome	1	Délétions impliquant NF1 (17q11) ou NF2 (22q12). (Carter J <i>et al.</i> , 2018).

	Tumeur hybride de la gaine nerveuse	1	SMARCB1/INI1. (Stahn V <i>et al.</i>, 2016).
	Tumeur mélanique maligne de la gaine nerveuse	Non attribué	Mutation dans le chromosome 17 affectant PRKAR1A. (Alexiev A <i>et al.</i>, 2018).
	Tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques	2, 3, 4	NF1, SUZ12, EED, TP53, CDKN2A. (Brohl A <i>et al.</i>, 2017).
	Paragangliome	1	VHL, SDHB, HRAS, ATRX, TP53. (Schweizer L <i>et al.</i>, 2020).

6. Méningiomes

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Méningiomes	Méningiome	1, 2, 3	NF2, AKT1, TRAF7, SMO, PIK3CA;KLF4, SMARCE1, BAP1 (grade 1 et 2) H3K27me3; promoteur TERT, CDKN2A/B (grade 3). (Louis D <i>et al.</i>, 2021).

7. Tumeurs mésoenchymateuses, non méningothéliales

Classe de tumeur	Sous-classe de tumeur	Famille de la tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Tumeurs des tissus mous	Tumeurs fibroblastiques et myofibroblastiques	Tumeur fibreuse solitaire	1, 2, 3	NAB2-STAT6. (Guseva V <i>et al.</i>, 2016).
	Tumeurs vasculaires	Hémangiomes et malformations vasculaires	Non attribué	MMP-9, fgf, b-FGF, TGF-β. (Richter T <i>et al.</i>, 2012).
		Hémangioblastome	1	VHL gène. (Catapano D <i>et al.</i>, 2005).
	Tumeurs musculaires squelettiques	Rhabdomyosarcome	2, 3	MYCN, FGFR1, CD4, MDM2. (Sun X <i>et al.</i>, 2015).
		Tumeur mésoenchymateuse intracrânienne, fusion FET-CREB positive	Non attribué	FET-CREB. (Louis D <i>et al.</i>, 2021).

	Différenciation incertaine	Sarcome réarrangé CIC	Elevé	Fusion du gène CIC-DUX4. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Sarcome intracrânien primitif, DICER1 muté	Non attribué	TP53, DICER1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
		Sarcome d'Ewing	2,3	EWS/FLI. (Toomey E <i>et al.</i> , 2010).
Tumeurs chondro-ossseuses	Tumeurs chondrogéniques	Chondrosarcome mésenchymateux	2,3	P-SMAD2, PAI-1. (Xu J <i>et al.</i> , 2015). Fusion HEY1-NCOA2. (Wang <i>et al.</i> , 2012).
		Chondrosarcome	1,2,3	IDH1, TP53, COL2A1. (Tarpey S <i>et al.</i> , 2013).
	Tumeurs notochordales	Chordome (y compris chordome peu différencié)	1	CDKN2A ou CDKB2B, EGFR, PDGFβ, SMARB1. (Sun X <i>et al.</i> , 2015).

8. Tumeurs mélanocytaires

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Tumeurs mélanocytaires méningées diffuses	Mélanocytose méningée et mélanomatose méningée	Non attribué	NRAS. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
Tumeurs mélanocytaires méningées circonscrites	Mélanocytome méningé et mélanome méningé	Non attribué	GNAQ, GNA11, PLCB4, CYSLTR2. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).

9. Tumeurs de la région sellaie

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Tumeurs de la région sellaie	Craniopharyngiome adamantinomeux	1	CTNNB1. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Craniopharyngiome papillaire	1	BRAF. (Louis D <i>et al.</i> , 2021).
	Pituicytome, tumeur à cellules granulaires de la région sellaie et	1	Positive à TTF-1. (Metz O <i>et al.</i> , 2013).

	oncocytome à cellules fusiformes		
	Adénome hypophysaire/PitNET	1	GNAS, USP8, SF3B1, MEN1. (Peculis R et al., 2021).
	Blastome hypophysaire	1	DICER1, PRAME. (Nadaf J et al., 2021).

10. Métastases au SNC

Type de tumeur	Classe de tumeur	Grade	Gènes/Profil moléculaire modifié de manière caractéristique
Métastases au SNC	Métastases au cerveau et au parenchyme de la moelle épinière	/	/
	Métastases aux méninges	/	/

Résumé

Résumé

La culture cellulaire animale est une approche expérimentale largement utilisée depuis les débuts de la recherche en cancérologie, permettant ainsi aux chercheurs de mieux comprendre les mécanismes d'apparition et de développement des différentes classes de cancers. En revanche, les milieux de cultures disponibles actuellement sont difficilement accessibles à cause de leurs coûts élevés, la durée d'expérimentation et des difficultés liés à la manipulation. Notre travail vise à utiliser et à développer une nouvelle technique de culture cellulaire *in vitro* pour les cellules cancéreuses. En effet, cette étude consiste à utiliser la membrane chorioallantoïque (CAM) de la poule domestique *Gallus gallus domesticus* pour la culture des cellules cancéreuses du glioblastome, connu pour être la tumeur cérébrale la plus agressive. Pour ce faire, des œufs fécondés de la poule domestique ont été incubés afin d'obtenir des embryons âgés de 10 jours. Des cellules tumorales du glioblastome et des cellules saines de la cervelle de veau ont été ensuite implantées séparément durant le même jour sur la CAM. Après sept jours, les échantillons ont été récupérés. L'étude histopathologique a révélé la survie et la prolifération des cellules tumorales tout en conservant leurs caractéristiques histologiques originales, et une absence de la croissance des cellules normales. Ces résultats soutiennent l'utilisation de la CAM comme environnement immunodéficient naturel pour la culture des cellules cancéreuses.

Mots clés : Culture cellulaire, Cancers, Membrane chorioallantoïque, *Gallus gallu sdomesticus*, Glioblastome

Abstract

Animal cell culture is an experimental approach that has been widely used since the beginning of cancer researches, thus enabling researchers to better understand the mechanisms of appearance and development of the different classes of cancers. On the other hand, the culture medium currently available are difficult to access because of their high costs, the duration of experimentation and the difficulties related to handling. Our work aims to use and develop a new *in vitro* cell culture technique for cancer cells. Indeed, this study consists in using the chorioallantoic membrane (CAM) of the domestic hen *Gallus gallus domesticus* for the culture of cancer cells of glioblastoma, known to be the most aggressive brain tumor. To do this, fertilized eggs from the domestic hen were incubated to obtain 10-day-old embryos. Glioblastoma tumor cells and healthy calf brain cells were then implanted separately on the same day on the CAM. After seven days, the samples were collected. Histopathological study revealed survival and proliferation of tumor cells while retaining their original histological characteristics, and an absence of normal cell growth. These results support the use of CAM as a natural immunodeficient environment for cell culture cancerous.

Key words: Cell culture, Cancers, Chorioallantoic membrane, *Gallus gallus domesticus*, Glioblastoma.