

L'imagerie par bioluminescence pour visualiser la progression tumorale et la métastase chez le petit animal

par Alexandre Kauskot^{1,3}, Jan Manent^{2,3}, Fabrice Chareyre^{2,3}, Márcia Cominetti⁴, Martine Chopin⁵, Marco Giovannini^{2,3}, Chantal Legrand^{1,3} & Arnaud Bonnefoy^{1,3,6}

¹INSERM, U 553, Paris, F-75010, France; ²INSERM, U 674, Paris, F-75010, France; ³Université Paris 7-Denis Diderot, Faculté de Médecine, IFR 105-Saint-Louis-Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, F-75475 France; ⁴Dep. Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil; ⁵Département d'Expérimentation Animale, IFR 105-Saint-Louis-Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, F-75475 France; ⁶INSERM U743, Montréal, H2X1P1, QC, Canada.

Email : arnaudbonnefoy@yahoo.fr

Reçu le 29 janvier 2007

RÉSUMÉ

De nouveaux modèles animaux sont nécessaires pour améliorer la détection précoce et le suivi de la dissémination métastatique afin de développer des thérapies efficaces contre les formes les plus agressives de cancer. Ce chapitre détaille les avantages et les limites de l'utilisation de l'imagerie par bioluminescence

(IB). Bien que l'IB permette de détecter en temps réel avec une grande sensibilité et de façon non invasive des lésions tumorales *in vivo*, cette approche souffre notamment d'une résolution anatomique relativement faible et d'une atténuation du signal par le tissu traversé.

SUMMARY Bioluminescent imaging to monitor tumor progression and metastasis in live animal

Animal models allowing more sensitive and early detection of tumorigenesis and metastasis are instrumental in the fight for developing effective therapies against aggressive forms of cancer. In the present chapter, the advantages and limitations of the bioluminescent imaging (BLI) approach are discussed.

Although BLI provides rapid, highly sensitive, non-invasive and quantitative detection of small tumors and micrometastases, several issues like the low anatomic resolution or the attenuation of the luminescent signal with tissue depth must be considered when using this technology.

INTRODUCTION

La dissémination métastatique est la cause majeure de mortalité chez les sujets atteints de cancer. Il s'agit d'un processus séquentiel dont les principales étapes comprennent le détachement de cellules cancéreuses de la tumeur primaire et l'invasion du tissu de l'hôte, leur pénétration et leur transport dans la circulation (intravasation) durant lequel elles interagissent avec les composants sanguins, puis leur adhérence à la paroi vasculaire de l'organe cible, leur extravasation et leur prolifération (Fidler, 2003).

Un cancer disséminé est souvent résistant aux thérapies anti-cancéreuses actuelles parce que le processus métastatique est détecté tardivement. Afin d'établir des diagnostics et identifier des traitements efficaces pour les patients atteints de cancer, il est nécessaire de développer des modèles animaux plus sensibles et non invasifs permettant de localiser précocement les tumeurs de petite taille et les micrométastases, de mesurer la charge

tumorale et d'évaluer l'efficacité *in vivo* de différents traitements anti-cancéreux.

L'imagerie par bioluminescence (IB) est une approche récente basée sur la détection de lumière visible émise par des cellules ou des tissus exprimant la luciférase.

Dans ce chapitre, nous présenterons brièvement les principes de l'IB et discuterons des avantages et des inconvénients de son utilisation dans l'étude de la tumorigenèse et de la dissémination métastatique par rapport à une approche histologique classique. Nous illustrerons ces propos à l'aide d'un modèle de mélanome murin (B16F10) exprimant la luciférase.

PRINCIPES DE PRODUCTION ET DE DÉTECTION DE LA BIOLUMINESCENCE

La bioluminescence correspond à la production et à l'émission de lumière dite « froide » par un organisme

vivant résultant de la conversion d'une énergie chimique en énergie lumineuse. Un certain nombre d'êtres vivants sont capables de produire cette lumière parmi lesquels des végétaux, des bactéries, des méduses, des insectes ou encore certains poissons. Les fonctions de la bioluminescence pour ces organismes vivants sont le camouflage, l'attraction, la répulsion et la communication. La réaction chimique responsable de la luminescence chez les lucioles est contrôlée par une enzyme, la luciférase, qui catalyse une réaction d'oxydation de la luciférine (substrat), en présence d'ATP, de Mg^{2+} et de dioxygène pour produire de la lumière, de l'oxyluciférine, du CO_2 et de l'AMP (White *et al.*, 1969; Seliger & McElroy, 1964). La luciférase la plus utilisée en recherche et la mieux caractérisée, est celle produite par *Photynus pyralis*. Celle-ci produit une luminescence dont le spectre d'émission s'étend de 530 à 640 nm et présente un maximum à 562 nm (Rice *et al.*, 2001).

Un nombre croissant de compagnies développent des appareillages de mesure de la bioluminescence *in vivo* chez le petit animal (souris), la pionnière dans ce domaine étant *Xenogen*. L'appareillage de base est composé d'un système d'anesthésie de la souris par isoflurane, d'une chambre d'exposition et d'une caméra de type *Charge-coupled device* (CCD) associée à une station d'acquisition et d'analyse d'images. L'émission de photons est détectée par le capteur CCD qui intègre spatialement le signal lumineux incident et le convertit en signal électrique pour générer une image.

Le large spectre d'émission de la luciférase, ainsi que les propriétés optiques du tissu biologique, permettent à la lumière de pénétrer dans plusieurs centimètres de tissu. Par conséquent, il est possible de détecter la lumière émise par des cellules exprimant la luciférase à l'intérieur d'un organe ou d'un animal vivant. L'IB a été utilisée dans des études de croissance tumorale et de métastase (Edinger *et al.*, 1999; Sweeney *et al.*, 1999; Edinger *et al.*, 2002) mais également de transplantation, de toxicologie, d'infection virale et de thérapie génique (Fowler *et al.*, 2005; Fotso & Smith, 2003; Harmache *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2006).

LES LIMITES DE L'ANALYSE HISTOPATHOLOGIQUE

Il existe deux grands types de modèles murins permettant d'étudier la dissémination métastatique. Dans la première approche, des cellules tumorales murines (ou humaines) sont directement injectées par voie intraveineuse ou intracardiaque à des souris de lignée syngénique ou immunodéprimées. Ces modèles n'intègrent pas les étapes de détachement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire, d'invasion et d'intravasation. Dans une autre approche, les cellules tumorales (ou la tumeur) sont implantées dans l'organe cible et l'on observe la formation de métastases spontanées par voie lymphatique ou vasculaire. La formation de tumeurs primaires est généralement suivie en mesurant le volume de la tumeur à l'aide d'un caliper si la tumeur est superficielle, ou

bien par la mesure de sa taille et de sa masse à un temps donné, après sacrifice de l'animal si la tumeur est profonde.

La lignée cellulaire de mélanome murin B16F10 est largement utilisée comme modèle préclinique de croissance tumorale et de métastase. Ces cellules sont dérivées de la lignée tumorale B16 et ont été sélectionnées pour leur tropisme pulmonaire après injection intraveineuse (Fig. 1 et 2). Quelques jours après avoir été injectées (généralement entre $0,3 \times 10^6$ et 1×10^6 cellules par souris) dans des souris syngéniques de fond C57BL/6, ces cellules, qui se caractérisent par un fort potentiel métastatique et un taux de prolifération élevé, forment des nodules métastatiques pulmonaires (Fig. 1) qui entraînent la mort de la souris en quelques semaines.

La pigmentation des cellules de mélanome facilite la visualisation des tumeurs et des foyers métastatiques et est utilisée pour quantifier leur charge. Cependant, la mesure en deux dimensions des zones pigmentées à la surface des poumons excisés ne peut être recueillie qu'après sacrifice de l'animal à un temps prédéterminé, ce qui limite le nombre de points de mesure, augmente d'autant le nombre d'animaux par expérience, et surtout ne permet pas de suivre la dissémination métastatique chez un même animal au cours du temps. De plus, la mesure des aires pigmentées est semi-quantitative et ne rend compte que partiellement de la charge tumorale réelle. Une analyse longue, minutieuse et systématique des coupes histologiques permettra d'identifier et de compter avec plus de précision les foyers métastatiques présents à l'intérieur de l'organe.

D'un point de vue pratique, il est difficile d'évaluer la qualité de l'injection des cellules tumorales dans l'animal, surtout lorsqu'il s'agit d'une injection intracardiaque. Cela peut être à l'origine de variations importantes dans les mesures finales pratiquées sur les biopsies d'organes.

Dans le but d'optimiser ce modèle, nous avons effectué une transfection des cellules B16F10 avec le plasmide pEGFP_{Luc} dont le gène de la luciférase est placé sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus), ce qui nous a permis de visualiser ces cellules au moyen de l'imagerie par bioluminescence (IB).

DÉTECTION ET SUIVI EN TEMPS RÉEL

L'IB, comme d'autres formes d'imagerie, est une approche globale de détection des foyers métastatiques dans l'ensemble de l'animal, ce qui permet d'éviter les biais d'une analyse histopathologique traditionnelle ciblée sur certains organes ou tissus. Le fait de pouvoir confronter l'analyse *in vivo* par IB avec une analyse *ex vivo* (par IB et/ou histologique) à l'issue de l'expérimentation permet de confirmer la localisation des lésions. Dans l'exemple que nous montrons (Fig. 3), l'IB a permis de détecter *in vivo* de nombreux foyers métastatiques (articulations de la patte, testicules, cerveau, intestins) qui se sont développés après injection des B16F10_{Luc} dans la circulation artérielle. Ce profil de métastases est

très proche de ceux observés chez des patients atteints de mélanome disséminé après autopsie (Weng & Schoder, 2004; Francken *et al.*, 2006).

Le temps d'acquisition relativement court du signal (de quelques secondes à quelques minutes) permet de mettre en évidence des modifications rapides du signal de bioluminescence lié à l'activité cellulaire. L'anesthésiant (isoflurane) pouvant perturber le métabolisme de l'animal observé, certains appareillages (*Biospace*) offrent la possibilité d'effectuer les mesures d'IB simultanément à l'injection de D-luciférine, permettant ainsi des mesures fines d'activité enzymatique sur l'animal vigile. Le suivi en temps réel permet d'écarter rapidement de l'étude les animaux dont l'injection a échoué (Fig. 4). La possibilité d'effectuer plusieurs mesures rapprochées dans le temps – chaque mesure nécessitant une nouvelle injection de luciférine – nous a permis d'observer une diminution rapide du signal de bioluminescence durant les premières heures suivant l'injection des cellules B16F10Luc par la veine caudale de l'animal (Fig. 2c). Cette extinction du signal, qui n'est pas seulement la conséquence d'une réponse immunitaire de l'hôte puisqu'elle a également été observée par d'autres dans un modèle de xénogreffe chez des souris immunodéprimées (Nogawa *et al.*, 2005), illustre « l'inefficacité » du processus métastatique durant lequel seule une fraction des cellules tumorales circulantes va être capable de survivre, adhérer puis proliférer (Chambers *et al.*, 2002).

SENSIBILITÉ ET QUANTIFICATION

L'IB permet de détecter des lésions tumorales avant l'apparition de points de mesure classiquement utilisés comme la perte de poids, l'apparition d'une tumeur palpable ou la mort de l'animal. Le nombre minimum de cellules détectables varie de quelques centaines à quelques milliers selon le taux d'expression de luciférase et la localisation tissulaire de celles-ci (Craft *et al.*, 2005). Wetterwald *et al.* (2002) ont montré que des micrométastases de 0,5 mm³ de volume pouvaient être détectées dans un modèle de métastase osseuse.

L'efficacité d'un traitement anticancéreux est généralement évaluée par mesure de la masse ou du volume tumoral, ce qui ne tient pas compte de la présence d'œdèmes ou de l'apparition de zones nécrosées. Parce qu'elle nécessite de l'ATP et de l'oxygène, l'activité luciférase de la cellule tumorale transfectée est un indicateur de son activité métabolique (Fig. 5). Cette activité constitue donc un marqueur de choix pour mesurer avec précision la réponse à un traitement.

LIMITES

Plusieurs facteurs incluant le niveau d'expression en luciférase, la profondeur et la nature du tissu colonisé par les cellules luminescentes ou encore la quantité de luciférine injectée à l'animal et la sensibilité du système de

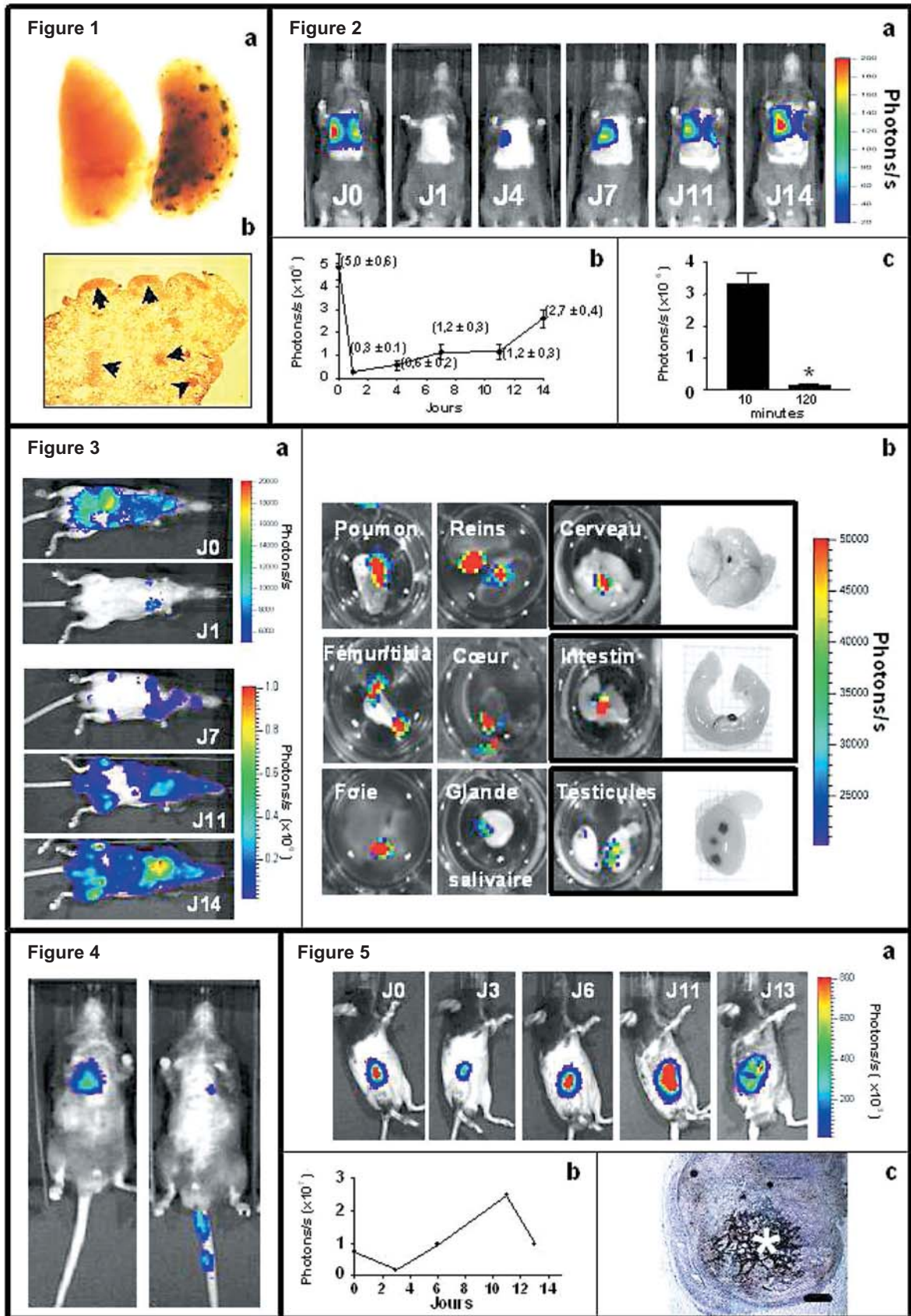
détection vont influencer la qualité de la détection (Sadiкот & Blackwell, 2005).

La lumière émise par la cellule transfectée est atténuée par le tissu environnant. Par conséquent, plus une lésion tumorale est située en profondeur dans le corps de l'animal plus le signal sera faible. De même, la couleur de la fourrure et la pigmentation plus ou moins foncée du ou des organes traversé(s) par le signal lumineux, avant d'être détecté par le capteur de l'appareil, vont être des facteurs importants d'atténuation du signal. Bien que la consistance du tissu traversé ne semble pas interférer avec le signal lumineux (ce qui permet de détecter une tumeur à travers une partie osseuse) des petites tumeurs profondément enfouies sous des organes pigmentés peuvent rester indétectables. Cela limite également l'utilisation de l'IB à de petits animaux. Pour optimiser la détection des micrométastases et petites tumeurs, il est préférable d'épiler la souris au niveau des surfaces d'intérêt et d'effectuer plusieurs prises de vue de l'animal (dorsales, ventrales, latérales).

Il est difficile de comparer de manière quantitative des charges tumorales localisées dans des endroits différents de l'animal. Cependant, une quantification au cours du temps pourra être réalisée sur une même tumeur ou un même organe colonisé. Le signal de bioluminescence comparé à celui émis par le nombre total de cellules tumorales injectées (et mesuré *in vivo* au niveau de l'organe cible) donnera une estimation relativement juste du nombre de cellules cancéreuses (Fig. 2b). Compte tenu de la destruction rapide de la majorité des cellules tumorales dès leur inoculation à l'animal (Fig. 2c), il faudra effectuer cette mesure de bioluminescence de référence dans les premières minutes qui suivent l'injection des cellules.

L'IB souffre également d'une résolution anatomique relativement faible comparativement à d'autres méthodes d'imagerie comme la tomographie par émission de positons (Lyons, 2005). La localisation et la forme de la zone d'émission lumineuse, superposées à l'image de l'animal peuvent, dans certains cas, permettre d'identifier l'organe lésé sans ambiguïté (la localisation pulmonaire par exemple, particulièrement évidente après une injection intraveineuse réussie) (Fig. 2a). Il est cependant prudent de confirmer l'identité de l'organe lésé par une analyse *ex vivo* en fin d'expérimentation car des signaux de bioluminescence intenses peuvent masquer d'autres signaux proches, notamment dans le cas de métastases multiples (Fig. 3).

L'introduction de gènes rapporteurs dans la souris peut entraîner une réaction immunologique et un rejet des tumeurs (Gambotto *et al.*, 2000; Zeamari *et al.*, 2004). Il est donc nécessaire de s'assurer que le phénotype *in vitro* et *in vivo* de la lignée cellulaire transfectée (cinétique de croissance, capacité d'invasion et de métastase, absence d'infiltrat inflammatoire chez la souris non sujette à une immunothérapie) est comparable à celui de la lignée parentale. Un compromis est à faire entre un taux d'expression élevé du gène rapporteur qui permettra d'augmenter le signal de bioluminescence (donc abaisser le seuil de détection des cellules tumorales dans l'animal) et les effets de cette expression sur le phéno-



type tumoral. Bien souvent, les lignées cellulaires ayant un taux d'expression de gènes rapporteurs modéré à faible donneront les meilleurs résultats.

Enfin, si l'IB permet de visualiser les cellules tumorales métaboliquement actives, le signal est en revanche perturbé par le degré de perfusion et d'oxygénation des tumeurs puisque la réaction photochimique émise par la cellule tumorale nécessite de l'oxygène et la présence de luciférine administrée de façon exogène. L'IB ne permet donc pas de détecter des zones tumorales viables en hypoxie temporaire.

Contrairement à l'IB, l'imagerie par fluorescence n'est pas produite par réaction enzymatique et ne requiert donc pas de substrat, ce qui peut représenter un avantage par rapport à la première, notamment pour la localisation des tumeurs faiblement perfusées. L'incorporation de marqueurs fluorescents dans des lignées cellulaires a ainsi permis d'effectuer de nombreuses études sur la dissémination métastatique chez la souris (Chishima *et al.*, 1997a, b; Caceres *et al.*, 2003; Dadiani *et al.*, 2006; Yokoyama *et al.*, 2006). La fluorescence présente cependant des limites lorsqu'elle est utilisée dans des modèles non-invasifs, principalement à cause de l'auto-fluorescence émise par les tissus et la fourrure de l'animal. Comme aucune longueur d'onde d'excitation n'est requise pour générer le signal de bioluminescence et que les tissus de mammifères ont une bioluminescence intrinsèque très faible, le signal de bioluminescence a en général un rapport signal/bruit de fond supérieur au signal de fluorescence. De nouveaux appareillages utilisant l'imagerie multispectrale permettent néanmoins de s'affranchir de

cette autofluorescence. Même s'il a été montré que la sensibilité de l'IB pour détecter des cellules tumorales à l'intérieur d'un organe était au moins aussi bonne que celle de la tomographie par émission de positons (TEP) (Iyer *et al.*, 2002), l'atténuation du signal par le tissu environnant reste un problème majeur de l'IB comme celui de l'imagerie par fluorescence. Il est admis que l'intensité du signal diminue d'un facteur 10 pour chaque centimètre de tissu traversé (Sadikot & Blackwell, 2005).

D'autres technologies d'imagerie sont utilisées pour détecter les tumeurs chez le petit animal. La plupart, comme le micro-TEP, le scanner CT, le SPECT (et HISPECT), l'IRM ou les ultrasons ont été développées à partir de différentes technologies utilisées chez l'homme. Ces techniques, qui utilisent soit les rayons X, soit un marquage radioactif ou encore des agents de contraste pour localiser et analyser les foyers tumoraux n'ont pas de problème d'atténuation du signal mais peuvent présenter d'autres inconvénients, comme l'invasivité, la faible sensibilité, un temps d'acquisition long ou encore un coût d'utilisation élevé (pour revue voir Lyons, 2005).

CONCLUSION

L'imagerie par bioluminescence permet de générer, pour un coût relativement bas par rapport à d'autres technologies, des informations à la fois (semi-) quantitatives et qualitatives (localisation et viabilité des cellules tumorales) sur la croissance et la dissémination métastatique tumorale. La détection se fait en un minimum de temps

FIG. 1. – *Métastases pulmonaires*. Photographie d'un poumon sain et d'un poumon 14 jours après l'injection des cellules de mélanome murin B16F10 (5×10^5) après excision et fixation au PFA 4 %. Le poumon lésé présente des nodules noirs caractéristiques de la production de mélanine par la lignée tumorale. En dessous est représentée une coupe histologique d'un poumon lésé (Hématoxyline-Eosine) présentant des nodules métastatiques. (flèches).

FIG. 2. – *Détection de métastases pulmonaires par bioluminescence*. L'émission de lumière est mesurée aux jours 0 (10 et 120 min.), 1, 4, 7, 11 et 14 suivant l'injection de B16F10Luc (5×10^5) et 5 minutes après l'injection de 150 mg/kg du substrat luciférine. (a) Superposition du signal lumineux et de l'image en noir et blanc de la souris. L'intensité est exprimée en photons/s et est représentée par des pseudocouleurs. (b) Évolution du signal au cours des 14 jours après l'injection des cellules, exprimé en photons/s. Le nombre ($\times 10^5$) de cellules tumorales viables, extrapolé à partir du flux lumineux mesuré 10 min après l'injection de cellules (6.7 ± 0.7 photons/s/cellule), est indiqué entre parenthèses. (c) Histogramme comparant le signal de bioluminescence 10 min. et 120 min. après l'injection des cellules. * : $P < 0,0001$, test t non apparié de Mann Whitney.

FIG. 3. – *Suivi de la formation de métastases disséminées après une injection de B16F10Luc par voie intracardiaque*. L'émission de lumière est mesurée aux jours 0, 1, 7, 11 et 14 suivant l'injection de B16F10Luc (5×10^5) par le ventricule gauche. Chaque mesure est effectuée 5 minutes après l'injection de 150 mg/kg de luciférine. (a) Images successives d'une souris superposées aux signaux lumineux représentant la dissémination métastatique. L'intensité est exprimée en photons/s et est représentée par des pseudocouleurs. (b) Au 14^{ème} jour, l'animal est sacrifié, les organes sont récupérés pour une analyse *ex vivo* par IB. La superposition de l'image de la souris et du signal lumineux montre la localisation des lésions métastatiques dans différents organes (poumons, cœur, testicules, intestins, cerveau, rein, foie, glande salivaire et os (fémur/tibia)). L'intensité du signal est exprimée en photons/s et est représentée par des pseudocouleurs. Les photographies à droite montrent pour le cerveau, les intestins et les testicules que le signal lumineux est superposable aux nodules métastatiques formés.

FIG. 4. – *Vérification de la réussite de l'injection intraveineuse*. Superposition de l'image noir et blanc de deux souris et du signal de bioluminescence obtenu 10 minutes après une injection de cellules B16F10Luc (5×10^5) dans la veine caudale. Lorsque l'injection est réussie, le signal lumineux est localisé exclusivement au niveau des poumons (exemple de gauche). Lorsque l'injection est imparfaite, un signal lumineux est détecté au niveau du site d'injection (exemple de droite).

FIG. 5. – *Évolution de la bioluminescence émise par des cellules B16F10Luc injectées par voie sous-cutanée*. Les mesures sont effectuées aux jours 0 (120 min.), 3, 6, 11 et 13 suivant l'injection des B16F10Luc (1×10^6). (a) Images illustrant la progression tumorale. Le signal est représenté en pseudocouleurs et est exclusivement restreint à la zone d'injection. (b) Évolution du signal de bioluminescence au cours des 13 jours suivant l'inoculation. (c) Au 13^{ème} jour, l'animal est sacrifié, la tumeur est disséquée, fixée en PFA 4 % puis incluse en paraffine pour une analyse histologique après coloration à l'Hématoxyline-Eosine. Celle-ci révèle la présence d'un cœur nécrotique (astérisque) responsable de la diminution de l'émission de photons entre le 11^{ème} et le 13^{ème} jour (Barre = 1 mm).

et de manière non invasive sur des animaux vivants, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires pour générer des résultats statistiquement significatifs. Malgré certains désavantages, dont le fait de devoir faire exprimer l'enzyme productrice de lumière par la lignée cellulaire tumorale, cette approche technologique permet d'appréhender la dynamique du processus métastatique et d'affiner de manière notable la compréhension de ses phases précoces. L'IB va certainement faciliter l'utilisation et le développement de modèles animaux précliniques de métastases spontanées, et l'évaluation de nouveaux traitements, au bénéfice du patient.

BIBLIOGRAPHIE

- Caceres G., Zhu X. Y., Jiao J.A., Zankina R., Aller A. & Andreotti P., Imaging of luciferase and GFP-transfected human tumours in nude mice. *Luminescence*, 2003, 18, 218-223.
- Chambers A. F., Groom A. C. & MacDonald I. C., Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 563-572.
- Chishima T., Yang M., Miyagi Y., Li L., Tan Y., Baranov E., Shimada H., Moossa A. R., Penman S. & Hoffman R. M., Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. *Clin. Exp. Metastasis*, 1997a, 15, 547-552.
- Chishima T., Miyagi Y., Wang X., Yamaoka H., Shimada H., Moossa A. R. & Hoffman R. M., Cancer invasion and micro-metastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res.*, 1997b, 57, 2042-2047.
- Chou C., Hung J., Liu J., Chen C. & Hung M., An attenuated Salmonella oral DNA vaccine prevents the growth of hepatocellular carcinoma and colon cancer that express α -fetoprotein. *Cancer Gene Therapy*, 2006, 13, 746-752.
- Craft N., Bruhn K. W., Nguyen B. D., Prins R., Liao L. M., Colisson E. A., De A., Kolodney M. S., Gambhir S. S. & Miller J. F., Bioluminescent imaging of melanoma in live mice. *J. Invest. Dermatol.*, 2005, 125 (1), 159-165.
- Dadiani M., Kalchenko V., Yosepovich A., Margalit R., Hassid Y., Degani H. & Seger D., Realtime imaging of lymphogenic metastasis in orthotopic human breast cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66, 8037-8041.
- Edinger M., Cao Y. A., Hornig Y. S., Jenkins D. E., Verneris M. R., Bachmann M. H., Negrin R. S. & Contag C. H., Advancing animal models of neoplasia through *in vivo* bioluminescence imaging. *Eur. J. Cancer*, 2002, 38 (16), 2128-2136.
- Edinger M., Sweeney T. J., Tucker A. A., Olomu A. B., Negrin R. S. & Contag C. H., Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia*, 1999, 1 (4), 303-310.
- Fidler I. J., The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3 (6), 453-458.
- Fotso J. & Smith J. S., Evaluation of beauvericin toxicity with the bacterial bioluminescence assay and the Ames mutagenicity bioassay. *Journal of Food Science*, 2003, 68 (6), 1938.
- Fowler M., Virostko J., Chen Z., Poffenberger G., Radhika A., Brissova M., Shiota M., Nicholson W.E., Shi Y., Hirshberg B., Harlan D. M., Jansen E. D. & Powers A. C., Assessment of pancreatic islet mass after islet transplantation using *in vivo* bioluminescence imaging. *Transplantation*, 2005, 79 (7), 768-776.
- Francken A. B., Fulham M. J., Millward M. J. & Thompson J. F., Detection of metastatic disease in patients with uveal melanoma using positron emission tomography. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2006, 32 (7), 780-784.
- Gambotto A., Dworacki G., Cicinnati V., Kenniston T., Steitz J., Tuting T., Robbins P. D. & DeLeo A. B., Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther.*, 2000, 7 (23), 2036-2040.
- Harmache A., LeBerre M., Droineau S., Giovannini M. & Brémont M., Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for novirhabdovirus. *Journal of Virology*, 2006, 80 (7), 3655-3659.
- Iyer M., Berenji M., Templeton N. S. & Gambhir S. S., Noninvasive imaging of cationic lipid-mediated delivery of optical and PET reporter genes in living mice. *Mol. Ther.*, 2002, 6 (4), 555-562.
- Lyons S. K., Advances in imaging mouse tumour models *in vivo*. *J. Pathol.*, 2005, 205, 194-205.
- Nogawa M., Yuasa T., Kimura S., Kuroda J., Sato K., Segawa H., Yokota A. & Maekawa T., Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different *in vivo* models. *Cancer Lett.*, 2005, 217, 243-253.
- Rice B. W., Cable M. D. & Nelson M. B., *In vivo* imaging of light-emitting probes. *J. Biomed. Opt.*, 2001, 6, 432-440.
- Sadikot R. T. & Blackwell T. S., Bioluminescence imaging. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2005, 2, 537-540, 511-532.
- Seliger H. H. & McElroy W. D., The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1964, 52 (1), 75-81.
- Sweeney T. J., Mailander V., Tucker A. A., Olomu A. B., Zhang W., Cao Y., Negrin R. S. & Contag C. H., Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96 (21), 12044-12049.
- Weng L. J. & Schoder H., Melanoma metastasis to the testis demonstrated with FDG PET/CT. *Clin. Nucl. Med.*, 2004, 29 (12), 811-812.
- Wetterwald A., van der Pluijm G., Que I., Sijmons B., Buijs J., Karperien M., Lowik C. W., Gautschi E., Thalmann G. N. & Cecchini M. G., Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am. J. Pathol.*, 2002, 160, 1143-1153.
- White E. H., Rapaport E., Seliger H. H. & Hopkins T. A., Chemical and bioluminescence of firefly luciferin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, 91 (8), 2178-2180.
- Yokoyama H., Nakanishi H., Kodera Y., Ikehara Y., Ohashi N., Ito Y., Koike M., Fujiwara M., Tatematsu M. & Nakao A., Biological significance of isolated tumor cells and micro-metastasis in lymph nodes evaluated using a green fluorescent protein-tagged human gastric cancer cell line. *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 361-368.
- Zeamari S., Rumping G., Floom B., Lyons S. & Stewart F. A., *In vivo* bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br. J. Cancer*, 2004, 90, 1259-1264.