

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM-UNISTRA UMR 1260 « Nanomédecine Régénérative »

**THÈSE** présentée par :

**Anasse Nounsi**

Soutenue le 22/06/2023

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Biotechnologies

---

Optimisation d'une plateforme de criblage de molécules anti-cancéreuses adaptée aux patients et basée sur un modèle de tumeur 3D vascularisé

---

**Rapporteurs externes**

**Pr. Marco Alifano**

*PU-PH Médecine, Université de Paris 5  
APHP, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris  
UMR 1138 INSERM*

**Dr. Lina Bolotine**

*MCU, Université de Lorraine  
UMR7038 CRAN*

**Examinatrice externe**

**Pr. Natalia De isla**

*PU, Université de Lorraine  
UMR7365 CNRS-UL IMoPA*

**Examinatrice interne**

**Dr. Isabelle Gross**

*CR, Université de Strasbourg  
UMR 1113 INSERM*

**Co-directeur de thèse**

**Pr. Pierre Emmanuel Falcoz**

*PU-PH Médecine, Université de Strasbourg,  
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg  
UMR 1260 INSERM*

**Directrice de thèse**

**Dr. Florence Fioretti**

*MCU-PH Odontologie Université de Strasbourg,  
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg  
UMR 1260 INSERM*

## Résumé

Le cancer est actuellement l'une des principales causes de décès à travers le monde. Une guérison peut être obtenue dans différents types de cancers grâce aux traitements actuels. Malheureusement, environ 85% des nouvelles molécules thérapeutiques échouent lors des essais cliniques. Ces échecs entraînent des pertes importantes de temps et d'investissements. Pour remédier à cette situation, une solution prometteuse consiste à développer un modèle *in vitro* capable de reproduire au mieux la vascularisation et l'environnement tumoral, afin d'améliorer la sélection des molécules thérapeutiques d'intérêt pour réduire l'agressivité tumorale.

Notre projet de recherche a pour but de créer des tumoroïdes dérivés de patients (PDT's) atteints de cancer du poumon. Ce modèle sera utilisé pour évaluer l'efficacité des traitements standards tels que la radiothérapie et la chimiothérapie à base de platine. Ainsi, ce modèle pourrait avoir une valeur prédictive de la réponse des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie chez les patients atteints du cancer du poumon. De plus, il a été incorporé à ce modèle une vascularisation permettant de mieux mimer la complexité de l'environnement tumoral.

Notre modèle de tumeur reconstruite en 3D est un outil rapide à obtenir qui est prometteur. Il pourrait être relié à un système micro-fluidique, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour les tests précliniques.

En effet, cette plateforme centrée sur notre modèle 3D pourrait ouvrir la voie à différents tests de médicaments anti-cancéreux directement sur les tumeurs reconstruites *in vitro* de chaque patient. Notamment, cela pourrait permettre différents tests évaluant la pertinence des associations moléculaires. Cette approche faciliterait le développement d'une médecine de précision personnalisée, où les traitements pourraient être adaptés spécifiquement aux tumeurs de chaque patient.

**Mots clés :** Tumoroïdes dérivés du patient, cancer du poumon, microenvironnement tumoral, radiothérapie, chimiothérapie, vascularisation, médecine personnalisée.

## REMERCIEMENTS

Une thèse est avant tout un travail de réflexion collective, donc au terme de ce travail, il m'est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Nadia Benkirane-Jessel, Directrice de Recherche INSERM et directrice du laboratoire INSERM UMR1260 « Nanomédecine Régénérative » à Strasbourg. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance, de m'avoir donné la chance de rejoindre et travailler au sein son équipe. Je la remercie pour ses conseils, ses qualités scientifiques et humaines indéniables. Je lui exprime ma gratitude et mes plus profondes considérations.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame Florence Fioretti, ma directrice de thèse. Je la remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant et tout à fait adapté à mes intérêts pour l'oncologie. Merci pour votre encadrement très précieux, votre orientation pour mener à bien mes travaux de recherche. Je la remercie également pour sa disponibilité ainsi que le temps qu'elle m'a accordé. Pour finir, je tiens à la remercier pour ces encouragements ainsi que sa patience qui m'ont beaucoup aidé à mener à bien ce travail.

Mes plus profonds remerciements vont à mon co-directeur de thèse, le Professeur Pierre Emmanuel Falcoz, le Chef du Pôle de Chirurgie Thoracique des nouveaux hôpitaux de Strasbourg. Je le remercie pour son encadrement et ses conseils scientifiques pertinents ainsi que sa patience pour diriger à bien ce travail. Je le remercie pour le temps accordé et son expertise médicale qui m'a aidé tout au long de mon parcours de thèse.

Je tiens à remercier Madame Lina Bolotine d'accepter de faire partie des membres du jury de cette thèse, en me permettant ainsi de bénéficier de son expertise. Je la remercie pour le temps qu'elle m'a accordé pour évaluer mon travail et je lui exprime ma respectueuse considération.

Mes sincères remerciements vont aussi au Pr. Marco Alifano qui m'a fait l'honneur de faire partie du jury de ce travail. Je le remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, en me permettant de bénéficier de son expérience et de ses connaissances précieuses. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour le temps accordé pour juger mon travail.

Je tiens à adresser mes remerciements à Madame Isabelle Gross, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinatrice de ma thèse et de siéger dans ce jury. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude.

Je remercie sincèrement Madame Natalia de Isla, Professeur au sein de l'Université de Lorraine de Nancy, de m'avoir fait l'immense honneur d'examiner mon travail et de faire partie du jury de cette thèse.

En cette occasion je tiens à remercier et à adresser ma gratitude ainsi que mon immense respect au Dr. Hua Guoqiang. Je tiens à le remercier de m'avoir supervisé et guidé durant mes travaux de recherche. Je le remercie pour sa patience et ses conseils qui m'ont aidé à me surpasser à chaque fois. Je lui présente un immense merci pour sa rigueur et tout le savoir-faire qui m'a transmis, sans lui ce travail n'aurait pas vu le jour.

Je tiens à présenter ma reconnaissance envers l'ensemble de l'équipe du laboratoire UMR1260, pour leur sympathie et leur soutien. Je tiens à remercier spécialement le Dr. Ysia Idoux-Gillet, pour son aide et ses conseils pertinents qui m'ont aidé durant mon parcours au sein du laboratoire. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon grand respect.

Ce travail de recherche est une étroite collaboration avec le Pôle de Chirurgie Thoracique des Nouveaux Hôpitaux Universitaires de Strasbourg dirigé par le Pr. Pierre Emmanuel Falcoz. Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance et à les remercier pour leurs efforts afin de nous permettre de bien mener nos travaux de recherche.

Je ne peux donc pas finir ce chapitre sans remercier ma famille, mes parents qui m'ont soutenu durant toute ma vie, je tiens à les remercier et à leur exprimer ma gratitude, mon amour, mon respect et ma reconnaissance envers eux. Je les remercie pour tous leurs efforts fournis pour me donner une meilleure vie ; ma sœur qui a toujours été là pour moi pour m'encourager et me soutenir dans les moments difficiles ; le reste de ma famille qui m'a soutenu et aidé durant ce parcours. Enfin je tiens à remercier mon épouse pour sa patience et sa compréhension durant la rédaction de ma thèse. Je lui exprime ma gratitude et ma reconnaissance d'être là pour moi pour me soutenir durant ces moments difficiles. Je la remercie pour ses conseils et son aide durant ces moments qui ont été ma force et qui m'ont permis de me surpasser. Je tiens à lui dire que sans elle je ne serai pas là où j'en suis aujourd'hui.

## Liste des abréviations

ACE : antigène carcino-embryonnaire  
ADC : les conjugués anticorps-médicament  
AIM : adénocarcinomes avec invasion minimale  
AJCC : American Joint Committee on Cancer  
AIS : adénocarcinomes *in situ*  
ALK : anaplastic lymphoma kinase  
CAF : cancer associated fibroblast  
CAR-T : récepteur antigénique chimérique  
CDB : cassures des doubles brins de l'ADN  
CE : carcinome épidermoïde  
CIRC : centre international de recherche sur le cancer  
c-MET : mesenchymal epithelial transition  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPPC : cancer du poumon à petites cellules  
CPNPC : cancer du poumon non à petites cellules  
CR : carcinome rénal  
CTC : cellules tumorales circulantes  
CTD : cellules tumorales disséminées  
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4  
EGFR: epidermal growth factor receptor  
EML4: echinoderm microtubule-associated protein-like 4  
EMA: agence européenne des médicaments  
FDA: food drug administration  
GBD: global burden of diseases  
GFP : green fluorescent protein  
GY : gray  
HAA : hyperplasie adénomateuse atypique  
HAP : les hydrocarbures aromatiques polycycliques  
HCA : amines hétérocycliques  
HGF : facteur de croissance hépatique  
HIF : hypoxia inducible factor

Hu PDX: humanized-derived xenograft  
IASLC: international association for the study of lung cancer  
INCA : institut national du cancer  
ITK : les inhibiteurs de la tyrosine kinase  
KRAS : kirsten rat sarcoma virus  
mAbs: les anticorps monoclonaux  
MB : membrane basale  
MEC : matrice extracellulaire  
MET : microenvironnement tumoral  
MMP : métalloprotéase matricielle  
MSC : cellules souches mésenchymateuses  
NK : natural killers  
NMSC : non mélanomes du cancer du poumon  
NOC : les composés N-nitroso  
OMS : organisation mondiale de la santé  
OR: odds ratio  
PD-1: programmed death cells-1  
PD-L1: programmed death cells ligand  
PDOX: patient derived orthopic- xenograft  
PDT: patient derived tumoroid  
PDX : patient derived xenograft  
RFP : red fluorescent protein  
RR : risque relatif  
RR : response rate  
SBRT : radiothérapie corporelle stéréotaxique  
SG : moyenne de survie globale  
SSP : survie sans progression  
TAN : tumor associated neutrophil  
TCR : la thérapie des récepteurs des lymphocytes T génétiquement modifiés  
TIL : lymphocytes infiltrants les tumeurs  
TNM : T : tumeur ; N : nœud ; M : Métastase  
Treg : T lymphocyt regulator  
TSM : taux d'incidence standardisée dans le monde  
UICC : l'union internationale contre le cancer

VEGF: vascular endothelial growth factor

WHO: world health organization

## Liste des figures

|  |     |
|--|-----|
| <i>Figure 1: Le classement des morts causées par le cancer avant l'âge de 70 ans en 2019 à travers le monde</i>  | 17  |
| <i>Figure 2: La distribution de l'incidence et de la mortalité de tous les cancers à travers le monde</i>  | 20  |
| <i>Figure 3: La distribution des cancers les plus communs</i>  | 21  |
| <i>Figure 4: Les dix principaux sites de cancer issus des estimations du nombre de nouveaux cas et de décès en 2018, France</i>  | 23  |
| <i>Figure 5: Les étapes de migrations des cellules métastatiques du site de l'organe primaire à travers le sang jusqu'à l'adhérence et la prolifération au sein du site distal</i>   | 25  |
| <i>Figure 6: Le nombre de nouveaux cas et de décès enregistrés en 2020 pour le cancer du poumon</i>  | 27  |
| <i>Figure 7: Le taux d'incidence et de mortalité pour les deux sexes à travers le monde. A : Incidence du cancer du poumon pour les deux sexes dans le monde, B : Mortalité enregistrée pour les deux sexes dans le monde</i>                  | 28  |
| <i>Figure 8: La prévalence à 5ans chez les patients atteints du cancer du poumon</i>   | 29  |
| <i>Figure 9: Courbes d'incidence et de mortalité selon la classe d'âge en France métropolitaine en 2018</i>  | 30  |
| <i>Figure 10: Le cancer de poumon non à petites cellules</i>   | 36  |
| <i>Figure 11: Les adénocarcinomes in situ</i>  | 38  |
| <i>Figure 12: Les adénocarcinomes avec invasion minimale</i>   | 38  |
| <i>Figure 13: Les principaux sous type des adénocarcinomes invasives</i>   | 39  |
| <i>Figure 14: Les carcinomes épidermoïdes</i>  | 40  |
| <i>Figure 15: Les carcinomes à grandes cellules</i>  | 41  |
| <i>Figure 16: Le cancer du poumon à petites cellules</i>   | 42  |
| <i>Figure 17: L'illustration de la chronologie des différents types de traitements pour le CPNPC</i>   | 48  |
| <i>Figure 18: L'évolution des traitements de la chimiothérapie dans le cancer du poumon à non petites cellules (CPNPC) dans le temps en représentant les molécules phares pour chaque étape avec les taux de survie globale moyen par mois</i> | 51  |
| <i>Figure 19: Les composantes du microenvironnement tumoral</i>  | 77  |
| <i>Figure 20: Les interactions entre les différentes composantes du microenvironnement tumoral</i>   | 88  |
| <i>Figure 21: Les principaux modèles 3D actuellement utilisés pour modéliser la tumeur et son microenvironnement</i>   | 92  |
| <i>Figure 22: La représentation schématique d'un modèle d'organoïde sur puce micro-fluidique</i>   | 99  |
| <i>Figure 23: Le modèle à base d'impression tissulaire en 3D</i>   | 100 |
| <i>Figure 24: La représentation du modèle de xénogreffes dérivés de patient (PDX)</i>  | 102 |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <i>Tableau 1: Le nombre de nouveaux cas et de morts pour les types de cancers les plus fréquents en 2020</i> | 19 |
| <i>Tableau 2: L'incidence, la mortalité et la prévalence en France par site de cancer</i>                    | 24 |
| <i>Tableau 3: Le taux d'incidence des métastases dans les différents types de cancers</i>                    | 26 |
| <i>Tableau 4: L'incidence et la mortalité du cancer du poumon à travers le monde</i>                         | 29 |
| <i>Tableau 5: Le nombre de cas et de décès par classe d'âge en France métropolitaine en 2018</i>             | 31 |
| <i>Tableau 6: Le taux d'incidence et de mortalité par classe d'âge en France métropolitaine en 2018</i>      | 31 |
| <i>Tableau 7: Les modifications apportées au descripteur T dans la 8e classification TNM</i>                 | 44 |
| <i>Tableau 8: La classification selon la 8<sup>ème</sup> édition du descripteur N</i>                        | 44 |
| <i>Tableau 9: La classification selon la 8<sup>ème</sup> édition du descripteur M</i>                        | 45 |
| <i>Tableau 10: Le résumé des descripteurs T, N et M pour le cancer du poumon</i>                             | 46 |
| <i>Tableau 11: La répartition par stade selon la 8e classification TNM pour le cancer du poumon</i>          | 47 |

# Sommaire

|  |    |
|--|----|
| Introduction .....   | 14 |
| Chapitre I : État de l'art.....                                      | 16 |
| I. Les tumeurs solides cancéreuses .....                             | 16 |
| 1. Les données épidémiologiques.....                                 | 16 |
| 1.1. L'épidémiologie générale .....                                  | 17 |
| 1.1.1. L'épidémiologie du cancer dans le monde .....                 | 17 |
| 1.1.2. L'épidémiologie du cancer en France.....                      | 22 |
| 1.1.3. Les métastases des tumeurs solides.....                       | 24 |
| 1.1.3.1. Définition.....   | 24 |
| 1.1.3.2. Les sites de métastases dans les tumeurs solides .....      | 25 |
| 1.2. Le cancer du poumon : données épidémiologiques .....            | 26 |
| 1.2.1. L'épidémiologie descriptive.....                              | 26 |
| 1.2.2. L'épidémiologie analytique .....                              | 32 |
| 1.2.2.1. Les facteurs de risques .....                               | 32 |
| 1.2.2.1.1. Le tabagisme .....  | 32 |
| 1.2.2.1.1.1. Le tabagisme actif.....                                 | 32 |
| 1.2.2.1.1.2. Le tabagisme passif .....                               | 32 |
| 1.2.2.1.1.3. Le sevrage tabagique.....                               | 33 |
| 1.2.2.1.2. Les expositions professionnelles .....                    | 33 |
| 1.2.2.1.2.1. Le radon .....  | 33 |
| 1.2.2.1.2.2. L'amiante .....   | 34 |
| 1.2.2.1.2.3. La silice.....  | 34 |
| 1.2.2.1.2.4. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ..... | 34 |
| 1.2.2.1.2.5. Les métaux .....  | 34 |
| 1.2.2.1.3. Les autres facteurs .....                                 | 35 |
| 1.2.2.1.3.1. La pollution atmosphérique .....                        | 35 |
| 1.2.2.1.3.2. Les pathogènes pulmonaires préexistants.....            | 35 |
| 1.2.2.1.3.3. Les susceptibilités génétiques .....                    | 35 |
| 2. Les classifications du cancer du poumon .....                     | 36 |
| 2.1. La classification anatomopathologique .....                     | 36 |
| 2.1.1. Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) .....      | 36 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1.1.1. Les adénocarcinomes .....                                 | 37        |
| 2.1.1.1.1. Lésion pré-invasives .....                              | 37        |
| 2.1.1.1.2. Les adénocarcinomes avec invasion minime (AIM).....     | 38        |
| 2.1.1.1.3. Les adénocarcinomes invasifs .....                      | 39        |
| 2.1.1.2. Les carcinomes épidermoïdes (CE) .....                    | 40        |
| 2.1.1.3. Les carcinomes à grandes cellules.....                    | 41        |
| 2.1.2. Le cancer du poumon à petites cellules (CPPC).....          | 41        |
| <b>2.2. La classification TNM.....</b>                             | <b>42</b> |
| 2.2.1. Les descripteurs T .....                                    | 43        |
| 2.2.2. Les descripteurs N.....                                     | 44        |
| 2.2.3. Les descripteurs M.....                                     | 45        |
| 2.2.4. Le regroupement des descripteurs par stade.....             | 45        |
| <b>3. Les traitements .....</b>                                    | <b>47</b> |
| <b>3.1. Description .....</b>                                      | <b>47</b> |
| 3.1.1. La chirurgie .....  | 49        |
| 3.1.2. La chimiothérapie .....                                     | 50        |
| 3.1.3. La radiothérapie.....                                       | 52        |
| 3.1.3.1. Généralités .....   | 52        |
| 3.1.3.2. La radiothérapie exclusive.....                           | 53        |
| 3.1.3.3. La radiothérapie adjuvante.....                           | 53        |
| 3.1.3.4. La radiothérapie corporelle stéréotaxique (SBRT).....     | 53        |
| 3.1.4. La thérapie ciblée .....                                    | 54        |
| 3.1.4.1. Le gène EGFR.....   | 54        |
| 3.1.4.2. Le gène ALK .....   | 57        |
| 3.1.4.3. Le gène BRAF.....   | 58        |
| 3.1.4.4. Le gène KRAS.....   | 58        |
| 3.1.4.5. Le gène c-MET .....                                       | 61        |
| 3.1.5. L'immunothérapie .....                                      | 62        |
| 3.1.5.1. L'immunomodulation .....                                  | 63        |
| 3.1.5.2. Les vaccins thérapeutiques.....                           | 64        |
| 3.1.5.3. Les thérapies cellulaires adoptives.....                  | 65        |
| 3.1.5.4. Les anticorps thérapeutiques: .....                       | 66        |
| 3.1.5.5. Les inhibiteurs des points de contrôles immunitaires..... | 67        |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.5.5.1. Protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) et son ligand PD-L1 ... | 67 |
| 3.1.5.5.2. CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) .....              | 69 |
| 3.2. Les limites des traitements .....   | 71 |
| 3.2.1. La chirurgie .....  | 71 |
| 3.2.2. La radiothérapie .....  | 72 |
| 3.2.3. La chimiothérapie .....   | 73 |
| 3.2.4. Les thérapies ciblées.....  | 74 |
| 3.2.5. L'immunothérapie .....  | 75 |
| II. Le microenvironnement de la tumeur cancéreuse .....                            | 76 |
| 1. Définition du microenvironnement tumoral (MET) .....                            | 76 |
| 2. Les composantes du microenvironnement tumoral .....                             | 77 |
| 2.1. Les composants cellulaires.....   | 77 |
| 2.1.1. Les cellules immunitaires.....  | 77 |
| 2.1.1.1. Les lymphocytes T .....   | 78 |
| 2.1.1.2. Les lymphocytes B.....  | 79 |
| 2.1.1.3. Les neutrophiles.....   | 79 |
| 2.1.1.4. Les macrophages .....   | 80 |
| 2.1.1.5. Les cellules dendritiques .....   | 81 |
| 2.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses .....                                 | 81 |
| 2.1.3. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) .....                             | 82 |
| 2.1.4. Les cellules endothéliales .....  | 82 |
| 2.1.5. Les adipocytes.....   | 83 |
| 2.2. La composante vasculaire.....   | 83 |
| 2.2.1. L'angiogenèse .....   | 83 |
| 2.2.2. Les vaisseaux tumoraux.....   | 84 |
| 2.3. La composante matricielle.....  | 85 |
| 2.3.1. La matrice extracellulaire (MEC) .....                                      | 85 |
| 2.3.2. L'hypoxie tumorale .....  | 86 |
| 3. L'agressivité tumorale.....   | 87 |
| III. Les plateformes de criblage .....   | 88 |
| 1. Les modèles 2D .....  | 89 |
| 2. Les modèles 3D .....  | 90 |
| 2.1. Les différents types de modèles 3D <i>in vitro</i> .....                      | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.1.1. Les sphéroïdes.....  | 92  |
| 2.1.2. Les organoïdes .....   | 94  |
| 2.1.3. Les tumoroïdes.....  | 95  |
| 2.1.4. Les modèles à base d'échafaudage.....  | 95  |
| 2.1.5. Les modèles micro-fluidiques .....   | 97  |
| 2.1.6. Les modèles à base d'impression tissulaire en 3D.....  | 99  |
| 2.2. Les principaux modèles <i>in vivo</i> utilisés en recherche biomédicale pour le cancer ..  | 100 |
| 2.2.1. Les modèles basés sur la xénotransplantation.....  | 101 |
| 2.2.1.1. Le modèle PDX.....   | 101 |
| 2.2.1.2. Le modèle PDOX.....  | 103 |
| 2.2.1.3. Le modèle Hu-PDX .....   | 103 |
| 2.2.2. Les modèles génétiquement modifiés.....  | 104 |
| 2.2.3. Les modèles basés sur l'induction chimique .....   | 105 |
| 3. Vers le modèle parfait .....   | 107 |
| Chapitre II : Objectifs.....  | 101 |
| Chapitre III : Construction de tumoroïdes dérivés de patients pour la prédiction de l'effet de la radiothérapie et de la chimiothérapie dans le cancer du poumon..... | 103 |
| 1. Contexte et objectif.....  | 103 |
| 2. Résultats .....  | 105 |
| 2.1. Identification des différentes réponses des PDT de cancers pulmonaires aux doses de la radiothérapie par rayons X .....  | 105 |
| 2.2. Identification des différentes réponses des PDT de cancers pulmonaires aux doses de chimiothérapie à base de cisplatine .....                                    | 106 |
| 2.3. Pertinence escomptée du modèle 3D <i>in vitro</i> pour la prescription en clinique .....   | 107 |
| 3. Discussion.....  | 122 |
| 4. Conclusion.....  | 125 |
| Chapitre IV : La vascularisation des tumoroïdes dérivés des patients du cancer du poumon non à petites cellules et de leur microenvironnement .....                   | 128 |
| 1. Contexte et objectif.....  | 128 |
| 2. Résultats .....  | 130 |
| 2.1. Les PDT du cancer du poumon conservent les caractéristiques histopathologiques du tissu cancéreux d'origine .....  | 130 |
| 2.2. Les cellules endothéliales s'infiltrent dans les PDT à partir du microenvironnement vasculaire normal .....  | 131 |
| 2.3. Les cellules endothéliales s'infiltrent dans le microenvironnement environnant normal à partir des PDT vascularisés .....  | 132 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2.4. La connexion du réseau vasculaire entre le microenvironnement vascularisé et le PDT vascularisé .....</b> | <b>132</b> |
| <b>3.Discussion .....</b>   | <b>147</b> |
| <b>4.Conclusion .....</b>   | <b>149</b> |
| <b>Conclusion générale et perspectives .....</b>  | <b>150</b> |
| <b>Références bibliographiques .....</b>  | <b>154</b> |

## Introduction

Le cancer est une cause majeure de décès à travers le monde, avec près de 10 millions de décès enregistrés en 2020. Parmi les types de cancer, le cancer du poumon est considéré comme le plus mortel en raison de la forte prévalence du tabagisme. Il est la principale cause de décès chez les hommes et la deuxième chez les femmes après le cancer du sein (Duchêne C.C, 2013 ; Siegel R.L., et *al.*, 2018 ; Bray.F et *al.*, 2021).

Le cancer du poumon se divise en deux grands types : le cancer du poumon à non petites cellules (CPNPC), qui représente 80% des cas, et le cancer du poumon à petites cellules (CPPC), qui représente les 20% restants. Les cancers du poumon à non petites cellules peuvent être classés en trois sous-types histologiques : le carcinome épidermoïde, l'adénocarcinome et le carcinome à grandes cellules. Parmi ceux-ci, l'adénocarcinome est le plus fréquent (Travis W.D., et *al.*, 2004 et 2015 ; Herbst R.S., et *al.*, 2008 ; Samet J.M., et *al.*, 2009).

Le diagnostic précoce peut permettre la guérison de nombreux cancers. Ainsi, grâce à la découverte et au développement de nouveaux médicaments anticancéreux, le taux de décès liés au cancer a diminué de 32% au cours des trois dernières décennies. Cependant, le processus de développement de nouveaux médicaments complexes et coûteux, et le taux de réussite global pour ces nouvelles molécules anti-cancéreuses reste faible (inférieur à 10%) (Takebe T., et *al.*, 2018 et Maeda, H., et *al.*, 2018).

Durant ces dernières années, de nombreuses études se sont concentrées sur les caractéristiques du microenvironnement tumoral (MET) afin de mieux comprendre son influence sur la croissance, la progression des tumeurs et leur résistance aux traitements. Le MET est ainsi devenu une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies. La complexité de sa composition a conduit les chercheurs à étudier de plus près les interactions entre ses différentes composantes et les mécanismes clés impliqués dans le développement et la propagation tumorales. Il est donc crucial de développer des plateformes de culture cellulaire optimales pour mieux étudier les caractéristiques et les interactions complexes des cellules cancéreuses. Cependant, la reproduction de toutes ces interactions complexes *in vitro* et *in vivo* s'avère difficile. Les modèles de culture cellulaire en 2D et les xénogreffes dérivées de patients (PDX) ont été les premiers modèles utilisés pour le criblage des médicaments anti-cancéreux. Les cultures cellulaires en 2D sont simples, rapides, polyvalentes, reproductibles et économiques par rapport aux modèles animaux. Cependant, les modèles 2D ne parviennent pas à reproduire fidèlement la structure tridimensionnelle des tumeurs et ne préservent pas les caractéristiques spécifiques des tumeurs d'origine, telles que les profils mutationnels. En raison de l'absence

d'une architecture tissulaire spécifique, ces modèles ne peuvent pas reproduire de manière précise le microenvironnement complexe qui soutient la croissance des cellules tumorales et donc ne peuvent pas prédire avec fiabilité leur sensibilité ou leur résistance aux molécules anti-cancéreuses. Les modèles PDX conservent les caractéristiques pathologiques, mutationnelles et l'organisation en 3D des tumeurs d'origine, mais leur élaboration est complexe et longue nécessitant plusieurs mois par cas, limitant ainsi leur utilisation clinique pour guider la médecine de précision (Cukierman E., et *al.*, 2001).

La culture cellulaire tridimensionnelle (3D) *in vitro* est devenue un modèle prometteur pour le criblage des médicaments. Ces modèles présentent de nombreux avantages telles que leur hétérogénéité, leur plasticité et la présence de régions nécrotiques et hypoxiques. Ils permettent de reproduire les interactions dynamiques entre les cellules et leur matrice extracellulaire, imitant ainsi plus fidèlement le microenvironnement naturel de la tumeur (Thoma C.R., et *al.*, 2014 ; Langhans S.A., 2018 ; Hickman, J.A., et *al.*, 2014 ; Balkwill F.R., et *al.*, 2012). Ainsi, le choix du modèle à utiliser pour reproduire puis étudier les diverses interactions des cellules avec le MET est crucial.

Dans ce travail, il est proposé de construire des tumoroïdes dérivés de patients atteints de cancer du poumon pour optimiser leur valeur prédictive des molécules anti-cancéreuses à prescrire aux patients et ainsi pour répondre aux besoins d'une médecine de précision et personnalisée.

Une première étude sera présentée permettant d'évaluer la valeur prédictive de l'efficacité à la fois de la chimiothérapie et de la radiothérapie sur des tumoroïdes dérivés de patients atteints de cancer du poumon.

Une seconde étude proposera un enrichissement du modèle des tumoroïdes dérivés de patients atteints de cancer du poumon par l'ajout d'une matrice extracellulaire et d'une vascularisation tumorale.

## *Chapitre I : État de l'art*

# Chapitre I : État de l'art

## I. Les tumeurs solides cancéreuses

### 1. Les données épidémiologiques

Les tumeurs solides sont des masses anormales de tissus qui ne contiennent généralement pas de kystes ou de zones liquides. Les tumeurs solides se développent au sein des tissus et peuvent être soit bénignes (non cancéreuses) ou malignes (cancéreuses). Les tumeurs solides sont différentes des tumeurs liquides, telles que les leucémies et les lymphomes qui se développent dans le sang et la moelle osseuse (Gavhane Y. N et *al.*, 2011).

La nomination des types de cancer est en général liée au type de tissu impliqué. Ainsi, par exemple : les sarcomes pour les tissus conjonctifs, les carcinomes pour les tissus épithéliaux et les lymphomes pour les tissus lymphoïdes (Gavhane Y. N et *al.*, 2011 ; Morandeira et *al.*, 2008). Les cancers solides sont très répandus, il est estimé qu'environ 80 % de tous les types de tumeurs sont dérivés d'un sous-ensemble d'organes solides incluant : le sein, la prostate, le côlon, le poumon et l'ovaire (Visvader et *al.*, 2008). La majorité des tumeurs solides sont d'origine épithéliale (Wang et *al.*, 2020) et représentent une cause majeure de morbidité et mortalité à travers le monde avec un taux de mortalité qui atteint plus de 85% (Najafi et *al.*, 2021 ; Praktiknjo et *al.*, 2020).

Malgré le progrès significatif du développement des différentes technologies anticancéreuses, il n'y a aucun remède qui permet de traiter les maladies malignes. L'efficacité des traitements contre les tumeurs solides dépend de plusieurs facteurs. Le transport des molécules anticancéreuses au sein des cellules tumorales reste l'un des facteurs les plus importants. Le transport inadéquat au sein des cellules tumorales mène à la re-prolifération des cellules tumorales voir même au développement de résistance contre les molécules thérapeutiques (Jaracz et *al.*, 2005).

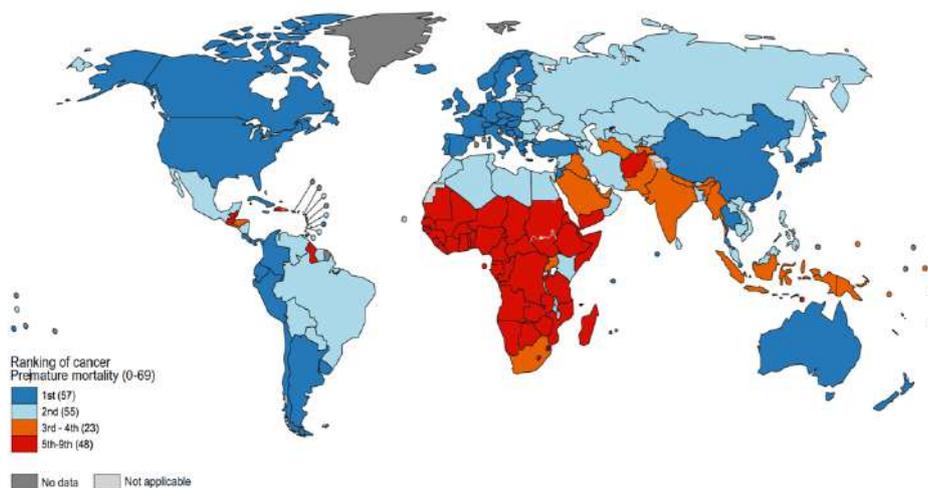
## 1.1. L'épidémiologie générale

### 1.1.1. L'épidémiologie du cancer dans le monde

Le cancer résulte d'un déséquilibre dans les mécanismes de croissance et de multiplication cellulaire, ce qui conduit à une prolifération incontrôlée des cellules saines qui se transforment en cellules cancéreuses au sein d'un organe (Anand P., et *al.*, 2008). Les cellules cancéreuses se caractérisent par des anomalies nucléaires avec des mitoses fréquentes et désordonnées, ils envahissent le tissu sain jusqu'à sa destruction (Quevauvillers, 2009).

Certaines cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur primaire d'origine et migrer vers d'autres parties du corps par le biais du système lymphatique ou du système sanguin. Ces cellules cancéreuses circulantes peuvent ensuite s'implanter dans d'autres organes ou tissus, formant des métastases (Welch DR., 2006).

Le cancer est classé comme la cause majeure des décès à travers le monde, il constitue une barrière importante à franchir pour améliorer le taux de vie et de survie dans chaque pays du monde (Bray.F et *al.*, 2021). En 2019 selon l'organisation mondiale de la santé (WHO), le cancer représente soit la première ou la deuxième cause de mort avant l'âge de 70 ans dans 112 de 183 pays et il est classé troisième ou quatrième dans 23 pays (Figure.1).



**Figure. 1. Le classement des morts causées par le cancer avant l'âge de 70 ans en 2019 à travers le monde (WHO, 2020)**

La fréquence d'apparition du cancer a doublé en 30 ans (Institut National du Cancer, 2015), cela peut s'expliquer par différents facteurs : démographiques, environnementaux, ainsi que médicaux, plus précisément les modes de dépistage des cancers (Institut National du Cancer., 2013 et 2016).

En 2018, plus 18 millions de nouveaux cas de cancers ont été estimés (17 millions hors cancer de la peau non mélanome) dans le monde. Le nombre de décès causés par le cancer était estimé à 9,6 millions de décès. La fréquence et les causes de décès par cancer varient considérablement d'un pays à l'autre. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la mortalité par cancer pourrait augmenter de 50% et atteindre 15 millions d'ici 2030 (American Cancer Society, 2018).

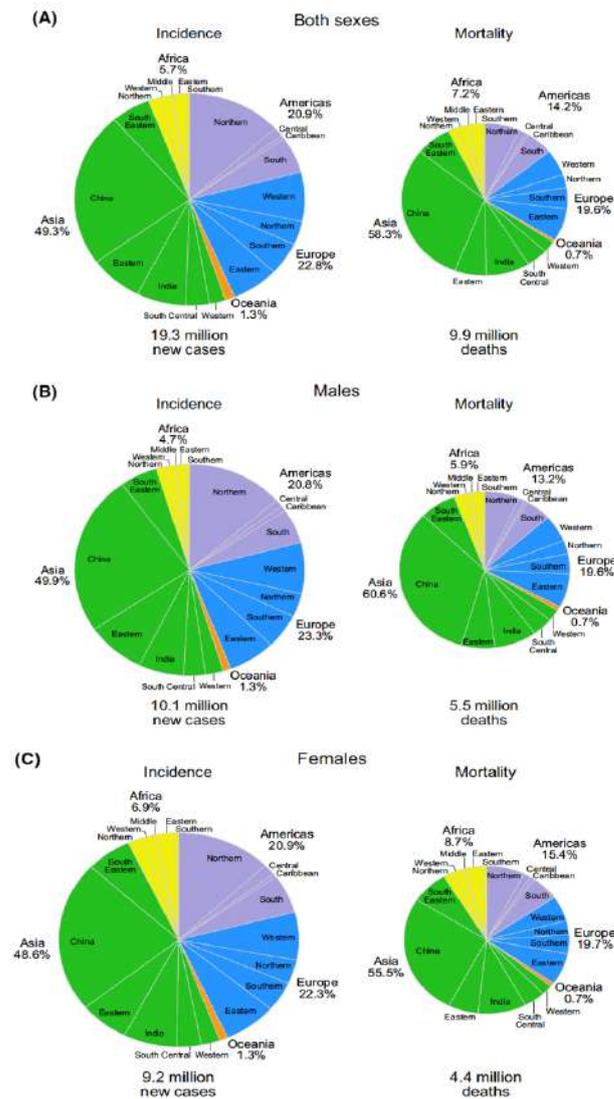
Ce taux de mortalité et cette incidence des cancers qui augmentent rapidement à travers le monde s'explique par le vieillissement des populations et la croissance démographique, ainsi l'augmentation des principaux facteurs de risque de cancer dont plusieurs sont liés au développement social économique (Gersten O., et Wilmoth JR., 2002 ; WHO, 2020).

En 2020 selon la base de données Globocan, il y a eu lieu de 19,3 millions de nouveaux cas de cancer (18,1 millions si on exclut les non-mélanomes de cancer de peau (NMSC) et les carcinomes de cellules basales) et 10 millions de morts causés par le cancer (9,9 millions en excluant NMSC et les carcinomes de cellules basales) (Tableau. 1).

**Tableau. 1. Le nombre de nouveaux cas et de morts pour les types de cancers les plus fréquents en 2020 (Globocan, 2020).**

| Le site du cancer  | Nombre de nouveaux cas de cancer (%) | Nombre de nouveaux morts par le cancer (%) |
|--|--------------------------------------|--|
| <b>Le cancer de sein</b>   | 2,261,419 (11.7%)                    | 684,996 (6,9%)                             |
| <b>Poumons</b>   | 2,206,771 (11.4%)                    | 1,796,144 (18.0%)                          |
| <b>Prostate</b>  | 1,414,259 (7.3%)                     | 375,304 (3.8%)                             |
| <b>Le cancer de la peau non mélanome</b>                         | 1,198,073 (6.2%)                     | 63,731 (0.6%)                              |
| <b>Colon</b>   | 1,148,515 (6.0%)                     | 576,858 (5.8%)                             |
| <b>Estomac</b>   | 1,089,103 (5.6%)                     | 768,793 (7.7%)                             |
| <b>Foie</b>  | 905,677 (4.7%)                       | 830,180 (8.3%)                             |
| <b>Rectum</b>  | 732,210 (3.8%)                       | 339,022 (3.4%)                             |
| <b>Col de l'utérus</b>   | 604,127 (3.1%)                       | 341,831 (3.4%)                             |
| <b>Œsophage</b>  | 604,100 (3.1%)                       | 544,076 (5.5%)                             |
| <b>Tyroïde</b>   | 586,202 (3.0%)                       | 43,646 (0.4%)                              |
| <b>Vessie</b>  | 573,278 (3.0%)                       | 212,536 (2.1%)                             |
| <b>Lymphome non hodgkinien</b>                                   | 544,352 (2.8%)                       | 259,793 (2.6%)                             |
| <b>Pancréas</b>  | 495,773 (2.6%)                       | 466,003 (4.7%)                             |
| <b>Leucémie</b>  | 474,519 (2.5%)                       | 179,368 (1.8%)                             |
| <b>Le corps de l'utérus</b>                                      | 417,367 (2.2%)                       | 97,370 (1.0%)                              |
| <b>Lèvres et cavité orale</b>                                    | 377,713 (2.0%)                       | 177,757 (1.8%)                             |
| <b>Le cancer de peau mélanome</b>                                | 324,635 (1.7%)                       | 57,043 (0.6%)                              |
| <b>Ovaires</b>   | 313,959 (1.6%)                       | 207,252 (2.1%)                             |
| <b>Le cerveau et le système nerveux</b>                          | 308,102 (1.6%)                       | 251,329 (2.5%)                             |
| <b>Tous les sites en excluant le cancer de peau non mélanome</b> | 18,094,716                           | 9,894,402                                  |
| <b>Tous les sites</b>  | 19,292,789                           | 9,958,133                                  |

D'autre part, la moitié des cas de mort causés par tous les types de cancer sont enregistrés en Asie avec un pourcentage de 58,3%, où réside 59,5% de la population mondiale. L'Europe compte pour 22,8% du nombre total des cas de cancer et 19,6% des cas de mort à cause du cancer, mais cela ne représente que 9,7% de la population mondiale. Le continent américain compte une incidence de 20,9% et un taux de mortalité de 14,2% du taux de mortalité mondiale (Figure. 2) (Globocan, 2020).



**Figure. 2. La distribution de l'incidence et de la mortalité de tous les cancers à travers le monde (A) les sexes combinés, (B) les hommes, (C) les femmes. Pour les sexes combinés ainsi que séparément pour les hommes et les femmes. Pour chaque sexe, la surface des cercles reflète la proportion totale des cas de morts. (Globocan, 2020).**

Parmi ces cancers, le cancer de sein est le plus diagnostiqué avec un pourcentage de 11,7% par rapport aux autres types de cancer, suivi de près par le cancer du poumon 11,4%, le cancer du côlon 10%, de l'estomac 7,7% et enfin 6,9% pour le cancer du sein pour les deux sexes combinés.

D'autre part chez l'homme, le cancer du poumon reste le cancer qui cause le plus de cas de décès, suivi du cancer de la prostate, le cancer colorectal pour son incidence et le cancer du foie pour sa mortalité. Par contre chez la femme, le cancer du sein reste le cancer le plus diagnostiqué et la cause majeure de décès. Le cancer du poumon et le cancer colorectal viennent juste après pour leurs incidences et leurs taux de mortalités (Figure.3) (Globocan, 2020).

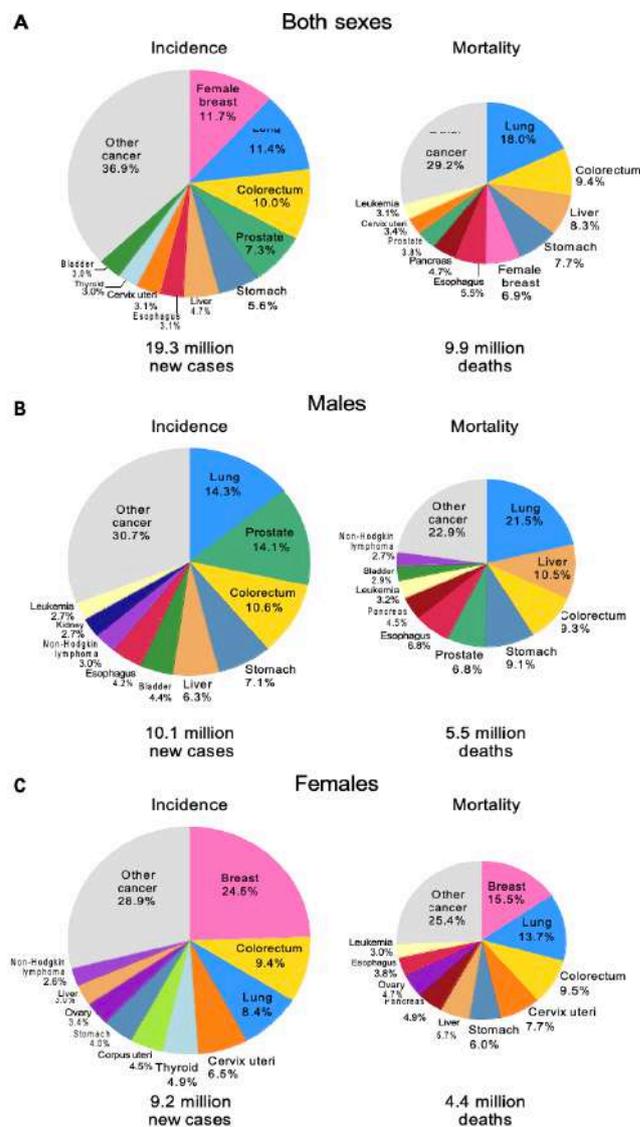


Figure.3. La distribution des cancers les plus communs (Globocan, 2020).

### 1.1.2. L'épidémiologie du cancer en France

Le cancer est le problème de santé publique majeur dans le monde et la première cause de décès en France (GBD, 2016). Ainsi, le suivi de la tendance de l'incidence et de la mortalité est la clé pour la planification et l'évaluation des programmes de lutte contre les cancers (Siegel RL et *al.*, 2021 ; Bray et *al.*, 2018).

En France, les tendances nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer sont mises à jour tous les 5 ans et contribuent à une connaissance précise du fardeau du cancer et de son évolution dans le temps (Defossez G., et *al.*, 2018 et 2021). Ces tendances aident les services de la santé public à mettre en place des stratégies et des plans d'intervention, tels que la mise en place de nouveaux traitements et le changement des méthodes de diagnostics ainsi que les pratiques de dépistages (Welch et *al.*, 2019).

En 2015, 41% des cas de tous types de cancer ont été attribués aux facteurs de risque majeurs qui sont : le tabac, l'alcool, l'alimentation et l'obésité (Soerjomataram et *al.*, 2015 et Menvielle G., 2018).

Historiquement, les hommes ont une prévalence d'exposition plus élevée à ces facteurs de risque comparés aux femmes. Mais lors de ces dernières décennies, les femmes ont tendance à fumer ce qui cause des variations substantielles sur la prévalence des cancers concernant les deux sexes (Hill et *al.*, 2005 et Richard JB., et *al.*, 2016). Par contre, la consommation d'alcool pour les deux sexes combinés montre une diminution, mais une augmentation rapide de la prévalence de l'obésité est observée. Les changements des comportements de la population vis-à-vis des facteurs de risque jouent un rôle majeur sur l'incidence des cancers (Charles M.A., et *al.*, 2008 ; Beck et *al.*, 2014 ; Shield KD., et *al.*, 2018 et Richard JB., Et *al.*, 2016).

Les cas de cancer en France métropolitaine sont aujourd'hui de plus en plus détectables et ce, grâce à l'évolution et au développement des stratégies de dépistage. En 2012 par exemple, grâce à ces méthodes, 355 000 nouveaux cas de cancer ont été détectés : ce dernier a touché 200 000 hommes et 155 000 femmes. Parmi ces cas, 148 000 personnes sont décédées. Le cancer est passé devant les maladies cardiovasculaires concernant le taux de mortalité (Institut de cancer, 2013).

En 2018, les estimations ont montré l'enregistrement de 177 400 nouveaux cas de cancer pour 67 800 de cas de décès causés par le cancer chez les femmes, chez les hommes, ils ont démontré l'enregistrement de 204 600 cas pour 89 600 cas de décès. Le cancer qui touche le plus les femmes est le cancer du sein avec un pourcentage de 33% suivi de près par le cancer colorectal avec 11% et enfin le cancer du poumon avec 9%. Chez les hommes, le cancer le plus fréquent est le cancer de la prostate avec un pourcentage de 25% suivi du cancer du poumon avec 15% et le cancer colorectal avec 11% (Figure. 4). D'autre part, le cancer du sein reste la cause majeure de décès chez les femmes avec un pourcentage de 18% suivi du cancer du poumon avec 15% et en dernière position, le cancer colorectal avec 12%. Par contre, chez les hommes le cancer du poumon est la cause première de mort avec un pourcentage de 25% devant le cancer colorectal (10%) et le cancer de la prostate (9%) (Defossez G., et al., 2021).

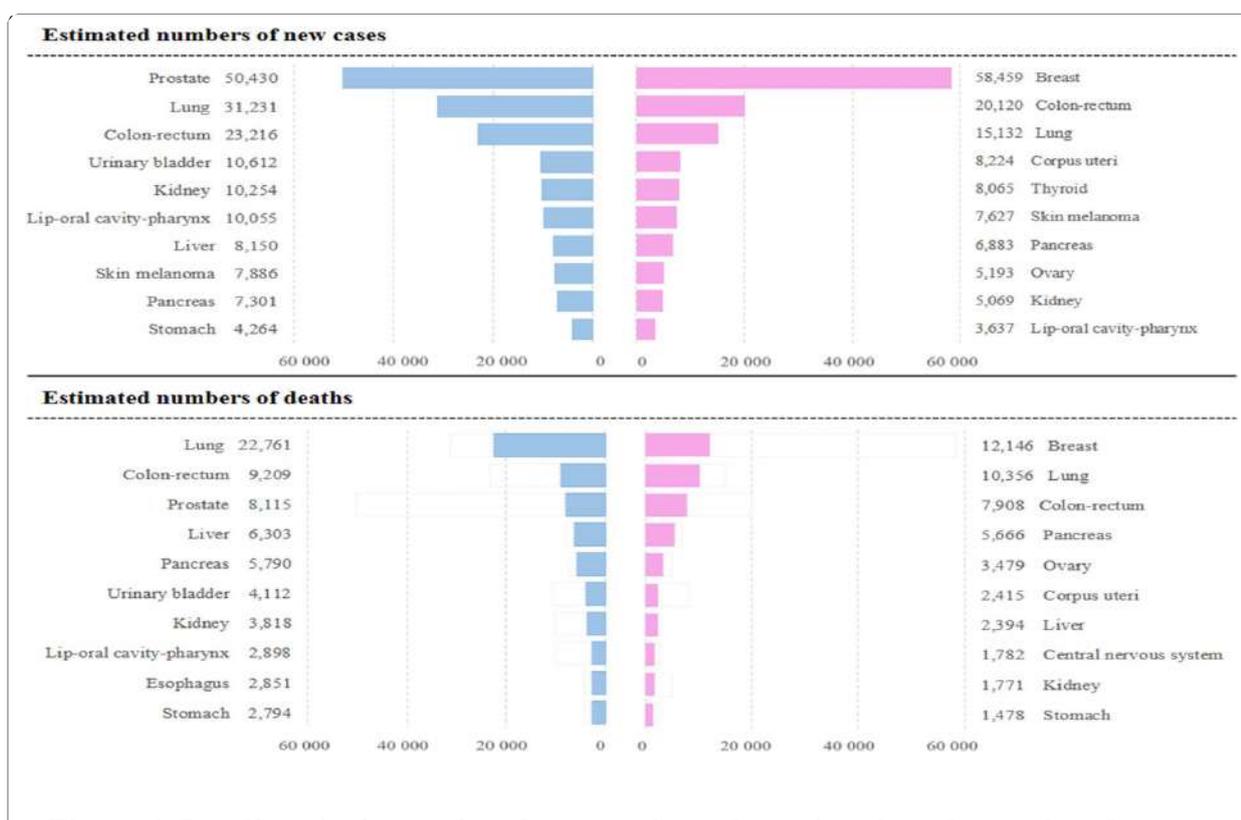


Figure.4. Les dix principaux sites de cancer issus des estimations du nombre de nouveaux cas et de décès en 2018, France (Defossez G. et al., 2021).

En 2020, le nombre de nouveaux cas de cancer enregistré est de 467 965 cas pour 185 621 cas de décès par cancer, dont le cancer de la prostate est le premier en termes d'incidence (14,1%) suivi du cancer du sein (12,4%) et en troisième position vient le cancer du poumon (10,3%). D'autre part pour la prévalence à 5 ans (les proportions sont calculées pour 100 000 personnes pour tous les âges), le cancer de la prostate compte le taux de survie le plus élevé avec 258 722 personnes, suivi du cancer du sein 236 658. Par contre, le cancer du poumon est le cancer le plus léthal avec un nombre de décès qui atteint 59 708 personnes (Tableau.2) (Globocan, 2020).

**Tableau.2. L'incidence, la mortalité et la prévalence en France par site de cancer source (Globocan, 2020)**

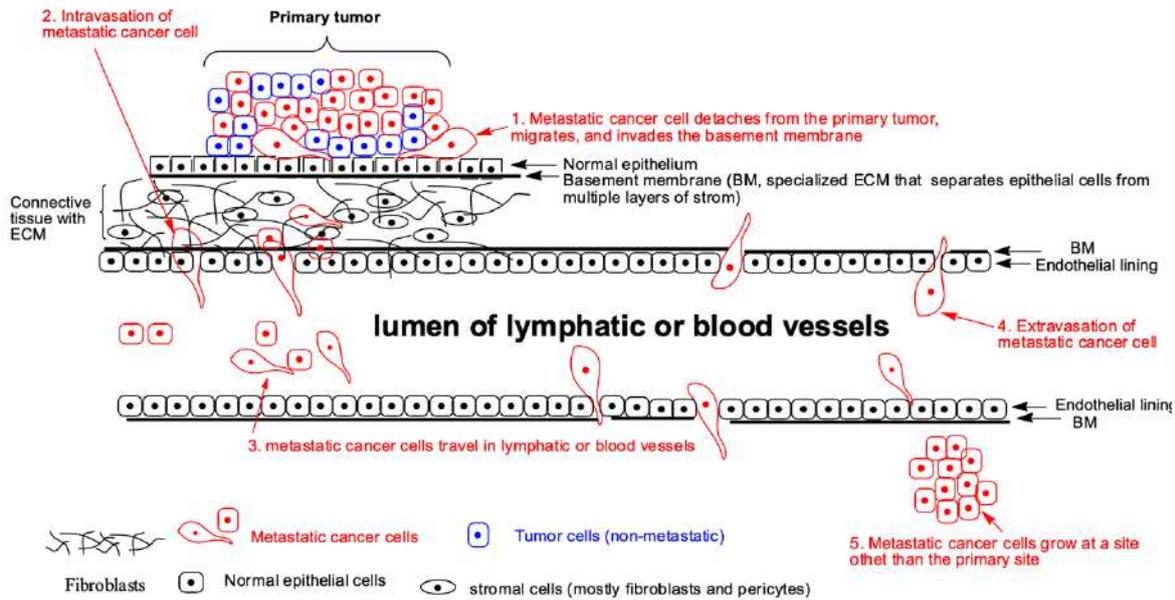
| Cancer                          | Nouveaux cas   |            |      |              | Nombre de décès |            |     |             | La prévalence à 5ans |                     |
|---------------------------------|----------------|------------|------|--------------|-----------------|------------|-----|-------------|----------------------|---------------------|
|                                 | Nombre         | Classement | (%)  | Risque       | Nombre          | Classement | (%) | Risque      | Nombre               | Prop. (par 100 000) |
| Prostate                        | 66 070         | 1          | 14,1 | 12,59        | 9060            | 6          | 4,9 | 0,59        | 258 722              | 819,02              |
| Sein                            |                | 2          | 12,4 | 10,55        | 14183           | 3          | 7,6 | 1,65        | 236 658              | 702,58              |
| Poumon                          |                | 3          | 10,3 | 4,34         | 37095           | 1          | 20  | 3,07        | 59 708               | 91,47               |
| Colon                           |                | 4          | 6,3  | 1,99         | 15025           | 2          | 8,1 | 0,72        | 85 607               | 131,15              |
| <b>Tous les sites de cancrs</b> | <b>467 965</b> |            |      | <b>32,65</b> | <b>185 621</b>  |            |     | <b>11,2</b> | <b>1 501 881</b>     | <b>2300,9</b>       |

### 1.1.3. Les métastases des tumeurs solides

#### 1.1.3.1. Définition

Le développement des métastases cancéreuses est un processus de propagation des cellules tumorales d'une masse tumorale primaire, par passage du stroma tumoral vers les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques (Guan X., et al., 2015).

Il s'agit d'une succession complexe d'une série d'événements biologiques cellulaires appelés « la cascade métastatique », cette dernière implique le développement de nouveaux vaisseaux sanguins (Angiogenèse), qui permettent le départ des cellules métastatiques de la tumeur primaire (Détachement et migration), en traversant les membrane basales (MB) entre les vaisseaux et le stroma tumoral. Ensuite il y a l'intravasation des cellules métastatiques dans les vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques suivie de l'adhésion des cellules métastatiques circulantes à l'endothélium des capillaires du site de l'organe cible. Cela permet l'invasion des cellules à travers la couche de cellules endothéliales et la membrane basale environnante dite « extravasation ». Enfin, il y a la fixation et la croissance de tumeurs secondaires au site de l'organe cible (Figure.5) (Daenen LGM., et al., 2011 ; Hu YY., et al., 2012).



**Figure.5. Les étapes de migration de cellules métastatiques du site de l'organe primaire à travers le sang jusqu'à l'adhésion et la prolifération au sein du site distal (Guan X., 2015).**

### 1.1.3.2. Les sites de métastases dans les tumeurs solides

La localisation des métastases pour les cancers dépend en premier lieu du type de cancer et de son stade (Guan X., 2015). Selon Zhuyan et *al.*, les cancers pour lesquels le développement des métastases est le plus fréquent sont : le cancer du sein, du mélanome, du poumon et le cancer colorectal (Tableau. 3).

Ainsi, les métastases sont responsables de la majorité des décès chez les patients atteints de cancer du poumon, du sein, du côlon, du mélanome, de la prostate et du pancréas. Pour le cancer du poumon, les sites métastatiques les plus fréquents sont l'os, le système nerveux central, le foie et la glande surrénale. Cependant, dans le cancer du sein, les métastases se retrouvent souvent dans l'os, les poumons et le foie. Pour le cancer colorectal, les régions ganglionnaires, le foie, les poumons et la cavité péritonéale sont les sites de métastases courants. D'autre part, le mélanome peut se propager aux ganglions lymphatiques, en particulier dans la région du bassin, et au poumon. Quant au cancer de la prostate, il présente une préférence inhabituelle pour les métastases osseuses. Enfin, pour le cancer du pancréas, le foie est le site de métastase le plus fréquent. Ces informations soulignent l'importance de comprendre les mécanismes métastatiques pour améliorer les stratégies de traitement et la survie des patients atteints de ces cancers (Niederhuber J.E., 1993 ; Nichols L., et *al.*, 2012 ; Park H.K., et *al.*, 2022 ; Reintgen

D., et *al.*, 2002 ; Balch C.M., et *al.*, 2001 ; Reintgen D., et *al.*, 1994 ; Leong S.P., et *al.*, 2006 ; Bubendorf L., et *al.*, 2000 ; Butturini G., et *al.*, 2008).

**Tableau.3. Le taux d'incidence des métastases dans les différents types de cancers (Zhuyan et *al.*, 2020)**

| Organe cible   | Le taux d'incidence                         | Organe primaire  |
|----------------|---|--|
| <b>Poumon</b>  | 21-32%<br>18-36%<br>10-15%<br>20-25%        | Le cancer du sein<br>Le mélanome<br>Le cancer colorectal<br>Le sarcome                                   |
| <b>Cerveau</b> | 4-30%<br>23-36%<br>5.8-28%<br>6.5-11%       | Le cancer du sein<br>Le cancer du poumon<br>Le mélanome<br>Le cancer du rein                             |
| <b>Foie</b>    | 50%<br>10-14%<br>35-55%<br>40-90%<br>14-20% | Le cancer du sein<br>Le cancer du poumon<br>Le cancer colorectal<br>Le cancer du pancréas<br>Le mélanome |
| <b>L'os</b>    | 30-60%<br>9-39%<br>68-80%<br>11-17%         | Le cancer du sein<br>Le cancer du poumon<br>Le cancer de la prostate<br>Le mélanome                      |

## 1.2. Le cancer du poumon : données épidémiologiques

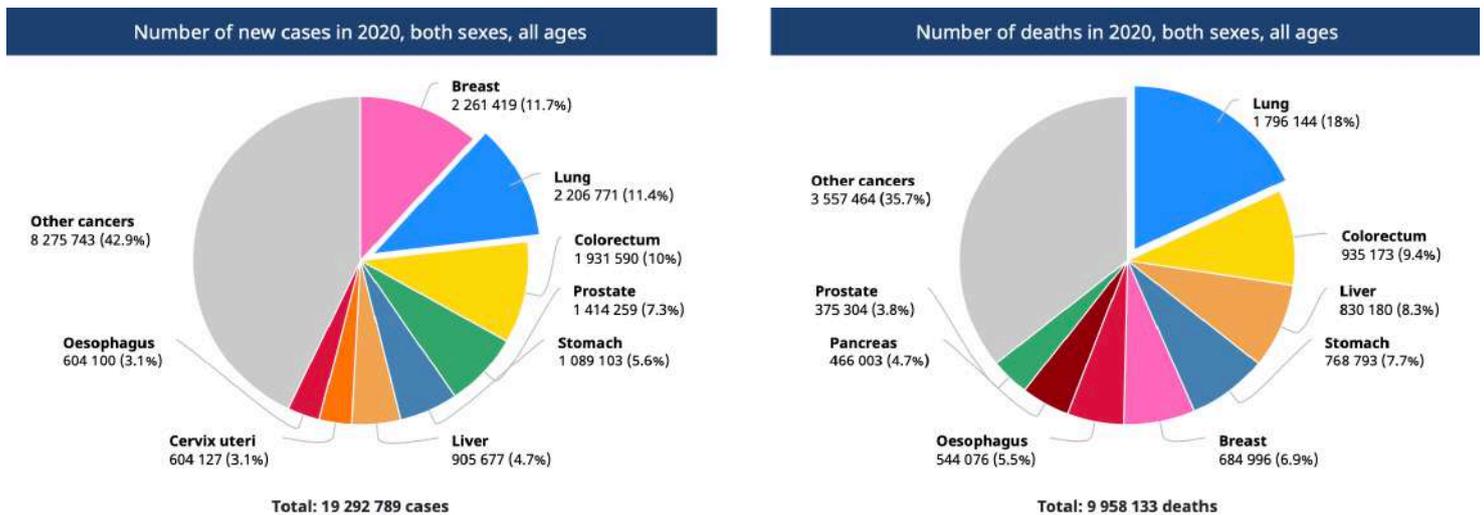
Le cancer du poumon peut être défini, comme étant une transformation maligne de l'épithélium qui tapisse les voies bronchiques : la trachée et les bronches. Il y a deux formes majeures qui sont classifiées selon la taille des cellules ; Le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) et le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) (Herbst R.S., et *al.*, 2008).

### 1.2.1. L'épidémiologie descriptive

Le cancer du poumon est considéré comme le cancer le plus léthal à travers le monde par rapports aux autres types de cancer, cela est dû à la grande consommation du tabac en premier lieu (Duchêne C.C., 2013). Il est la cause principale de décès chez l'homme et la deuxième chez la femme juste après le cancer du sein (Siegel RL., et *al.*, 2018).

Il y a une diversité en termes d'incidence et de mortalité entre les zones géographiques et sexes à cause des différences socioculturelles, le niveau de développement et la consommation du tabac entre les pays (Global Burden of diseases Cancer Collaboration et *al.* 2018).

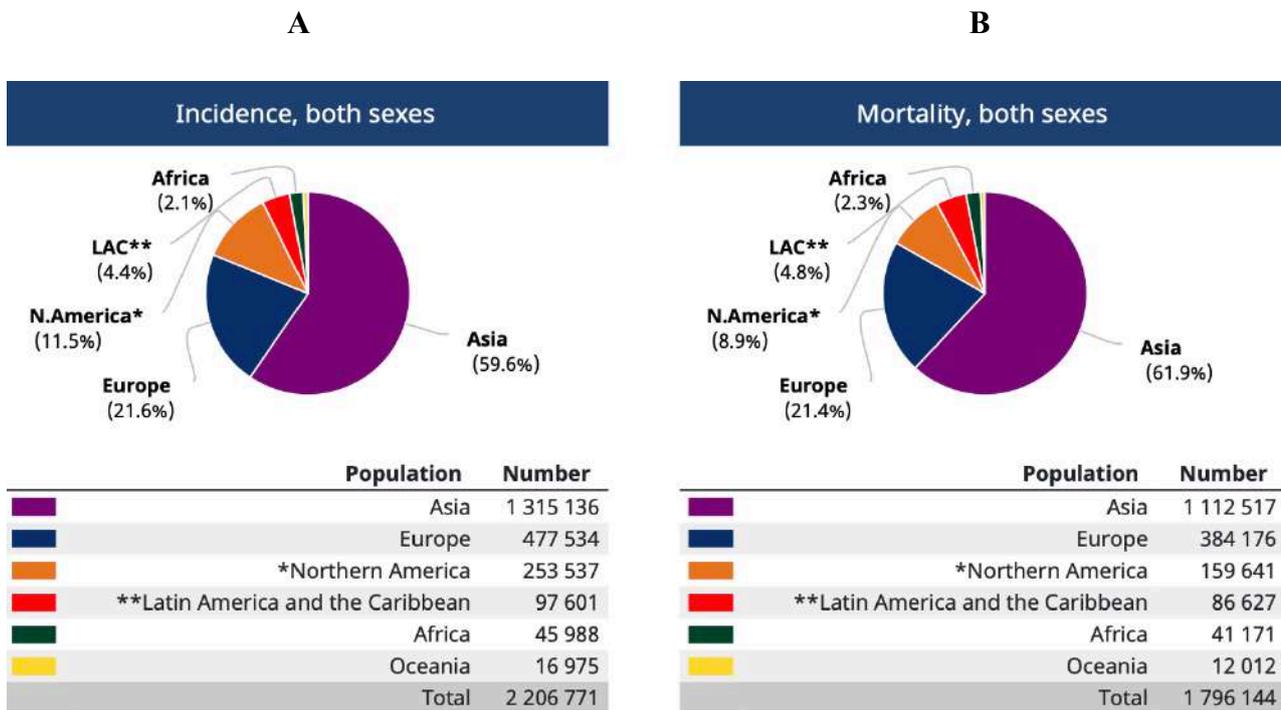
En 2020, selon les données enregistrées par le Centre International de Recherche sur le cancer (CIRC), le nombre de nouveaux cas enregistrés à travers le monde a dépassé la barre des 2 millions pour tous les sexes et âges confondus. De ce fait, le cancer du poumon possède le deuxième taux d'incidence (11,4%) derrière le cancer du sein (11,7%) en nombre de cas totaux de cancer enregistrés durant cette année. Durant la même année, le nombre de patients décédés à cause du cancer du poumon à atteint 1 796 144 cas, ce qui prouve que le cancer du poumon est la cause majeure de mort à travers le monde pour tous les patients diagnostiqués avec un cancer tous âges et les deux sexes combinés, avec un pourcentage de 18% (Figure. 6) (Globocan, 2020).



**Figure.6. Le nombre de nouveaux cas et de décès enregistrés en 2020 pour le cancer du poumon (Globocan, 2020)**

Selon Globocan en 2020, le taux d'incidence le plus élevé est enregistré en Asie, plus de 1 million de nouveaux cas enregistrés ce qui représente plus de la moitié (59,6%) du nombre total des cas de cancer du poumon à travers le monde. Par ailleurs, le continent européen enregistre le deuxième taux d'incidence avec 477 534 cas (21,6%) (Figure. 7A).

Plus que la moitié des décès à cause du cancer du poumon sont enregistrés en Asie : avec 1 112 517 de décès (61,9%). Le second taux de mortalité le plus élevé est enregistré en Europe (21,4%), suivi de l'Amérique du nord (8,9%) (Figure. 7B).



**Figure.7. Le taux d'incidence et de mortalité pour les deux sexes à travers le monde. A : Incidence du cancer du poumon pour les deux sexes dans le monde, B : la mortalité enregistrée pour les deux sexes dans le monde (Globocan,2020)**

D'autre part, chez les hommes les taux d'incidence les plus élevés s'observent en Asie de l'Est, en Amérique du nord et pour finir en Europe de l'Est/Centrale, Par contre chez les femmes, les taux d'incidence s'enregistrent dans les mêmes régions. Une seule différence où l'incidence la plus élevée en Europe pour les femmes est enregistrée en Europe de l'ouest (Tableau. 4) (Globocan, 2020).

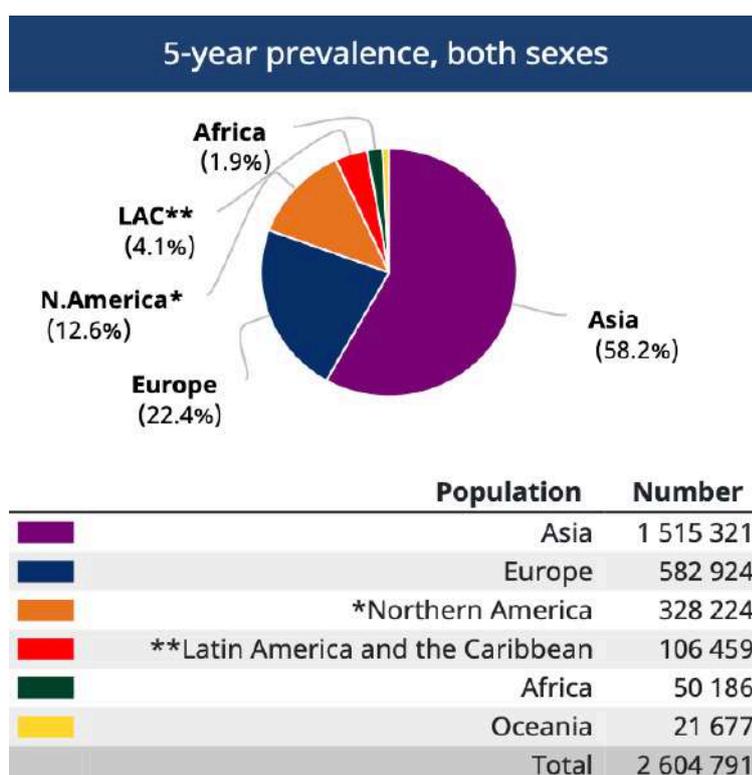
La tendance actuelle de l'incidence chez les hommes est en baisse alors qu'il y a une augmentation de l'incidence chez les femmes dans la plupart des pays (Lortet-Tieulent et al. 2015).

Les variations d'incidence du cancer du poumon entre les différentes régions du monde sont le reflet de l'évolution de l'augmentation de la consommation du tabac en premier lieu suivi des autres facteurs de risques comme la pollution atmosphérique et les agents inhalés (Van der Heyden et al., 2009).

En Asie, la prévalence à 5 ans chez les patients atteints du cancer dépasse 1 million de cas pour les deux sexes (58,2%), suivi de l'Europe (22,4%) et de l'Amérique du nord (12,6%) (Figure. 8) (Globocan, 2020).

**Tableau.4. L'incidence et la mortalité du cancer du poumon à travers le monde source (Globocan 2020)**

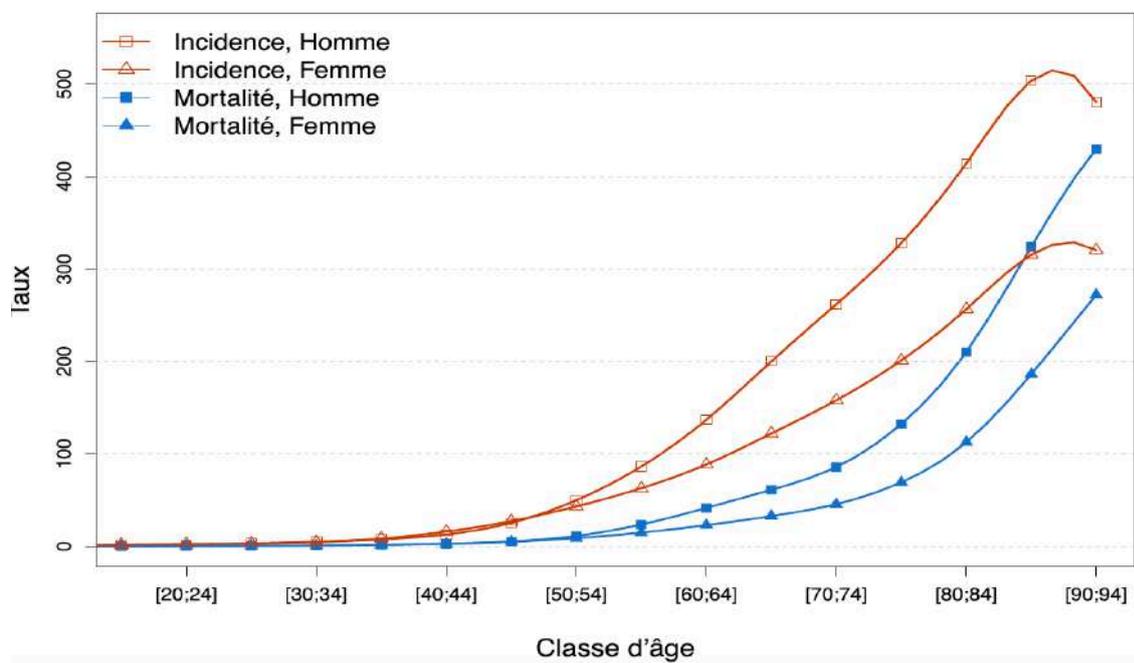
|                            | Incidence  |                    |           |                    |           |                    | Mortality  |                    |           |                    |         |                    |
|----------------------------|------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|------------|--------------------|-----------|--------------------|---------|--------------------|
|                            | Both sexes |                    | Males     |                    | Females   |                    | Both sexes |                    | Males     |                    | Females |                    |
|                            | New cases  | Cum. risk 0-74 (%) | New cases | Cum. risk 0-74 (%) | New cases | Cum. risk 0-74 (%) | Deaths     | Cum. risk 0-74 (%) | Deaths    | Cum. risk 0-74 (%) | Deaths  | Cum. risk 0-74 (%) |
| Eastern Africa             | 7 419      | 0.42               | 3 970     | 0.49               | 3 449     | 0.36               | 6 758      | 0.39               | 3 611     | 0.45               | 3 147   | 0.33               |
| Middle Africa              | 2 037      | 0.29               | 1 270     | 0.41               | 767       | 0.18               | 1 897      | 0.27               | 1 184     | 0.38               | 713     | 0.17               |
| Northern Africa            | 23 179     | 1.32               | 19 310    | 2.29               | 3 869     | 0.40               | 20 728     | 1.19               | 17 295    | 2.06               | 3 433   | 0.36               |
| Southern Africa            | 9 178      | 2.05               | 6 283     | 3.24               | 2 895     | 1.13               | 7 939      | 1.80               | 5 408     | 2.83               | 2 531   | 1.01               |
| Western Africa             | 4 175      | 0.26               | 2 449     | 0.32               | 1 726     | 0.21               | 3 849      | 0.25               | 2 262     | 0.30               | 1 587   | 0.20               |
| Caribbean                  | 11 058     | 2.10               | 6 670     | 2.73               | 4 388     | 1.54               | 10 079     | 1.89               | 6 230     | 2.54               | 3 849   | 1.32               |
| Central America            | 9 934      | 0.61               | 5 798     | 0.79               | 4 136     | 0.46               | 9 236      | 0.56               | 5 499     | 0.74               | 3 737   | 0.41               |
| South America              | 76 609     | 1.64               | 44 878    | 2.12               | 31 731    | 1.23               | 67 312     | 1.42               | 39 106    | 1.80               | 28 206  | 1.08               |
| Northern America           | 253 537    | 3.99               | 129 086   | 4.32               | 124 451   | 3.70               | 159 641    | 2.29               | 83 945    | 2.61               | 75 696  | 1.99               |
| Eastern Asia               | 1 012 021  | 4.14               | 670 827   | 5.66               | 341 194   | 2.65               | 841 174    | 3.38               | 558 235   | 4.67               | 282 939 | 2.12               |
| South-Eastern Asia         | 123 309    | 2.02               | 85 795    | 3.06               | 37 514    | 1.10               | 109 520    | 1.81               | 76 521    | 2.76               | 32 999  | 0.97               |
| South-Central Asia         | 121 369    | 0.80               | 88 130    | 1.17               | 33 239    | 0.42               | 109 356    | 0.72               | 79 920    | 1.06               | 29 436  | 0.37               |
| Western Asia               | 58 437     | 2.93               | 47 146    | 4.99               | 11 291    | 1.01               | 52 467     | 2.71               | 42 542    | 4.69               | 9 925   | 0.87               |
| Central and Eastern Europe | 151 632    | 3.49               | 111 986   | 6.26               | 39 646    | 1.46               | 130 596    | 2.97               | 96 769    | 5.39               | 33 827  | 1.20               |
| Western Europe             | 146 460    | 4.07               | 89 646    | 5.05               | 56 814    | 3.15               | 113 524    | 2.91               | 72 486    | 3.80               | 41 038  | 2.09               |
| Southern Europe            | 104 391    | 3.61               | 74 009    | 5.38               | 30 382    | 2.00               | 85 635     | 2.71               | 61 692    | 4.10               | 23 943  | 1.44               |
| Northern Europe            | 75 051     | 3.63               | 39 413    | 3.96               | 35 638    | 3.33               | 54 421     | 2.39               | 29 072    | 2.67               | 25 349  | 2.13               |
| Australia and New Zealand  | 15 587     | 3.06               | 8 372     | 3.33               | 7 215     | 2.80               | 10 791     | 1.89               | 6 104     | 2.14               | 4 687   | 1.65               |
| Melanesia                  | 918        | 1.63               | 588       | 2.22               | 330       | 1.09               | 798        | 1.41               | 515       | 1.93               | 283     | 0.93               |
| Polynesia                  | 268        | 4.90               | 188       | 6.91               | 80        | 2.87               | 229        | 4.16               | 157       | 5.76               | 72      | 2.56               |
| Micronesia                 | 202        | 4.38               | 129       | 5.96               | 73        | 2.92               | 194        | 4.20               | 126       | 5.86               | 68      | 2.66               |
| Low HDI                    | 16 418     | 0.40               | 9 713     | 0.51               | 6 705     | 0.31               | 15 108     | 0.37               | 8 987     | 0.48               | 6 121   | 0.28               |
| Medium HDI                 | 165 943    | 0.96               | 116 316   | 1.39               | 49 627    | 0.55               | 149 887    | 0.87               | 106 011   | 1.27               | 43 876  | 0.48               |
| High HDI                   | 1 047 707  | 3.21               | 697 411   | 4.51               | 350 296   | 1.99               | 918 661    | 2.81               | 610 626   | 3.95               | 308 035 | 1.74               |
| Very high HDI              | 975 665    | 3.68               | 611 867   | 4.96               | 363 798   | 2.54               | 711 630    | 2.49               | 462 513   | 3.54               | 249 117 | 1.55               |
| World                      | 2 206 771  | 2.74               | 1 435 943 | 3.78               | 770 828   | 1.77               | 1 796 144  | 2.18               | 1 188 679 | 3.08               | 607 465 | 1.34               |



**Figure.8. La prévalence à 5ans chez les patients atteints du cancer du poumon (Globocan,2020)**

Chez les pays industrialisés comme les États-Unis et le Royaume-Uni, l'incidence de la maladie a diminué, par contre chez les pays émergents ou en voie de développement elle ne cesse d'augmenter. L'incidence du cancer du poumon reste stable dans certains pays de l'Europe de l'ouest en particulier la France, ces écarts au niveau de l'incidence du cancer pulmonaire s'expliquent par les différents pics de consommation tabagique (Van der Heyden *et al.*, 2009). En France, lors de l'année 2018 le cancer pulmonaire présentait toujours une incidence élevée avec à peu près 46 363 nouveaux cas par an dont 67% chez l'homme. D'après les données Enregistrées les taux d'incidence standardisées dans le monde (TSM) sont de 50,5 cas pour 100 000 personnes-années chez l'homme contrairement chez la femme qui est de 23,2 cas pour 100 000 personnes-années. Durant la même année, les taux de mortalité (TSM) sont respectivement 34,7% pour l'homme et 14% pour la femme (Defossez G., 2018).

Pour les patients diagnostiqués avec un cancer du poumon, les âges médians lors du diagnostic et au décès sont respectivement entre 67- 69 ans chez l'homme et entre 65-68ans chez la femme. Les taux d'incidence selon la classe d'âge lors de l'année 2018 ont connu une évolution de façon importante à partir de l'âge de 40 ans chez pour les deux sexes (Figure.9), pour ensuite atteindre une valeur maximale de 378,5 pour 100 000 chez l'homme 80-84 ans et de 117 chez la femme entre 60-64ans (Tableaux 5 et 6) (Defossez G., 2018).



**Figure.9. Courbes d'incidence et de mortalité selon la classe d'âge en France métropolitaine en 2018 (Defossez, 2018)**

**Tableau.5. Le nombre de cas et de décès par classe d'âge en France métropolitaine en 2018 (Defossez, 2018)**

| Âge              | [0;14] | [15;19] | [20;24] | [25;29] | [30;34] | [35;39] | [40;44] | [45;49] | [50;54] | [55;59] | [60;64] | [65;69] | [70;74] | [75;79] | [80;84] | [85;89] | [90;94] | [95;+] |
|------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| <b>Incidence</b> |        |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |        |
| Homme            | 18     | 19      | 32      | 58      | 95      | 148     | 258     | 553     | 1 069   | 1 748   | 2 582   | 3 650   | 3 620   | 3 049   | 3 046   | 2 298   | 844     | 129    |
| Femme            | 24     | 33      | 45      | 60      | 91      | 173     | 326     | 607     | 955     | 1 348   | 1 831   | 2 483   | 2 519   | 2 346   | 2 804   | 2 687   | 1 421   | 367    |
| <b>Mortalité</b> |        |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |        |
| Homme            | 0      | 1       | 2       | 7       | 17      | 30      | 52      | 111     | 239     | 476     | 784     | 1 116   | 1 185   | 1 228   | 1 545   | 1 478   | 755     | 183    |
| Femme            | 0      | 1       | 2       | 6       | 15      | 32      | 58      | 111     | 194     | 317     | 473     | 665     | 727     | 808     | 1 229   | 1 584   | 1 207   | 479    |

**Tableau.6. Le taux d'incidence et de mortalité par classe d'âge en France métropolitaine en 2018 (Defossez, 2018)**

| Âge              | [0;14] | [15;19] | [20;24] | [25;29] | [30;34] | [35;39] | [40;44] | [45;49] | [50;54] | [55;59] | [60;64] | [65;69] | [70;74] | [75;79] | [80;84] | [85;89] | [90;94] | [95;+] |
|------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| <b>Incidence</b> |        |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |        |
| Homme            | 0,3    | 0,9     | 1,7     | 3,1     | 4,9     | 7,3     | 12,7    | 25,3    | 49,8    | 86,2    | 136,6   | 199,9   | 261,8   | 327,9   | 414,1   | 503,8   | 480,3   | 335,0  |
| Femme            | 0,4    | 1,7     | 2,5     | 3,2     | 4,5     | 8,3     | 15,8    | 27,3    | 43,1    | 62,8    | 88,5    | 121,8   | 157,8   | 200,9   | 256,4   | 315,5   | 320,3   | 257,5  |
| <b>Mortalité</b> |        |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |        |
| Homme            | 0,0    | 0,0     | 0,1     | 0,4     | 0,9     | 1,5     | 2,6     | 5,1     | 11,1    | 23,5    | 41,5    | 61,1    | 85,7    | 132,1   | 210,0   | 324,0   | 429,7   | 475,2  |
| Femme            | 0,0    | 0,1     | 0,1     | 0,3     | 0,7     | 1,5     | 2,8     | 5,0     | 8,8     | 14,8    | 22,9    | 32,6    | 45,5    | 69,2    | 112,4   | 186,0   | 272,0   | 336,1  |

D'autre part, en France au cours de l'année 2020, le nombre total de nouveaux cas enregistrés pour le cancer du poumon a atteint 48 299, ce qui représente 12,3% du nombre total des cas enregistrés pour tous les types de cancer. Par ailleurs, le nombre des cas enregistrés chez l'homme est de 31 941 (12,3%) et 16 358 chez la femme (7,9%). Le taux d'incidence du cancer du poumon est classé troisième (48 299) après le cancer du sein (58 083) et de la prostate (66 070), avec le taux de mortalité le plus élevé avec 37 095 patients décédés durant l'année 2020 (GLOBOCAN, 2020).

## **1.2.2. L'épidémiologie analytique**

### **1.2.2.1. Les facteurs de risques**

#### **1.2.2.1.1. Le tabagisme**

Le tabac est la principale cause du cancer du poumon avec une relation dose effet (Sanchez et al. 2015). Le tabagisme est à l'origine de l'augmentation des cas diagnostiqués dans le cancer du poumon. De ce fait, le risque d'avoir un cancer pulmonaire lié au tabagisme est estimé entre 80 à 90% des cas incidents quelques soient les formes histologiques (Thiberville et Paris, 2014).

##### **1.2.2.1.1.1. Le tabagisme actif**

Depuis 1950, la consommation du tabac est connue comme étant la cause principale un du cancer du poumon (Doll R. et al., 1952). Lors des deux dernières décennies, les variations de la mortalité du cancer du poumon sont liées à la consommation des cigarettes. Chez les fumeurs le taux de mortalité est lié au nombre moyen de cigarettes fumées, durant les dix dernières années. Ce nombre commence à diminuer chez les hommes et à augmenter de manière régulière chez les femmes (Quoix et Lemarié, 2011).

##### **1.2.2.1.1.2. Le tabagisme passif**

Les personnes qui inhalent involontairement la fumée de tabac subissent une exposition estimée entre 1 à 10% de celle des fumeurs actifs à l'origine de cette exposition. Cette dernière est composée essentiellement de deux courants. Le courant dit secondaire qui constitue 80%, qui est riche en agents carcinogènes, est composé de la fumée émise directement dans l'air par la combustion de la cigarette. Le deuxième courant qui représente 20%, est le courant exhalé par le fumeur après inhalation (Thiberville et Paris, 2004).

L'augmentation du risque du cancer pulmonaire par inhalation passive de la fumée de cigarette est estimée entre 1,17 à 1,44 avec une relation dose-effet qui est basée sur l'exposition tabagique cumulée. Cette relation dose-effet reflète l'augmentation du risque de 20 à 30% chez les conjoints de fumeurs, et serait plus élevée lorsque le conjoint fumeur est une femme (Zhong L., et al., 2000 ; Dockery DW., et al., 1997).

### **1.2.2.1.1.3. Le sevrage tabagique**

En France, lors du diagnostic du cancer du poumon 40,3% des patients sont des ex-fumeurs et 52,5% des fumeurs actifs (Axelson, 1991). En revanche, l'arrêt de la consommation du tabac engendre une diminution du risque, avec une diminution de la mortalité qui passe de 128/100 000 pour les fumeurs actifs à 67/100 000 pour les ex-fumeurs sevrés depuis moins de 5ans. D'autre part, elle passe de 49/100 000 pour les ex-fumeurs sevrés depuis 5 à 9 ans, de 18/100 000 pour les ex-fumeurs de plus de 10ans (Thiberville et Paris, 2004).

Enfin, le sevrage tabagique joue un rôle majeur dans la diminution des risques de cancer, selon les dernières études épidémiologiques qui démontrèrent une réduction de 40 à 90% de risque de cancers pulmonaires dans les dix ans après l'arrêt du tabac (Peiffer., et al., 2013).

### **1.2.2.1.2. Les expositions professionnelles**

Les facteurs professionnels représentent la deuxième cause du cancer du poumon. Le risque dû à l'ensemble des expositions professionnelles a été estimé à 9,2% aux États-Unis (Morabia A., et al., 1992) et 25% en Europe (Jockel KH., et al., 1997 ; Chatzis C., et al., 1999).

Plusieurs expositions professionnelles ont été associées au risque de contracter le cancer du poumon (Pairol JC., et al., 1996). Parmi ces expositions il y a : le radon, l'amiante la silice, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et certains métaux qui sont les plus fréquemment impliqués (Thiberville et al., 2004).

#### **1.2.2.1.2.1. Le radon**

Le premier lien avec le cancer du poumon a été démontré chez les mineurs extrayant l'uranium, qui sont exposés à forte concentrations de radon. Le risque de cancer du poumon augmente d'une façon linéaire avec une forte exposition au radon. Cet effet reste le même chez les mineurs fumeurs ou non-fumeurs quel que soit le sexe (Quoix et Lemarié., 2011).

Le radon constitue la première source carcinogène domestique, il remonte du sol à travers les murs des habitations particulièrement ceux à base de granite (Simpson SG., et al., 1983).

#### **1.2.2.1.2.2. L'amiante**

L'amiante est une fibre naturelle utilisée dans l'industrie sous ces diverses variétés. Son pouvoir cancérigène est corrélé à l'intensité d'exposition. Elle représente le risque professionnel le plus récurrent. Le mécanisme d'action des fibres d'amiante qui favorisent le cancer du poumon n'est pas bien connu. L'amiante pourrait intervenir directement ou indirectement par l'intermédiaire de l'inflammation bronchique (Moreau., 2006 ; Quoix et Lemarié., 2011).

Des études récentes estiment que le pourcentage attribué aux personnes atteintes d'un cancer du poumon à cause de l'amiante est compris entre 10 et 20% (Imbrnon et *al.*, 2004).

#### **1.2.2.1.2.3. La silice**

La silice cristalline a été identifiée comme étant un agent cancérigène pour l'homme, le risque d'exposition est élevé durant le travail (dans les carrières de pierre, en fonderie, dans l'industries de la pierre et du verre). Cette association entre silicose et cancer du poumon est actuellement admise, avec un risque relatif (RR) variant de 1,3 à 7 selon les études épidémiologiques (Steenland K., et *al.*, 2001).

#### **1.2.2.1.2.4. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Les HAP représentent la troisième catégorie d'exposition professionnelle à des cancérigènes bronchiques. Ils existent plusieurs types de professions comportant une exposition aux HAP, tels que : la production d'aluminium par électrolyse, le travail en fonderie, la manipulation de bitumes. Ces activités professionnelles sont associées à un risque de cancer du poumon avec un odds ratio (OR) de 2. Un autre type de risque avec un OR élevé (1,33) est lié à la fumée de diesel inhalés par les chauffeurs de poids lourds et par les cheminots (Bhatia R, et *al.*, 1998).

#### **1.2.2.1.2.5. Les métaux**

Des études ont démontré de nombreux de décès par le cancer du poumon lié à l'exposition à certains composés métalliques comme l'arsenic, le béryllium, le nickel, le cadmium ou le chrome. Les OR associés à ces expositions varient ente 1,49 et 3,69. Ces expositions sont

généralement rencontrées dans la métallurgie et en particulier dans les fonderies ou bien dans les travaux liés aux soudures (Paris C., 2002).

### **1.2.2.1.3. Les autres facteurs**

#### **1.2.2.1.3.1. La pollution atmosphérique**

A l'heure actuelle, il n'existe pas une réponse claire concernant la relation de la pollution atmosphérique et le cancer du poumon. La difficulté réside dans le fait de pouvoir évaluer les expositions environnementales sur des longues périodes. D'autre part, l'effet des autres facteurs de confusion tels que le tabagisme ou les facteurs professionnels. De ce fait, il y a une faiblesse de l'estimation des niveaux de risques (Thiberville., et *al.* 2004).

Une étude réalisée au États-Unis dans six villes, a montré que le risque ajusté de mortalité par cancer pulmonaire représente un risque multiplié par 1,4 dans les villes les plus polluées (Quoix et Lemarié., 2011).

#### **1.2.2.1.3.2. Les pathogènes pulmonaires préexistants**

Ils existent plusieurs maladies respiratoires qui peuvent être associées à un risque de contracter un cancer pulmonaire. Parmi ces maladies il y a la broncho-pneumopathie chronique obstructive. Les fumeurs atteints par cette pathologie seront plus susceptibles de développer un cancer du poumon. Les maladies fibrosantes et les cicatrices pulmonaires sont aussi des facteurs de risque qui permettent le développement d'un cancer bronchique (Moreau et *al.*, 2006 et Denotte, et *al.*, 2009).

#### **1.2.2.1.3.3. Les susceptibilités génétiques**

Les principaux facteurs qui favorisent l'apparition du cancer du poumon sont environnementaux. Cependant, il existe des facteurs génétiques qui peuvent influencer la prédisposition au cancer. Les causes de ces différences individuelles restent inconnues pour le moment, mais il existe différentes hypothèses qui suggèrent l'implication des gènes qui codent pour le métabolisme des agents cancérigènes. La réparation de l'ADN et la transduction du signal à partir des récepteurs membranaires favorisent le développement du cancer (Denotte., et *al.*, 2009).

## 2. Les classifications du cancer du poumon

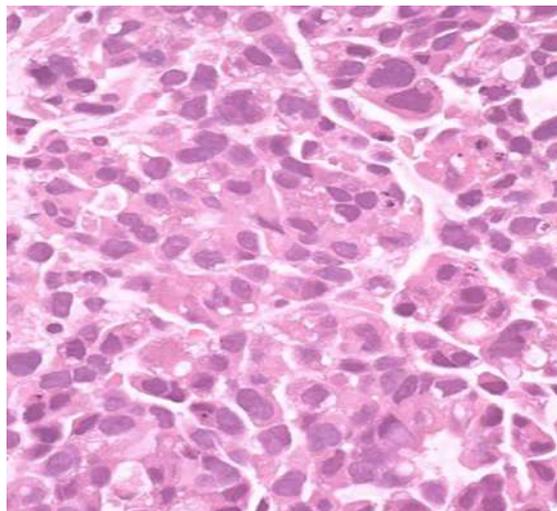
### 2.1. La classification anatomopathologique

Le cancer du poumon est divisé en deux grands types selon l'histologie et le comportement biologique des cellules, il s'agit du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), qui représente environ 80% des cas de cancer du poumon, tandis que le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) représente environ 20% des cas (Travis WD., et *al.*, 2004 et 2015).

#### 2.1.1. Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC)

Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) est une tumeur maligne qui se développe à partir des cellules qui tapissent la paroi des bronches, des bronchites et des alvéoles (Figure. 10).

Il est le type de cancer du poumon le plus diagnostiqué chaque année avec un pourcentage qui varie entre 80 à 85%. Le CPNPC a un mauvais pronostic, avec un taux de survie à 5 ans de la maladie qui est en dessous de 20% pour tous les stades confondus. Il est subdivisé en trois sous types : les adénocarcinomes (40%), les carcinomes épidermoïdes (30%) et les carcinomes à grandes cellules (10 à 15%) (Pêgo-Fernandes., 2021 et Moreau, 2006 ; et Cancer.gov, 2007).



**Figure.10. Le cancer de poumon non à petites cellules, Grandissement : x 200 (Galli G., et Rossi G., 2020).**

### **2.1.1.1. Les adénocarcinomes**

Les adénocarcinomes représentent le type le plus fréquent du cancer du poumon, ils constituent plus de 40% des cancers du poumon, 60% des cancer du poumon à non petites cellules et plus 70% des cas nécessitant une résection chirurgicale (Lewis DR., et *al.*, 2014 ; Travis WD., et *al.*, 2015).

Les adénocarcinomes sont des néoplasmes épithéliaux malins qui sont composés de cellules tumorales de grande taille, ils sont caractérisés par une différenciation glandulaire ou bien une sécrétion de mucine (Lantuejoul et *al.*, 2016).

Les cellules de l'adénocarcinome expriment des marqueurs pneumocytaires tels que : le facteur 1 de la transcription de la thyroïde (Thyroid Transcription Factor-1 ou bien TTF-1) et la Napsine, qui sont exprimés dans plus de 85% des cas de cancer du poumon. Cette expression pourrait servir pour l'identification des adénocarcinomes dans les tumeurs non différenciées ainsi que pour l'analyse de biopsies de taille minimale (Mukhopadhyay S., et *al.*, 2011 ; Tacha D., et *al.*, 2012).

Selon la nouvelle classification de l'OMS, les adénocarcinomes sont classés en trois entités différentes : les lésions pré-invasives, les adénocarcinomes à invasion minimale et les adénocarcinomes invasifs.

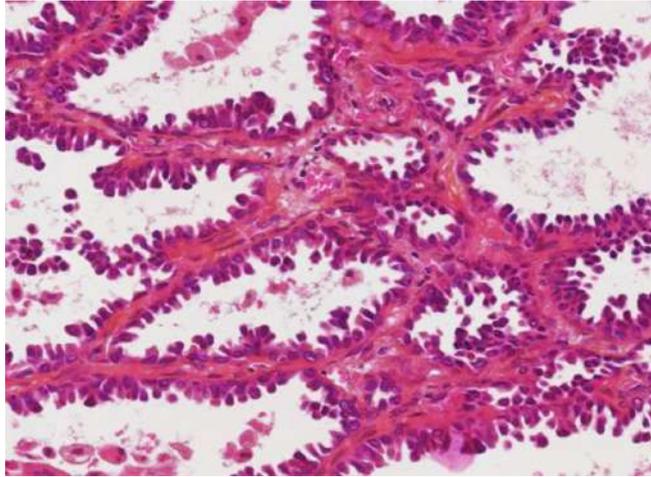
#### **2.1.1.1.1. Lésion pré-invasives**

Selon la nouvelle classification qui reconnaît l'adénocarcinome *in situ* (AIS) comme une lésion pré-invasive venant s'ajouter à l'hyperplasie adénomateuse atypique (HAA).

L'HAA est une lésion de petite taille (en général < 0,5 cm) constituée de pneumocytes bordant les parois alvéolaires. Dans cette lésion, les pneumocytes peuvent être séparés par un espace intercellulaire. Cet espace est occupé par des cellules rondes, basses ou cuboïdales, présentant un noyau rond. Ces cellules peuvent également présenter une inclusion intranucléaire.

L'AIS préalablement dénommé « Carcinomes bronchiolo-alvéolaire », est une lésion isolée de petite taille (< 3 cm) avec des cellules néoplasiques qui se développent tout au long de la structure alvéolaire préexistante déterminant ainsi une architecture purement lépidoïde. Il n'y a aucune trace d'invasion stromale, vasculaire ou pleurale (Jones KD., 2013).

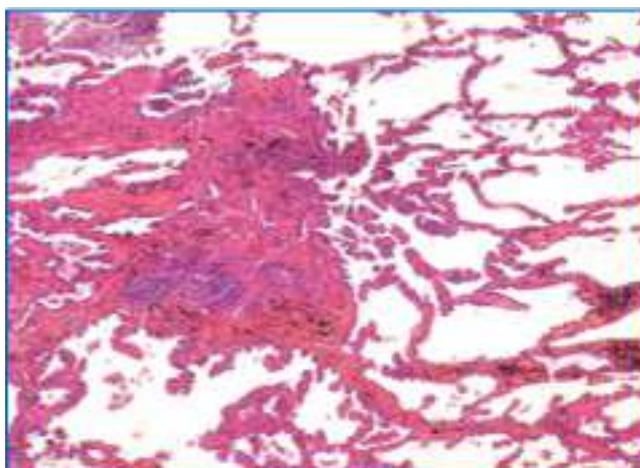
Il y a des AIS mucineux et non mucineux (Figure. 11) . La majeure partie sont de type non mucineux (Weingartner N., et Chenard M-P., 2015).



**Figure.11. Les adénocarcinomes *in situ* (Hématoxyline éosine safran [HES] ; Grandissement original  $\times 200$ ) (Lantuéjoul et al., 2016).**

#### **2.1.1.1.2. Les adénocarcinomes avec invasion minime (AIM)**

L'AIM qui est devenue à son tour une nouvelle entité, peut être définie comme étant une lésion de petite taille ( $< 3$  cm), avec une architecture lépidique prédominante et la présence d'une zone invasive qui est généralement moins de 5 mm (Figure. 12). En générale, les AIM sont de type non mucineux et très rarement mucineux. Concernant la composante invasive, elle se définit par la présence d'architectures autres que lépidique (acineuse, papillaire, micro-papillaire ou solide) ou bien par l'infiltration de cellules tumorales au sein du stroma myofibroblastique (Weingertner N., et Chenard M-P., 2015).

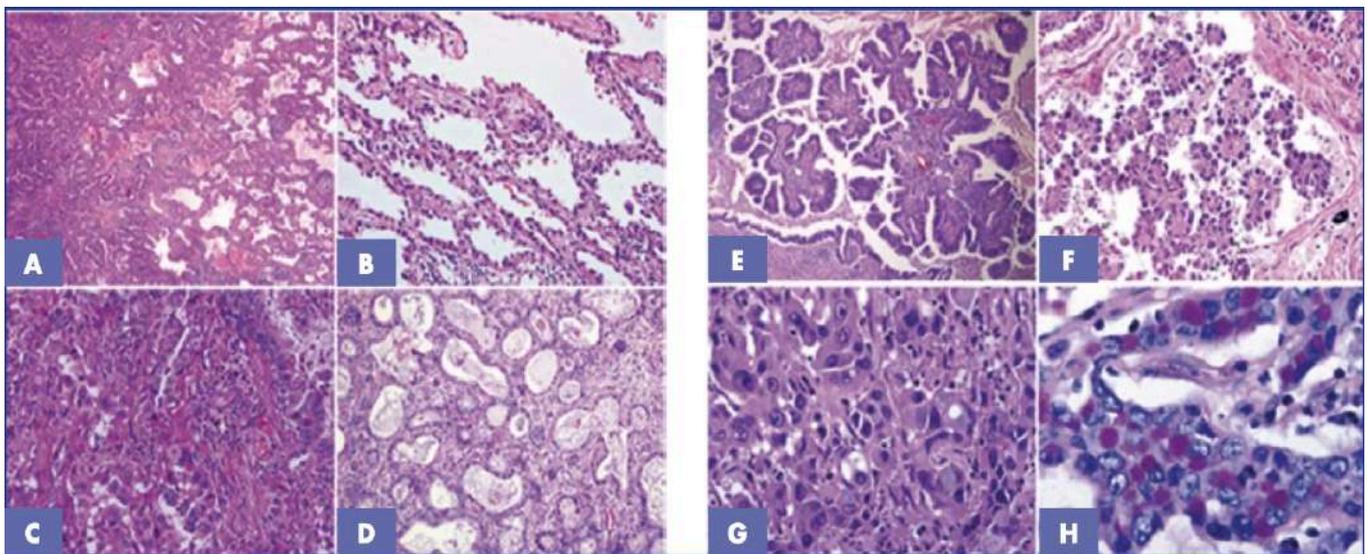


**Figure.12. Les adénocarcinomes avec invasion minime (Hématoxyline éosine safran [HES] (Lantuéjoul et al., 2011).**

### 2.1.1.1.3. Les adénocarcinomes invasifs

Les adénocarcinomes invasifs sont majoritairement composés d'un mélange de plusieurs types histologiques, qui sont caractérisés par des structures tumorales différentes. Selon l'OMS entre 1999 à 2004, la majorité des adénocarcinomes invasifs étaient classés comme des adénocarcinomes de type mixte. Cependant, ce terme qui regroupe la globalité des sous types d'adénocarcinomes en un seul type n'est plus utilisé selon la nouvelle classification. Ils sont aujourd'hui classés selon les structures architecturales prédominantes dans la tumeur. De ce fait, chaque tumeur est classée selon le sous-type architectural le plus dominant. Plusieurs sous types d'adénocarcinome sont distingués : lépidique, acineux, papillaire, micro-papillaire et solide (Weingartner N. et Chenard M-P., 2015) (Figure.13). Chaque sous type supplémentaire est enregistré de manière semi-quantitative sous forme de pourcentage qui est estimé par 5% du volume tumoral (Travis WD, 2011 et 2004).

Cette évaluation semi-quantitative encourage les pathologistes à identifier l'ensemble des types architecturaux présents et à évaluer le degré d'hétérogénéité d'une tumeur ainsi que la présence de types architecturaux ayant un impact pronostique favorable comme les adénocarcinomes lépidique ou bien défavorable comme adénocarcinomes solides et micro-papillaires (Yoshizawa A., et *al.*, 2011 ; Yanagawa et *al.*, 2013 ; Woo T., 2012).

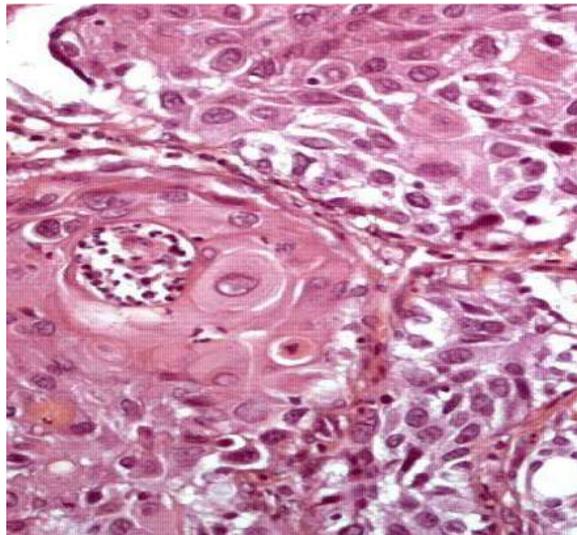


**Figure.13. Les principaux sous types des adénocarcinomes invasifs A) Prédominant lépidique (droite) et zone acinaire (gauche) B) Forme lépidique. C) et D) Acineux, glandes malignes ovales, rondes et invasion du stroma. E) Papillaire cellules tumorales avec axe F) Micropapillaire : micro-papilles sans axe vasculaire. G) Solide : grandes cellules tumorales à cytoplasme abondant, noyaux vésiculeux avec nucléoles, sans composante acineuse, papillaire, ou lépidique. H) Solide avec vacuoles de mucine (Cucherousset J., et Cucherousset N., 2014).**

### 2.1.1.2. Les carcinomes épidermoïdes (CE)

Les carcinomes épidermoïdes du poumon représentent environ 20 à 30% des cancers du poumon, mais leur incidence a diminué durant ces dernières décennies (Lewis et *al.*, 2014). Le CE est une tumeur épithéliale maligne avec la présence de cellules kératinisées et/ou la présence de ponts intercellulaires (Figure. 14). Il se développe à partir de l'épithélium bronchique et la plupart du temps est invasif au moment du diagnostic. Il survient généralement dans la partie centrale du poumon, le long des principales voies respiratoires. Il peut alors former des cavités lorsqu'il atteint une taille importante. Au cours des examens immuno-histochimiques, l'expression des marqueurs de différenciation squameuse comme la cytokératine 5 et 6 ainsi que l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) sont retrouvés (Vignaud., 2016).

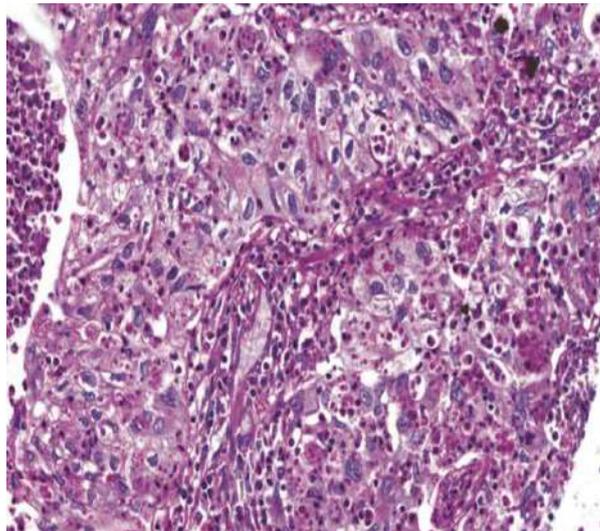
Le CE est divisés en sous types kératinisant ou non kératinisant et basaloïdes, contrairement aux sous types d'adénocarcinomes. Une telle sous classification n'a aucune utilité pronostique apparente à l'exception des carcinomes basaloïdes. Ces derniers présentent un profil moléculaire distinct conférant une résistance intrinsèque à la chimiothérapie cytotoxique (Brambilla C., 2014).



**Figure.14. Les carcinomes épidermoïdes (DES pneumologie, 2018)**

### 2.1.1.3. Les carcinomes à grandes cellules

Les carcinomes à grandes cellules représentent moins de 3% des cancers du poumon. Ils représentent une minorité de cas du CPNPC. Les carcinomes à grandes cellules sont dépourvus de différenciation spécifique de type malpighienne ou glandulaire. Ils sont caractérisés par des tumeurs périphériques, volumineuses solides et d'apparence nécrotique. Les cellules tumorales sont de grande taille et de forme polygonale avec des noyaux pléomorphes et vésiculaires (Figure. 15) (Lewis DR., et al., 2014 et Brambilla C., et al., 2014).



**Figure.15. Les carcinomes à grandes cellules (DES pneumologie, 2018)**

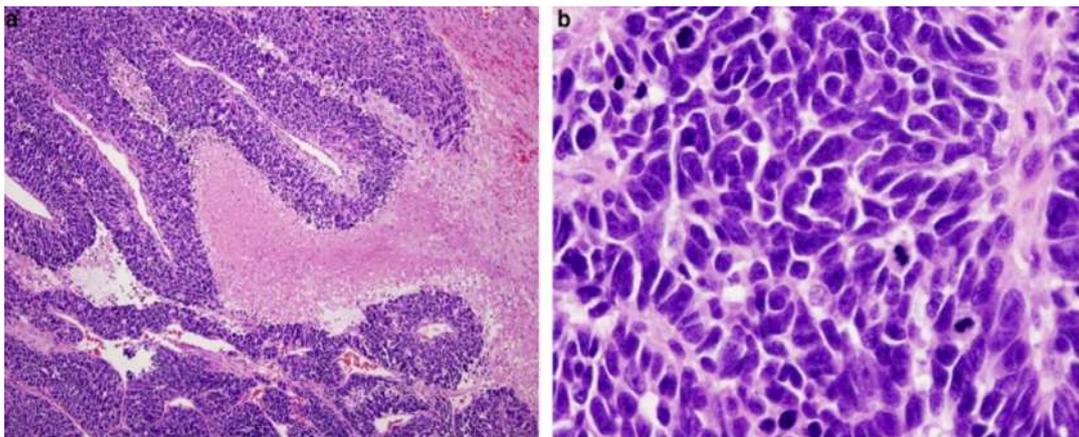
### 2.1.2. Le cancer du poumon à petites cellules (CPPC)

Le cancer du poumon à petites cellules représente 10 à 20% de tous les cas de cancer du poumon. Le CPPC est une tumeur maligne très agressive d'origine neuroendocrinienne. Les cellules tumorales sont de petite taille par rapport aux autres types de cancers du poumon. Elles sont généralement inférieures au diamètre de 3 lymphocytes matures (Figure .16) (Zheng M, 2016 et Lewis DR., et al., 2014).

La chromatine est finement granuleuse sans nucléoles proéminents, avec un cytoplasme peu abondant. Le CPPC possède une activité mitotique élevé, il est généralement de l'ordre de 10 mitoses par 2 mm<sup>2</sup> (Hanahan D et Weinberg R., 2000). Le CPPC est généralement situé au centre de la voie aérienne principale et il possède un taux d'apoptose élevé avec la présence d'une nécrose tumorale étendue (Zheng M., 2016).

La majorité des patients ont des antécédents de tabagisme et présentent des maladies métastatiques. Chez la plupart des patients, il y a une rechute lors des 2 premières années suivant le traitement, avec un taux de survie à 2 ans inférieur à 10 % chez les patients métastatiques (Planchard D., et *al.*, 2011).

Le CPPC possède un pouvoir métastatique très important, par voie lymphatique et sanguine, ce qui rend inutile toute approche thérapeutique chirurgicale. Cependant, il reste très sensible à la chimiothérapie et la radiothérapie (Chater., 2014).



**Figure.16. Le cancer du poumon à petites cellules(a) la tumeur se compose de feuilles diffuses de petites cellules malignes. Une nécrose extensive est présente. (b) La tumeur se compose de feuilles denses de petites cellules avec un cytoplasme mince, une chromatine nucléaire finement granulaire, des mitoses fréquentes et des nucléoles peu visibles ou absents (Travis W. 2011).**

## 2.2. La classification TNM

La classification TNM (T : Pour tumeur primitive ; N : pour Nœud (Ganglion) ; M : pour métastases) est basée sur la catégorisation des tumeurs selon les caractéristiques de la tumeur primitive, des zones d'invasion ganglionnaire loco-régionale et de l'extension à distance. Celle-ci a été proposée par le médecin français Mr Denoix (Denoix PF., 1959), mais elle n'a pas été prise en compte en termes de classification officielle en 1968 par le comité de nomenclature et de statistiques de « l'Union Internationale Contre le Cancer » (UICC), avec la 1<sup>er</sup> édition du manuel de classification TNM des tumeurs malignes (UICC, 1968). Au cours des années 1970, « l'American Joint Committee on Cancer » (AJCC) et l'UICC ont collaborés ensemble pour établir le même système de classification des cancers pulmonaires. Ainsi à la sortie de la 2<sup>ème</sup> édition de l'AJCC a été proposé une classification internationale du cancer du poumon basée sur une base de données bi-centrique. Il faut attendre les année 2000 pour avoir de

nouveaux changements qui vont intégrer la classification internationale pour la 6<sup>ème</sup> édition publiée en 2002 (Moutain, 1997).

En 2009, l'UICC et l'AJCC ont adopté les travaux de « l'International Association for the Study of lung Cancer » (IASLC) pour créer le comité IASLC staging project, ce comité a été chargé de mener une étude plus élaborée avec une rétrospective multicentrique internationale. Cette étude statistique a permis de séparer les différents stades et d'apporter une vraie avancée à la classification TNM (Goldstraw P., et *al.*, 2007).

Finalement en 2017, selon la même optique l'IASLC a suggéré des nouveaux changements qui sont à la base de la classification TNM de la 8<sup>ème</sup> édition qui est actuellement reconnue et suivie jusqu'à aujourd'hui (Rami-Porta R., et *al.*, 2014 ; Goldstraw P., et *al.*, 2016).

### **2.2.1. Les descripteurs T**

Selon la nouvelle classification (8<sup>e</sup> édition), l'évaluation basée sur la taille de la tumeur reste la même, avec quelques changements comparés à la 7<sup>e</sup> éditions illustrées sur le tableau (7) (Berghmans T., et *al.*, 2020).

Les majeures modifications concernent :

- Le T1 qui est a, b, c selon que la taille de la tumeur allant respectivement de 1cm, 2cm et 3cm.
- Les tumeurs dont la taille est comprise entre 5 et 7 cm sont maintenant classées T3 (T2b pour la 7<sup>e</sup> édition).
- Les tumeurs de plus de 7cm sont classées T4 au lieu de T3.

**Tableau.7. Les modifications apportées au descripteur T dans la 8<sup>ème</sup> classification TNM (Berghmans T., et al., 2020).**

| Taille              |  |
|---------------------|--|
| T1                  | T1a : $\leq 1$ cm<br>T1b : $> 1$ cm – $\leq 2$ cm<br>T1c : $> 2$ cm – $\leq 3$ cm                      |
| T2                  | T2a : $> 3$ cm – $\leq 4$ cm<br>T2b : $> 4$ cm – $\leq 5$ cm   |
| T3                  | T3 : $> 5$ cm – $\leq 7$ cm  |
| T4                  | T4 : $> 7$ cm  |
| Autres descripteurs |  |
| T2 :                | Envahissement bronche principale, peu importe distance à la caréna mais sans invasion de celle-ci      |
| T2                  | Atélectasie partielle ou totale d'un lobe ou du poumon   |
| T4                  | Envahissement du diaphragme<br><br>Suppression de l'invasion pleurale médiastinale comme descripteur T |

### 2.2.2. Les descripteurs N

Selon la nouvelle classification reconnue par l'IASLC, la classification de l'extension ganglionnaire locorégionale reste inchangée (Tableau. 8) (Asamura H, et al., 2015).

L'IASLC recommande la répartition des 14 niveaux ganglionnaires en 7 zones distinctes : supraclaviculaire, médiastinale supérieure, aorto-pulmonaire, sous-carénaire, médiastinale inférieure, hilare/interlobaire et périphérique (Rusch VW, et al., 2009).

**Tableau.8. La classification selon la 8<sup>ème</sup> édition du descripteur N (Berghmans T., et al., 2020).**

| Descripteur N |   |
|---------------|---|
| Nx            | Les ganglions régionaux ne peuvent être évalués   |
| N0            | Pas de métastase ganglionnaire régionale  |
| N1            | Envahissement de ganglion ipsilatéral péribronchique et/ou hilare et ganglion intrapulmonaire, incluant un envahissement direct de contiguïté |
| N2            | Envahissement de ganglion médiastinal ipsilatéral et/ou sous-carénaire  |
| N3            | Envahissement ganglion médiastinal ou hilare controlatéral, scalène ou sus-claviculaire   |

### 2.2.3. Les descripteurs M

Selon l'IASLC, les modifications apportées par la nouvelle classification touchent essentiellement le stade M1b qui a été divisé en deux groupes de pronostics distincts (Tableau 9) :

- M1b qui consiste en une métastase unique dans un seul organe
- M1c regroupant les tumeurs avec métastases multiples dans un seul organe ou une atteinte métastatique de plusieurs organes.

Par contre le groupe M1a a conservé les mêmes caractéristiques de la classification précédente avec une atteinte pleurale ou péricardique métastatique diffuse (Eberhardt WEE, et *al.*, 2015).

**Tableau.9. La classification selon la 8<sup>ème</sup> édition du descripteur M (Berghmans T., et *al.*, 2020).**

| Descripteur M |   |
|---------------|---|
| M0            | Pas de métastase à distance   |
| M1a           | Métastase dans le poumon controlatéral, envahissement pleural ou péricardique (épanchement malin ou nodule) |
| M1b           | Métastase extrathoracique unique  |
| M1c           | Multiplés métastases extrathoraciques dans un ou plusieurs organes  |

### 2.2.4. Le regroupement des descripteurs par stade

La nouvelle classification TNM, a permis le regroupement des descripteurs T, N et M en différents stades de pronostics équivalents (Tableau. 10).

Les modifications majeures qui ont été introduites pour la répartition des stades (Tableau. 11) (Goldstraw P., et *al.*, 2016) :

- Le stade IA est réparti en 3 entités en fonction de la plus grande dimension de la tumeur primaire (IA1, IA2 et IA3).
- Un nouveau stade IIIC qui a fait son apparition (Tumeurs T3 ou T4, N3).
- Le stade IV est subdivisé en IVA et IVB cela dépendant de l'existence ou pas de plusieurs métastases extra thoraciques.

**Tableau.10. Le résumé des descripteurs T, N et M pour le cancer du poumon (Berghmans T., et al., 2020)**

| Descripteur |  |
|-------------|--|
| <b>T</b>    |  |
| Tx          | La tumeur primaire ne peut pas être évaluée OU tumeur prouvée par la présence de cellules néoplasiques dans les expectorations ou le lavage bronchique mais non visualisée par imagerie ou bronchoscopie   |
| T0          | Pas d'évidence de la tumeur primaire   |
| Tis         | Carcinome <i>in situ</i>   |
| T1          | Tumeur ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension entourée par du parenchyme pulmonaire ou de la plèvre viscérale sans invasion endoscopique proximale au-delà de la bronche lobaire <ul style="list-style-type: none"> <li>- T1a(mi) Adénocarcinome minimalement invasif</li> <li>- T1a Tumeur ≤1 cm dans sa plus grande dimension</li> <li>- T1b Tumeur &gt; 1 cm mais ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension</li> <li>- T1c Tumeur &gt; 2 cm mais ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension</li> </ul>   |
| T2          | Tumeur > 3 cm mais ≤ 5 cm ou tumeur avec au moins un des descripteurs suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Envahissement de la bronche principale quelle que soit la distance à la caréna mais sans l'envahir</li> <li>- Envahissement de la plèvre viscérale</li> <li>- Atélectasie ou pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare, impactant tout ou partie du poumon</li> <li>- T2a Tumeur &gt; 3 cm mais ≤ 4 cm dans sa plus grande dimension</li> <li>- T2b Tumeur &gt; 4 cm mais ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension</li> </ul> |
| T3          | Tumeur > 5 cm mais ≤ 7 cm dans sa plus grande dimension OU présence de nodules tumoraux séparés dans le même lobe que la tumeur primaire OU envahissement direct d'une des structures suivantes : paroi thoracique (incluant la plèvre pariétale et les tumeurs du sommet), nerf phrénique, péricarde pariétal   |
| T4          | Tumeur > 7 cm dans sa plus grande dimension OU présence de nodules tumoraux séparés dans un lobe ipsilatéral différent de la tumeur primaire OU envahissement d'une des structures suivantes : diaphragme, médiastin, coeur, gros vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, oesophage, corps vertébral, caréna   |
| <b>N</b>    |  |
| Nx          | Les ganglions régionaux ne peuvent être évalués  |
| N0          | Pas de métastase ganglionnaire régionale   |
| N1          | Envahissement de ganglion ipsilatéral péribronchique et/ou hilare et ganglion intrapulmonaire, incluant un envahissement direct de contiguïté  |
| N2          | Envahissement de ganglion médiastinal ipsilatéral et/ou sous-carénaire   |
| N3          | Envahissement ganglion médiastinal ou hilare controlatéral, scalène ou sus-claviculaire  |
| <b>M</b>    |  |
| M0          | Pas de métastase à distance  |
| M1a         | Métastase dans le poumon controlatéral, envahissement pleural ou péricardique (épanchement malin ou nodule)  |
| M1b         | Métastase extrathoracique unique   |
| M1c         | Multiplés métastases extrathoraciques dans un ou plusieurs organes   |

**Tableau.11. La répartition par stade selon la 8e classification TNM pour le cancer du poumon (Berghmans T., et al., 2020)**

| Stade          | T       | N      | M   |
|----------------|---------|--------|-----|
| Cancer occulte | Tx      | 0      | 0   |
| 0              | Tis     | 0      | 0   |
| IA1            | T1a(mi) | 0      | 0   |
|                | T1a     | 0      | 0   |
| IA2            | T1b     | 0      | 0   |
| IA3            | T1c     | 0      | 0   |
| IB             | T2a     | 0      | 0   |
| IIA            | T2b     | 0      | 0   |
| IIB            | T1a-c   | 1      | 0   |
|                | T2a     | 1      | 0   |
|                | T2b     | 1      | 0   |
|                | T3      | 0      | 0   |
| IIIA           | T1a-c   | 2      | 0   |
|                | T2a-b   | 2      | 0   |
|                | T3      | 1      | 0   |
|                | T4      | 0      | 0   |
|                | T4      | 1      | 0   |
| IIIB           | T1a-c   | 3      | 0   |
|                | T2a-b   | 3      | 0   |
|                | T3      | 2      | 0   |
|                | T4      | 2      | 0   |
| IIIC           | T3      | 3      | 0   |
|                | T4      | 3      | 0   |
| IVA            | Tout T  | Tout N | M1a |
|                | Tout T  | Tout N | M1b |
| IVB            | Tout T  | Tout N | M1c |

### 3. Les traitements

#### 3.1. Description

L'évolution du cancer du poumon est différente d'un patient à un autre. Ainsi le traitement établi pour chaque patient est personnalisé et ils sont appelés un « schéma thérapeutique ». Le choix du traitement dépend du stade, de la taille et de l'agressivité de la tumeur (Kim J., et al., 2022 et Wissler., et al., 2012).

Au cours des années 1960 et 1970, la chirurgie et la chimiothérapie cytotoxique ont été introduites pour le traitement du CPNPC, améliorant pour la première fois le pronostic de survie pour les patients atteints de cancers du poumon. Par ailleurs, c'est au début des années 2010, qu'il y a eu l'utilisation en première ligne des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) tels que,

ITK ALK et ITK EGFR qui ciblent les récepteurs des facteurs de croissance en stoppant la prolifération des cellules cancéreuses. Enfin durant les cinq dernières années, l'immunothérapie est rentrée en scène avec l'utilisation d'anticorps anti PD-L1 tels que le pembrolizumab. Ce dernier est utilisé en association avec la chimiothérapie. Cette combinaison a été approuvée en 2017, offrant ainsi un nouvel espoir aux patients qui ne présentent pas de mutations spécifiques pouvant être ciblées (Andrade del mello., et al., 2021) (Figure.17).

Pour la prise en charge du cancer pulmonaire, il existe trois types de traitements phares : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux. Parmi les traitements médicamenteux utilisés pour traiter le cancer du poumon, il y a la chimiothérapie, l'immunothérapie et les thérapies ciblées. L'utilisation d'un ou plusieurs de ces traitements dépend essentiellement du type histologique et le stade de la tumeur (Latimer KM., et al., 2015).

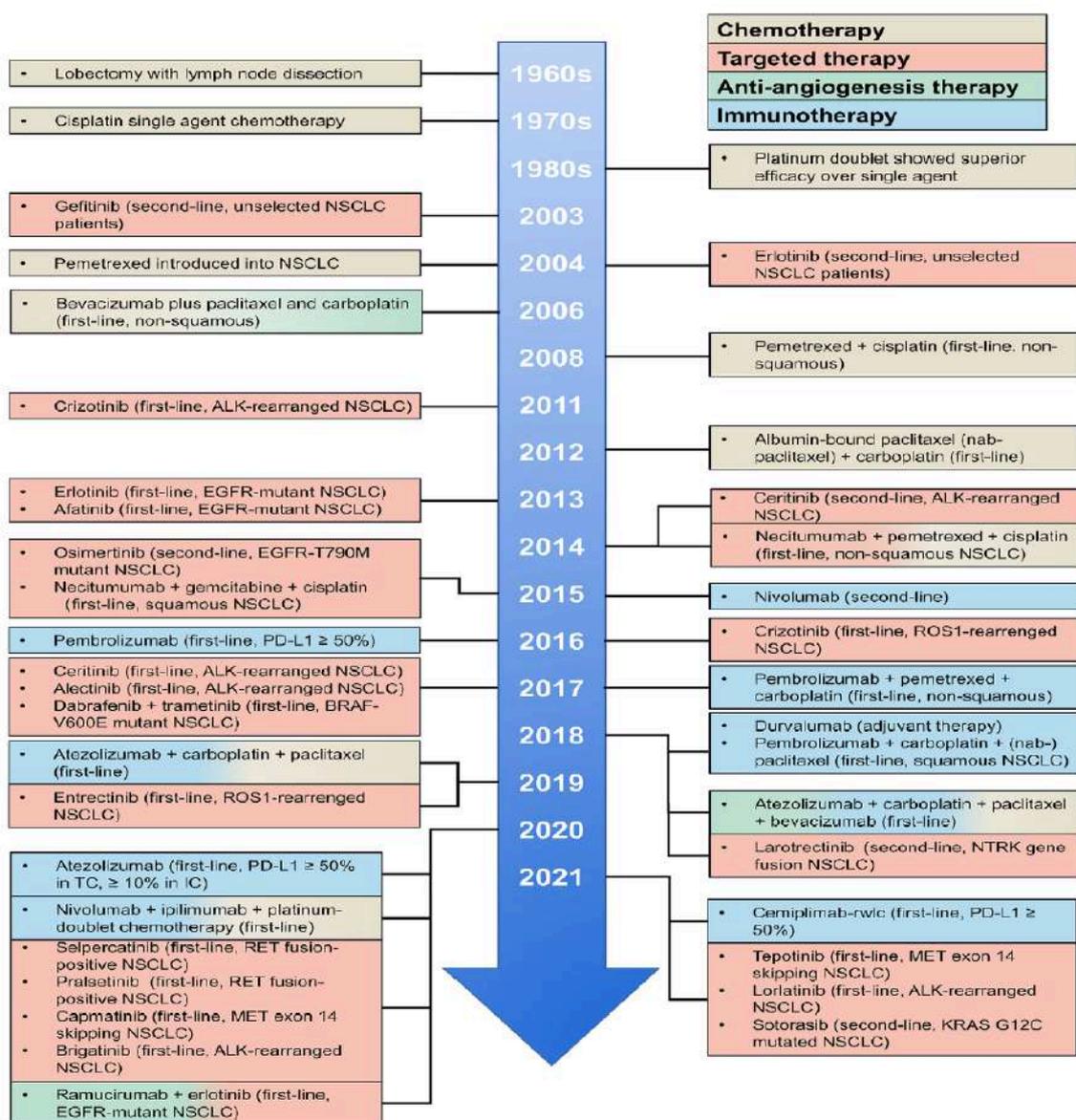


Figure.17. L'illustration de la chronologie des différents types de traitements pour le CPNPC (Andrade del mello., et al., 2021).

### 3.1.1. La chirurgie

Le traitement par chirurgie est l'ablation de l'intégralité de la tumeur et des ganglions lymphatiques qui lui sont associés. C'est le traitement le plus recommandé pour les stades précoces de cancer du poumon (Stade I et II) et pour un groupe limité de patients atteints de la maladie au stade III (Stade IIIA et IIIB). Par contre, elle peut être pratiquée sur certains patients avec un stade métastatique IV (Bains MS., 1991 ; Schuchert MJ., *et al.*, 2010 et Howington JA., *et al.*, 2013).

L'exérèse chirurgicale a pour but la résection macroscopique et microscopique complète de la tumeur. Le pronostic à 5 ans pour une résection complète est de 75% pour les stades Ia et de 25% pour les stades IIIa (Thomas P., *et al.*, 2008).

Selon diverses études, la taille de la résection pulmonaire dépend de certains critères dont (Duma N., *et al.*, 2019 ; Shcuchert MJ., *et al.*, 2010) :

- Le volume de la tumeur.
- La topographie et l'emplacement de la tumeur.
- Les envahissements ganglionnaires.
- L'existence d'extension aux structures avoisinantes.
- L'état physiologique du patient.

Les types d'exérèses pulmonaires sont classées par ordre croissant d'ablation d'organe (Duma N., *et al.*, 2019 ; Yano M., *et al.*, 2016 ; Jiro Okami , 2019 ; American Cancer Society, 2022) :

- La résection wedge.
- La segmentectomie.
- La lobectomie.
- La lobectomie avec broncho et/ou angioplastie.
- La lobectomie élargie à une portion du lobe adjacent.
- La pneumectomie.

En générale, la chirurgie est pratiquée sur des patients de plus de 60 ans. La probabilité de survie est supérieure à 60% après une résection d'une tumeur de stade I. Ainsi le but ultime de l'intervention chirurgicale, qui est la guérison des patients avec le risque opératoire le plus faible (ScariM., *et al.*, 2018 ; Shirvani SM., 2014 ; Jiro Okami, 2019).

### 3.1.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie a été le traitement principal du cancer du poumon pendant plusieurs années, Avant l'ère de la chimiothérapie, la moyenne de survie globale (SG) du cancer du poumon métastatique était de 3,9 mois avec le meilleur apport de soin (Dietrich, M.F., et *al.*, 2016).

Les combinaisons de platine jouent un rôle principal dans ce traitement depuis les années 80. L'étude la plus marquante a été la méta-analyse de collaboration sur le cancer du poumon à non petites cellules en 1995, qui a démontré que la chimiothérapie à base de platine améliorait significativement la Survie Globale (SG) de 15% (Lee SH., 2019).

Le principe de la chimiothérapie repose sur la destruction des cellules cancéreuses en agissant sur le cycle de division cellulaire en empêchant leur prolifération. Les agents cytotoxiques bloquent le cycle cellulaire de toutes cellules à division rapide, y compris les cellules saines à croissance rapide telles que ; les cellules de la moelle osseuse, de la paroi du tube digestif, des poils et des cheveux. Ceci entraîne des effets secondaires importants (Naylor E.C., et *al.*, 2016). Cette méthode de chimiothérapie est encore prescrite chez jusqu'à 80% des patients diagnostiqués avec un cancer du poumon, qu'ils soient traités avec la chimiothérapie seule ou combiné à la radiothérapie. Cette modalité de traitement a été utilisée dans plusieurs scénarios différents.

La chimiothérapie peut être administrée comme traitement principal curatif pour aboutir à la rémission du cancer. Elle peut être aussi néoadjuvante et réduire la masse tumorale à des stades avancés du cancer du poumon, afin de pratiquer un traitement local par radiothérapie ou bien par chirurgie. La chimiothérapie « néoadjuvante » peut aussi être utilisé dans le cadre de soins palliatifs systémiques chez les patients atteints d'une maladie métastatique ou chez les patients qui ne peuvent pas subir de chirurgie quel que soit le stade tumoral. Enfin la chimiothérapie peut être « adjuvante » pour les patients atteints d'un cancer du poumon à un stade précoce, avec la présence de métastases qui représentent le point d'échec le plus courant après une chirurgie curative. Le traitement adjuvant est indiqué pour les patients de stade II et IIIA après une résection chirurgicale. Il est basé sur une combinaison thérapeutique à base de platine (Visconti, R., et *al.*, 2017 ; Duma N., et *al.*, 2019).

Les combinaisons à base de platine (cisplatine, carboplatine) ont été associées à des agents cytotoxiques de troisième génération (Paclitaxel, gemcitabine et docetaxel). Cette combinaison est appelée : doublets de platine.

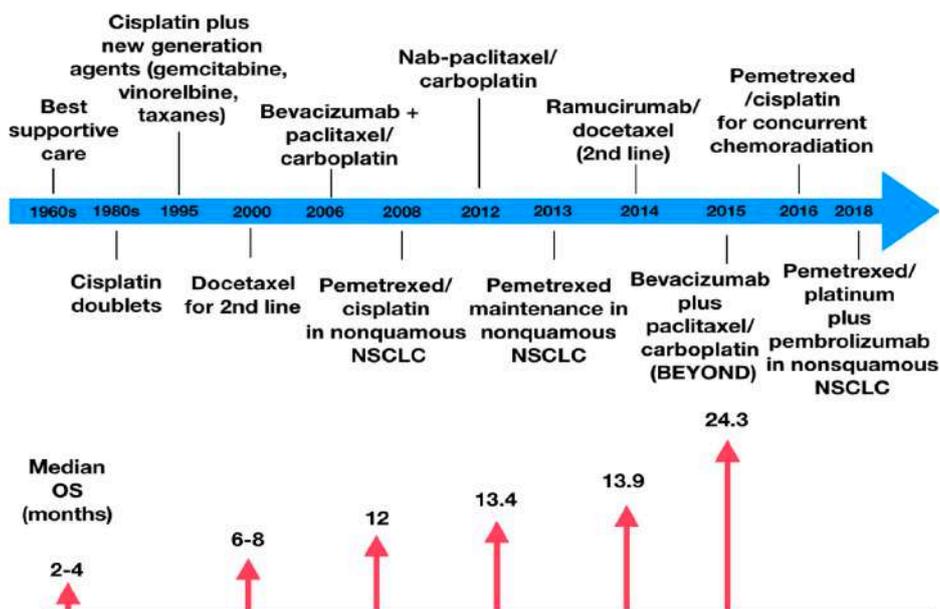
Cette combinaison peut doubler le taux de réponse (RR) par rapport aux schémas thérapeutiques en monothérapie (Baxevanos, P., et *al.*, 2018). Plusieurs études comparatives pour voir l'effet

des différents doublets ont montré que les taux de réponse sont similaires pour le paclitaxel (RR=0,89) et la gemcitabine (RR= 0,92). Le docétaxel lui a un taux de réponse plus faible (RR=0,76) (Vasconcellos V.F., et al., 2020).

Au cours des années 2000, une nouvelle molécule cytotoxique a démontré son efficacité en combinaison avec la platine, il s'agit de la pemetrexed. Le pemetrexed était le seul agent cytotoxique qui améliorait à la fois la survie sans progression et la SG en traitement d'entretien. C'était aussi le médicament qui provoquait le moins d'effets indésirables toxiques chez les patients (Minami, S., et al., 2015).

Dans les essais cliniques de phase de 3, les doublets pemetrexed-cisplatine ont démontré un bénéfice clinique (augmentation de la SG de 1,7mois) sur le CPNPC par rapport aux doublets de gemcitabine-cisplatine (Lee S.H., 2019).

L'évolution du bénéfice clinique de la chimiothérapie avec le temps montre que, plus les traitements sont précis plus la survie globale des patients augmente à son tour (Figure.18) (Andrade de mello., et al., 2020).



**Figure.18. L'évolution des traitements de la chimiothérapie dans le cancer du poumon à non petites cellules (CPNPC) dans le temps en représentant les molécules phares pour chaque étape avec les taux de survie globale moyen par mois (Andrade de mello R., et al., 2020).**

### **3.1.3. La radiothérapie**

#### **3.1.3.1. Généralités**

Le mécanisme d'action de la radiothérapie est basé sur l'exposition des cellules cancéreuses à des rayonnements ionisants de fortes doses dans le but de les détruire. Ces rayonnements sont composés de particules hautement énergétiques, qui sont en générale des photons dont le rôle est d'arracher les électrons aux atomes de la zone irradiée. La création de radicaux libres hautement réactifs provoque des lésions au sein des bases de l'ADN. La taille des lésions provoquées par la radiothérapie est importante. Plus les lésions provoquées sur l'ADN sont importantes, plus les mécanismes réparatoires des cellules cancéreuses auront du mal à se mettre en place, ce qui entraîne la mort des cellules cancéreuses ciblées. De ce fait, le taux d'ionisation est augmenté pour entraîner l'augmentation du nombre de lésions d'ADN au sein des cellules cancéreuses et donc engendrer l'augmentation du taux de mort cellulaire (Kantor G., et *al.*, 2011).

Cette thérapie peut aider à contrôler ou à éliminer les tumeurs à des endroits précis du corps, tels que pour les patients atteints d'un CPNPC localisé au thorax et qui ne sont pas candidats à une résection chirurgicale. D'autre part, la radiothérapie peut être usitée directement sur la tumeur primitive ou bien sur les sites métastatiques. Elle peut être indiquée comme traitement curatif ou palliatif pour améliorer la qualité de vie des patients atteints de CPNPC qui ne répondent pas à la chirurgie ou à la chimiothérapie (Amini A., et *al.*, 2014).

Elle constitue le traitement majeur pour les stades avancés ou bien métastatiques. Elle est généralement combinée avec la chimiothérapie. Le taux de contrôle local à 5ans est compris entre 30 à 50% et le taux de Survie Globale (SG) est de 10 à 30% (Giraud P., et *al.*, 2016).

Les dosages utilisés pour la radiothérapie sont exprimés en Gray (Gy), un Gy correspond à une énergie absorbée de 1joule par kilogramme de matière irradiée. Les doses reçues varient selon la prise en charge du patient et le stade de la tumeur.

Pour la procédure de radiothérapie, l'irradiation doit cibler uniquement les régions potentiellement cancéreuses afin d'éviter que les rayonnements n'affectent les cellules saines et n'altèrent la qualité de vie du patient.

Les effets indésirables de cette thérapie peuvent toucher la fonction respiratoire à court ou à long terme. Afin de préserver au mieux la santé des patients avant de procéder à l'irradiation, des doses de tolérance sont calculées en tenant compte de l'état de santé du patient ainsi que les types de traitements qui lui sont administrés. Mais par contre ces doses peuvent être dépassées

pour l'irradiation de la tumeur, de ce fait la dose administrée au patient doit être justifiée cliniquement et après le consentement du patient (Giraud P., et *al.*, 2016).

### **3.1.3.2. La radiothérapie exclusive**

Les doses administrées sont plus fortes que celles indiquées pour la radiothérapie combinée à une chimiothérapie ou bien après une intervention chirurgicale. La dose reçue par le patient est de 66 à 70 Gy, répartie sur plusieurs séances. Le fractionnement des doses suit le cadre d'une dose de 1,8 à 2,1 Gy par fraction, dispatchée sur cinq séances par semaine, pour une période qui dure de 5 à 8 semaines après la résection chirurgicale (Giraud P., et *al.*, 2016).

### **3.1.3.3. La radiothérapie adjuvante**

La prescription de radiothérapie adjuvante pour les patients atteints de maladies de stade N2 et ayant subi une résection complète ne s'applique pas à tous les cas. Cependant, il existe un sous-groupe de patients pour lesquels cette option devrait être envisagée et discutée de manière pluridisciplinaire (Le Péchoux., C et *al.*, 2022).

Elle est administrée seulement dans le cas d'envahissement ganglionnaire médiastinal, il est préférable de commencer la radiothérapie qu'après 6 à 8 semaines de l'intervention chirurgicale. En générale une chimiothérapie néoadjuvante précède le traitement radiothérapeutique. Le délai qui sépare ces deux thérapies est de l'ordre d'un mois pour les CPPC. La dose totale varie entre 54 et 60 Gy pour les stades limités (Bezjak A., et *al.*, 2015 ; Giraud P., et *al.*, 2016).

### **3.1.3.4. La radiothérapie corporelle stéréotaxique (SBRT)**

Elle est utilisée pour les patients atteints de CPNPC à un stade précoce qui ont un seul petit nodule dans les poumons sans métastases aux ganglions lymphatiques voisins. Cette technique utilise un système de coordonnées avancé pour localiser avec précision la tumeur et assurer un placement précis du dispositif de suivi. Cela permet d'administrer un traitement par rayonnement concentré et hautement focalisé. Dans une méta-analyse comparant l'efficacité de la radiothérapie avec les rayons x, il a été constaté que la SBRT offrait de meilleurs taux de survie globale à 2 ans, des coûts inférieurs et une plus grande commodité pour le patient (Grutters JP., et *al.*, 2010).

### 3.1.4. La thérapie ciblée

Lors des dernières décennies, les altérations moléculaires causées par le cancer du poumon ont fait l'objet de différentes études pour déchiffrer les mécanismes d'oncogenèse. Ces altérations génétiques forment des biomarqueurs théranostiques, qui jouent un rôle majeur pour aider les médecins pour le diagnostic, le choix du traitement ainsi que pour le suivi du patient.

Les principaux inducteurs de ces altérations génétiques sont les mutations qui touchent des gènes précis tels que les gènes EGFR, BRAF, ALK, RAS et MET et les voies de transduction intracellulaires associées (Chen Y., et *al.*, 2021).

En 2004, il y a eu la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques qui peuvent cibler ces altérations génétiques qui se présentent chez des patients atteints de cancer pulmonaire. Plus que 60% des patients avec des stades avancés du CPNPC présentent une altération génétique, la majorité des cas sont des adénocarcinomes (Tsao AS., et *al.*, 2016).

Le principe de la thérapie ciblée est basé, sur la mise au point de médicaments qui bloquent des molécules spécifiques qui se trouvent surexprimées ou suractives uniquement dans les cellules tumorales. Ces molécules cibles altérées sont le résultat de mutations conductrices dans les cellules cancéreuses, qui amplifient les voies de prolifération et de survie tumorales, conduisant à la croissance tumorale. (Baudino T.A., 2015 et Gridelli., et *al.*, 2015).

La thérapie ciblée est devenue le traitement de première ligne pour les patients du cancer du poumon présentant des mutations aux niveaux des gènes tels que EGFR, RAS, ALK, BRAF et MET (Chen Y., et *al.*, 2021).

#### 3.1.4.1. Le gène EGFR

Le gène EGFR est un récepteur transmembranaire à tyrosine kinase qui joue un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire et la transmission des signaux provoqués par le facteur de croissance épidermique (EGF). Il appartient à la famille des récepteurs ErbB, comprenant quatre protéines similaires (ErbB1-4). Le gène EGFR est situé sur le chromosome 7 et il est considéré comme l'un des gènes pilotes qui déterminent la carcinogenèse de CPNPC (Sankar K., et *al.*, 2020 ; Li S., et *al.*, 2022 ; Stewart, E.L., et *al.*, 2015).

Les mutations de l'EGFR produisent une division cellulaire incontrôlable au sein des tumeurs sous l'effet d'une activation constante. Ces types de mutations sont présentés chez 10 à 15% des patients non-fumeurs et des femmes atteints d'adénocarcinomes pulmonaire. (Lynch TJ., et *al.*, 2004 ; Paez JG., et *al.*, 2004 et Pao W., et *al.*, 2004). 32,3% des patients atteints de CPNPC

hébergent des mutations du gène EGFR. Cette mutation est plus fréquente dans les populations féminines (les taux de mutation sont de 19,7 % plus élevés que chez les hommes), asiatiques (les taux sont de 52 % plus élevés que dans les populations nord-américaines), non-fumeurs (les taux sont de 27,8 % plus élevés que chez les fumeurs passés ou actuels) (Zhang Y-L., et al., 2016 ; Black RC., et al., 2015).

Environ 90% de ces mutations sont des mutations qui consistent soit en une délétion de la guanine dans l'exon 19 (G719X) soit en une substitution de la leucine par l'arginine dans l'exon 21 (L858R) (Castellanos E., et al., 2017).

Ces mutations qui touchent le gène EGFR modifient la structure du récepteur à la tyrosine kinase et son fonctionnement. Dans certains cas, la protéine est activée malgré l'absence des facteurs de croissance et cela provoque la stimulation des voies MAPK, PI3K et STAT en provoquant une prolifération cellulaire incontrôlée (Lopes G.L., et al., 2015).

La surexpression de l'EGFR peut être observée chez plus 60% des CPNPC, La thérapie anti-EGFR basée sur des molécules inhibitrices de la Tyrosine kinase (ITK) est utilisée comme le traitement en première ligne pour le CPNPC (INCa, 2010).

Les thérapies ITK ciblant l'EGFR se fixent spécifiquement sur le site de fixation de l'ATP de la tyrosine-kinase intramembranaire, en causant l'inhibition de son activation par phosphorylation. Elles sont indiquées uniquement dans les CPNPC avancés ou métastatiques avec des mutations activatrices de l'*EGFR* et elles sont administrées par voie orale. Elles sont divisées en médicament de première, deuxième et troisième génération.

Les ITK dits de « première génération » incluent l'erlotinib, gefitinib et l'icotinib. Ces médicaments se lient de manière réversible au site de liaison de l'ATP de la tyrosine-kinase.

Les ITK dits de « deuxième génération » incluent l'afatinib et dacomitinib, et bloquent de manière irréversible l'activité tyrosine-kinase de l'EGFR en provoquant une modification covalente du domaine catalytique de cette protéine (Nan, X., et al., 2017 ; Girard, N. 2018).

De nombreux essais cliniques de phase III ont montré le bénéfice des ITK de première et deuxième génération par rapport à la chimiothérapie à base de platine dans le traitement du CPNPC aux stades avancés. Le taux de réponse est de 70 % chez les patients recevant un traitement à l'erlotinib ou au géfitinib. Les 30% restants sont intrinsèquement résistants aux médicaments ITK. D'une manière générale, Après 12 mois d'utilisation d'inhibiteurs de première et deuxième génération, environ 60% des patients développent la mutation résistante au médicament T790M, ce qui réduit l'efficacité du traitement en altérant la structure de la kinase (Riely GJ., et al., 2008 ; Lin, L et al., 2012 et Mayor S. 2017 ; Li S., et al., 2022).

La mutation T790M est cause la plus fréquente (60% des cas) de cette résistance. Elle est causée par la substitution de la méthionine à la thréonine en position 790 de l'exon 20 du gène EGFR. Ce changement d'acide aminé conduit à des altérations de la structure sur laquelle les médicaments ITK se lient à l'EGFR. La chaîne latérale de la molécule de thréonine entrave le processus de liaison des ITK, conduisant à une résistance à ces médicaments (Wu, S.-G., et al., 2018).

Les ITK dits de « troisième génération » tels que l'osimertinib, le mereletinib et le rociletinib, lazertinib (YH25448), Olmutinib, Nazartinib (EGF816) et Aflutinib (AST2818). Ces médicaments sont la parade contre la résistance causée par la mutation T790M. Ils se lient de manière irréversible et avec une puissance élevée aux protéines EGFR ayant des mutations T790M, entraînant une puissante inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Majeed et al., 2021).

La sélectivité des ITK de troisième génération pour les protéines EGFR mutantes signifie qu'ils épargnent l'EGFR non muté, ce qui entraîne moins d'effets secondaires toxiques. Plusieurs études ont démontré que le contrôle de la maladie est de 19% par rapport à la chimiothérapie standard pour le CPNPC (Wang, S., et al., 2016).

Actuellement, l'osimertinib est considéré comme le traitement standard pour les patients atteints de NSCLC avancé porteurs de mutations EGFR non traitées (ex19del ou L858R) en raison de son efficacité supérieure et de sa meilleure tolérabilité (Soria J-C., et al., 2017).

Cependant, les inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR de troisième génération réduisent la résistance provoquée par la mutation EGFR T790M, mais de nouvelles mutations d'EGFR apparaissent après le traitement, telles que C797S et G796X (Li S., et al., 2022).

Pour contrer ces mutations telles que C797S et T790M, des inhibiteurs de tyrosine kinase d'EGFR de quatrième génération sont actuellement en développement. Des études précliniques ont montré que BLU-945, EAI045 et OBXOZ-011 sont prometteurs pour cibler les mutations C797S et T790M qui sont les principales causes de résistance chez l'osimertinib (Wang S., et al., 2017 ; Schalm SS., et al., 2020 ; Eno M., et al., 2022).

Il existe une multitude d'ITKs de quatrièmes générations en voie de développement et d'essais cliniques, qui ciblent diverses mutations qui causent la résistance aux traitements par les précédentes générations d'ITKs (EAI045, BLU-945, BDTX-189, CLN-081 (TAS6417), DZD9008, Tarloxotinib, Amivantamab, Poziotinib, Mobocertinib). (Majeed et al., 2021).

D'autre part, une approche thérapeutique combinée peut surmonter la résistance causée par les mutations C797S. Une approche thérapeutique combinant des inhibiteurs de tyrosine kinase

d'EGFR de première et troisième génération pourrait surmonter la résistance causée par les mutations EGFR 19Del/T790M/in cis-C797S (Zhou et al., 2019).

Ainsi, la combinaison de brigatinib et de cetuximab a démontré une prolongation de la survie sans progression médiane par rapport à la chimiothérapie seule, chez les patients atteints de CPNPC porteurs de la mutation activatrice d'EGFR, T790M et de la mutation triple cis-C797S (Wang S. et al., 2020).

### **3.1.4.2. Le gène ALK**

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) est un récepteur à la tyrosine kinase qui appartient à la famille des récepteurs de l'insuline. Le récepteur ALK peut subir divers réarrangements qui ont été retrouvés chez 3 à 7 % des patients atteints du CPNPC. Les altérations du gène ALK, comprennent le réarrangement ou la fusion du gène ALK avec le gène EML4 (Echinoderm Microtubule-Associated Protein-like 4). La fusion ALK-EML4 se produit lorsque les deux gènes se rejoignent d'une manière anormale, formant un nouvel ARN messager qui code pour une protéine de fusion ALK-EML4. Cette fusion entraîne l'activation anormale de la voie de signalisation ALK, ce qui provoque la stimulation de la croissance et la survie des cellules cancéreuses. (Dagogo-Jack I, et al., 2017 ; Li G., et al., 2017).

Le crizotinib a été le premier inhibiteur d'ALK approuvé par la FDA. Par la suite, le ceritinib, l'alectinib, le brigatinib et le lorlatinib ont également reçu l'approbation pour leur utilisation (majeed et al., 2021).

D'autres part, plusieurs études cliniques testent l'efficacité de la nouvelle génération d'inhibiteurs d'ALK : SAF-189, TQ-B3101, TPX-0131 et Ensartinib (X-396). Ces molécules ont montré des résultats prometteurs mais il faudrait encore approfondir les études pour pouvoir les adopter comme futurs traitements pour les patients atteints de cancer pulmonaires (Shaw AT., et al., 2018 ; Camidge DR., et al., 2020 ; Cui JJ et al., 2020; Fang Y., et al., 2020 ; Selvaggi G., et al., 2020; Yang J-J., et al., 2020).

### 3.1.4.3. Le gène BRAF

BRAF est un gène qui code pour une protéine kinase de sérine/thréonine, qui joue un rôle important dans la voie de signalisation MAPK qui est impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et l'apoptose. Des mutations somatiques BRAF ont été observées chez 1 à 4% des patients atteints du CPNPC, le plus souvent chez des patients atteints d'adénocarcinome (Daum G, et *al.*, 1994 ; Brose MS, et *al.*, 2002 ; Cardarella S, et *al.*, 2013 et Pratilas CA, et *al.*, 2008).

Ces mutations sont plus souvent liées aux fumeurs anciens/actuels, la mutation V600E est la mutation la plus courante chez les patients du CPNPC. Les inhibiteurs de BRAF sont une classe de médicaments qui ciblent la forme mutante de BRAF. L'association dabrafenib (Inhibiteur des mutations BRAF V600E) et de trametinib (Inhibiteur de MEK), est le seul traitement approuvé par la FDA jusqu'à aujourd'hui (Planchard D., et *al.*, 2017 ; Sanchez JN., et *al.*, 2018). Il a été rapporté que la vemurafinib a un effet bénéfique sur les adénocarcinomes pulmonaires muté BRAF (Paik PK., et *al.*, 2011 ; Gautschi et *al.*, 2012 et Pratilas CA, et *al.*, 2008).

Cependant, il existe d'autres types de molécules inhibitrices de BRAF en voie de développement tel que, LXH254 et ABM-1310. Ces deux molécules ont montré un effet antitumoral lors des divers essais cliniques de phase I sur des patients atteints du CPNPC avec une mutation de type V600E (Planchard D., et *al.*, 2017 ; Janku F., et *al.*, 2018).

### 3.1.4.4. Le gène KRAS

Le gène KRAS (Kirsten Rat sarcoma virus) code pour la protéine K-ras, cette protéine appartient à la famille des protéines G possédant une activité GTPasique. Il existe trois gènes RAS qui codent à leur tour pour quatre protéines : HRAS, KRAS A et B et NRAS. Ces protéines jouent un rôle majeur dans la voie de signalisation RAS/MAPK, qui est responsable de la prolifération et de la survie cellulaire (Lurje et Lenz, 2009).

KRAS est un oncogène muté associé au CPNPC, dont les mutations les plus communes se font par substitution d'acides aminés sur les codons 12, 13 et 61.

Plus que 90% des mutations du gène RAS sont situées sur le codon 12. D'autre part moins de 10% des mutation sont sur le codon 13 et 2% sur le codon 61 (Riely et *al.*, 2008 ; Prior et *al.*, 2012).

Les mutations KRAS sont identifiées plus fréquemment chez les adénocarcinomes, environ 10 à 25% des patients atteints d'adénocarcinomes ont des tumeurs associées à la mutation KRAS.

Ces mutations touchent plus la population caucasienne. La fréquence de la mutation est présente dans 20 à 30% des adénocarcinomes pulmonaires et dans 5% des carcinomes épidermoïdes (Riely GJ., *et al.*, 2008 ; Gao *et al.*, 2010 ; Hunt *et al.*, 2002 ; Graziano *et al.*, 1999 ; Roberts et Der, 2007).

Les mutations du gène RAS sont plus fréquentes chez les personnes ayant des antécédant de tabagisme. Le type de mutation diffère entre les patients fumeurs et non-fumeurs (Riely GJ., *et al.*, 2008 ; Brose MS., *et al.*, 2002).

En général, les mutations KRAS sont reconnues d'être des mutations uniques, mais dans certains cas il a été démontré que les mutations KRAS peuvent être présent en même temps dans des tumeurs mutées EGFR et ALK. Ces mutations constituent un nouveau sous-ensemble moléculaire du CPNPC. Les mutations KRAS sont associées d'une manière générale à un mauvais pronostic (Huncharek *et al.*, 1999 et Mascaux *et al.*, 2005).

Les mutations de KRAS sont fréquemment liées à une résistance aux thérapies ciblées et à des pronostics défavorables pour les patients. Plus spécifiquement, la mutation KRAS G12C est observée dans environ 13 % des cas de carcinomes pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) Nadal E., *et al.*, 2014 ; Biernacka A., *et al.*, 2016)

La valeur pronostique dépend également du type de mutation. Lors d'une étude menée par Metro en 2012, il a démontré que les tumeurs pulmonaires mutées KRAS G13 sont de moins bon pronostic en termes de survie globale que les mutations KRAS G12. D'autre part, de nouvelles données suggèrent qu'il pourrait y avoir une valeur pronostic possible des mutations de KRAS, mais un rôle limité en tant que prédicteur de l'effet des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR ou de la chimiothérapie cytotoxique (Riely GJ., *et al.*, 2008 et 2009 ; Metro *et al.*, 2012).

Les inhibiteurs de KRAS sont une classe de médicaments qui ciblent une forme mutante de KRAS. Cependant, le développement de ces médicaments a été difficile en raison de la complexité de la voie de signalisation RAS/MPAK, ainsi que la variabilité des mutations de KRAS.

Les scientifiques ont commencé à développer des stratégies qui pourraient cibler directement un sous-ensemble mutationnel de KRAS, avec des inhibiteurs à petites molécules dirigés contre la mutation commune du cancer du poumon G12C. Ces nouveaux agents possibles se lient à la cystéine mutante et n'affectent pas la protéine KRAS non muté, montrant ainsi une sélectivité pour un sous-type spécifique (Ostrem JM., *et al.*, 2013).

Ces études récentes ont permis d'identifier deux groupes d'inhibiteurs de KRAS, qui ciblent spécifiquement la région de liaison switch II de la protéine KRAS. Cette région est impliquée

dans l'interaction de KRAS avec les effecteurs cellulaires, tels que la voie de signalisation MAPK, ainsi que la régulation de la liaison du nucléotide GTP à KRAS. Cette dernière joue un rôle majeur pour l'activation de KRAS (Ostrem, J.M., et *al.*, 2013 ; Lim, S.M., et *al.*, 2014).

D'autre part, les inhibiteurs de KRAS se lient à la poche nucléotidique sous la région switch II de KRAS. Cette poche est responsable de la régulation de la liaison nucléotide GTP. De ce fait, lors de liaison des inhibiteurs à la poche nucléotidique, il inhibe directement la liaison de GTP à KRAS. Ceci inhibe l'activation de la voie de signalisation MAPK et peut potentiellement arrêter la prolifération des cellules cancéreuses (Ostrem, J.M., et *al.*, 2013 et 2016 ; Hong, D.S., et *al.*, 2020).

Actuellement, il existe deux inhibiteurs directs de KRAS G12C qui ont fait l'objet de divers essais cliniques : le sotorasib (AMG 510) et l'adagrasib (MRTX849).

Le sotorasib (AMG 510), également connu sous le nom de LUMAKRAS™, développé par la société Amgen, est une petite molécule qui inhibe de manière irréversible la cystéine 12 au voisinage de la poche 2 de la région switch II, entraînant ainsi un état inactif lié au GDP.

En mai 2021, le sotorasib est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) comme la première thérapie à cibler directement l'oncoprotéine KRAS chez tous les patients atteints du CPNPC portant une mutation KRAS, en particulier ceux porteurs de la mutation KRAS G12C (Skoulidis, F., et *al.*, 2021 ; Hong, D.S., et *al.*, 2020 ; Lito, P., et *al.*, 2016).

L'adagrasib (MRTX-849), est une petite molécule inhibitrice ciblant le KRAS G12C. Elle se lie à la cystéine 12 dans la poche de commutation II inductible de KRAS G12C, ce qui a pour effet de désactiver cette protéine et d'empêcher la signalisation oncogène. Actuellement, elle est en cours d'évaluation dans le cadre d'une étude de phase I/II (Papadopoulos KP., et *al.*, 2019).

Ainsi, l'essai Krystal-1 (NCT03785249), qui a pour but d'étudier l'effet de l'adagrasib sur 79 patients souffrants de CPNPC, la dose administrée est de 600 mg deux fois par jour.

Les résultats de cet essai clinique ont montré que 51 patients pour lesquels l'activité clinique a pu être évaluée (14 de la phase 1/1b ; 37 de la phase 2), dont 45 % ont montré une réponse objective. Le taux de maîtrise de la maladie s'élevait à 96 % (49/51), par contre le seul événement indésirable grave de grade 3/4 lié au traitement a été l'hyponatrémie (3 %, 2/79).

(Jänne PA., et *al.*, 2020).

D'autre part, Dans l'étude KRYSTAL-12 (NCT04685135), l'adagrasib est comparé au docétaxel dans le cadre d'un essai de phase III chez des patients atteints de CPNPC préalablement traités, porteurs de la mutation KRAS G12C. L'objectif de l'étude est de démontrer une amélioration des principaux critères d'évaluation, à savoir la survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS) (Mok TSK, et *al.*, 2021).

D'après les résultats des essais cliniques qui ont montré une efficacité du traitement chez les patients atteints de CPNPC. Mais il est important de noter que le médicament est encore en développement et n'a pas encore été approuvé pour l'utilisation clinique. Les résultats obtenus sont encourageants, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité du traitement à long terme (Riely, G.J., et *al.*, 2021 ; Gort E., et *al.*, 2020).

### **3.1.4.5. Le gène c-MET**

Le gène c-MET (Mesenchymal Epithelial Transition), est situé sur le chromosome 7 humain et code pour le récepteur c-MET. Le c-MET est un récepteur transmembranaire de la famille des récepteurs de tyrosine kinase, il est également connu sous le nom de récepteur du facteur de croissance hépatique (HGF). Il joue un rôle majeur dans les voies de signalisation telles que : MAPK, PI3K et STAT3. Ces voies de signalisation jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire et contribuent donc à l'oncogenèse. De ce fait, le c-MET est un facteur clé dans la progression du CPNPC, ce qui le rend une cible prometteuse pour de nouvelles thérapies contre le cancer (De Mello, R.A, et *al.*, 2020 ; Pasquini, G., et *al.*, 2018).

Les altérations du gène c-MET, notamment situées sur le chromosome 7q21-31, ont été largement signalées dans les tissus du CPNPC. La surexpression du gène c-MET est l'altération génétique la plus fréquente, elle est présente dans 72% des tumeurs du CPNPC. Parmi ces mutations dans le gène c-MET, il y a la délétion de l'exon 14 qui a été signalée dans environ 4% des cas du CPNPC. Ces mutations entraînent une diminution du taux d'ubiquitination et de dégradation du récepteur c-MET. Ceci mène à l'amplification des voies de prolifération et à des caractéristiques tumorales plus agressives (Pasquini, G., et *al.*, 2018 et Salgia, R., 2018).

L'amplification du gène c-MET est présente chez jusqu'à 20% des patients ayant des CPNPC. Cette altération est liée à une résistance acquise aux inhibiteurs de la tyrosine kinase contre EGFR. En présence des inhibiteurs d'EGFR, les cellules tumorales répondent par une amplification du gène c-MET. Ceci permet le maintien des voies de proliférations cancéreuses hyperactivées, conduisant à la progression tumorale malgré le traitement par les ITK d'EGFR. Une étude de 2019 a montré que les patients ayant acquis une résistance à l'Osimertinib via l'amplification MET avaient une survie sans progression (SSP) raccourcie par rapport aux patients qui ne présentaient pas cette altération du gène c -MET (15,6 mois contre 30,7 mois, respectivement) (Del Re, M., et *al.*, 2019 ; Wang Y., et *al.*, 2018).

Les médicaments utilisés pour inhiber l'activation du c-MET comprennent, des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de MET (Crizotinib, Tepotinib, Capmatinib) et des anticorps monoclonaux monovalents ciblant MET (Onartuzumab) ou HGF (Rilotumumab).

Actuellement, le capmatinib et le tepotinib ont été approuvés par la FDA comme étant des inhibiteurs sélectifs du MET. Ces médicaments peuvent être utilisés comme traitement de première ligne chez les patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules présentant des mutations d'épissage de l'exon 14 du gène MET. Ces inhibiteurs de MET offrent une nouvelle option thérapeutique pour les patients présentant cette mutation spécifique et représentent un progrès important dans la prise en charge du CPNPC (Wolf J., et *al.*, 2020 et Le X., et *al.*, 2021).

Par conséquent, les médicaments ciblant les mécanismes impliqués dans l'activation du c-MET sont des molécules d'intérêt dans la lutte contre les tumeurs pulmonaires dont le CPNPC (Wang Q., et *al.*, 2019).

### **3.1.5. L'immunothérapie**

L'immunothérapie est un traitement révolutionnaire en oncologie qui utilise les défenses naturelles de l'organisme pour lutter contre le cancer. Certaines cellules cancéreuses partagent des caractéristiques similaires aux cellules saines, de sorte que le système immunitaire ne peut pas différencier les cellules saines des cellules cancéreuses. Partant de ce principe, l'immunothérapie fonctionne en renforçant le système immunitaire afin qu'il puisse cibler les cellules cancéreuses et arrêter ou ralentir leur croissance. Ainsi, l'objectif de l'immunothérapie en oncologie est d'induire (ou de réinduire) une réponse immunitaire cellulaire, en mobilisant la cytotoxicité des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux ainsi que des antigènes associés aux tumeurs, pour cibler et détruire sélectivement les cellules tumorales (Banchereau J., et *al.*, 1998 ; Pardoll D., 2003 ; Schreiber RD, 2011).

Les avancées récentes dans la recherche ont affiné notre compréhension de la réaction du système immunitaire face au cancer et des moyens d'améliorer son efficacité, entraînant d'importantes améliorations dans le domaine de l'immunothérapie contre le cancer. De ce fait, l'immunothérapie offre un potentiel d'efficacité qui n'est pas restreint par l'histologie ni le statut mutationnel du gène, ce qui ouvre la voie à des rémissions soutenues, surtout chez les patients qui répondent positivement (Forde PM., et *al.*, 2014 ; Seegobin K., et *al.*, 2021).

Cependant, au fil des dernières années, l'immunothérapie a été considérée comme moins adaptée au traitement du cancer du poumon en raison de réponses immunitaires limitées.

L'immunothérapie dans le contexte du cancer du poumon présente un défi, car les cellules parviennent à échapper à la surveillance immunitaire et à réduire la réponse immunitaire globale en régulant la cytotoxicité orchestrée par les lymphocytes T, en sécrétant des cytokines immunosuppressives et en diminuant l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Raez LE, *et al.*, 2004 ; Massarelli E, 2014).

Les récents progrès techniques ont permis une meilleure compréhension de la complexité moléculaire de l'immunogénicité du cancer du poumon, ouvrant ainsi la voie à une variété d'approches d'immunothérapie pour traiter cette maladie. Les stratégies d'immunothérapie englobent les vaccins thérapeutiques, les modulateurs du système immunitaire, les thérapies cellulaires autologues, ainsi que les anticorps monoclonaux ciblant les signaux inhibiteurs des points de contrôle associés aux lymphocytes T activés et/ou aux cellules cancéreuses. Cependant, étant donné que chaque approche thérapeutique présente ses propres avantages et inconvénients, il est préférable de combiner plusieurs traitements ou stratégies thérapeutiques en conjonction avec l'immunothérapie (Pardoll DM., *et al.*, 2012 ; Wang J, *et al.*, 2012).

### **3.1.5.1. L'immunomodulation**

L'immunomodulation vise à renforcer la réponse immunitaire en stimulant le système immunitaire de l'organisme hôte. Bien que divers agents jouent un rôle dans l'immunomodulation, l'approche fondamentale repose sur la stimulation des cellules présentatrices d'antigènes afin de susciter une réaction des lymphocytes T, conduisant ainsi à l'élimination ultérieure des cellules tumorales par ces mêmes lymphocytes T. Les cytokines jouent un rôle crucial en tant qu'agents d'immunomodulation. Plusieurs immunomodulateurs à base de cytokines ont été approuvés pour être utilisés en immunothérapie contre différents types de cancers. Par exemple, l'aldesleukine (Proleukin®), une version synthétique de l'IL-2 produite par technologie d'ADN recombinant, est autorisée pour le traitement du cancer du rein et du mélanome. Un autre exemple est l'interféron alfa-2b (Intron A®), également produit grâce à une technologie de recombinaison, utilisée dans le traitement de la leucémie, du lymphome et du mélanome (Han S., *et al.*, 2020 ; Quijano-Rubio A., *et al.*, 2020).

Un autre ensemble d'immunomodulateurs utilisés en immunothérapie contre le cancer appartient à la catégorie des inhibiteurs des points de contrôle. Les inhibiteurs des points de contrôle agissent en bloquant les protéines qui entravent l'action du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Selon leur mécanisme d'action, ils peuvent également être considérés

comme une forme de thérapie ciblée, car ces inhibiteurs visent spécifiquement les protéines présentes sur les cellules T ou les cellules cancéreuses.

Par exemple, l'Ipilimumab (Yervoy®), développé pour inhiber CTLA-4 (protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques) exprimée sur les cellules T, est utilisé dans le traitement du mélanome avancé. D'autre part, Atezolizumab (Tecentriq®) a été élaboré en tant qu'inhibiteur de PD-L (Protéine de mort cellulaire programmée 1) et est utilisé pour traiter le cancer du poumon ainsi que le cancer urothélial. Bien que seulement un groupe restreint de patients puisse bénéficier des bloqueurs des points de contrôle immunitaires, avec des taux de réponse avoisinant les 40 % en clinique, l'efficacité de ces traitements dépend des niveaux de lymphocytes T présents au niveau de la tumeur. C'est la raison pour laquelle ces agents sont souvent combinés avec d'autres modalités thérapeutiques telles que la chimiothérapie, la radiothérapie ou les vaccins (Bernard-Tessier A et *al.*, 2018 ; Sun L., et *al.*, 2019).

### **3.1.5.2. Les vaccins thérapeutiques**

Pendant de nombreuses années, les vaccins ont été des outils médicaux traditionnels principalement utilisés pour prévenir l'apparition et la propagation de maladies infectieuses. Dans certains cas, cette méthode thérapeutique est appliquée en oncologie. Les vaccins ont pour objectif de susciter des réponses immunitaires spécifiques aux antigènes chez les patients en présentant des antigènes associés aux tumeurs au système immunitaire individuel dans l'environnement cancéreux.

La thérapie vaccinale vise à initier ou à renforcer les réponses immunitaires adaptatives anti-tumorales en introduisant des antigènes tumoraux pour stimuler le système immunitaire de l'hôte, ce qui engendre des réactions effectrices et des réponses cellulaires de mémoire spécifiques aux antigènes tumoraux, sans altérer les cellules non malignes (Kelly RJ et *al.*, 2011 ; Cuppens K., et Vansteenkiste J., 2014 ; Sellars MC., et *al.*, 2022).

Au cours de la décennie écoulée, plusieurs essais de phase III ont exploré l'utilisation de vaccins ciblant le cancer de poumon à non petites cellules. Bien que ces vaccins aient présenté un profil de toxicité favorable et une bonne tolérance, la plupart n'ont pas réussi à démontrer des avantages en terme de survie, malgré des résultats prometteurs observés lors des essais randomisés de phase II préliminaires. Ainsi, les vaccins actuellement à l'étude sont généralement regroupés en deux catégories principales : les vaccins spécifiques aux antigènes (vaccins à base de peptides/protéines, vaccins à base d'ADN et vaccins à base de vecteurs) ou

les vaccins à base de cellules entières (vaccins allogéniques et vaccins à base de cellules dendritiques autologues) (Saavedra D., et *al.*, 2017 ; Srivatsan S., et *al.*, 2014 ; Weng TY., et *al.*, 2014 ; Sellars MC., et *al.*, 2022).

La vaccination contre les tumeurs fait face à divers défis, mais la prise en compte de ces défis pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses. Les vaccins contre le cancer sont limités par leur capacité à pénétrer dans la tumeur, par le déclin de la réponse immunitaire au fil du temps et par le développement de résistance. La conception de vaccins ciblant plusieurs épitopes optimisés pour l'immunogénicité pourrait contribuer à surmonter certains de ces obstacles. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes d'évasion immunitaire, le développement de formulations vaccinales plus efficaces et l'exploration d'approches d'immunothérapie combinée (ciblant le microenvironnement tumoral et les facteurs produits par les cellules tumorales) pourraient favoriser l'avènement de la prochaine génération de vaccins contre le cancer (Keshavarz-Fathi M., et Rezaei N. et *al.*, 2019).

### **3.1.5.3. Les thérapies cellulaires adoptives**

La thérapie cellulaire adoptive représente une forme d'immunothérapie visant à renforcer la réaction du système immunitaire contre les cellules cancéreuses. Cette approche utilise les lymphocytes T de différentes manières en exploitant leur capacité innée à éliminer les cellules cancéreuses. Essentiellement, les lymphocytes T sont prélevés soit du sang du patient atteint de cancer, soit des tissus tumoraux, puis sont modifiés en laboratoire pour améliorer leur capacité à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Par la suite, ces lymphocytes T modifiés sont réinjectés chez le patient (Rohaani, M.W., et *al.*, 2019).

Cependant, la simple présence de lymphocytes T ne suffit pas toujours à éliminer les cellules cancéreuses. De ce fait, pour que les lymphocytes T cytotoxiques soient efficaces, il faudrait remplir plusieurs conditions : ils doivent être abondants dans les zones tumorales, préalablement activés et leur activité maintenue jusqu'à l'éradication complète de la tumeur. Ainsi, la thérapie par lymphocytes infiltrants les tumeurs (TIL) est une composante de l'approche de la thérapie cellulaire adoptive, en remplissant parfaitement ces exigences.

Dans cette méthode de traitement par TIL, les lymphocytes T qui ont déjà migré dans les tissus tumoraux du patient atteint de cancer sont collectés, multipliés en laboratoire, puis réinjectés chez le patient pour garantir leur nombre adéquat. Cependant, malgré les avantages prometteurs de la thérapie par TIL, elle présente certaines limites. Parfois, même en multipliant les

lymphocytes T en laboratoire, il peut être difficile d'obtenir des quantités suffisantes chez les patients (Veatch JR., et *al.*, 2021).

Pour surmonter ces obstacles, la thérapie des récepteurs des lymphocytes T génétiquement modifiés (TCR) a été développée grâce à l'ingénierie génétique. Cette méthode permet non seulement d'activer et de multiplier les lymphocytes T anti-tumeur déjà présents, mais également de les rendre capables de cibler spécifiquement les antigènes du cancer.

Par contre, dans les approches de traitement par TIL et TCR, seules les cellules cancéreuses présentant leurs antigènes peuvent être ciblées. Les lymphocytes T sont en mesure de reconnaître le cancer grâce à la présentation médiée par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) d'antigènes spécifiques exprimés à la surface des cellules cancéreuses (Shafer P., et *al.*, 2022).

D'autre part, une nouvelle approche du récepteur antigénique chimérique (CAR-T) a été développée, afin de faire face à cette limitation. Cette méthode permet aux lymphocytes T de reconnaître les cellules cancéreuses de manière indépendante du CMH. La FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (Agence européenne des médicaments) ont approuvé des produits thérapeutiques CAR-T tels que Kymriah® et Yescarta® pour le traitement des lymphomes, cette stratégie est un pur exemple de la médecine personnalisée (Zheng P.-P., et *al.*, 2018).

#### **3.1.5.4. Les anticorps thérapeutiques :**

Les anticorps thérapeutiques sont des protéines spécialement conçues pour se lier à des cibles spécifiques dans l'organisme, tels que des antigènes présents sur des cellules cancéreuses. Cette interaction peut avoir divers effets bénéfiques, tel que l'arrêt de la croissance des cellules tumorales et la stimulation de réponses immunitaires ciblant les cellules cancéreuses (Akkin S., et *al.*, 2021).

Lors de ces dernières années, les chercheurs ont exploité pleinement la capacité des anticorps à cibler spécifiquement les antigènes tumoraux présents sur les cellules cancéreuses, donnant ainsi naissance à une multitude d'anticorps thérapeutiques visant à entraver les activités des cellules tumorales. Ces anticorps peuvent être généralement regroupés en trois catégories : les anticorps monoclonaux (mAbs), les conjugués anticorps-médicament (ADC) et les anticorps bispécifiques. Quelques mAbs qui ont reçu l'approbation de la FDA pour le traitement du cancer du poumon à non petites cellules (CPNPC) au cours des deux dernières décennies incluant le cétuximab, le bévacizumab, ramucirumab, le nivolumab et le pembrolizumab.

D'autre part, il existe d'autres anticorps monoclonaux en voie d'évaluation pour le traitement du CPNPC tels que ; Nécitumumab, le Nimotuzumab et le Ficlatusumab. Ces trois anticorps qui ciblent l'EGFR, ont montré une efficacité lors des tests cliniques pour les patients atteints de cancer pulmonaire (Arcangelo M., et Cappuzzo F., 2013 ; Garon EB., et al., 2014 ; Santini D., et al., 2015 ; Díaz-Serrano A., et al., 2019 ; ; Yamamoto N., et al., 2021).

### **3.1.5.5. Les inhibiteurs des points de contrôles immunitaires**

De nouvelles stratégies en immunothérapie ciblent le blocage des mécanismes de modulation immunitaire qui aident les cellules tumorales à se défendre contre le système immunitaire. Cette approche cible les voies de contrôle immunitaire, qui comprennent le blocage des récepteurs inhibiteurs de l'antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques 4 (CTLA-4) et de la mort cellulaire programmée-1 (PD-1) et de son ligand, PDL1. Ces points de contrôles immunitaires sont utilisés par le système immunitaire pour maintenir l'auto-tolérance afin de protéger les tissus contre les dommages, lorsque le système immunitaire lance une réponse à un agent pathogène. Les voies de contrôle immunitaire peuvent être dérégulées par des mécanismes de résistance tumorale. Ainsi, les recherches lors de ces dernières années ont mené au développement d'anticorps monoclonaux qui ont pour objectif la restauration de l'immunité antitumorale (Pardoll DM., et al., 2012).

#### **3.1.5.5.1. La protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) et son ligand PD-L1**

PD-1 est un récepteur clé de contrôle qui se trouve à la surface des lymphocytes T, B et NK activés. Son rôle est de réguler la réponse immunitaire en inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

PD-1 et son ligand (PD-L1) jouent un rôle important dans le mécanisme d'échappement mis en place par les cellules tumorales pour se soustraire à la détection et à la destruction par le système immunitaire, en induisant l'apoptose ou l'épuisement des lymphocytes T. La voie de contrôle immunitaire PD-1 est une cible thérapeutique supplémentaire pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Les thérapies visant à bloquer PD-1 ou PD-L1 ont pour objectif de lever cette inhibition immunitaire et de permettre une réponse immunitaire antitumorale plus efficace. Leur inhibition a été utilisée pour traiter les patients atteints de cancer du CPNPC sans mutations EGFR ou ALK. Les inhibiteurs d'anticorps basés sur PD-1

et PD-L1 induisent une rémission tumorale persistante chez divers types de patients atteints de cancers avancés, ce qui rend l'inhibition de la voie de signalisation PD-1/ PD-L1 cliniquement cruciale dans les traitements des tumeurs. A ce jour, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé six anticorps monoclonaux ciblant PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab et Cemiplimab) ou PD-L1 (Atezolimab, Durvalumab et Avelumab) comme traitement des malignités hématologiques et solides (Tan et *al.*, 2016 ; Chen et *al.*, 2021). Ces anticorps sont approuvés en tant que thérapies de deuxième ligne ou en combinaison avec une chimiothérapie en première ligne (Ettinger, D.S., et *al.*, 2017 ; Soria, J.-C., et *al.*, 2018 et Zhang, M., et *al.*, 2017 ; Tan et *al.*, 2016 ; Chen et *al.*, 2021).

Les anticorps monoclonaux peuvent réduire de manière significative la toxicité, la taille des tumeurs solides et même inhiber les tumeurs dans des stades avancés et métastatiques. Les anticorps tels que Nivolumab et pembrolizumab ont été autorisés pour le traitement du mélanome, du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) et du carcinome rénal (CR) en ciblant PD1 et en bloquant son interaction avec PDL1 et PDL2. La Food Drug Administration (FDA) a approuvé en 2015 l'utilisation du Nivolumab comme traitement de deuxième ligne pour le CPNPC à stades avancés ou métastatiques. Il a démontré selon plusieurs études, une augmentation de la survie globale par rapport à d'autres molécules de chimiothérapie classique comme le Docétaxel. En 2016, la FDA a autorisé l'utilisation du Pembrolizumab comme traitement de première ligne pour les patients présentant une forte expression ( $\geq 50\%$ ) de PD-L1, ce qui permet une augmentation de la survie globale et de stopper la progression des du cancer du poumon (Hughes et *al.*, 2016 ; Kazandjian D., et *al.*, 2016 ; Borghaei H, et *al.*, 2015 ; Reck, M., et *al.*, 2016 ; Li, J., et *al.*, 2019 ; Pan et *al.*, 2021 ; Lahiri et *al.*, 2023).

Le traitement avec les anticorps monoclonaux lors des essais cliniques de phase I et II concernant le CPNPC, ont montré une bonne réponse au traitement dans 20% des cas et une augmentation de la survie globale des patients. L'association d'anticorps anti-PD1 ou PD-L1 et d'anticorps anti-CTLA-4, a montré des taux de réponses supérieures à 50%. Ce genre de traitement par association est utilisé en majorité chez les patients souffrant de carcinome épidermoïde. Ces patients sont dans la plupart des cas des fumeurs et donc porteurs de forte charge mutationnelle. Ils représentent 85% des cas non traitables avec les inhibiteurs de tyrosine kinase. Ainsi, les inhibiteurs de points de contrôles, surmontent les lacunes des thérapies anticancéreuses traditionnelles et inhibent l'effet mutuel de PD1/PDL1 (Hughes et *al.*, 2016 ; Arranz-Nicolás et *al.*, 2021 ; Liu J., et *al.*, 2021 ; Lussier, D. M., et *al.*, 2015 ; Lahiri et *al.*, 2023).

### 3.1.5.5.2. CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4)

CTLA-4 est une protéine inhibitrice exprimée sur la surface des lymphocytes T lors de leur activation. Elle joue un rôle important dans l'équilibre entre les réponses immunitaires pro et anti- inflammatoires en régulant négativement la réponse immunitaire. Cette protéine interagit avec les ligands B7 (CD80/CD86) qui sont exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes, afin d'inhiber la prolifération cellulaire, mais aussi la production de cytokines (dont l'interleukine-2 et l'interféron) et la progression du cycle cellulaire. Chez l'homme, CTLA-4 se compose de deux isoformes. Premièrement une isoforme récepteur lié à la membrane (mCTLA-4) avec à la fois des domaines extracellulaires et intracellulaires. Deuxièmement une isoforme soluble, sécrétée (sCTLA-4), qui ne possède qu'un domaine extracellulaire pour lier les ligands. Ces deux isoformes forment des boucles de rétroaction négatives pour réduire l'activation des lymphocytes T de manière intrinsèque et extrinsèque, afin de maintenir la tolérance immunitaire et l'homéostasie (Huang P., et *al.*, 2016 ; Santegoets. S. J. A. M., et *al.*, 2013 ; Yu H., et *al.* 2015).

En tant que récepteur co-stimulateur majeur hautement exprimé à la surface des lymphocytes T au repos, CD28 peut être engagé par CTLA-4 pour prévenir l'anergie et la mort cellulaire. La stimulation des lymphocytes T naïf par leurs récepteurs peut provoquer une translocation rapide et transitoire de CTLA-4 intracellulaire vers les surfaces cellulaires et/ou des sécrétions extracellulaires. Les expressions constitutives de CTLA-4 par les lymphocytes T régulatrices (Treg) réduisent le niveau de ligand B7 sur les cellules présentatrices d'antigènes, inhibant ainsi davantage l'immunité des cellules T effectrices. De plus, les cellules exprimant CTLA-4 endocytent les ligands sur les cellules voisines, empêchant la co-stimulation de CD28 (Brunner, M. C., 1999 ; Linsley, P. S. et *al.*, 1996 ; Chambers, C. A., 2001 ; Qureshi, O. S. et *al.* 2011).

Cette protéine a également été impliquée dans l'évasion immunitaire des cellules tumorales. Il a été démontré que l'expression de la protéine CTLA-4 semble être importante pour les tumeurs afin d'échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte dans les cancers (Johnson D.B., et *al.*, 2014 ; Mellman I., et *al.*, 2011).

Le blocage de la surexpression de CTLA-4 à la surface des lymphocytes T, repose sur le traitement avec des anticorps monoclonaux. Ces anticorps jouent un rôle majeur dans l'activation intense et non spécifique du système immunitaire. Parmi ces anticorps monoclonaux, il y a l'ipilimumab qui a été approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome métastatique, et qui a fait l'objet de diverses investigations pour le traitement d'autres tumeurs solides telles que le cancer du rein, de la prostate et du poumon. L'Ipilimumab est un anticorps

monoclonal entièrement humanisé qui peut neutraliser le CTLA-4, activant ainsi les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) en maintenant les réponses immunitaires en grande partie et en éliminant les cellules T régulatrices (Tregs) qui expriment fortement CTLA-4. Il a montré des résultats prometteurs comme étant un traitement de première ligne en combinaison avec une chimiothérapie à base de carboplatine/paclitaxel lors de diverses études de phase II de CPNPC. Ainsi, lors d'une étude préliminaire de phase II (CA184-041), Lynch et ses collaborateurs ont démontré que l'association de l'ipilimumab avec une chimiothérapie en tant que traitement de première ligne pour le CBNPC métastatique des stades IIIB/IV a conduit à une amélioration significative de la survie sans progression liée à l'immunité par rapport à la chimiothérapie seule, sans l'ajout de toxicités importantes (Peggs KS., *et al.*, 2009 ; Tomasini P, *et al.*, 2012 ; Lynch TJ., *et al.*, 2012).

D'autre part, l'efficacité de la combinaison de l'ipilimumab avec erlotinib, crizotinib et nivolumab a également été évaluée dans un essai clinique de phase Ib non randomisé (NCT01998126) chez des patients atteints du CBNPC de stade IV avec des translocations EGFR et ALK, qui s'est terminé en 2018. La survie médiane n'a pas pu être établie en raison d'un profil de toxicité excessif qui a entraîné l'arrêt de l'étude (Chalmers AW., *et al.*, 2019).

Cependant, le tremelimumab est un anticorps monoclonal qui est entièrement humain et qui cible spécifiquement l'anti-CTLA4 humain, cet anticorps a fait l'objet de divers essais cliniques. Lors de l'essai randomisé de phase II (n = 87) mené chez des patients atteints de CPNPC de stade avancé préalablement traités, les résultats obtenus se sont soldés par un échec. Cependant, les résultats récents de l'essai NEPTUNE de phase III (NCT02542293, phase III, randomisé, 953 participants) ont montré que l'association de tremelimumab avec Imfinzi (Durvalumab, anticorps anti-PD-L1) n'a pas démontré de supériorité par rapport à la chimiothérapie standard pour prolonger la survie des personnes atteintes de CPNPC métastatique (Zatloukal P., *et al.*, 2009).

## 3.2. Les limites des traitements

### 3.2.1. La chirurgie

La chirurgie reste le seul moyen curatif pour le traitement des stades précoces du CPNPC. Plusieurs patients ont bénéficié d'une guérison totale après une intervention chirurgicale. Mais cette méthode de traitement reste trop limitée, aux vues des risques de récurrences qui touchent les patients atteints de CPNPC. En effet, 30 à 55% des patients atteints du CPNPC développent une récurrence et meurent de leur maladie malgré une résection curative (Al-Kattan K., *et al.*, 1997 ; Hoffman PC., *et al.*, 1997 ; Yamashita T., *et al.*, 2010 ; Uramoto H., *et al.*, 2012 ; Carnio S., *et al.*, 2013).

Par conséquent, de nombreux patients finissent par mourir de leur maladie en raison d'une récurrence après la chirurgie. De plus, la chirurgie elle-même comporte un certain degré de risque. Bien que les décès liés à la chirurgie soient relativement rares, il existe toujours un risque important de mortalité. Ainsi, la plupart des patients atteints de cancer du poumon présentent une diminution de leur fonction pulmonaire après la chirurgie. Ainsi, malgré les progrès de la chirurgie, le traitement par résection chirurgicale est loin d'être parfait, même lorsqu'une résection complète est possible (Uramoto H., *et al.*, 2001 et 2010).

Cependant, de nombreuses études ont été menées, pour déterminer la cause des taux de récurrences élevés après résection complète chez les patients atteints de CPNPC. Ces dernières ont montré que l'élimination complète doit être assurée tant macroscopiquement et microscopiquement. D'autre part, il a été suggéré qu'il existe souvent des cellules cancéreuses micro-métastatiques occultes, qui ne sont pas détectées par les méthodes de stadification standards. Ceci suggère qu'il existe une sous-estimation du véritable stade de la tumeur au moment de la résection. Enfin la manipulation de la tumeur pendant la chirurgie elle-même pourrait entraîner la dissémination des cellules cancéreuses (Hayashi *et al.*, 1999 ; Hashimoto *et al.*, 2013).

En se basant sur d'anciens rapports concernant les cellules tumorales disséminées (CTD) ou les cellules tumorales circulantes (CTC), il a été montré qu'il y a une association entre la présence de DTC ou CTC lors de la résection tumorale et le devenir du patient. A l'heure actuelle, il existe toujours une certaine controverse concernant cette théorie. Par conséquent, la détection de DTC et CTC n'est actuellement pas incluse dans les recommandations de stadification ou de traitement pour le CPNPC. Il est également difficile à savoir si ces cellules ont une activité proliférative ou sont des cellules dormantes. Enfin le risque de récurrences reste un facteur

important à prendre en considération après une intervention chirurgicale. Ceci est le point faible du traitement par résection complète. De ce fait, il faudrait pallier avec des thérapies adjuvantes pour éviter et diminuer ce risque. (Pantel K., 2008 ; Siemel W., *et al.*, 2003 ; Tanaka F., *et al.*, 2009 ; Rud AK., *et al.*, 2015 et Bessa X., *et al.*, 2001 et Felip E., *et al.*, 2010).

### **3.2.2. La radiothérapie**

La radiothérapie est une modalité importante utilisée pour le traitement du cancer du poumon, qui peut être utilisée comme traitement curatif ou palliatif à tous les stades de la maladie (Vinod K.S., et Hau E., 2020). Environ 70% des patients présentant un cancer du poumon recevront une radiothérapie à faisceau externe sur le thorax en tant que traitement définitif ou adjuvant (Vinod K.S., et Hau E., 2020).

Malgré les avancées en matière de localisation tumorale, de précision des doses de radiation et d'utilisation de la chimiothérapie concomitante, les taux de rechutes locorégionales des patients restent élevés. De plus, même chez les patients pour lesquels la radiothérapie est efficace, le développement d'une deuxième tumeur pulmonaire est un problème courant. Il a été démontré, que le risque de survenue de seconds cancers pulmonaires augmente à la suite de l'irradiation du poumon à des doses supérieures à 5 Gy. D'autre part, la radiothérapie peut causer des dommages aux tissus sous-jacents, selon la distance entre la région d'intérêt et la tumeur. Il y a de plus l'incapacité de tuer les cellules tumorales qui ne sont pas visibles sur les scanners d'imagerie et qui ne sont pas toujours incluses dans les modèles 3D de la planification de la radiothérapie. D'autre part la radiothérapie ne permet de réduire l'effet de masse (la pression exercée par la tumeur sur les structures normales sous-jacentes) dans certaines parties du corps comme au niveau cérébral (Travis *et al.*, 2002 et 2012 ; Kelly *et al.*, 2010 ; Kang *et al.*, 2015). L'irradiation pulmonaire est la cause de divers complications précoces ou tardives chez les patients. Les effets secondaires précoces (ou aigus) se produisent immédiatement après ou peu de temps après le traitement par radiothérapie. Il peut y avoir des pneumonies radio-induites qui apparaissent d'une manière précoce ou des fibroses d'une façon plus tardive. La pneumonie est la toxicité la plus fréquente après irradiation et cause : une congestion, une dyspnée, de la fièvre et des douleurs thoraciques. Cependant, 60% des patients développent une pneumonie avec des signes uniquement radiologiques et moins de 10% présentent des pneumonies qui nécessitent une prise en charge clinique (Palma *et al.*, 2010 ; Okubo *et al.*, 2017 ; Guberina *et al.*, 2017).

D'autre part, les effets secondaires tardifs sont définis par le moment de leur apparition, c'est à dire plusieurs mois voire plusieurs années après la radiothérapie. Les effets secondaires tardifs sont en général chroniques et souvent progressifs, ce qui mène à une diminution de la qualité de vie des patients après le traitement. Ils sont souvent utilisés pour déterminer les limites de dose de radiation, contrairement aux effets secondaires précoces. Toutes ces réponses inhibent ultérieurement le potentiel régénératif des tissus ce qui influence directement la qualité de vie des patients (Bentzen SM., 2006 et De Ruyscher D., et *al.*, 2019).

Certaines tumeurs ne répondent pas à une telle thérapie, ou répondent bien initialement puis rechutent progressivement. Cela peut amener à une augmentation de la posologie du médicament, ce qui augmente généralement les effets indésirables, mais n'améliore pas le pronostic ou le résultat clinique.

### **3.2.3. La chimiothérapie**

La chimiothérapie est le traitement majeur dans les soins primaires et palliatifs des patients atteints de cancers du poumon, y compris les patients atteints à un stade précoce avec une résection complète. Cependant, le taux de réponse à la chimiothérapie chez les patients atteints de NSCLC est d'environ 20 à 30 %, cette mauvaise réponse à la chimiothérapie est principalement causée par la résistance aux agents cytotoxiques (chimiorésistance). Ce phénomène de résistance est l'obstacle majeur de la chimiothérapie qui il pourrait apparaître soit de manière intrinsèque, soit acquise au cours du traitement. De nombreuses études ont suggéré plusieurs mécanismes sous-jacents à la résistance aux agents chimio-thérapeutiques, tels que :

- L'augmentation de l'efflux de médicaments.
- La réduction de l'absorption des médicaments.
- L'activation de la signalisation pro-survie.
- L'apoptose défectueuse.
- L'acquisition de phénotypes épithéliaux-mésenchymateux et des propriétés de type cellule souche cancéreuse.
- Les changements dans l'expression des microARNs.
- La modulation épigénétique et les interactions avec le microenvironnement tumoral.

La compréhension de ces mécanismes sous-jacents à la chimiorésistance est nécessaire pour développer des stratégies thérapeutiques anticancéreuses efficaces et améliorer les résultats

cliniques des patients atteints de CPNPC (Zarogoulidis et *al.* 2013 ; Lee SH., 2019 ; Scheff et Schneider 2013).

Cependant, le mode d'action non sélectif des agents cytotoxiques ainsi que leur importante toxicité génèrent beaucoup d'effets indésirables en détruisant les cellules saines à régénération rapide (les cellules de la moelle osseuse, du tube digestif et des follicules pileux).

Plusieurs facteurs entrent en jeu concernant l'intensité des effets secondaires : le type de la molécule ainsi que la dose administrée, la sensibilité et l'état de santé générale du patient.

Les effets secondaires les plus fréquents sont : la fatigue, la perte de cheveux, les nausées et les vomissements, les diarrhées, la neutropénie, les mucites buccales, l'insuffisance rénale et peut même atteindre la mort dans les cas les plus graves.

Enfin, il est nécessaire d'approfondir les recherches sur les mécanismes qui mènent à la chimiorésistance, ainsi que d'adopter de nouvelles stratégies pour surmonter cette résistance et la rechute tumorale. Ces efforts pourraient fournir de nouvelles options thérapeutiques et amélioreraient ainsi les résultats cliniques des patients atteints du cancer du poumon (Min H-Y., et Lee H-Y., 2021 ; Aslam M.S., et *al.*, 2014 et Chen Y., et *al.*, 2007).

### **3.2.4. Les thérapies ciblées**

La médecine personnalisée est une extension de la médecine traditionnelle qui repose sur une approche hautement individuelle pour chaque patient. L'un des outils les plus importants qui permet cette approche est la thérapie ciblée. En oncologie, elle se concentre principalement sur le blocage de la prolifération des cellules cancéreuses et des capacités d'angiogenèse en interférant avec des molécules spécifiques impliquées dans la croissance et la progression de la tumeur. De ce fait, les inhibiteurs de petites molécules et les anticorps monoclonaux sont les principaux médicaments actuellement utilisés pour cibler des voies biochimiques spécifiques dans les cellules cancéreuses (Krajewski KM., et *al.*, 2017 ; Huang M., et *al.*, 2014).

Cependant, tout comme les autres types de traitements contre le cancer du poumon, la thérapie ciblée a ses propres limites. Parmi ces limites, il y a la nécessité de l'identification d'une molécule cible qui est l'élément clé pour ce type de traitement. Par ailleurs, la deuxième limite est la toxicité qui apparaît durant le traitement, tout comme dans le cas de la chimiothérapie et la radiothérapie. Celle-ci dépend de la dose administrée pour chaque type de molécules. En général, la thérapie ciblée provoque moins d'effets indésirables que les agents cytotoxiques utilisés lors de la chimiothérapie. Cependant, les effets indésirables de la thérapie ciblée sont d'ordre digestifs, tels que, des diarrhées et des nausées et des vomissements qui sont moins

fréquent comparés à la chimiothérapie. Par contre les ITK ciblant l'EGFR peuvent provoquer des mucites et ceux qui ciblent EGFR et ALK peuvent générer une altération du goût. De plus, le coût de cette thérapie est considérablement plus élevé par rapport aux traitements classiques. Enfin, les principaux obstacles sont les mécanismes de résistance aux médicaments contre le cancer qui se développent souvent en réponse aux médicaments administrés. La résistance apparaît après un certain temps après le début de la thérapie, le plus souvent après 12 ou 18 mois. La plupart des patients développent une résistance à l'une des étapes du traitement, cela rend la suite du traitement impossible (Spaans JN., et Goss GD., 2014, Jakka S., et Rossbach M., 2013 ; Elkin EB., et *al.*, 2011 et Liu HB., et *al.*, 2013).

### **3.2.5. L'immunothérapie**

Les techniques d'immunothérapie émergent comme des traitements révolutionnaires contre le développement des cancers. Cependant, elle présente également comme tout autres types de traitements des limites et des défis à relever pour améliorer la survie des patients atteints de cancer. De ce fait, l'obstacle qui se dresse face à ces modalités de traitement est l'incapacité à prédire la réponse clinique ainsi que l'efficacité du traitement chez les patients. Jusqu'à présent, divers types de traitements d'immunothérapie n'ont été efficaces que dans un petit sous-ensemble de tumeurs malignes et généralement chez une petite proportion de patients atteints de ces maladies. En plus, les coûts de l'immunothérapie sont souvent très élevés, en particulier pour les thérapies les plus récentes et avancées, ce qui peut en limiter l'accès. La toxicité générée par l'immunothérapie reste légère comparée à la chimiothérapie et à la radiothérapie, mais les effets secondaires causés par l'immunothérapie restent gênants et voire graves chez certains patients. Les effets secondaires de ce type de traitement sont d'ordre immunologiques tels que le rash cutané, le prurit, les diarrhées, les nausées, la diminution de l'appétit, la dyspnée, la toux et la fatigue (Green AK., 2021 ; Yang Y., et *al.*, 2015 ; Gupta S., et Shukla S., 2022).

D'autre part, la plupart des patients développent inévitablement une résistance au traitement une fois celui-ci initié. Cette résistance constitue l'un des facteurs limitant la réussite du traitement. Elle se manifeste soit par une résistance primaire, ou bien une résistance acquise pour les patients ayant répondu initialement au traitement. Les mécanismes de la résistance immunitaire tumorale sont très complexes et multifactoriels : génétiques, métaboliques, inflammatoires. De ce fait, Il faudrait cibler les recherches sur les mécanismes de résistance à l'immunothérapie, pour augmenter le taux de réussite de ces thérapies et la survie des patients (Bain R., et *al.*, 2020 ; Taefehshokr S, et *al.*, 2022).

## II. Le microenvironnement de la tumeur cancéreuse

### 1. Définition du microenvironnement tumoral (MET)

Le microenvironnement tumoral (MET) ou bien stroma, désigne un écosystème complexe et hétérogène qui interagit avec la tumeur en permettant son évolution. De ce fait, la tumeur ne se résume pas uniquement en un ensemble d'amas de cellules cancéreuses, mais plutôt à un ensemble d'interactions entre les différents composants de cette entité complexe et en constante évolution. La composition du microenvironnement tumoral varie selon les types de tumeurs, mais les structures principales incluent : les cellules stromales (les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes) les vaisseaux sanguins et la matrice extracellulaire (Figure.19) (Di Martino J. S., et *al.*, 2019 ; El-Kenawi A. et *al.*, 2020 ; Truffi et *al.*, 2020).

Le MET est crucial dans la progression des cancers. Il induit une relation dynamique qui permet le soutien et la survie des cellules cancéreuses, l'invasion locale et la dissémination métastatique. Il permet de coordonner un programme qui favorise l'angiogenèse pour restaurer l'apport d'oxygène et de nutriments et pour éliminer les déchets métaboliques. De ce fait, les cellules stromales et la matrice extracellulaire jouent un rôle clé dans le processus de tumorigenèse. Elles peuvent remplir à la fois des fonctions pro et antitumorales modulant à la progression des tumeurs.

D'autre part, les diverses interactions qui se produisent entre les composantes du MET impliquent divers types de facteurs biomoléculaires tels que les facteurs de croissance, les cytokines, des enzymes de remodelage de la matrice extracellulaire et des chimiokines. De plus, il a été démontré que les exosomes et les corps apoptotiques jouent un rôle dans la promotion de la tumorigenèse et de la résistance aux médicaments. L'ensemble de ces interactions biomoléculaires permettent de réguler un grand nombre de perturbations des propriétés chimiques ou biophysiques des tissus tumoraux.

Lors de ces dernières années, diverses études s'intéressent aux caractéristiques du microenvironnement tumoral pour comprendre mieux ces mécanismes d'action qui influencent la croissance et la progression des tumeurs, sans oublier son rôle dans la résistance aux différents types de traitements. Enfin tous ces facteurs font du MET une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies (Arneth, B. 2019 ; Hinshaw D.C. et Shevde., 2019 ; Dzobo K., et *al.*, 2020 ; Anderson N.M., et Simon M.C., 2020).

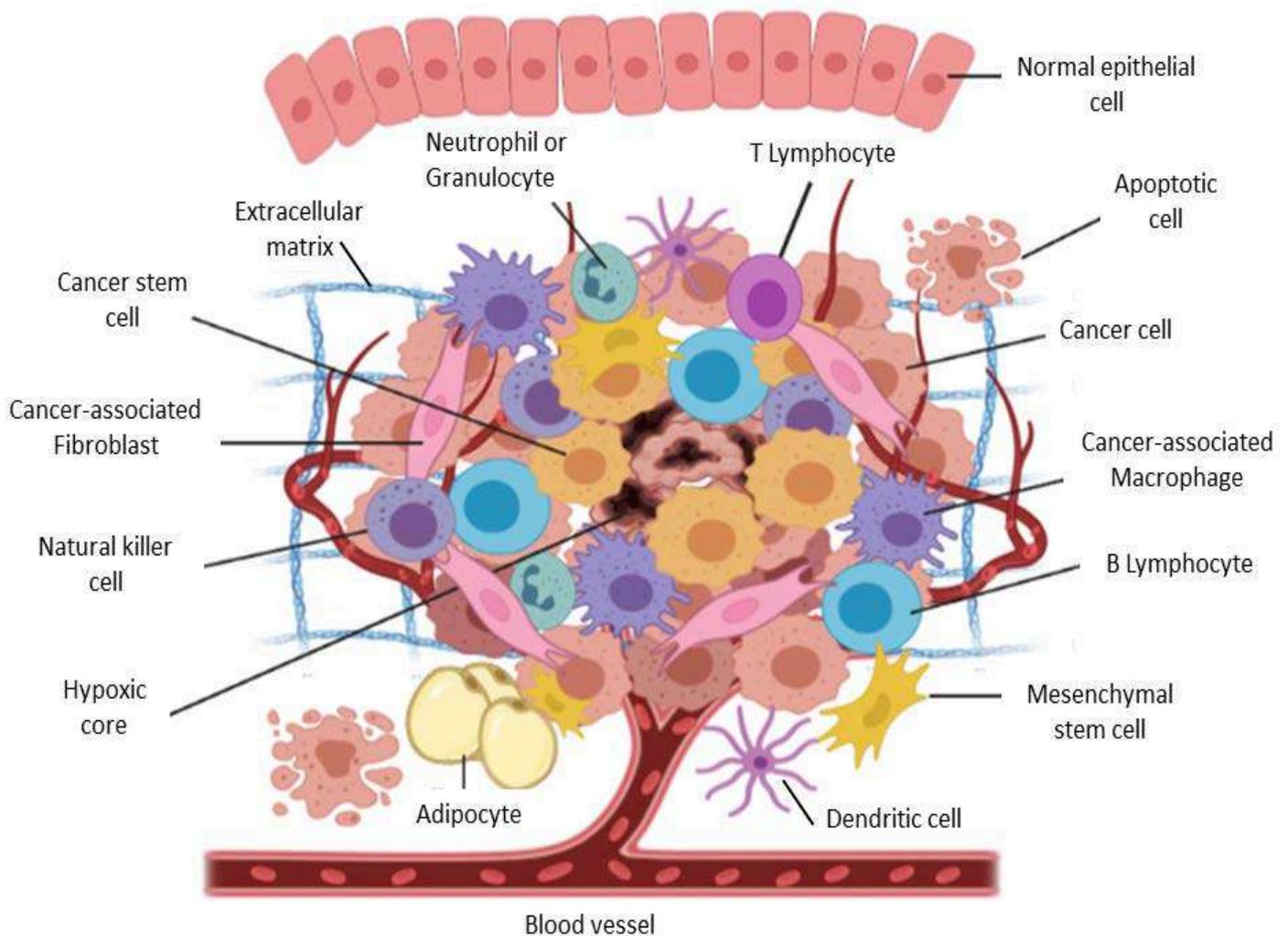


Figure.19. Les composantes du microenvironnement tumoral (Dzobo et al., 2023)

## 2. Les composantes du microenvironnement tumoral

### 2.1. Les composants cellulaires

#### 2.1.1. Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires sont des composants essentiels du microenvironnement tumoral. Elles peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la croissance tumorale. Les cellules immunitaires peuvent se diviser en deux catégories : les cellules immunitaires adaptatives et les cellules immunitaires innées. D'une part, l'immunité adaptative est activée par l'exposition à des antigènes spécifiques et utilise une mémoire immunologique pour évaluer la menace et renforcer les réponses immunitaires. Les cellules qui interviennent durant la réponse

immunitaire adaptative sont : les lymphocytes T, B et les cellules tueuses naturelles (NK). D'autre part, l'immunité innée est un mécanisme de défense non spécifique qui entre en jeu dans les heures qui suivent l'entrée d'un antigène étranger dans l'organisme. Les cellules qui effectuent une réponse immunitaire innée comprennent les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques.

### **2.1.1.1. Les lymphocytes T**

Les lymphocytes T appartiennent au système immunitaire adaptatif qui renforce la réponse immunitaire. Il permet d'effectuer à la fois une réponse spécifique à l'antigène et une réponse de mémoire contre le même agent infectieux. Cependant, différentes populations de lymphocytes T ont été identifiées dans le microenvironnement tumoral au cours des différentes étapes du développement de la tumeur. De ce fait, les lymphocytes T peuvent être soit effecteurs (anti-tumoraux) ou bien régulateur (pro-tumoraux). Concernant les lymphocytes T anti-tumoraux, ils sont représentés par les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> et les cellules NK.

Les lymphocytes T cytotoxiques ont des récepteurs spécifiques qui leur permettent d'identifier les antigènes anormaux exprimés sur les surfaces des cellules tumorales. Leur attachement aux cellules tumorales conduit à leur destruction. D'autre part, les lymphocytes T cytotoxiques jouent également un rôle important dans la prévention de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, en libérant l'interféron-gamma pléiotropique. En revanche, les cellules NK n'ont pas besoin d'une exposition préalable à un antigène pour exprimer leurs propriétés cytotoxiques, ceci leur permet de déclencher une réponse plus rapidement que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> (Maimela, N.R., et al. 2019 Shembrey C., et al., 2017 ; Nicholson S.E. et al., 2019 ; Lindau, D., et al., 2013).

D'autre part, les lymphocytes pro-tumoraux sont représentés par les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui représentent un sous-ensemble des cellules CD4<sup>+</sup>. Ces lymphocytes participent à la suppression de l'inflammation et des réponses immunitaires antitumorales. Dans un certain nombre de tumeurs, la présence importante de ces lymphocytes est liée négativement avec la survie. En effet ces cellules sont impliquées dans la régulation négative de la réponse immunitaire anti-tumorale. Par contre, les lymphocytes régulateurs contrôlent les fonctions des lymphocytes cytotoxiques en libérant des facteurs inhibiteurs tels que TGF- $\beta$  et les interleukines -2 et 10. Cependant, ces cellules sécrètent divers types de facteurs de croissances et de cytokines qui peuvent favoriser indirectement la tumorigénèse (Dees, S., et al., 2020 ; Stockis J., et al., 2019 ; Elkord, E., et al., 2018).

### **2.1.1.2. Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont des cellules immunitaires spécialisées, qui assurent plusieurs fonctions : la production des anticorps dans le corps, la présentation d'antigènes aux lymphocytes T ainsi que la sécrétion de diverses cytokines qui favorisent les réponses immunitaires cytotoxiques.

Les cellules B sont principalement localisées à la périphérie des tumeurs et dans les ganglions lymphatiques proches du site de la tumeur. De ce fait, il y a moins de lymphocytes B infiltrant le microenvironnement tumoral comparés aux lymphocytes T. Lors de récentes études, il a été démontré que les lymphocytes B jouent un rôle important au cours de la tumorigenèse. Ils peuvent infiltrer la tumeur en formant des structures lymphoïdes ectopiques au sein du microenvironnement tumoral. D'autre part il a été montré que les lymphocytes B sont pro-tumorigènes dans certaines tumeurs. Ainsi, les cellules B régulatrices produisent diverses cytokines dont IL-10 et TGF- $\beta$  qui favorisent la suppression immunitaire via leurs effets sur les macrophages et les lymphocytes T (Chen V.E., *et al.*, 2020 ; Corsiero *et al.*, 2019 ; Chen X., et Jensen P.E., 2008 ; Ghosh *et al.*, 2021 ; Rastogi *et al.*, 2022 ; Catalán D., *et al.*, 2021).

### **2.1.1.3. Les neutrophiles**

Les neutrophiles associés à la tumeur (TAN) sont des cellules importantes du système immunitaire. Ils sont la première ligne de défense contre de nombreux agents pathogènes lors d'une infection. Les TAN sont le type de granulocytes le plus fréquent et font partie du système immunitaire inné. Cependant, dans le microenvironnement tumoral leur rôle est complexe et peut varier en fonction du type de tumeur et de son stade de développement. Ils peuvent avoir soit des effets pro- ou bien anti-tumoraux. De ce fait, au début de la tumorigenèse, les neutrophiles sont recrutés dans le microenvironnement tumoral et favorisent l'inflammation en libérant des cytokines (IL-6) et radicaux libres qui peuvent conduire à l'apoptose des cellules tumorales (Nozawa *et al.*, 2006 ; Shaul M.E., *et al.*, 2019 ; Wu L., *et al.*, 2019).

Par contre, au stade avancé de la tumorigenèse, les neutrophiles libèrent divers facteurs de croissance tels que le VEGF, qui favorise l'angiogenèse et donc la tumorigenèse par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. D'autre part, les neutrophiles sont également impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire en produisant des métalloprotéases matricielles (MMP). Les MMPs sont également activement impliquées dans la promotion de

l'invasion des cellules tumorales et du développement de métastases en dégradant les molécules de la matrice extracellulaire (Masucci M.T., et *al.*, 2019 ; Jabłońska-Trypuć A., et *al.*, 2016 ; Youn et Gabrilovich, 2010 ; Houghton A.M. et *al.*, 2010 ; Tolle F., et *al.*, 2021).

Les neutrophiles peuvent contribuer à l'acquisition d'une résistance aux médicaments anticancéreux en réprimant le système immunitaire, en favorisant l'angiogenèse, ainsi qu'en augmentant la prolifération des cellules tumorales. Les neutrophiles activent également diverses cascades de signalisation qui empêchent le bon fonctionnement de nombreux médicaments anticancéreux tels que les bloqueurs de points de contrôle immunitaires et les médicaments cytotoxiques courants. En association avec les traitements standards, il peut être possible de mieux sensibiliser les cellules tumorales aux médicaments et ainsi prévenir la résistance aux médicaments et les rechutes (Masucci, M.T., et *al.*, 2019 ; Shaul M.E., et *al.*, 2019 ; Bui T.M., et *al.*, 2021).

#### **2.1.1.4. Les macrophages**

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné, qui jouent un rôle clé dans l'élimination des pathogènes, la cicatrisation des blessures et la réparation des tissus. Ces types de cellules répondent à la présence de pathogènes en présentant des antigènes et en effectuant leur phagocytose. Lors de la réponse immunitaire, les macrophages vont se différencier en deux sous-types : les macrophages de type M1 et M2 qui ont des fonctions différentes.

Les macrophages de type M1 sont le type de macrophages les plus prédominants au cours des stades initiaux de la tumorigenèse, car ils participent à la phagocytose des pathogènes et à la présentation des antigènes. Ils sont impliqués dans la réponse inflammatoire et l'immunité antitumorale. Les macrophages de type M2 quant à eux sont prédominants dans le microenvironnement tumoral et contribuent à la suppression de la réponse immunitaire et à la cicatrisation des blessures. Ils exercent des activités anti-inflammatoires et pro-tumorales. L'infiltration de tumeurs par les macrophages se produit tout au long du processus de tumorigenèse. Ils peuvent représenter jusqu'à un tiers de la masse de la tumeur à certains stades. Des rapports indiquent que des niveaux élevés de macrophages au sein des tumeurs sont associés à de faibles taux de survie dans divers cancers, car ils favorisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) via la libération de cytokines. De plus, les macrophages associés aux tumeurs jouent un rôle clé dans la résistance à la chimiothérapie et dans la promotion de la capacité tumorigène des cellules souches cancéreuses en augmentant la synthèse d'enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments (Almatroodi S.A., et *al.*,

2016 ; Heusinkveld M., et *al.*, 2011 ; Galdiero M.R., et *al.*, 2013 ; Solinas G., et *al.*, 2009 ; Chen J.J., et *al.*, 2005 ; Jayasingam S.D., et *al.*, 2020).

### **2.1.1.5. Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques ont pour fonction principale de reconnaître et de capturer des antigènes, puis de les présenter aux lymphocytes T. Elles se trouvent principalement dans les ganglions lymphatiques, où elles contribuent à la réponse des lymphocytes T face à une infection pathogène spécifique. L'infiltration de cellules dendritiques au sein de la tumeur est un marqueur de mauvais pronostic, car ils suppriment la réponse immunitaire dans la tumeur ou bien contribuent à la progression tumorale en stimulant la formation de lymphocytes Treg. De ce fait, les cellules dendritiques peuvent avoir des effets anti-tumoraux ou pro-tumoraux. D'autre part, les tumeurs peuvent exploiter les cellules dendritiques locales pour former des lymphocytes T suppressifs, entraînant une résistance aux médicaments (Li et *al.*, 2017 ; Fu et Jiang, 2018 ; Vicari A.P., 2002 ; Gajewski T.F., et *al.*, 2013 ; Lee Y.S., et *al.*, 2019 ; Zhou B., 2021).

### **2.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses**

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC), également connues sous le nom de cellules stromales mésenchymateuses, sont importantes pour la régénération et la réparation des tissus lors de blessures. Elles peuvent se différencier en différents types de cellules, notamment en ostéoblastes et en chondrocytes. Dans le microenvironnement tumoral, les MSC peuvent se transformer en cellules associées aux tumeurs, comme les fibroblastes activés (CAF) (Dzobo, K., 2016 ; Dzobo *al.*, 2021 ; Senthebane D.A., 2018).

Les MSC peuvent également contribuer à l'immunosuppression dans les tumeurs à des stades avancés. La différenciation des MSC en CAF peut avoir des effets durables sur la promotion de la tumorigenèse en raison de la libération continue de facteurs favorables à la croissance tumorale. Des études antérieures ont démontré l'implication des MSC dans la différenciation des CAF et la libération de facteurs de croissance, tels que le TGF- $\beta$  (Kass L., et *al.*, 2007 ; Papait A., et *al.*, 2020 ; Orimo A., et *al.*, 2005 ; Denton A.E., et *al.*, 2018).

### **2.1.3. Les fibroblastes associés au cancer (CAF)**

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont l'une des populations cellulaires les plus abondantes dans le microenvironnement tumoral. Ils sont principalement issus des fibroblastes qui résident dans les tissus sains. Normalement, les fibroblastes sont peu actifs dans les tissus sains et ne s'activent que dans des situations particulières, comme lors de la cicatrisation. En revanche, les CAF ont des capacités prolifératives et migratoires accrues et produisent de nombreux facteurs de croissance (TGF $\beta$ , le HGF et le PDGF). Les CAF sont activés par l'hypoxie tumorale ainsi que par les facteurs de croissance et les cytokines produits par les cellules tumorales et immunitaires. (Liu T., et *al.*, 2019 ; Shiga.K., et *al.*, 2015).

Ils ont un rôle pro-tumoral en régulant le microenvironnement immunitaire. Ils favorisent la différenciation des macrophages de type M2 et le recrutement de lymphocytes Treg pro-tumoraux. Ils limitent la réponse immunitaire anti-tumorale en inhibant l'activité cytotoxique des cellules NK et CD8+. Les CAF sécrètent MMP2 et MMP9, favorisant ainsi la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Ils soutiennent l'angiogenèse en produisant des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, le FGF et le SDF-1. Enfin, les CAF sont la source et le modulateur principal de la matrice extracellulaire (MEC), qui est capable de moduler l'évolution tumorale (Henke E., et *al.*, 2020 ; Sahai E., et *al.*, 2020).

### **2.1.4. Les cellules endothéliales**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins au cours de la tumorigenèse est initiée par les cellules endothéliales qui constituent la couche la plus interne des vaisseaux sanguins. Ce processus est essentiel pour permettre aux tumeurs de croître en fournissant des nutriments, de l'oxygène et l'évacuation des déchets métaboliques (Davies G., et *al.*, 2004 ; De Sanctis F., et *al.*, 2018).

Les cellules endothéliales jouent un rôle clé dans ce processus en libérant des facteurs de croissance qui favorisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, la libération non régulée de cytokines et de facteurs de croissance peut entraîner la formation de vaisseaux sanguins malformés qui fuient et favorisent la propagation des cellules cancéreuses vers d'autres tissus. De ce fait, les cellules endothéliales sont importantes pour la migration des cellules cancéreuses et la dissémination métastatique (Bergers, G., et Benjamin L.E., 2003 ; Yehya, A.H.S. et *al.*, 2018).

D'autre part, les cellules endothéliales peuvent également subir une transformation appelée « transition endothéliale à mésenchymateuse », qui leur permet de devenir des fibroblastes associés au cancer et favorisant ainsi la croissance tumorale. Enfin, les cellules endothéliales associées au cancer peuvent également moduler l'immunité anti-tumorale en perturbant l'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur et en favorisant la résistance aux médicaments (Potenta S., et *al.*, 2008).

### **2.1.5. Les adipocytes**

Le tissu adipeux est constitué de deux types de cellules, les adipocytes ou cellules graisseuses et le tissu adipeux blanc. Les adipocytes ont pour fonction le stockage de l'énergie et le maintien de l'équilibre énergétique dans le corps. Les adipocytes ont été identifiés comme jouant un rôle clé dans l'initiation et la progression des tumeurs en raison de l'énergie élevée requise par les cellules tumorales. De ce fait, les adipocytes peuvent être amenés à subir une lipolyse, qui convertit les lipides en acides gras utilisés par les cellules tumorales au cours de la tumorigenèse. Par ailleurs, les adipocytes sécrètent diverses biomolécules telles que des facteurs de croissance, des enzymes et des cytokines, qui peuvent induire un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), favorisant ainsi la migration et le développement de métastases. Cependant, ils sécrètent des hormones telles que, la leptine qui favorise la prolifération et la migration des cellules tumorales ainsi que, le recrutement de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral. D'autre part, plusieurs rapports montrent que les cellules adipeuses dans des organes tels que le sein se sont avérées pro-tumorigènes. Ainsi, le tissu adipeux blanc est lié à un risque accru de cancers et à la formation de tumeurs secondaires dans les poumons (Nieman K.M., et *al.*, 2013 ; Hefetz-Sela S., et *al.*, 2013 ; Ntikoudi E., et *al.*, 2014 ; Camarda R., et *al.*, 2018 ; Gao Y., et *al.*, 2020).

## **2.2. La composante vasculaire**

### **2.2.1. L'angiogenèse**

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux sanguins préexistants. L'angiogenèse est un processus normal et nécessaire pour la croissance et la réparation des tissus dans l'organisme, Cependant, ce même processus peut également être exploité par les cellules tumorales pour stimuler la croissance et la propagation

des tumeurs. Les cellules tumorales ont besoin de nutriments et d'un apport en oxygène, afin de pouvoir survivre au sein d'un microenvironnement hypoxique. Ceci nécessite donc la présence des cellules tumorales dans un environnement proche de vaisseaux sanguins. De ce fait, la formation de nouveau vaisseaux représente un élément essentiel pour la croissance et la progression des cellules tumorales (Lugano R., et *al.*, 2020 ; Teleanu R.I., et *al.*, 2019 ; Lutz J.C., et *al.*, 2019).

Dans le contexte tumoral, l'angiogenèse est principalement déclenchée par la tumeur elle-même en raison de l'environnement hypoxique qui y règne. En effet, les cellules tumorales ont une hyper-prolifération ce qui nécessite une quantité d'oxygène supérieure à celle qui est disponible, créant ainsi des zones hypoxiques dans la tumeur. Pour y remédier, les cellules tumorales libèrent des facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth factor), qui stimulent les cellules endothéliales tumorales. Ces cellules jouent un rôle clé en proliférant intensément pour créer de nouveaux vaisseaux sanguins. Ensuite elles se déconnectent des vaisseaux préexistants en migrant dans l'espace périvasculaire, puis elles commencent à se multiplier pour former de nouvelles structures vasculaires matures. Les facteurs pro-angiogéniques sont régulés positivement par les protéines de la famille HIF (*hypoxia inducible factor*), qui forment des hétérodimères HIF1- $\alpha$ /HIF1- $\beta$ , dont la sous-unité  $\alpha$  est responsable de l'activation transcriptionnelle des gènes pro-angiogéniques en présence d'un environnement hypoxique. En effet, le processus de l'angiogenèse est contrôlé par une variété de facteurs de croissance, de protéases, de molécules d'adhérence et d'autres médiateurs angiogéniques. Enfin, le niveau d'angiogenèse est directement lié à l'agressivité de la tumeur et permet d'évaluer le pronostic du patient (Ahlskog J, et *al.*, 2006 ; Nishida N., et *al.*, 2006 ; De Palma M., et *al.*, 2017 ; Multhoff G., et *al.*, 2020).

### **2.2.2. Les vaisseaux tumoraux**

Les vaisseaux sanguins tumoraux se distinguent des vaisseaux normaux par des défauts structuraux et fonctionnels de leurs cellules endothéliales. Les cellules endothéliales tumorales présentent une instabilité chromosomique sous forme d'aneuploïdie. D'autre part les péricytes qui ont comme fonction principal de stabiliser les vaisseaux sanguins sont moins présents et sont faiblement attachés aux cellules endothéliales. Ce déficit en péricytes, conduit à une perturbation des jonctions endothéliales qui aboutit à une désorganisation des vaisseaux tumoraux. De ce fait, ce détachement des péricytes des vaisseaux tumoraux causent une

altération de la membrane basale, ce qui entraîne l'apparition de plusieurs fuites à l'origine de l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux et donc à une réduction du flux sanguin.

L'ensemble de ces perturbations du système vasculaire tumoral augmente l'hypoxie, ce qui entraîne la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux avec les mêmes caractéristiques préalablement citées. Ceci aide les cellules tumorales à migrer vers d'autres organes pour former des métastases et contribue à la distribution inefficace des médicaments au sein du microenvironnement tumoral (De Palma M., *et al.*, 2017 ; Lutz J.C., *et al.*, 2019 ; Multhoff G., *et al.*, 2020).

## **2.3. La composante matricielle**

### **2.3.1. La matrice extracellulaire (MEC)**

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure complexe qui comprend des protéoglycanes, des protéines fibreuses telles que le collagène et l'élastine, ainsi que des protéines d'adhérence comme la fibronectine et la laminine. Elle est hautement dynamique et subit des remaniements constants pour répondre aux besoins des cellules. Cependant, la MEC constitue la partie structurelle du microenvironnement tumoral, située sous les couches épithéliales et entourant les cellules du tissu conjonctif (Walker *et al.*, 2018 ; Dzobo K., *et al.*, 2012).

L'élasticité et la rigidité de la MEC favorisent la tumorigenèse via la signalisation des intégrines. Ainsi, les changements dans la composition et l'élasticité de la MEC influencent de nombreux aspects de la tumorigenèse. Sa composition est en constante évolution et est influencée par des enzymes telles que les cathepsines, la LOX, les MMPs et leurs inhibiteurs spécifiques.

En effet, les changements liés aux enzymes dans la composition et les niveaux de densité de la MEC facilitent la migration des cellules tumorales via la création de « pores » permettant aux cellules tumorales d'envahir les tissus environnants et de se déplacer vers des tissus et organes distants.

Ces divers changements dans la composition et l'élasticité de la MEC ont un impact sur la tumorigenèse, en favorisant la croissance, la survie et la résistance au traitement des cellules cancéreuses. En effet, dans les tumeurs solides, la MEC peut constituer jusqu'à la moitié de la masse tumorale ce qui est associé à une mauvaise survie des patients (Stupack D.G., *et Cheresch D.A.* 2002 ; Cox T.R., *et Erler J.T.* 2011 ; Lu P., *et al.*, 2012 ; Sirica A.E., *et Gores G.J.* 2014).

Par ailleurs, la MEC est considérée comme un élément modulant la vascularisation tumorale en séquestrant des facteurs de croissance et des cytokines tels que le TGF- $\beta$ , le VEGF et le PDGF. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est importante pour la croissance tumorale, mais une MEC rigide peut comprimer les vaisseaux sanguins et donc limiter le flux de médicaments et d'oxygène dans la tumeur. De ce fait, la MEC représente un obstacle physique à la distribution des médicaments dans les tumeurs (Morin P.J. 2003 ; Campbell N.E., et *al.*, 2010 ; Rohwer N., et *al.*, 2011 ; Holle A.W., et *al.*, 2016 ; Cox, T.R. 2021).

### **2.3.2. L'hypoxie tumorale**

L'hypoxie est due à la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses, qui est souvent associée à une insuffisance d'oxygène et de nutriments dans certaines zones de la tumeur. Cette carence est due au fait que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins via l'angiogenèse, ne se produit pas assez rapidement pour fournir suffisamment d'oxygène à toutes les cellules cancéreuses en prolifération. Cela entraîne la formation de zones hypoxiques où le niveau d'oxygène est inférieur à 2%. Les cellules cancéreuses dans ces zones hypoxiques acquièrent un phénotype différent de celles qui ont un accès suffisant à l'oxygène, ce qui les rend plus agressives et résistantes aux traitements (Harris A.L., 2002 ; Finger E.C. et *al.*, 2010 ; Jing X., et *al.*, 2019). Les zones hypoxiques de la tumeur présentent également des niveaux élevés de HIF-1  $\alpha$ , qui joue un rôle clé dans le développement du cancer. HIF-1  $\alpha$  influence l'expression génique et le métabolisme en réponse à l'hypoxie. Il facilite la migration et la formation de métastase des cellules cancéreuses en modulant la synthèse et l'organisation des fibres de collagène et des interactions intégrine-matrice extracellulaire au sein du microenvironnement tumoral. En outre, la pression du liquide interstitiel augmente en raison de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ce qui facilite la propagation des cellules cancéreuses (Gilkes D.M., et *al.*, 2013 et 2014).

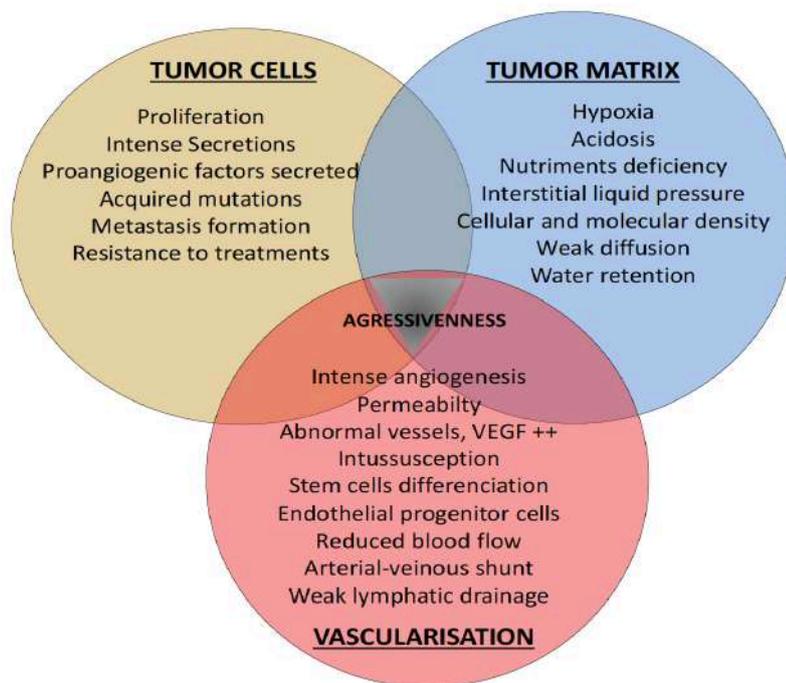
Les zones hypoxiques du microenvironnement tumoral favorisent également la suppression du système immunitaire en abritant des macrophages associés au cancer de type M2 et en modifiant le comportement des cellules myéloïdes suppressives. En outre, l'hypoxie peut altérer le métabolisme et empêcher l'apoptose des cellules cancéreuses, ce qui conduit à une résistance accrue aux traitements médicamenteux. Enfin, l'hypoxie tumorale peut être un facteur pronostique dans les cancers associés à des résultats défavorables. Par conséquent, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être développées pour cibler l'hypoxie tumorale en utilisant

différents composants du microenvironnement tumoral (Chiu D.K.-C., et *al.*, 2017 ; Du Souich P., et *al.*, 2011 ; Park T.E., et *al.*, 2019).

### **3. L'agressivité tumorale**

L'agressivité et l'expansion tumorales sont liées à la complexité des trois composantes majeures du microenvironnement tumoral : la matrice extracellulaire, la composante cellulaire et surtout la composante vasculaire. Les interactions entre les différentes composantes du microenvironnement tumoral causent une augmentation de l'agressivité tumorale (Figure. 20). Ainsi, les tumeurs se comportent différemment au sein des zones hypoxiques, les cellules adoptent un comportement distinct de celui des cellules cancéreuses ayant un accès adéquat en oxygène. Par conséquent, certaines cellules deviennent plus agressives et développent une résistance accrue aux traitements (Harris A.L., 2002 ; Finger E.C. et *al.*, 2010 ; Jing X., et *al.*, 2019 ; Lutz J.C. et *al.*, 2019).

D'autres part, l'ensemble des caractéristiques du système vasculaire tumoral augmente l'hypoxie, ceci mène à la formation de vaisseaux sanguins défailants qui augmentent la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ainsi, ces brèches vasculaires facilitent la migration des cellules tumorales vers d'autres organes pour former des métastases. De même, cela contribue à la distribution inefficace des médicaments au sein du microenvironnement tumoral. L'ensemble de ces interactions est la cause majeure de la résistance aux différents types de traitement. Ces données expliquent donc les limites des traitements cliniques aujourd'hui disponibles, dont les cibles ne sont pas toujours optimales et pas assez adaptées à la tumeur du patient. Ainsi, il faudrait penser à améliorer le criblage thérapeutique. Ce constat motive donc le développement de nouveaux modèles d'études pour reproduire cette complexité du MET. Ainsi, les modèles 3D apportent une valeur ajoutée en repoussant les limites des traitements standardisés, permettant ainsi le développement de thérapies innovantes et orientées vers une médecine personnalisée (De Palma M., et *al.*, 2017 ; Lutz J.C., et *al.*, 2019 ; Park T.E., et *al.*, 2019 ; Multhoff G., et *al.*, 2020).



**Figure.20. Les interactions entre les différentes composantes du microenvironnement tumoral (Lutz J.C. et al., 2019)**

### III. Les plateformes de criblage

La complexité de la composition du microenvironnement tumoral (MET) a poussé les chercheurs à étudier de plus près les interactions entre les différentes composantes de ce dernier, aussi que les mécanismes qui jouent un rôle clé dans le processus de développement et de propagation de la tumeur. Ainsi, il est devenu crucial de développer des plateformes de substitution optimales qui vont permettre d'étudier les caractéristiques complexes des cellules cancéreuses, telles que leur migration, leur prolifération et leur chimiorésistance. Cependant, il s'est avéré difficile de reproduire toutes les interactions complexes des cellules tumorales. La tâche est donc difficile à réaliser *in vitro* et *in vivo* (Hoarau-Véchet J., et al., 2018).

Cependant, la mise en place de ces plateformes ou bien modèles de cultures cellulaires permet de mieux comprendre la biologie cellulaire, caractéristiques histologiques, les mécanismes pathologiques et l'action des médicaments. En effet, elles sont souvent utilisées dans la recherche préclinique pour de nombreux médicaments, aussi bien dans la recherche sur le cancer que dans les études génétiques. Dans le domaine de la recherche sur le cancer, le choix des méthodes de culture cellulaire peut permettre de mieux comprendre la biologie des tumeurs

et voire même de trouver de nouvelles stratégies de traitement. De ce fait, le type de culture le plus couramment utilisé est le modèle 2D, mais récemment de nouvelles plateformes de culture cellulaire 3D sont en cours de création pour mieux mimer les conditions *in vivo* (Pampaloni F., et al., 2007 ; Aggarwal B., et al., 2008 ; Sanyal S., 2014).

## **1. Les modèles 2D**

Depuis plus d'un siècle, les cultures cellulaires en deux dimensions (2D) ont été utilisées comme modèles *in vitro* pour étudier les réponses cellulaires aux stimuli provenant de signaux biophysiques et biochimiques. Cependant, la culture cellulaire conventionnelle en 2D repose sur l'adhérence des cellules à une surface plane. Les cellules se développent ainsi en une monocouche dans une fiole de culture, dans une boîte de Petri en verre, un puits en polystyrène pour fournir un support mécanique aux cellules. De ce fait, la croissance cellulaire en monocouche 2D permet d'avoir accès à une quantité similaire de nutriments et des facteurs de croissances présents dans le milieu. Ceci entraîne une croissance et une prolifération homogènes. Cette caractéristique rend les plateformes 2D attrayantes pour les biologistes et les cliniciens dans la recherche en cancérologie, de même leur simplicité et leur efficacité pour la réalisation des tests fonctionnels avec un faible coût est avantageux (Breslin S., et O'Driscoll L., et al., 2013 ; Edmondson R, et al., 2014).

Cependant, dans le contexte tumoral, la plupart de ces méthodes en 2D ne permettent pas de contrôler la forme et le phénotype des cellules et de reproduire l'organisation des tissus tumoraux. En effet, il existe différents types de techniques qui sont utilisées pour essayer de combler les lacunes des plateformes 2D afin de contrôler la forme des cellules tels que, le micro-patterning et la culture en sandwich, il existe différents types de substrats micro-patterning, qui ont été créés pour personnaliser la forme des cellules et aider à étudier les effets de la forme des cellules sur les bioactivités tels que, des îlots adhésifs, des micropuits et des micropiliers. Néanmoins, ces modèles pseudo-3D induisent une polarité apicobasale qui est peu naturelle *in vivo* pour certains types de cellules. Cette polarité artificielle peut altérer les fonctions des cellules natives en ce qui concerne la diffusion, la migration et la détection de facteurs solubles et autres indices microenvironnementaux. L'effet de la polarisation cellulaire en culture 2D peut être atténué en utilisant une méthode de culture sandwich qui ajoute une couche d'ECM au-dessus des cellules pour éliminer la polarité apico-basale et fournir une imitation de la matrice extracellulaire en 3D (Xu X., et al., 2014 ; Dupont S., et al., 2011 ; Fu J., 2010 ; Ihalainen TO., et al., 2015 ; Bi YA., et al., 2006).

En revanche, malgré les nombreux avantages des cultures adhérentes, ces modèles présentent de nombreux inconvénients. Les interactions en 3D entre les cellules et leurs microenvironnements sont cruciales pour la différenciation cellulaire, la prolifération, la vitalité, l'expression génique et protéique, la sensibilité aux stimuli, le métabolisme des médicaments et autres fonctions cellulaires. En outre, en raison des perturbations dans leurs interactions avec l'environnement externe, les cellules en cultures adhérentes perdent leur polarité et leur réponse à divers phénomènes, tels que l'apoptose (Mseka T., et *al.*, 2007 ; Weaver V., et *al.*, 2002 ; Meyers J., et *al.*, 2003).

Un autre inconvénient est que les cellules en monocouche ont un accès illimité aux ingrédients du milieu, ce qui ne reflète pas la disponibilité variable de nutriments et d'oxygène dans la masse tumorale *in vivo*. De plus, les cultures avec adhérence modifient l'expression génique, l'épissage, la topologie et la biochimie de la cellule. Elles ne permettent l'étude que d'un seul type de cellule, ce qui empêche la représentation adéquate de l'environnement tumoral *in vivo*. Les modèles 2D ne permettent pas une bonne évaluation des traitements, malgré leur sensibilité élevée comparé au modèles 3D. A cause de ces nombreux inconvénients des systèmes 2D, il était nécessaire de trouver des modèles alternatifs, capables de mieux mimer la masse tumorale naturelle du patient, tels que les systèmes de culture 3D (Griffith LG., et Swartz MA., 2006 ; Cawkill D., et Eaglestone SS., 2007 ; Pampaloni F., et *al.*, 2007 ; Birgersdotter A., et *al.*, 2005).

## **2. Les modèles 3D**

Lors de ces dernières années, l'utilisation de modèles tridimensionnels (3D) de tumeur générée par ingénierie tissulaire a gagné en popularité grâce aux avancées récentes dans le domaine de la recherche sur le cancer. Ces modèles sont plus proches de la réalité biologique que les cultures cellulaires en 2D qui présentent beaucoup de limitations pour mimer les conditions *in vivo*.

Dans le domaine de la recherche sur le cancer et les tests de médicaments anticancéreux, différentes méthodes sont utilisées, notamment les cultures en 2D, les xénogreffes et les modèles de souris syngéniques. Cependant, les cultures en 2D sont considérées comme trop simplistes car elles ne parviennent pas à reproduire la complexité et les interactions dynamiques du microenvironnement tumoral (MET). D'autre part, pour confirmer un phénomène ou un mécanisme observé *in vitro*, l'approche habituelle et courante consiste à utiliser des tests standard sur des animaux, appelés « modèles animaux ». Toutefois, de nombreuses préoccupations existent concernant le bien-être et la douleur des animaux dans certaines

conditions expérimentales. Ces modèles sont souvent coûteux, complexes à gérer et soulèvent des problèmes éthiques. De plus, l'obtention d'une concordance entre les modèles animaux et les essais cliniques reste un défi majeur, avec un taux moyen de résultats concordants qui ne dépasse guère 8%. De ce fait, le développement de modèles 3D humains de cancer est un objectif important en termes de cadre 3R (remplacer, réduire et raffiner) pour s'affranchir de l'utilisation de modèles animaux. Par conséquent, la mise en place de modèles 3D permettrait d'éliminer les différences inter espèces, et ainsi de tester directement les médicaments sur des modèles humains (Voskoglou-Nomikos T., et *al.*, 2003 ; Kimlin et *al.*, 2013 ; Mak I.W., et *al.* 2014 ; Díaz et *al.*, 2020).

En effet, l'ensemble de ces données ont braqué les projecteurs sur l'utilisation de diverses approches pour créer des modèles 3D, afin de mieux comprendre la croissance tumorale. Ces plateformes 3D peuvent surmonter l'ensemble des limitations des autres modèles, ainsi de combler le fossé entre la faisabilité expérimentale et la pertinence physiologique. De ce fait, les modèles 3D peuvent reproduire les signaux mécaniques et biochimiques cruciaux pour le développement du cancer, tels que la morphologie, les interactions cellule-cellule/cellule-matrice extracellulaire, la rigidité tissulaire et les gradients spécifiques (Duval K., et *al.*, 2017 ; Langhans S.A., 2018 ; Jensen C., et Teng Y., 2020).

En revanche, les nouveaux modèles 3D n'atteignent pas la complexité du microenvironnement tumoral. Ils ne présentent généralement que des interactions spécifiques entre une composante du microenvironnement tumoral et les cellules tumorales. Néanmoins, les récents progrès dans les modèles tridimensionnels de cancer nourrissent l'espoir de pouvoir améliorer la découverte de nouveaux médicaments, d'être utilisés comme plateformes de test de médicaments et de permettre le développement de traitements personnalisés contre le cancer. De ce fait, la recherche de modèles 3D optimaux qui imitent fidèlement la spécificité du microenvironnement tumoral est devenue un enjeu majeur pour la communauté scientifique. (Weigelt et *al.*, 2014 ; Asghar W., et *al.*, 2015 ; Valkenburg et *al.*, 2018 ; Melissaridou S., et *al.*, 2019 ; Jensen C., et Teng Y., 2020).

## 2.1. Les différents types de modèles 3D *in vitro*

Dans le domaine de la modélisation 3D du cancer, il existe différents types de modèles 3D reproduisant avec précision la complexité des tumeurs et leurs microenvironnement (Figure.21).

L'objectif principal de ces modèles est la création d'une compartimentalisation précise entre la tumeur et son microenvironnement, tout en reproduisant les interactions existantes entre ces différents composants (Pampaloni et al., 2007).

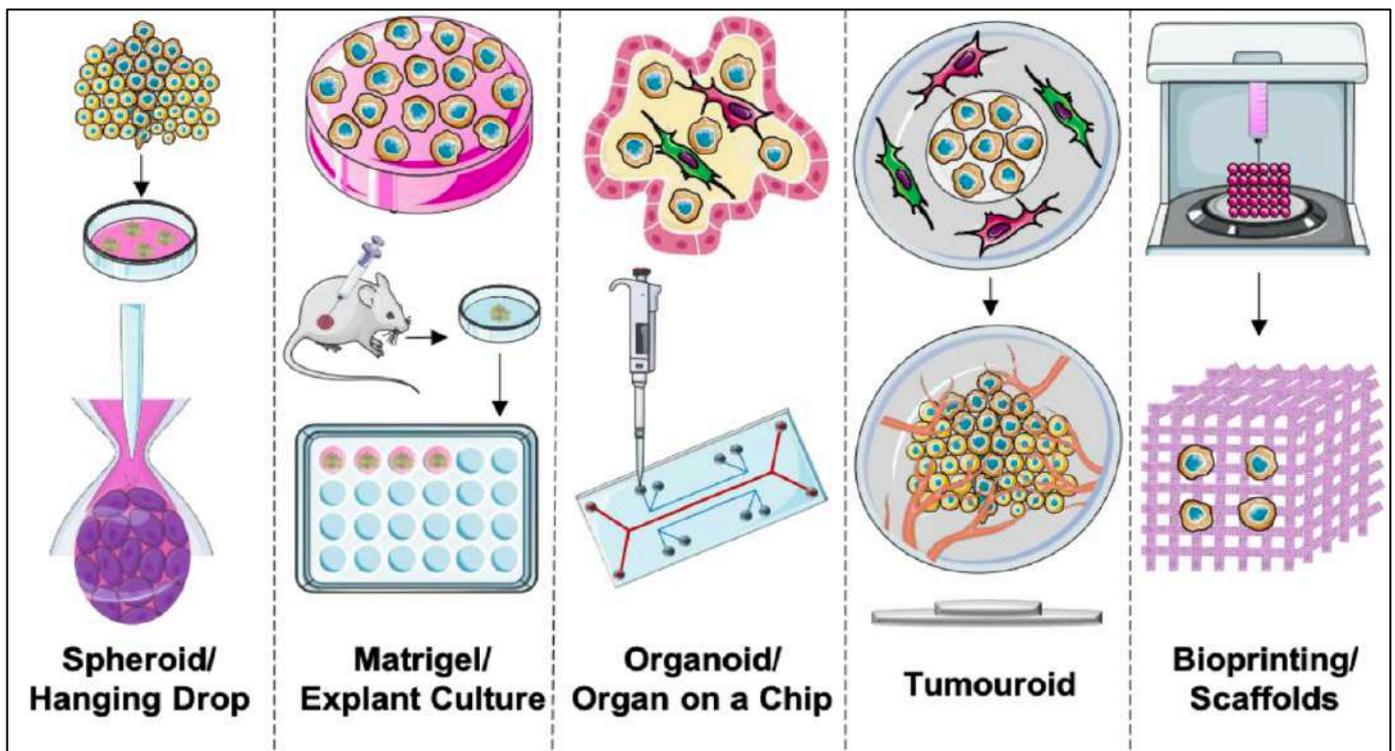


Figure.21. Les principaux modèles 3D actuellement utilisés pour modéliser la tumeur et son microenvironnement (Pape et al., 2021).

### 2.1.1. Les sphéroïdes

Les sphéroïdes sont l'un des modèles 3D les plus utilisés pour l'étude de la biologie des tumeurs, en particulier pour tester les médicaments anticancéreux. Ils reproduisent de manière précise les caractéristiques importantes des tumeurs : l'hétérogénéité cellulaire, les voies de signalisation cellulaire, les interactions cellule-cellule/cellule-MEC, les schémas d'expression génétique similaires à ceux des conditions *in vivo*, ainsi qu'une morphologie tumorale composée

de différentes couches cellulaires. Tels que, diverses techniques peuvent être utilisées pour produire des sphéroïdes cellulaires tels que, la technique des gouttes suspendues et des plaques à faible adhérence (ULA en forme de U ou V). Ces techniques permettent la formation d'amas de cellules cancéreuses, et donc permettent aux cellules cancéreuses d'être en proximité immédiate les unes des autres dans une configuration en 3D, elles forment une "masse", en effet qui permet l'accumulation de fibres collagènes. La plupart de ces méthodes sont relativement simples et permettent une grande capacité de traitement, tout en offrant la flexibilité d'intégrer plusieurs types de cellules ou différents types de gradients (Costa EC., et *al.*, 2016 ; De Angelis et *al.*, 2018).

Pour la formation des sphéroïdes, certains aspects importants de l'environnement tumoral ne sont pas reproduits en raison de l'absence de la matrice extracellulaire. Cependant, les principaux avantages des sphéroïdes sont leur grande capacité de traitement, leur reproductibilité, leur facilité d'utilisation et le faible coût des méthodes utilisées pour leur formation. De plus, les sphéroïdes contiennent un gradient d'oxygène, entraînant une mort cellulaire au sein du noyau où l'hypoxie est la plus intense. Bien que la surface des sphéroïdes présente une perméabilité élevée aux nutriments et à l'oxygène grâce au contact direct avec le milieu nutritif, il n'y a pas d'espaces pour les compartiments les plus profonds du stroma, ceci limite ainsi les interactions entre les cellules tumorales et stromales, à moins d'utiliser une co-culture au sein du sphéroïde lui-même. Grâce à cette diffusion restreinte des nutriments et de l'oxygène dans le noyau. Les sphéroïdes de plus grande taille (d'un diamètre de 500  $\mu\text{m}$ ) reproduisent bien le microenvironnement des micro-métastases et des tumeurs avasculaires. Ainsi, ils constituent un modèle adéquat pour examiner les conséquences de l'hypoxie sur le développement tumoral (Däster S., et *al.*, 2017 ; Yakavets et *al.*, 2019 ; (Lucendo-Villarin et *al.*, 2020).

Enfin, les sphéroïdes sont une méthode de culture tridimensionnelle largement utilisée et économique, pouvant être combinée avec des technologies plus pointues telles que l'impression 3D de tissus, les dispositifs micro-fluidiques et les plates-formes d'échafaudages, afin de générer des modèles de tumeurs plus représentatifs des tumeurs. Les sphéroïdes de cellules tumorales sont particulièrement utiles pour l'étude des cancers qui forment des agrégats de cellules tumorales étroitement regroupées, comme c'est le cas dans le cancer du poumon (Nath S., et Devi, G.R., 2016).

### 2.1.2. Les organoïdes

Les organoïdes sont formés par la prolifération et l'auto-organisation de cellules progénitrices et peuvent reproduire de manière fidèle la structure et l'architecture tridimensionnelle du tissu dont ils proviennent. Étant donné que les organoïdes tumoraux se développent généralement à partir d'une seule cellule en une structure tridimensionnelle et suivent les différentes étapes de développement des tumeurs naturelles, ces modèles 3D sont capables de préserver dans une plus grande mesure l'hétérogénéité cellulaire propre à la tumeur d'origine. Ainsi, ils conservent la physiopathologie de la tumeur *in vitro*, y compris ses caractéristiques génétiques et phénotypiques spécifiques (Drost, J., et Clevers, H. 2018 ; Sachs, N. et *al.*, 2018).

Cependant, contrairement aux sphéroïdes qui sont formés par l'agrégation forcée de plusieurs cellules en une structure en 3D, les organoïdes tumoraux se développent naturellement en une forme tridimensionnelle en fonction de leur programmation génétique. Cette capacité à se développer de manière autonome reflète plus fidèlement le processus réel de développement d'une tumeur. Ceci confère ainsi aux organoïdes un avantage par rapport aux sphéroïdes ou à d'autres cultures en 3D. De plus, les organoïdes offrent l'avantage d'une culture efficace en utilisant les propres cellules d'un patient, les positionnant ainsi comme une alternative plus avantageuse aux xénogreffes tumorales dérivées de patients. Ces xénogreffes sont coûteuses et demandent beaucoup de temps de travail. De plus, les organoïdes sont plus économiques et physiologiquement pertinents que les modèles animaux. En revanche, le fait de travailler avec des organoïdes présente également certains inconvénients : un temps de culture plus long, une difficulté d'atteindre une maturité similaire à celle observée *in vivo*, une variabilité importante les expériences, un manque de vascularisation et du stroma (Dutta D., et *al.*, 2017 ; Fan H., et *al.*, 2019).

En raison de leur capacité à préserver des caractéristiques tumorales essentielles, les organoïdes sont devenus une plateforme adaptée pour étudier les interactions entre la tumeur et le microenvironnement tumoral, ceci ouvre à ces modèles une nouvelle porte de combinaison avec d'autres méthodes plus sophistiquées tel que l'impression 3D. Ainsi, l'intégration de l'impression 3D avec les organoïdes présente un potentiel pour permettre un agencement spatial approprié des cellules dans des structures 3D complexes, tout en préservant l'architecture hiérarchique du microenvironnement tumoral et en améliorant la reproductibilité du modèle (Fan H., et *al.*, 2019).

### 2.1.3. Les tumoroides

La recherche autour des organoïdes spécifiques aux cancers s'intensifie ; en particulier en intégrant une matrice extracellulaire dense composée de collagène de type I ou d'autres biomatériaux. Ces modèles sont appelés "tumoroides". Ils sont développés dans le but de servir de modèles préliminaires aux études *in vivo*, car ils permettent de reproduire non seulement la masse tumorale elle-même, mais aussi l'environnement stromal qui l'entoure. La frontière de la tumeur est précisément modélisée en implantant une masse tumorale à l'intérieur d'un compartiment stromal. Dans ces modèles, il est possible de mesurer directement la distance d'invasion depuis l'origine (Magdeldin et *al.*, 2017 ; Pape et *al.*, 2019).

Ces modèles peuvent présenter un coût élevé en fonction du type de tumeur. Cependant, ils offrent un haut degré de reproductibilité et une perméabilité adéquate à l'oxygène et aux nutriments. En effet, les modèles de tumoroides présentent un coefficient de diffusion élevé pour le glucose et l'oxygène, ce qui favorise leur approvisionnement. D'autre part, des études de mesure de la consommation d'oxygène spécifique aux cellules ont montré que celle-ci peut refléter le profil métabolique distinct des différentes populations cellulaires. Afin de mimer au mieux le microenvironnement tumoral, le modèle de tumoroïde peut être combiné avec d'autres systèmes micro-fluidique. (Rong et *al.*, 2006 ; Cheema et *al.*, 2012 ; Streeter et Cheema., 2011 ; Azimi et *al.*, 2020).

### 2.1.4. Les modèles à base d'échafaudage

L'utilisation d'échafaudages biologiques dans les modèles 3D plus complexes permet de recréer de manière biomimétique la matrice extracellulaire (MEC) dans laquelle les cellules cancéreuses se développent. Le but est de reproduire fidèlement la structure et les propriétés de la masse tumorale initiale. Parmi les échafaudages couramment utilisés, il y a les matrices décellularisées, le Matrigel, le collagène et d'autres biomatériaux favorables (Tanner et Gottesman., 2015).

D'autre part, il existe d'autres options pour recréer la MEC de manière similaire, premièrement, l'utilisation de tissus humains décellularisés, qui permet de préserver la composition et l'architecture de la MEC naturelle. Deuxièmement, les hydrogels bio-imprimés en 3D, fabriqués à partir de divers matériaux, offrent une grande flexibilité pour ajuster les propriétés mécaniques et chimiques de la MEC. Ainsi, des hydrogels d'acide hyaluronique imprimés peuvent être modulés en termes de rigidité pour imiter différentes conditions tissulaires. Enfin, l'utilisation

des hydrogels de peptides auto-assemblants peuvent former des structures similaires à la MEC en s'auto-organisant dans des arrangements spécifiques (Mollica et *al.*, 2019 ; Yang et *al.*, 2020 ; Bonnesoeur et *al.*, 2020).

Les échafaudages utilisés dans la recherche sur le cancer permettent la co-culture de cellules cancéreuses avec des cellules stromales, ainsi que l'incorporation de facteurs chimiques et de protéines de la matrice extracellulaire. Ces modèles peuvent être optimisés pour être utilisés à haut débit et présentent généralement une bonne perméabilité aux nutriments et à l'oxygène. Cependant, il est important de noter que ces modèles peuvent également être coûteux. Le modèle d'échafaudage le plus utilisé pour reproduire la MEC est le Matrigel<sup>®</sup>, qui est connu pour présenter une grande variabilité d'un lot à l'autre en termes de composition de la matrice extracellulaire ajoutée. Cependant, le Matrigel<sup>®</sup> est constitué d'un mélange de protéines de la membrane basale dérivées du sarcome de la souris Engelbert-Holm-Swarm. Ainsi, le Matrigel<sup>®</sup> est composé d'environ 60% de laminine, 30% de collagène IV et 8% d'entactine, avec l'ajout de divers facteurs de croissance tels que TGF- $\beta$ , EGF et VEGF à des concentrations inconnues. Il est ainsi couramment utilisé pour cultiver les cellules cancéreuses primaires. Ces différences dans sa composition et sa préparation peuvent entraîner une grande variabilité dans les résultats expérimentaux. (Hughes et *al.*, 2010 ; Nyga et *al.*, 2011).

De plus, l'utilisation du Matrigel<sup>®</sup> ne permet pas d'obtenir des compartiments distincts entre la tumeur et le stroma en raison de la densité de sa matrice. De ce fait, certaines recherches remettent en question la pertinence de l'implantation de cellules tumorales dans une matrice de lame basale. En effet, le tissu humain est principalement composé de collagène de type I, ainsi que d'autres composants importants de la matrice extracellulaire tels que les protéoglycanes et les glycosaminoglycanes.

Enfin, l'ensemble de ces approches innovantes offrent de nouvelles possibilités pour créer des modèles 3D plus sophistiqués qui reproduisent fidèlement le microenvironnement tumoral, ceci permet d'étudier plus précisément les interactions entre les cellules cancéreuses et leur environnement. Cependant, il est important de noter que chaque échafaudage présente ses avantages et ses limitations spécifiques. Le choix de l'échafaudage dépendra des caractéristiques souhaitées du modèle tumoral à construire.

(Theocharis et *al.*, 2003).

### 2.1.5. Les modèles micro-fluidiques

La microfluidique, développée dans les années 1990, offre une opportunité unique pour la culture cellulaire en trois dimensions et les tests basés sur les cellules. Elle permet de créer des plateformes permettant de développer des microenvironnements complexes et dynamiques, qui sont contrôlables, reproductibles et optimisables. Cette technologie est largement utilisée dans la recherche biomédicale pour étudier divers aspects de la biologie cellulaire. Elle permet notamment l'analyse des cellules individuelles, les analyses génétiques, les études sur les protéines, la signalisation intracellulaire, l'étude de la résistance aux médicaments, l'évaluation de la toxicité des médicaments, la détection des agents pathogènes, la culture cellulaire, et l'ingénierie tissulaire (Salieb-Beugelaar GB., et al., 2010 ; Wheeler AR., et al., 2003 ; Li X., et al., 2011 ; Li XJ., et al., 2005 et 2011 ; Derda R., et al., 2009 ; Meyvantsson I., et al., 2008).

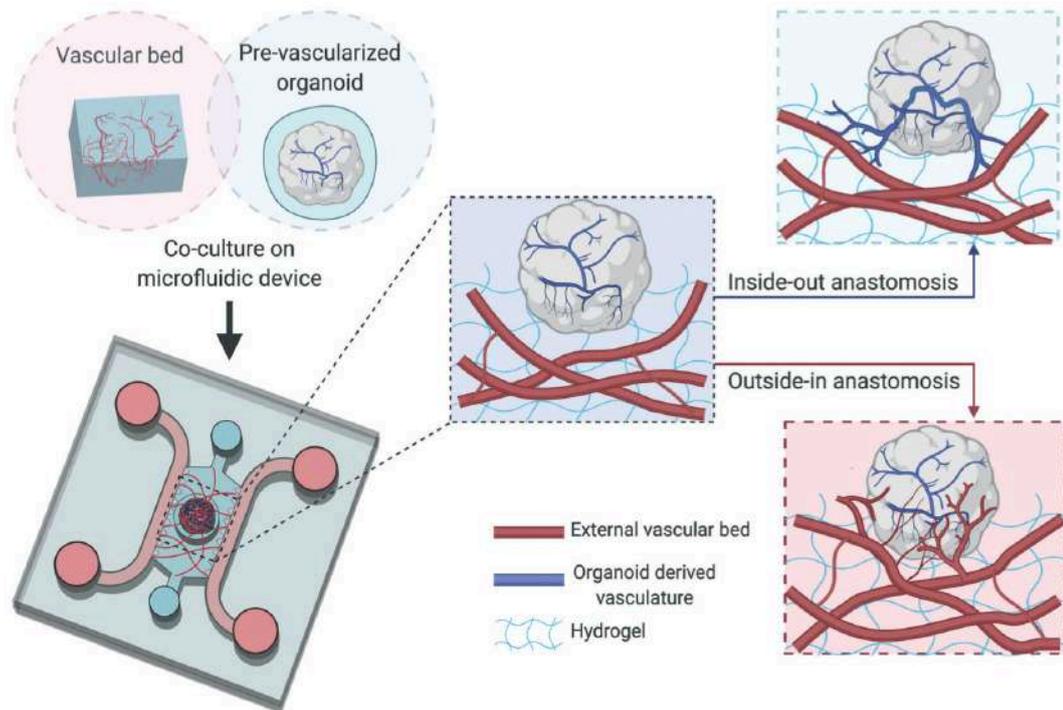
La micro-fluidique a apporté une avancée significative en permettant la reproduction des conditions biophysiques et chimiques naturelles des cellules dans ces modèles *in vitro*. Son objectif principal est de créer des plateformes, connues sous le nom de dispositifs « organ-on-chip », qui sont capables de modéliser les fonctions physiologiques et pathologiques des tissus et des organes. Ces dispositifs sont conçus pour imiter les caractéristiques spécifiques des tissus et des organes, en reproduisant les flux de liquide, les gradients de nutriments, les forces mécaniques et d'autres paramètres importants. Cela permet aux chercheurs d'étudier et de comprendre plus précisément les mécanismes cellulaires et les interactions tissulaires, tout en réduisant la nécessité de tests sur des modèles animaux. Ces plateformes sont constituées d'un réseau de canaux micro-fluidiques qui permettent la culture de cellules dans des conditions de perfusion continue. Cependant, ce qui distingue les modèles micro-fluidiques des autres modèles, c'est leur capacité à concevoir des systèmes de culture 3D complexes où différents paramètres peuvent être ajustés et contrôlés de manière indépendante. En effet, cette flexibilité permet d'optimiser les conditions de survie cellulaire et de reproduire de manière plus précise l'environnement physiologique *in vivo* (Bhatia S.N., et Ingber D.E., 2014).

En outre, ces dispositifs exploitent des volumes à l'échelle microscopique, ceci les rend plus économiques par rapport à d'autres méthodes de culture 3D et aux bioréacteurs. De plus, ils offrent la possibilité de réaliser des criblages à haut contenu et à haut débit, tout en assurant un niveau de contrôle plus élevé. Cependant, il est important de noter que la fabrication de ces modèles nécessite des compétences spécialisées. Dans ce contexte, les progrès rapides des nouvelles techniques de fabrication, telles que la bio-impression 3D, ont conduit à une réduction globale des coûts et des compétences spécialisées nécessaires pour leur fabrication (Bhatia S.N.,

et Ingber D.E., 2014 ; Sung K.E. et Beebe D.J. 2014 ; Jia W., et *al.*, 2016) ; Datta, P. et *al.*, 2017 ; Langhans, S.A. 2018).

De plus, ces modèles présentent des avantages potentiels en termes de fiabilité et de robustesse, car ils sont moins sensibles aux perturbations techniques externes telles que les bulles d'air. Cependant, les effets de bord et les contraintes de cisaillement élevées peuvent influencer négativement les performances et la cohérence du dispositif en perturbant l'écoulement laminaire dans les canaux de ces modèles, pouvant ainsi endommager les cellules ou altérer leur répartition. Cette situation peut conduire à des résultats incohérents qui diminuent la valeur prédictive de la plateforme. D'autre part, il est crucial de développer de nouveaux matériaux pour la fabrication de ces modèles, car le matériau couramment utilisé, le polydiméthylsiloxane (PDMS), a la capacité d'absorber de manière non spécifique de petites molécules (Halldorsson S. et *al.*, 2015 ; Shemesh J., et *al.*, 2015 ; Sontheimer-Phelps, A., et *al.* 2019).

Lors de ces dernières années, plusieurs recherches récentes ont donné lieu à l'émergence de modèles novateurs qui combinent des organoïdes/sphéroïdes tumoraux avec des systèmes micro-fluidiques. L'incorporation d'organoïdes dans des dispositifs micro-fluidiques permet aux « organoïdes-sur-puce » de bénéficier des avantages conjugués de la micro-fluidique et des modèles d'organoïdes en trois dimensions (Figure.22), ceci ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour l'étude des interactions entre les tumeurs et le stroma, ainsi que de leurs effets à l'échelle systémique. Ainsi, une étude récente a permis de mettre en place un modèle « d'organoïde-sur-puce » de carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), qui a été développé pour reproduire la croissance et la dormance spécifique à l'environnement microvasculaire de l'organe. Enfin, la micro-fluidique permet aux chercheurs d'étudier les réponses cellulaires et les interactions tissulaires dans des conditions plus proches de la réalité, ou encore évaluer l'efficacité des médicaments et des thérapies sur des modèles plus représentatifs de l'organisme humain. De ce fait, ont ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche biomédicale et offrent ces modèles des opportunités passionnantes pour l'étude des maladies, la découverte de médicaments et le développement de thérapies personnalisées (Hassell, B.A. et *al.*, 2017 ; Ma Y.-H.V. et *al.*, 2018 ; Rothbauer M., et *al.*, 2018 ; Sontheimer-Phelps, A. et *al.*, 2019).



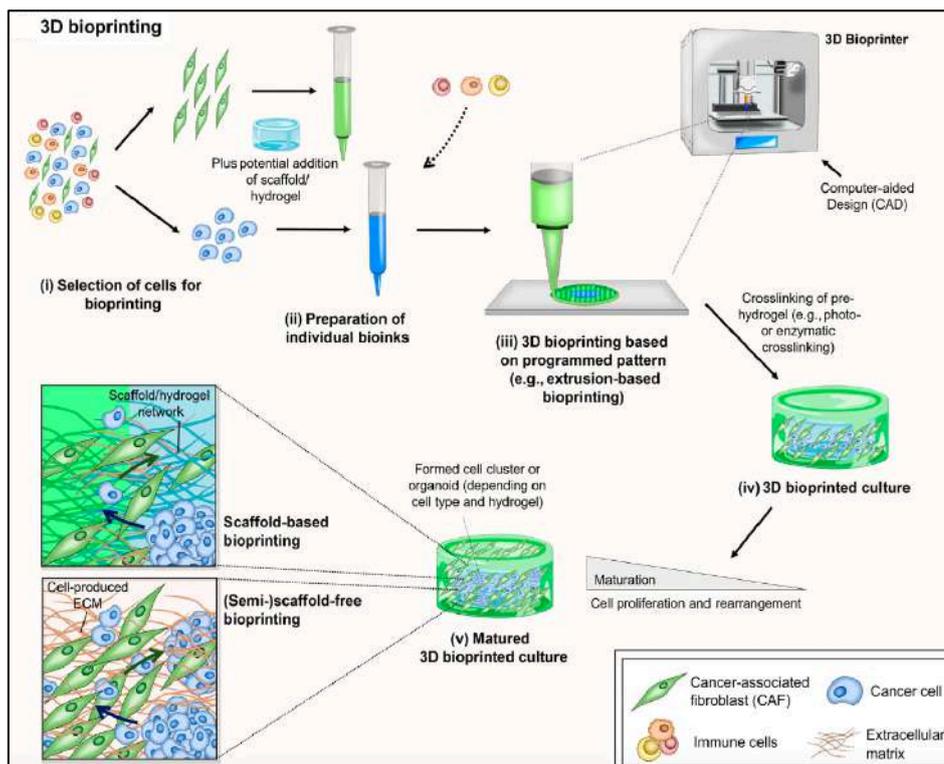
**Figure.22. La représentation schématique d'un modèle d'organoïde sur puce microfluidique (Zhang S., et al., 2021)**

### 2.1.6. Les modèles à base d'impression tissulaire en 3D

L'impression 3D a révolutionné de nombreux domaines, y compris celui de l'ingénierie tissulaire en biologie. Elle permet d'utiliser des bio-encre spéciales, telles que l'alginate et l'alcool polyvinylique (PVA), pour créer des structures sur mesure avec une grande précision (Figure.23). Ces bio-encres offrent une grande flexibilité, permettant d'ajuster la concentration, la porosité et la rigidité en fonction des besoins spécifiques de l'application. Des études ont montré que certaines de ces bio-encres présentent une viabilité cellulaire exceptionnelle, atteignant jusqu'à 100% lorsque les cellules sont ensemencées sur les échafaudages pendant plusieurs jours.

Dans certains cas, les cellules sont directement mélangées avec les bio-encres avant l'impression, utilisant des combinaisons d'agarose, de gélatine et de collagène. Ces bio-encres à base de collagène sont particulièrement intéressantes car elles permettent d'observer le comportement des cellules cancéreuses dans des conditions d'écoulement, ce qui peut être crucial pour étudier l'invasion des métastases tumorales.

Ces avancées dans l'impression 3D ouvrent de nombreuses possibilités dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Cependant, il est important de reconnaître certaines limitations associées à ces modèles. Par exemple, la nature artificielle de ces structures et l'origine des bio-encres utilisées peuvent influencer la viabilité et l'adhérence des cellules. Il est donc essentiel de continuer à optimiser ces techniques pour améliorer la pertinence et la fiabilité des modèles 3D en culture cellulaire (Mohanty *et al.*, 2015 ; Gopinathan et Noh, 2018 ; Luo *et al.*, 2017 ; Campos *et al.* 2019 ; Bonnesoeur *et al.*, 2020).



**Figure.23. Le modèle à base d'impression tissulaire en 3D (Rodrigues G., et al., 2021)**

## 2.2. Les principaux modèles *in vivo* utilisés en recherche biomédicale pour le cancer

Les modèles animaux jouent un rôle essentiel dans la recherche médicale, en particulier dans l'étude du cancer. Ils permettent de simuler le corps humain et de mieux comprendre les mécanismes tumoraux. Au fil du temps, de nombreux modèles animaux ont été développés et utilisés dans la recherche sur le cancer, témoignant de leur importance.

Différentes méthodes sont utilisées pour construire ces modèles animaux de cancer, notamment l'induction chimique, la xénotransplantation et la programmation génétique. Chacune de ces approches offre des avantages spécifiques et permet d'étudier différentes facettes du cancer.

Ces modèles animaux sont également utilisés pour évaluer l'efficacité des médicaments anticancéreux. Ils servent de plateforme pour tester de nouveaux traitements, identifier les composés les plus prometteurs et comprendre comment ils agissent sur les tumeurs. Cela permet d'optimiser les stratégies thérapeutiques et d'améliorer les taux de réussite des traitements.

De plus, les modèles animaux offrent une opportunité d'explorer les possibilités de thérapie génique dans le traitement du cancer. Ils permettent de tester des approches innovantes visant à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, à moduler l'expression de certains gènes impliqués dans le cancer et à développer de nouvelles thérapies personnalisées (Mendes N, et *al.*, 2020).

### **2.2.1. Les modèles basés sur la xénotransplantation**

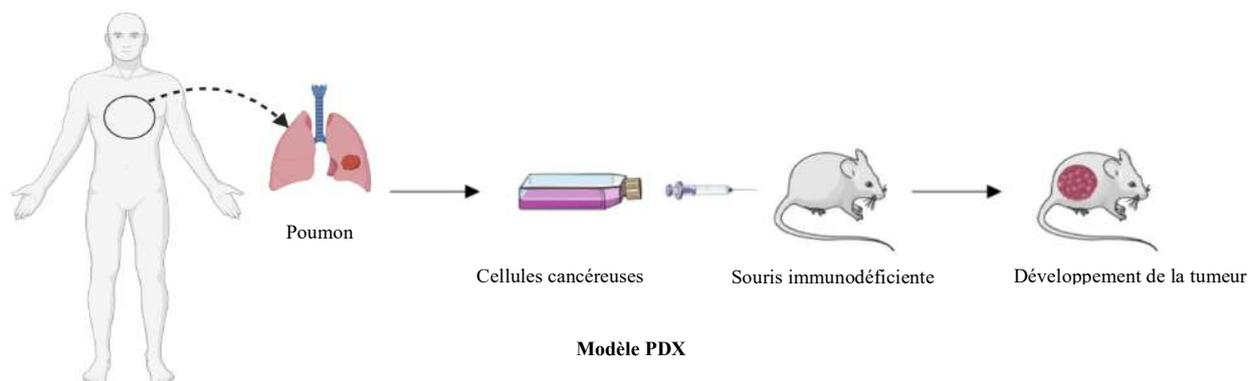
Les modèles de tumeurs transplantables sont créés en implantant une suspension de cellules cancéreuses vivantes ou un tissu tumoral solide provenant d'un donneur dans un autre animal. Il y a deux types de transplantation : la xéno greffe et l'allo greffe, en fonction de l'espèce d'origine de la tumeur et de l'hôte. Dans le cas de la xéno greffe, les animaux hôtes sont généralement immunodéficients, ce qui leur permet de tolérer les cellules cancéreuses provenant d'espèces différentes. En revanche, l'allo greffe se réfère à la transplantation de tumeurs entre individus de la même espèce, avec un génome proche. Cependant, les greffes peuvent être réalisées de différentes manières, soit de manière orthotopique, sous-cutanée ou intravasculaire. Ces différentes approches permettent d'étudier les différentes étapes de la progression tumorale (Vargo- Gogola T., et Rosen JM., 2007 ; Ni Y., 2009).

#### **2.2.1.1. Le modèle PDX**

Le modèle PDX (Patient-Derived Xenograft) est un modèle de tumeur créé en transplantant chirurgicalement des tissus tumoraux frais prélevés sur des patients dans des animaux (Figure. 24), principalement des souris immunodéficientes. Cependant, des recherches sont en cours pour explorer l'utilisation d'autres animaux tels que le poisson-zèbre dans l'établissement des modèles PDX. En revanche, l'avantage le plus important du modèle PDX est sa capacité à préserver intégralement le microenvironnement tumoral, à éviter les effets des passages répétés

sur l'hétérogénéité tumorale et à mieux simuler le processus de croissance tumorale chez les patients. Les chercheurs ont réalisé divers tests biologiques sur les tumeurs transplantées, notamment dans les cas de cancer du foie, de cancer colorectal, de mélanome, de cancer de l'œsophage et du cancer ovarien. Ces études ont confirmé que le modèle PDX conservait les caractéristiques biologiques des tumeurs primaires, offrant ainsi un modèle animal précis pour l'étude de l'oncologie (Morton CL., et al., 2007 ; Marangoni E., et al., 2007 ; Keysar SB., et al., 2013 ; Owonikoko TK., et al., 2016).

D'autre part, en raison de l'utilisation de tissus tumoraux provenant de patients différents et de l'association d'un modèle spécifique à chaque patient, le modèle PDX offre la possibilité de refléter la diversité génétique des patients. Cette caractéristique en fait un outil largement utilisé dans la recherche sur tous les types de cancer. Par contre, le modèle PDX utilise généralement des souris immunodéficientes, dont le système immunitaire diffère de celui des humains, ceci limite sa capacité à reproduire l'interaction entre le système immunitaire et la tumeur. De plus, la durée de vie des souris immunodéficientes est courte, car elles présentent un risque de développement de tumeurs spontanées et le taux de réussite de l'établissement du modèle PDX varie selon les types de tumeurs. Face à ces limites, de nouveaux modèles PDX améliorés ont émergé pour tenter de pallier ces problèmes. Afin de mieux représenter la réalité clinique et de fournir des informations plus précises pour la recherche en oncologie, ces modèles visent : à intégrer davantage les interactions entre le système immunitaire et la tumeur, à prolonger la durée de vie des animaux hôtes et à améliorer le taux de réussite de l'établissement du modèle PDX (Tanaskovic O., et al., 2019 ; Giraud J., et al., 2019).



**Figure.24. La représentation du modèle de xénogreffes dérivés de patient (PDX) source biorender)**

### **2.2.1.2. Le modèle PDOX**

Les modèles PDOX (Patient-Derived Orthotopic Xenograft) sont utilisés en recherche médicale pour étudier le cancer. Ils consistent à prélever des échantillons de tumeurs chez des patients atteints de divers types de cancer tels que le cancer du côlon, du pancréas, du sein, de l'ovaire, du poumon, de l'estomac et du mésothéliome. Ces échantillons sont ensuite implantés chez des animaux de laboratoire, généralement des souris, afin de permettre la croissance des tumeurs. Ces modèles ont été développés pour la première fois dans les années 1990. L'une des caractéristiques essentielles des modèles PDOX est leur capacité à reproduire fidèlement la croissance tumorale primaire et métastatique observée chez les patients d'origine (Hoffman R., 2015).

Le modèle PDOX représente une avancée par rapport au modèle PDX, car il permet de simuler de manière plus objective et précise l'évolution des tumeurs humaines *in vivo*. Ce modèle est plus apte à reproduire les caractéristiques biologiques de l'invasion et du développement de la métastase tumorale maligne par rapport au modèle PDX. D'autre part il permet une meilleure compréhension de l'impact du microenvironnement sur la progression tumorale et l'efficacité des traitements, ceci lui confère la possibilité de prédire avec précision le pronostic des patients atteints de cancer et de sélectionner le traitement individuel le plus approprié. De ce fait, le modèle PDOX fournit des informations utiles pour la médecine personnalisée et le développement de nouvelles thérapies ciblées (Sicklick JK, et *al.*, 2014 ; Hiroshima Y., et *al.*, 2015 ; Igarashi K, et *al.*, 2017).

### **2.2.1.3. Le modèle Hu-PDX**

Les modèle hu-PDX (Humanized-Derived Xenograft) consistent à transplanter des cellules humaines, des tissus, voire même des systèmes immunitaires complets, chez des animaux immunodéficients, généralement des souris. L'objectif est de créer une représentation plus précise de la physiologie humaine et des processus pathologiques. Contrairement au modèle PDX qui visent à reproduire les caractéristiques de la tumeur d'origine, afin d'étudier la biologie tumorale et la réponse au médicament (Kang Y., et *al.*, 2022 ; Steinkamp, M. P., et *al.*, 2023). Ce qui fait de ce modèle un outil précieux pour le traitement des tumeurs et l'étude de l'apparition des tumeurs, de leur développement, de leur métastase et de leur traitement en particulier dans le domaine de l'immunothérapie des tumeurs. Ce modèle est capable de recréer

un environnement de croissance des tumeurs plus similaire à celui du corps humain, ce qui en fait une méthode plus représentative.

Le modèle hu-PDX a été largement utilisé dans la recherche sur différents types de tumeurs. Par exemple, une étude menée par Lin et al. a utilisé des lymphocytes du sang périphérique pour établir des souris immunodéficientes humaines. Les résultats ont démontré l'efficacité de ce modèle PDX dérivé des lymphocytes du sang périphérique pour l'étude de l'immunothérapie ciblant PD-L1/PD-1. De ce fait, avec l'utilisation du modèle hu-PDX, les chercheurs sont en mesure d'évaluer plus précisément l'efficacité des traitements immunothérapeutiques spécifiques. En recréant le microenvironnement tumoral similaire à celui des patients humains, ce modèle permet une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques impliqués dans la réponse aux traitements (Rongvaux A., et *al.*, 2014 ; Wang X., et *al.*, 2012 ; Morton JJ., et *al.*, 2016 ; Lin S., et *al.*, 2018).

### **2.2.2. Les modèles génétiquement modifiés**

Le modèle génétiquement modifié pour le cancer désigne une souche animale qui a été modifiée au niveau génomique, soit par surexpression d'un oncogène, soit par perte de la fonction d'un gène suppresseur de tumeur spécifique. Ces modèles sont créés spécialement afin d'étudier les mécanismes du cancer. Ils peuvent être divisés en deux catégories principales : les modèles transgéniques et les modèles endogènes. En effet, les modèles transgéniques sont créés en introduisant artificiellement un gène spécifique dans l'ADN des cellules germinales d'un animal, ce qui permet au gène modifié d'être transmis à sa descendance. Tandis que, les modèles endogènes sont générés en utilisant des techniques de manipulation génétique pour perturber spécifiquement un gène particulier chez un animal, ce qui entraîne une altération de la fonction génétique associée au cancer. Ces modèles permettent d'étudier le rôle de certains gènes ou de certaines voies de signalisation dans le développement et la progression des tumeurs. Ils permettent aux chercheurs de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents du cancer et d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies ciblées (Frese KK., 2007 ; Richmond A., et Su Y., 2008 ; Doetschman T., 2011).

D'autre part, les modèles génétiquement modifiés offrent aux chercheurs la possibilité d'étudier en détail les rôles spécifiques des gènes et des voies génétiques dans le développement et la progression des tumeurs. En manipulant de manière sélective ces gènes, les chercheurs peuvent observer les effets sur des aspects tels que la croissance tumorale, le développement de métastase et la résistance aux traitements. Cette approche fournit des informations précieuses

sur les mécanismes tumoraux moléculaires sous-jacents, ce qui contribue à une meilleure compréhension de la maladie.

Bien que la création et la maintenance des modèles génétiquement modifiés soient complexes, ils présentent l'avantage de reproduire fidèlement la physiopathologie et les mécanismes moléculaires de certains cancers humains. Ces modèles de cancer primaire permettent de simuler l'étiologie, l'évolution et les conséquences du processus tumoral, allant de l'initiation précoce à la progression intermédiaire, puis à l'apparition clinique et à l'aggravation tardive. Ils sont particulièrement utiles pour étudier l'étiologie, la prévention, le diagnostic et le traitement du cancer à tous les stades. De plus, les lésions tumorales primaires reproduites ici présentent une complexité histologique et une hétérogénéité similaire à celles des cancers réels chez l'humain (Ni Y., et *al.*, 2009 ; Frese KK., 2007).

Pour conclure, l'ensemble de ces similitudes permettent aux chercheurs d'étudier ces cancers de manière plus précise en utilisant les modèles génétiquement modifiés comme un outil préclinique pour tester de nouveaux traitements, explorer l'évolution de la maladie et développer des stratégies de prévention

### **2.2.3. Les modèles basés sur l'induction chimique**

Les modèles de cancer chimiquement induit sont d'un grand intérêt dans la recherche sur le cancer car ils permettent d'élucider les mécanismes de la carcinogenèse et d'évaluer l'efficacité de différentes interventions thérapeutiques. Ces modèles sont créés en exposant des animaux de laboratoire à des composés chimiques spécifiques qui reproduisent les conditions d'exposition aux substances cancérigènes chez les Humains. En effet, il existe une variété de substances chimiques cancérigènes dont la capacité d'induire des cancers chez les animaux de laboratoire a été démontrée suite à des expositions prolongées ou excessives, il peut s'agir : des carcinogènes dérivés de viandes cuites (les amines hétérocycliques (HCA)), des additifs alimentaires, des produits chimiques industriels et des polluants environnementaux (les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)) , des carcinogènes présents dans la fumée de tabac (les composés N-nitroso (NOC)) , des agents antinéoplasiques, des composés naturels et des carcinogènes synthétiques. Ces substances chimiques cancérigènes utilisées ont la capacité d'induire la formation de tumeurs dans divers tissus et organes, permettant d'obtenir une gamme variée de cancer. Cette diversité de tumeurs observées dans les modèles chimiquement induits est cruciale pour l'étude de la biologie des tumeurs et donc pour l'évaluation de l'efficacité des

thérapies et le développement de nouvelles approches de traitement (Williams GM. 2001 ; Luch A., 2005 ; Takayama S., *et al.*, 2008).

Cependant, les modèles de cancer chimiquement induit sont moins invasif ou non invasif par rapport à d'autres modèles de cancer, tels que les modèles de xénotransplantation ou les modèles transgéniques. De ce fait, les animaux sont exposés aux produits chimiques cancérigènes de manière courante, par des voies d'exposition telles que l'ingestion, l'inhalation, l'injection ou l'absorption cutanée, ceci reflète les voies d'exposition les plus fréquemment rencontrées chez les êtres humains. Cette approche permet de reproduire de manière plus fidèle les conditions réelles d'exposition et donc les mécanismes de carcinogenèse (Irigaray P., et Belpomme D. 2010).

D'autre part, un des avantages majeurs de ces modèles réside dans leur simplicité et leur coût économique, Ils ne nécessitent ni manipulateurs expérimentés, ni installations ou équipements complexes. En plus, ces modèles ont la capacité à générer une charge tumorale abondante et une grande analogie avec les cancers primaires humains observés en clinique. Ils produisent un spectre complet de cancers primaires : fréquemment avec différentes tailles, degrés de différenciation et même origines tumorales. Par conséquent, les modèles de cancer primaire nous fournissent également un outil de grande valeur pour une meilleure compréhension des mécanismes de la pathogenèse du cancer. Ils permettent d'obtenir des informations précieuses sur les étapes précoces de l'apparition du cancer, notamment leur initiation et leur promotion, ainsi que sur leurs mécanismes de résistance aux traitements (Lemmer R., *et al.*, 2004).

En revanche, ces modèles présentent également certains inconvénients. En plus du temps nécessaire à la progression de la carcinogenèse, le principal inconvénient réside dans la difficulté d'évaluer la charge tumorale de manière non invasive chez les petits animaux vivants. En effet, tout comme chez les patients atteints de cancer dans la réalité, les tumeurs se développent de manière imprévisible et hétérogène en termes de moment d'apparition, d'emplacement, de nombre, de taille, de différenciation et de vascularisation sanguine des lésions. En particulier, pour les tumeurs viscérales dans le foie, les poumons, les reins ou le pancréas. Il est très difficile de détecter les nouvelles lésions tumorales et de surveiller leur croissance dans les organes individuels. Par conséquent, cela pose des défis pour le regroupement et la définition des critères de fin de construction du modèle (Lemmer R., *et al.*, 2004 ; Chakraborty T., *et al.*, 2007 ; Kim WJ., *et al.*, 2011).

Les modèles chimiquement induit reste un modèle facilement reproductible, en permettant d'obtenir des données cohérentes et fiables. Ceci est essentiel pour la recherche translationnelle

et l'application clinique. De ce fait, les modèles chimiquement induits offrent une plateforme robuste pour étudier en détail les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la progression du cancer.

### **3. Vers le modèle parfait**

Au cours des dernières années, le domaine de l'ingénierie des modèles 3D a connu une évolution rapide, offrant une diversité de modèles pour la recherche en oncologie. Chaque modèle présente ses avantages et ses inconvénients, ce qui rend le choix du modèle idéal difficile. De ce fait, l'objectif ultime est de trouver un modèle qui reproduise le plus fidèlement possible le microenvironnement tumoral et ses différentes composantes (Pampaloni F., *et al.*, 2007 ; Duval K., *et al.*, 2017 ; Jensen C., et Teng Y., 2020).

Idéalement, le modèle parfait serait dérivé des cellules tumorales provenant directement du patient, afin de reproduire au mieux sa tumeur d'origine. Ce modèle devrait également inclure différents types de cellules stromales présentes dans le microenvironnement tumoral et être enrobé dans une matrice qui imite la matrice extracellulaire. En recréant ces conditions complexes un modèle fonctionnel serait obtenu qui reflétant fidèlement la réalité clinique (Kapałczyńska M., *et al.*, 2018).

Cependant, il est important de prendre en compte le coût et le temps nécessaires à la mise en place de ces modèles. Les chercheurs ont besoin d'une plateforme expérimentale qui leur permette d'obtenir rapidement un modèle fonctionnel, tout en minimisant les coûts de production. Ceci constitue un défi majeur, mais c'est un aspect essentiel pour rendre demain ces modèles accessibles et utilisables dans un contexte préclinique. D'autre part, la reproduction de la vascularisation tumorale est l'un des points faibles principaux des différents modèles, car elle joue un rôle crucial dans la croissance tumorale et la résistance aux traitements. De ce fait, il faudrait réussir à reproduire fidèlement les conditions de flux sanguin et d'hypoxie présentes dans la tumeur d'origine, afin d'obtenir des résultats prédictifs pertinents (Jing X., *et al.*, 2019 ; Lutz J.C. *et al.*, 2019).

Ainsi, l'objectif ultime est de développer un modèle innovant qui fournit des données reproductibles et utiles pour la prédiction standardisée des traitements standardisés ou la combinaison de plusieurs thérapies. Cette innovation ouvrira de nombreuses possibilités pour les tests de nouvelles molécules thérapeutiques. L'ensemble de ces avantages va permettre aux cliniciens de gagner du temps pour du choix du traitement le plus pertinent pour leurs patients, offrant ainsi une lueur d'espoir pour une amélioration de la survie des patients atteints de cancer.

## ***Chapitre II : Objectifs***

## Chapitre II : Objectifs

Ce projet de recherche s'inscrit dans le domaine oncologique, plus spécifiquement dans l'étude de nouvelles approches de modélisation 3D des tumeurs pour l'étude de leur microenvironnement et des molécules thérapeutiques. L'objectif principal est d'optimiser une plateforme de criblage de molécules anti-cancéreuses afin qu'elle permette de tester des thérapeutiques directement sur les tumeurs reconstituées *in vitro* du patient pour une médecine de précision et donc personnalisée.

Cette plateforme pourra permettre de tester des médicaments directement sur les tumeurs des patients en vue de développer une médecine de précision, optimisée et personnalisée.

Dans ce travail, le cancer du poumon a été choisi comme modèle. De ce fait, il consiste en la formation de tumoroides dérivés de patients atteints de cancers pulmonaires plus précisément de type adénocarcinome.

Ces tumoroides représentent la base de notre plateforme de criblage, ils vont nous permettre de standardiser des tests thérapeutiques de précision et de reproduire la vascularisation tumorale.

Ce travail de recherche est organisé autour de deux chapitres principaux :

### ***Chapitre 1 : Construction de tumoroides dérivés de patients pour la prédiction de l'effet de la radiothérapie et de la chimiothérapie dans le cancer du poumon.***

Cette étude est consacrée à l'établissement d'un modèle tridimensionnel utilisant des tumoroides dérivés de patients atteints de cancer du poumon (PDT's). Au cours de la dernière décennie, les PDT's ont été développés et utilisés pour le criblage des différents médicaments anticancéreux. Comparé aux autres modèles de criblage existants, ce modèle offre l'immense avantage de préserver les caractéristiques histologiques et mutationnelles spécifiques à chaque tumeur et de reproduire leur microenvironnement tumoral.

Ainsi, ce modèle de PDT a été choisi comme plateforme de prédiction pour différents types de traitements standardisés, avec un accent particulier sur la radiothérapie et la chimiothérapie à base de platine, qui sont des traitements couramment utilisés chez les patients atteints de cancers du poumon (Dietrich, M.F., et *al.*, 2016). Il est important de noter qu'aucun modèle de tumoroïde dérivé du patient n'a encore été proposé pour prédire l'efficacité de la radiothérapie dans les cancers du poumon. Par conséquent, notre modèle représentera une avancée

significative dans la recherche préclinique et pourra être utilisé pour évaluer l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie à base de cisplatine dans le traitement du cancer du poumon.

Enfin, les résultats obtenus pourront être corrélés aux résultats cliniques des patients afin de confirmer la capacité prédictive de notre modèle pour ces deux types de thérapies chez les patients atteints de cancers du poumon.

## ***Chapitre 2 : la Vascularisation des tumoroïdes dérivés des patients du cancer du poumon non à petites cellules et de leur microenvironnement.***

Cette étude vise à optimiser notre modèle de PDT en y intégrant une composante vasculaire. En effet, parmi les nombreux travaux réalisés sur les modèles PDT, l'absence de vascularisation est souvent identifiée comme un point faible majeur. Cette absence de vascularisation représente un obstacle majeur pour reproduire *in vitro* de manière précise la tumeur et son microenvironnement. Peu d'études ont été menées pour améliorer le réseau microvasculaire reliant les PDT à leur microenvironnement environnant. Il convient de souligner que le transport inefficace et la faible distribution des médicaments spécifiques au sein des tumeurs associées sont des causes d'échec des criblages des médicaments anticancéreux sur les modèles et de la résistance aux traitements chez les patients. Cette lacune du modèle PDT doit pouvoir être comblée. Des PDT vascularisés ont été réalisés en seulement six jours en utilisant différents types de cellules préservant les caractéristiques histopathologiques du tissu cancéreux d'origine. La présence d'un réseau vasculaire reliant les PDT à leur microenvironnement environnant y a été mise en évidence. De plus, ce modèle de PDT rapide et prometteur ouvre de nouvelles perspectives pour la médecine personnalisée. En effet, il pourrait facilement être utilisé pour tester l'efficacité des différents traitements thérapeutiques et il pourrait être intégré à un dispositif micro-fluidique pour un criblage des molécules anti-cancéreuses.

***Chapitre III : Construction de tumoröides dérivés de patients pour la prédiction de l'effet de la radiothérapie et de la chimiothérapie dans le cancer du poumon***

# **Chapitre III : Construction de tumoroïdes dérivés de patients pour la prédiction de l'effet de la radiothérapie et de la chimiothérapie dans le cancer du poumon**

## **1.Contexte et objectif**

Le cancer du poumon est l'une des principales causes de décès dans le monde. En 2020, plus de 2 millions de personnes ont été diagnostiquées avec un cancer du poumon dans le monde. Les patients diagnostiqués à un stade précoce et traités par une chirurgie de résection complète ont un meilleur pronostic, avec un taux de survie à 5 ans pouvant atteindre 40% pour le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). Cependant, la majorité des patients ne présentent pas de symptômes évidents aux stades précoces, ce qui entraîne souvent un diagnostic tardif et l'impossibilité d'une chirurgie curative pour les patients atteints de CPNPC avancé ou métastatique. Par conséquent, le taux de survie global à 5 ans pour le CPNPC reste faible. (Siegel R.L., et *al.*, 2020 ; Birring S.S., et Peake M.D., 2005 ; Ray, M.R., et *al.*, 2010; Liello, R.D.; et *al.*, 2019).

La radiothérapie est une approche thérapeutique éprouvée qui peut offrir des avantages significatifs à plus de 70% des patients atteints de cancer du poumon. Elle est utilisée de différentes manières, notamment pour réduire la taille de la tumeur avant une chirurgie du cancer du poumon, ceci facilite l'opération en permettant une résection plus complète. De plus, la radiothérapie peut être utilisée après la chirurgie pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et réduire le risque de récurrence (Vinod S.K., et Hau E., 2020).

En ce qui concerne la chimiothérapie, les traitements à base de platine sont fréquemment administrés aux patients atteints de cancer du poumon. Ces médicaments sont efficaces pour cibler et détruire les cellules cancéreuses, mais ils sont également associés à des importants effets secondaires en raison de leur toxicité. Des doses maximales sont souvent nécessaires pour atteindre l'efficacité thérapeutique, augmentant ainsi les effets secondaires indésirables (Oun R. ; et *al.*, 2018).

Il est important de noter que les traitements par radiothérapie et chimiothérapie peuvent être utilisés seuls ou en combinaison, en fonction de la nature et de l'étendue du cancer du poumon, ainsi que des caractéristiques spécifiques de chaque patient. Des approches personnalisées sont essentielles pour optimiser les résultats thérapeutiques et minimiser les effets secondaires indésirables.

Dans l'ensemble, la radiothérapie et la chimiothérapie continuent d'être les piliers du traitement du cancer du poumon. Cependant, des recherches sont nécessaires pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui amélioreront l'efficacité des traitements tout en réduisant la toxicité associée.

De ce fait, les récentes avancées dans les thérapies ciblées contre les mutations génétiques spécifiques et dans les immunothérapies ont ouvert de nouvelles perspectives pour améliorer la survie des patients atteints de cancer du poumon. Ces approches thérapeutiques se révèlent particulièrement efficaces chez les patients dont les tumeurs présentent des oncogènes activés ou une réponse immunitaire préexistante contre le cancer. Cependant, malgré leurs promesses, ces thérapies sont toujours confrontées à des importants défis tels que la résistance tumorale due à l'hétérogénéité des tumeurs ou à un faible taux de réponse complète à l'immunothérapie. Dans ce contexte, il est devenu essentiel de développer des modèles précliniques personnalisés capables de reproduire fidèlement la situation clinique réelle pour les patients atteints de CPNPC. Ces modèles permettraient de recommander des traitements médicamenteux efficaces avec moins de toxicité, ce qui améliorerait la survie et la qualité de vie des patients. De plus, cela contribuerait à réduire l'impact médical et économique des thérapies anticancéreuses (Xie M., et *al.*, 2021 ; Kwak E.L., et *al.*, 2010 ; Bergethon K., et *al.*, 2012 ; Drilon A., et *al.*, 2013 ; Stephens P., et *al.*, 2004 ; Massarelli E., et *al.*, 2014 ; Topalian S.L., et *al.*, 2012 ; Van Maldegem F., et *al.*, 2020).

Des études, menées par notre équipe ainsi que d'autres chercheurs, ont démontré que les modèles de organoïdes/tumoroïdes dérivées de patients (PDT's) conservent aussi bien les caractéristiques histopathologiques et génomiques des tumeurs d'origines dans le cancer du poumon. Ces modèles pourraient donc être utilisés pour prédire les réponses aux traitements. Dans le cas spécifique du cancer du poumon, le modèle d'organoïdes a été capable de prédire la réponse aux médicaments cytotoxiques et aux traitements ciblés (Dijkstra K.K., et *al.*, 2018 ; Kim M., et *al.*, 2019 ; Yokota E., et *al.*, 2021 ; Delom F., et *al.*, 2020 ; Seitlinger J., et *al.*, 2022). Une étude menée par Delom et *al.* a révélé que les tumoroïdes en 3D, comparées aux cultures en monocouche en 2D, présentaient une plus grande résistance à la radiothérapie. Cependant, il convient de souligner qu'aucune recherche spécifique dans le domaine du cancer du poumon n'a encore démontré la capacité du modèle PDT à prédire la réponse à la radiothérapie (Delom F., et *al.*, 2020).

Nous avons mis au point un modèle de tumoroïdes dérivées de patients (PDT's) spécifique aux patients atteints de CPNPC. Ce modèle permet d'identifier le traitement le plus efficace pour chaque patient dans un délai de deux semaines (Seitlinger J., et *al.*, 2022).

Dans cette partie de mon travail, nous avons également démontré que notre modèle PDT est capable de générer différents profils de réponse aux traitements, notamment à la radiothérapie par rayons X et à la chimiothérapie à base de cisplatine/vinorelbine. En combinant les résultats expérimentaux obtenus à partir de notre modèle de PDT combinés aux données cliniques des patients, nous avons pu démontrer que notre modèle PDT peut fournir des indications prédictives pour les thérapies cliniques à proposer aux patients.

## **2.Résultats**

### **2.1. Identification des différentes réponses des PDT de cancers pulmonaires aux doses de la radiothérapie par rayons X**

Des échantillons de cancer du poumon non à petites cellules ont été prélevés sur des patients ayant subi une résection majeure de leur tumeur pulmonaire. Les interventions sont faites au niveau du l'UF de Chirurgie Thoracique des Hôpitaux universitaires de Strasbourg.

Des échantillons récemment rééqués de cancer du poumon non à petites cellules ont été utilisés pour former des tumoroïdes dérivés de patients (PDT) dans le laboratoire UMR1260. D'autre part, les PDT ont été irradiés avec des rayons X à différentes doses, et leur viabilité cellulaire a été évaluée après 96 heures à l'aide d'un test de viabilité cellulaire.

Les résultats ont montré différents profils de réponse à la dose pour les PDT provenant de différents patients. Certains PDT ont montré une forte réponse à la radiothérapie avec une mortalité cellulaire significative, tandis que d'autres ont montré peu de cellules mortes, suggérant une possible résistance à ce traitement.

Les patients 21T080, 211T117 et 21T135 pourraient être sensibles à la radiothérapie, tandis que les patients 20T222, 21T099, 21T324, 21T362 et 21T518 pourraient présenter une résistance. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les irradiations à 4 Gy et 8 Gy.

L'analyse d'immunofluorescence a révélé la présence d'une expression de la caspase 3 clivée dans les PDT's formés à partir du patient ayant une réponse favorable à la radiothérapie (21T117), indiquant la présence de cellules apoptotiques. En revanche, aucune cellule apoptotique n'a été détectée dans les PDT formés à partir du patient sans réponse significative (21T324).

Il est connu que l'exposition aux radiations provoque des cassures des doubles brins de l'ADN (CDB) qui peuvent ultérieurement entraîner la mort cellulaire ou la formation de cancer. Les CDB peuvent être identifiées et quantifiées par le dosage immunofluorescent utilisant l'anticorps  $\gamma$ -H2AX. Les PDT ont été fixés 24 heures après l'irradiation pour étudier les CDB. Après l'irradiation aux rayons X, des foyers de  $\gamma$ -H2AX ont été détectés exclusivement dans les PDT formés à partir du patient 21T117, indiquant la présence des cassures des doubles brins de l'ADN. En revanche, aucun foyer de  $\gamma$ -H2AX n'a été observé dans les PDT formés à partir du patient 21T324, suggérant une réparation efficace et rapide des lésions de l'ADN causées par l'irradiation. Ces résultats suggèrent que la radiothérapie basée sur les rayons X pourrait être bénéfique pour le patient 21T117, mais pas pour le patient 21T324.

Par ailleurs, les PDT radiosensibles ont été soumis à des irradiations répétées tous les deux jours, correspondant à la fréquence clinique des traitements fractionnés. Les CDB de l'ADN ont été évalués en quantifiant les foyers de  $\gamma$ -H2AX marqués dans le noyau des PDT. Après fixation des PDT 24 heures après la dernière irradiation, une coloration immunofluorescente en montage complet de  $\gamma$ -H2AX a été réalisée et des analyses quantitatives ont été effectuées. Nous avons évalué le pourcentage de cellules positives pour  $\gamma$ -H2AX par couche (20 couches, profondeur de 5  $\mu$ m) et le nombre de foyers de  $\gamma$ -H2AX marqués dans chaque noyau de cellule (100 noyaux de cellules) dans chaque PDT.

Les résultats ont montré une augmentation significative du pourcentage de cellules positives pour  $\gamma$ -H2AX par couche et du nombre de foyers de  $\gamma$ -H2AX dans chaque noyau cellulaire après irradiation répétée. De plus, une irradiation de 8 Gy a induit davantage de CDB que celle de 4 Gy dans les PDT sensibles à la radiothérapie. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les tests de viabilité cellulaire entre les irradiations à 4 Gy et 8 Gy.

## **2.2. Identification des différentes réponses des PDT de cancers pulmonaires aux doses de chimiothérapie à base de cisplatine**

Pour valider notre modèle PDT pour la chimiothérapie, des PDT formés à partir de 10 patients ont été traités après 4 jours avec la cisplatine. Trois groupes distincts ont été identifiés à l'aide de tests de viabilité cellulaire après 4 jours de traitement.

Premièrement, une résistance au traitement par la cisplatine a été observée dans les PDT formés à partir des patients 21T226, 21T201 et 21T176 ( $CI_{50} > 30 \mu$ M). De bonnes courbes de réponses ont été obtenues avec les PDT formés à partir des patients 21T518, 21T581, 20T222,

21T080 et 21T362, tandis que les PDT formés à partir des patients 20T428 et 22T017 se sont révélés très sensibles au traitement par le cisplatine ( $CI_{50} < 7 \mu\text{M}$ ).

De ce fait, la coloration hématoxyline éosine a révélé que les structures des PDT étaient progressivement détruites et leur taille réduite, avec l'augmentation de la dose de cisplatine dans les PDT des patients 21T080 et 21T581.

Cependant, la structure des PDT formés à partir du patient 21T017 était endommagée à  $5 \mu\text{M}$  sans aucune surprise car c'est un patient qui s'est révélé très sensible ; tandis que les PDT du patient 21T226 ont conservé leur structure même avec  $20 \mu\text{M}$  de cisplatine.

D'autre part, les analyses de PCR quantitative ont été réalisées sur les PDT pour étudier l'expression des gènes pro-inflammatoires : Caspase 3 et Bcl-2-Associated X protein (BAX). L'expression de ces deux gènes a augmenté avec le traitement à la cisplatine. Cependant, par rapport à celle des PDT du patient 21T362, une expression plus faible de Caspase 3 et BAX a été observée dans les PDT du patient 21T201, dans lesquels une résistance au traitement a été détectée.

Dans le traitement chimiothérapeutique clinique du cancer du poumon, la cisplatine est administrée au patient avec un autre médicament, tel que le vinorelbine, le pemetrexed ou le paclitaxel. Par conséquent, les PDT ont été traités avec la combinaison de cisplatine et de vinorelbine.

Les résultats obtenus ont montré que le traitement combiné de cisplatine et de vinorelbine a conduit à une diminution du  $IC_{50}$  dans les PDT dérivés des patients 21T226 ( $IC_{50} : 26,1 \mu\text{M}$ ), 21T080 ( $IC_{50} : 11 \mu\text{M}$ ) et 21T581 ( $IC_{50} : 6,5 \mu\text{M}$ ). Ceci suggère une plus grande efficacité du traitement combiné. Une observation intéressante est que dans les PDT dérivés du patient 20T222, une résistance à la chimiothérapie combinée a été observée, avec un  $IC_{50}$  de  $17,6 \mu\text{M}$ , tandis que le traitement au cisplatine seul a montré une meilleure réponse à la dose.

### **2.3. Pertinence escomptée du modèle 3D *in vitro* pour la prescription en clinique**

Étant donné les différents profils de sensibilité ou de résistance observés chez les patients traités par radiothérapie ou chimiothérapie, traitements couramment administrés aux patients atteints de CPNPC, nous avons cherché à déterminer s'il existe une corrélation entre les résultats obtenus à partir de nos modèles de PDT et les évaluations des résultats cliniques des patients.

Un suivi de deux ans a été réalisé pour tous les patients inclus dans cette étude afin d'évaluer les résultats cliniques des traitements décidés lors des réunions du comité de tumorothérapie. Selon la base des données concernant la radiothérapie ; une approche de radio-chimiothérapie adjuvante a été recommandée pour le patient 21T117 après une pneumonectomie en mars 2021. Ce patient a montré une réponse favorable à la radiothérapie et a bien toléré le traitement, avec une absence de récurrence de cancer détectée en février 2023. Ces résultats cliniques sont en accord avec les observations faites sur les PDT dérivés de ce patient, qui ont également montré une bonne réponse à la radiothérapie.

Concernant le patient 21T324, qui a subi une lobectomie en juin 2021, une récurrence/progression ganglionnaire a été confirmée histologiquement en février 2022. Par la suite, une radiothérapie stéréotaxique corporelle (SBRT) a été administrée à ce patient. Cependant, malgré le traitement, la taille de l'adénopathie médiastinale n'a pas diminué, ce qui suggère une possible résistance des cellules carcinomateuses à la radiothérapie. Les résultats obtenus à partir de notre modèle de PDT ont également indiqué que les cellules tumorales de ce patient présentaient une résistance à l'irradiation aux rayons X, ce qui pourrait expliquer la résistance observée dans les cellules carcinomateuses récurrentes présentes dans les ganglions lymphatiques.

Cependant, en ce qui concerne les données cliniques de chimiothérapie recueillies à l'hôpital, le patient 22T017 a montré une réponse encourageante au traitement à base de platine lors de la chimiothérapie néoadjuvante avant la lobectomie. Cette réponse positive à la chimiothérapie a également été observée dans notre modèle de PDT pour ce patient, où une sensibilité significative à la dose a été observée. En revanche, le patient 21T226, qui a reçu une chimiothérapie néoadjuvante à base de cisplatine et de vinorelbine avant la chirurgie, a présenté une augmentation de la taille de la tumeur. Ces résultats indiquent une résistance du patient à la chimiothérapie.

Dans nos modèles de PDT, une efficacité supérieure de l'association cisplatine et vinorelbine a été observée (CI50 : 26,1  $\mu$ M) par rapport au cisplatine seul (CI50 : 30,4  $\mu$ M). Cependant, malgré cette amélioration, une certaine résistance à la chimiothérapie a été observée dans les deux traitements. En effet, pour les patients 21T080 et 21T362, qui ont subi une chirurgie en février 2021 et juillet 2021 respectivement, une chimiothérapie adjuvante à base de cisplatine et de vinorelbine leur a été administrée. Jusqu'à présent, aucun signe de récurrence n'a été détecté chez ces deux patients. Dans notre modèle de PDT, nous avons observé une bonne réponse à la dose avec le traitement au cisplatine pour les patients 21T080 et 21T362. De plus, le patient 21T080 a bénéficié d'un traitement encore plus efficace avec la chimiothérapie combinée au cisplatine et à la vinorelbine.



Article

# Patient-Derived Tumoroid for the Prediction of Radiotherapy and Chemotherapy Responses in Non-Small-Cell Lung Cancer

Anasse Nounsi <sup>1,2,†</sup>, Joseph Seitlinger <sup>1,†</sup>, Charlotte Ponté <sup>1,†</sup>, Julien Demiselle <sup>1,3,†</sup>, Ysia Idoux-Gillet <sup>1,2</sup>, Erwan Pencreach <sup>4</sup>, Michèle Beau-Faller <sup>4</sup>, Véronique Lindner <sup>1,5</sup>, Jean-Marc Balloul <sup>6</sup>, Eric Quemeneur <sup>6</sup>, Hélène Burckel <sup>7,8,9</sup>, Georges Noël <sup>7,8,9</sup>, Anne Olland <sup>1,10</sup>, Florence Fioretti <sup>1,2</sup>, Pierre-Emmanuel Falcoz <sup>1,10</sup>, Nadia Benkirane-Jessel <sup>1,2,\*</sup> and Guoqiang Hua <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Regenerative Nanomedicine Unit, Center of Research on Biomedicines of Strasbourg (CRBS), French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), University of Strasbourg, UMR 1260, 1 Rue Eugène Boeckel, 67000 Strasbourg, France; anas-2020@hotmail.fr (A.N.); jo.seitlinger@gmail.com (J.S.); charlotte.ponte@chru-strasbourg.fr (C.P.); julien.demiselle@chru-strasbourg.fr (J.D.); yidouxgillet@unistra.fr (Y.I.-G.); veronique.lindner@chru-strasbourg.fr (V.L.); anne.olland@chru-strasbourg.fr (A.O.); fioretioce@gmail.com (F.F.); pefalcoz@gmail.com (P.-E.F.)
  - <sup>2</sup> Faculty of Dental Surgery, Strasbourg University Hospital (HUS), University of Strasbourg, 8 Rue de Stè. Elisabeth, 67000 Strasbourg, France
  - <sup>3</sup> Department of Medical Intensive Care, Strasbourg University Hospital (HUS), 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France
  - <sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Strasbourg University Hospital (HUS), 67098 Strasbourg, France; erwan.pencreach@chru-strasbourg.fr (E.P.); michele.beau@chru-strasbourg.fr (M.B.-F.)
  - <sup>5</sup> Department of Pathology, Strasbourg University Hospital (HUS), 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France
  - <sup>6</sup> Transgene SA, 400 Boulevard Gonthier d'Andernach—Parc d'Innovation—CS80166, 67405 Illkirch Graffenstaden, France; balloul@transgene.fr (J.-M.B.); quemeneur@transgene.fr (E.Q.)
  - <sup>7</sup> Department of Radiation Oncology, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), UNICANCER, 67200 Strasbourg, France; h.burckel@icans.eu (H.B.); g.noel@icans.eu (G.N.)
  - <sup>8</sup> Radiobiology Laboratory, Paul Strauss Comprehensive Cancer Center, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), 17 Rue Albert Calmette, 67033 Strasbourg, France
  - <sup>9</sup> ICube Laboratory, 300 Bd Sébastien Brant, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France
  - <sup>10</sup> Lung Transplantation Group, Thoracic Surgery Department, Strasbourg University Hospital (HUS), 1 Place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France
- \* Correspondence: nadia.jessel@inserm.fr (N.B.-J.); g.hua@unistra.fr (G.H.)  
 † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Nounsi, A.; Seitlinger, J.; Ponté, C.; Demiselle, J.; Idoux-Gillet, Y.; Pencreach, E.; Beau-Faller, M.; Lindner, V.; Balloul, J.-M.; Quemeneur, E.; et al. Patient-Derived Tumoroid for the Prediction of Radiotherapy and Chemotherapy Responses in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1824. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071824>

Academic Editor: Alberto Ricci

Received: 12 May 2023

Revised: 19 June 2023

Accepted: 20 June 2023

Published: 26 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Radiation therapy and platinum-based chemotherapy are common treatments for lung cancer patients. Several factors are considered for the low overall survival rate of lung cancer, such as the patient's physical state and the complex heterogeneity of the tumor, which leads to resistance to the treatment. Consequently, precision medicines are needed for the patients to improve their survival and their quality of life. Until now, no patient-derived tumoroid model has been reported to predict the efficiency of radiation therapy in non-small-cell lung cancer. Using our patient-derived tumoroid model, we report that this model could be used to evaluate the efficiency of radiation therapy and cisplatin-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer. In addition, these results can be correlated to clinical outcomes of patients, indicating that this patient-derived tumoroid model can predict the response to radiotherapy and chemotherapy in non-small-cell lung cancer.

**Keywords:** patient-derived tumoroid; radiation therapy; chemotherapy; personalized medicine; non-small-cell lung cancer

## 1. Introduction

Lung cancer is the worldwide leading cause of death; almost 25% of all cancer deaths are due to this disease in the US [1]. In 2020, more than 2 million people in the world were

diagnosed with lung cancer. Early diagnoses and complete resection surgeries would be helpful for non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients, which will increase their 5-year survival rate up to 40%. Unfortunately, most patients are asymptomatic in the early stage of lung cancer, and as a result, most of them are found to have this poor prognosis of disease at an advanced/metastatic stage [2]. Consequently, such resection surgery cannot be carried out for patients at the advanced and metastatic stages [3]. As a result, the general five-year survival rate of NSCLC remains low [4].

It was reported that more than 70% of lung cancer patients could have an evidence-based indication for radiotherapy, which can be used to reduce the tumor size before lung cancer surgery or to eradicate any remaining cancer cells left in the lungs after surgery [5]. However, one recent phase 3 clinical trial suggested that postoperative radiotherapy cannot be recommended as the standard of care in patients with stage IIIAN2 NSCLC [6]. Platinum-based chemotherapy regimens are administered to patients as a gold-standard treatment, but remain limited by severe and dose-limiting side effects [7]. Recent therapies targeting specific genomic mutations such as EGFR, KRAS, ALK, RET, ROS1, BRAF and ERBB2, as well as immunotherapies, could provide a better survival outcome for patients who have a somatically activated oncogene in their tumors [8–13] or pre-existing immunity against cancer [14]. However, these promising therapies are rapidly compromised by resistance due to the heterogeneity of the tumor or low complete response rate to immunotherapy [15–18]. In this context, a personalized pre-clinical drug-screening system that can mimic the real in vivo clinical situation is urgently required for NSCLC patients not only to recommend an efficient drug treatment with lower toxicities and to improve the overall survival and quality of life but also to reduce the increasing medico-economic impact of anti-cancer therapies.

We and other researchers have demonstrated that patient-derived organoid/tumoroid (PDT) models maintain both histopathological and genomic characterization of parental tumors in lung cancer [19–23], which could consequently be used to predict the responses of treatments. The lung cancer organoid model was shown to predict the response to cytotoxic drugs, as well as targeted treatment [20]. Delom et al. have found that 3D tumoroids were more resistant to radiation than 2D monolayer cultures [22]. However, no research on lung cancer has demonstrated that the PDT model is feasible to predict the radiation therapy response.

We have recently published a PDT model for NSCLC patients that could allow us to propose the most efficient back-to-patient treatment within two weeks [23]. Here, we further showed that different dose–response profiles were indeed observed using our PDT model for X-ray-based radiotherapy and cisplatin/vinorelbine-based chemotherapy. Combining the experimental results from these PDTs with the clinical outcomes from patients, we demonstrate here that the PDT model established in our lab could indeed provide a predictive indication for clinical therapies proposed to patients.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Human Specimens, Tissue Preparation and PDT Formation

The research project was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Grand Est, France (CNRIPH N° 20.11.12.42058). Samples are taken from patients who underwent lung major resection for localized lung cancer in the Thoracic Surgery Department of Strasbourg University Hospital. All written informed consent was obtained from patients the day before the surgery. As soon as the lung resection was performed, an adenocarcinomas sample (5 mm by 5 mm fragment) was freshly taken by a pathologist without interfering with the clinical pathological diagnosis and then immediately transported in cold culture medium to the laboratory for the formation of PDTs. The tumor dissociation and PDT formation were carried out as previously described [23]. A total of 5000 primary human pulmonary fibroblasts (HPF, CP3300-SC, (CliniSciences, Nanterre, France)) were mixed with 5000 patient-derived cells from either tumor sample in 150  $\mu$ L of mixed medium (50% of HPF medium + 50% of DMEM/F12 supplemented with 10% FCS, 20 ng/ $\mu$ L bFGF, 50 ng/ $\mu$ L human EGF, 2% B27

and 1% N2) in each well of a 96-well round bottom ultra-low-attachment (ULA) plate (S-bio, Fuggerstraße, Germany).

### 2.2. X-ray Irradiation

The X-ray irradiation was performed in the Centre Paul Strauss (ICANS, Strasbourg, France) with a 6 MV linear accelerator (Siemens, Courbevoie, France). The PDTs were irradiated directly in the 96-well ultra-low-attachment (ULA) plate after 4 days of formation with an either 4 Gy or 8 Gy X-ray dose at a dose rate of 2 Gy/min with a field size of 40 × 40 cm, a gantry angle of 180° and a source isocenter distance of 100 cm. The PDTs were then incubated again at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.  $\gamma$ -H2AX staining was performed 24 h post-irradiation. A cell viability assay and cleaved-Caspase 3 staining were performed 4 days post-irradiation.

### 2.3. Chemotherapy Treatment

The PDTs were treated after 4 days of formation with different concentrations of cisplatin for 96 h. The medium with the drug was changed after 48 h. For the cisplatin and vinorelbine co-treatment, 10  $\mu$ M of vinorelbine was added with each concentration of cisplatin [24]. A total of 8 PDTs were treated in each condition.

### 2.4. Cell Viability Assay

After the treatment, the cell viability of the PDTs was assessed with a CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA). Each PDT contained in 40  $\mu$ L of the medium in which they had been incubated was transferred from ULA plate to an opaque-walled 96-well plate. A 40  $\mu$ L volume of CellTiter-Glo 3D reagent (Promega, Madison, WI, USA) were added to each well, and the plate was agitated for 25 min at room temperature. The luminescence resulting from the release of ATP was read by MicroBeta TriLux Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Each luminescence value was normalized to the mean value of the control (PDTs without treatment), which is predefined as 100%.

### 2.5. Histological and Immunofluorescence Staining

PDTs were fixed in Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT (Optimum Cutting Temperature, Fisher Scientific, Illkirch, France) and frozen at −20 °C. Samples in 10  $\mu$ m sections were cut with a Leica CM3000 cryostat (Leica Biosystems, Nanterre, France) and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room temperature (RT). The standard hematoxylin and eosin staining protocol was followed.

For the cleaved-Caspase 3 staining, PDT sections were fixed with PFA, washed three times with PBS and then incubated in PBS containing 1% BSA and 0.1% Triton X-100 for 30 min at RT. After the wash, the sections were incubated with cleaved Caspase 3 (D175, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) overnight at 4 °C. The primary antibody was detected by incubating with Alexa Fluor<sup>™</sup> 488 (A11001, Invitrogen, Illkirch, France) secondary antibody for 1 h at RT. The samples were washed with PBS before incubation with 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 10 min at RT. The slides were observed under an epifluorescence Leica DM4000 B microscope (Leica Biosystems, Nanterre, France).

For the whole-mount staining of  $\gamma$ -H2AX, the PDTs were fixed with PFA at 4 °C overnight (ON), washed three times with PBS with rotation for 15 min and then incubated in PBS containing 1% BSA and 0.1% Triton X-100 with rotation at RT ON. After 3 washes with rotation, the PDTs were incubated with  $\gamma$ -H2AX antibody (clone JBW301, 05-636, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 4 °C with rotation ON. Incubation with Alexa Fluor<sup>™</sup> 488 (A11001, Invitrogen, Illkirch, France) secondary antibody was also carried out with rotation at RT ON. The samples were washed with PBS with rotation before incubation with 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) at

RT ON with rotation. Images were taken and analyzed with a confocal microscope (Leica SP8x, objective HC FLUOTAR 25X/0.95, Leica Biosystems, Nanterre, France).

### 2.6. Quantitative PCR Analyses

The RNA of 10 PDTs of each treatment were extracted with Direct-zol RNA MicroPrep (ZYMO research, R2062, Freiburg im Breisgau, Germany) according to the manufacturer's protocol. The RNA concentrations and purity were measured using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE, USA). Reverse transcription was conducted with the iScript<sup>®</sup> reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The quantitative PCR reaction was then performed using the iTaq<sup>®</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> green super mix (Bio-Rad, Miltry-Mory, France) using CFX Connect-Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Miltry-Mory, France). The primers were synthesized by Life Technologies (Saint-Aubin, France) (Table 1). The specificity of the reaction was controlled using melting-curve analysis. GAPDH was used as the endogenous RNA control (housekeeping gene). The expression level was calculated using the comparative Ct method ( $2^{\Delta\Delta C_t}$ ) after normalization to GAPDH. All PCR assays were performed in triplicate, and the results are represented by the mean values with standard error bars.

**Table 1.** List of primers used for quantitative PCR analysis.

| Gene Product | Forward Primer Sequence | Reverse Primer Sequence |
|--------------|-------------------------|-------------------------|
| GAPDH        | CTGACTTCAACAGCGACACC    | GTGGTCCAGGGGTCTTACTC    |
| Caspase 3    | AGAACTGGACTGTGGCATTGAG  | GCTTCTCGGCATACTGTTTCAG  |
| BAX          | GATGCGTCCACCAAGAAGCT    | CGGCCCCAGTTGAAGTTG      |

### 2.7. Droplet Digital PCR

A mutation analysis was performed using duplex ddPCR mutation assays from BioRad on a QX200 Droplet Digital PCR system (Marnes-la-Coquette, France). All reactions were prepared using the ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and performed in duplicate. KRAS somatic mutations were detected using commercial probes provided by Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). For each mutation, two different labeled probes are tested in a single reaction, the first one to detect the mutant allele (6-carboxy-fluorescein, FAM) and the second one to detect the wild-type allele (Hexachloro-fluorescein, HEX). The quantitative value of the KRAS mutant was determined using the variant allele frequency (VAF%). The VAF was reported by the QX200 Droplet Reader and QX manager software, version 2.1 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), after correction for the Poisson distribution.

## 3. Results

### 3.1. Identification of Different Dose-Responses of Lung Cancer PDTs to X-ray-Based Radiation Therapy

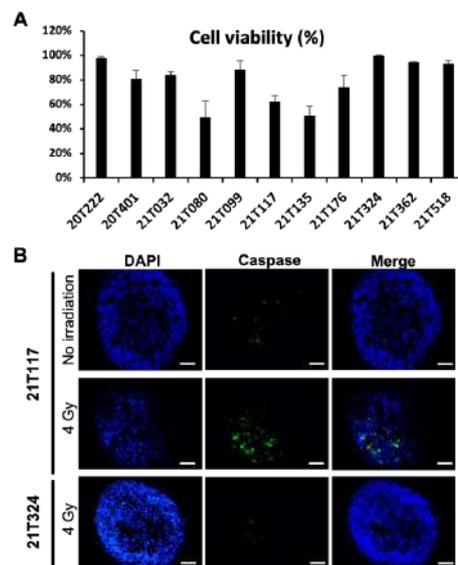
Non-small-cell lung cancer samples were taken from patients who underwent major lung resection for localized lung cancer in the Thoracic Surgery Department of Strasbourg University Hospital. The general information, pathological characterization and clinical outcome of the patients are summarized in Table 2.

**Table 2.** List of NSCLC patients' samples used in this study for the generation of patient-derived tumoroids.

| Patient Identity | Sourcing       | Gender | Age | NSCLC Subtype and TNM Score | Mutational Status     | Decision MDTMs                         |
|------------------|----------------|--------|-----|-----------------------------|-----------------------|--|
| 20T222           | CRB Strasbourg | M      | 80  | AC cT4N2Mx                  | KRAS G12C             | Died quickly after surgery             |
| 20T401           | CRB Strasbourg | F      | 64  | AC cT3N0M0                  | KRAS G12V             | Adjuvant chemotherapy                  |
| 20T428           | CRB Strasbourg | M      | 66  | AC pT3N3M0                  | No mutation           | Surveillance                           |
| 21T032           | CRB Strasbourg | M      | 77  | SCC cT2aN0M0                | Unknown               | Surveillance                           |
| 21T080           | CRB Strasbourg | F      | 48  | AC cT1cN0M0                 | EGFR deletion exon 19 | Adjuvant chemotherapy                  |
| 21T099           | CRB Strasbourg | M      | 60  | AC cT2bN0M0                 | KRAS G12D             | Adjuvant chemotherapy                  |
| 21T117           | CRB Strasbourg | M      | 69  | SCC cT3N0M0                 | Unknown               | Adjuvant radiotherapy                  |
| 21T135           | CRB Strasbourg | M      | 71  | AC cT1bN0M1a                | No mutation           | Adjuvant chemotherapy                  |
| 21T176           | CRB Strasbourg | F      | 55  | AC cT1cN0M0                 | KRAS G12C             | Surveillance                           |
| 21T201           | CRB Strasbourg | M      | 68  | AC cT2aN1M0                 | KRAS G12C             | Adjuvant chemotherapy                  |
| 21T226           | CRB Strasbourg | F      | 62  | AC cT2aN2M0                 | KRAS G12C             | Surveillance                           |
| 21T324           | CRB Strasbourg | M      | 69  | AC cT2bN2M0                 | Unknown               | Immunotherapy                          |
| 21T362           | CRB Strasbourg | M      | 65  | AC cT2bN2M0                 | EGFR deletion exon 19 | Adjuvant chemotherapy and radiotherapy |
| 21T518           | CRB Strasbourg | M      | 84  | AC cT2bN0M1a                | No mutation           | No chemotherapy                        |
| 21T581           | CRB Strasbourg | M      | 63  | AC cT1bN0M0                 | Unknown               | Surveillance                           |
| 22T017           | CRB Strasbourg | M      | 79  | AC cT2bN2M0                 | ROS 1                 | Adjuvant chemotherapy and radiotherapy |

MDTM: multidisciplinary team meetings; AC: adenocarcinoma; SCC: squamous-cell lung carcinoma. TNM Classification of Malignant Tumors (TNM): T: size or direct extent of the primary tumor; N: degree of spread to regional lymph nodes; M: presence of distant metastasis.

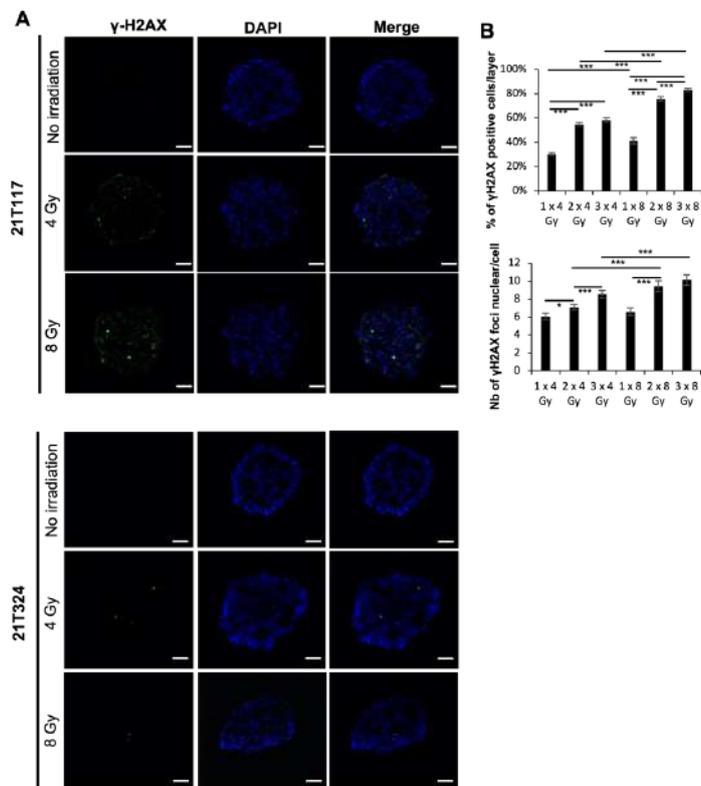
NSCLC samples freshly resected by thoracic surgeons were immediately transported in cold culture medium to the laboratory for the formation of patient-derived tumoroids (PDTs) as previously described [23]. At day four, the PDTs were irradiated with X-rays at 4 Gy in one fraction, and cell viability assays and immunofluorescence analyses were performed 96 h post-irradiation. As shown in Figure 1A, different dose–response profiles were observed for PDTs formed from 11 patients. Around 50% of cells were found dead in the PDTs formed from patients 21T080, 21T117 and 21T135, whereas few dead cells were detected in the PDTs formed from patients 20T222, 21T099, 21T324, 21T362 and 21T518. These results suggest that patients 21T080, 21T117 and 21T135 could be sensitive to X-ray-based radiotherapy; however, patients 20T222, 21T099, 21T324, 21T362 and 21T518 may present radioresistance. The immunofluorescence assay revealed that cleaved-Caspase 3 expression was indeed observed in the PDTs formed from the patient with a good radiation-therapy-related response (21T117), which demonstrated the presence of apoptotic cells in the PDTs. No apoptotic cells were labeled in PDTs formed from the patient with no significant response in viability (21T324) (Figure 1B).



**Figure 1.** Validation of X-ray irradiation in PDT model. (A) Dose–response of PDTs formed from 11 patients’ tumor samples. (B) Immunofluorescence analyses performed on cryosection of PDTs with cleaved-Caspase 3 antibody. Scale bar: 100  $\mu$ m.

It is known that radiation exposure causes DNA double-strand breaks (DSBs), which subsequently lead to cell death or cancer formation, and DSBs could be identified and quantified with the immunofluorescence assay using the  $\gamma$ -H2AX antibody, which could consequently reflect the radiosensitivity of the cells or PDTs [25]. The PDTs were fixed 24 hr post-irradiation to investigate the residual remaining DSBs. Notably,  $\gamma$ -H2AX foci were stained inside of the nucleus upon irradiation only in PDTs formed from patient 21T117, but not in those formed from 21T324, indicating that fewer DNA lesions made by irradiation were detected 24 h post-irradiation in patient 21T324 than in patient 21T117 (Figure 2A). These results suggest that X-ray-based radiotherapy may be beneficial for patient 21T117, but not for patient 21T324.

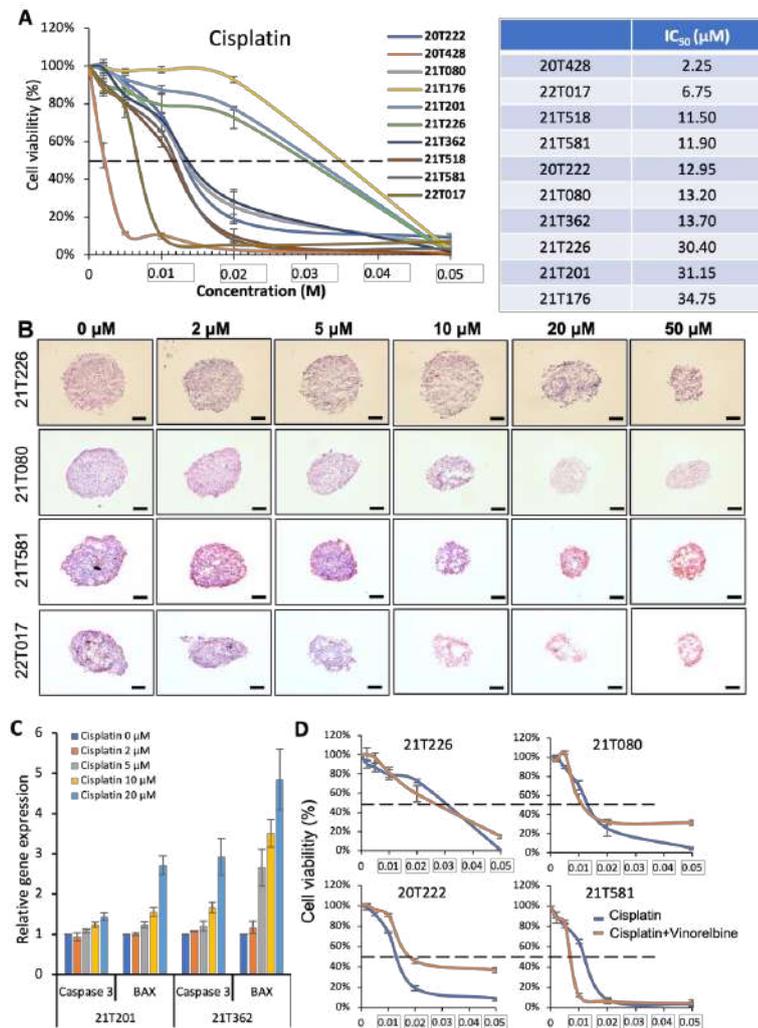
Regarding radiation therapy administration, depending on the clinical indications, patients receive the total amount of irradiation dose with repetitive fractions (up to 25 or 30 fractions depending on the regimen) within a short period of time (3 to 6 weeks mainly). Thus, we have irradiated repetitively those radiosensitive-profile PDTs once every two days to evaluate the DNA DSBs by quantifying the number of stained  $\gamma$ -H2AX foci in the nucleus. The PDTs were fixed 24 h after the last irradiation and whole-mount immunofluorescence staining of  $\gamma$ -H2AX was performed. Quantitative analyses were performed with images obtained from a confocal microscope. We assessed the percentage of  $\gamma$ -H2AX-positive cells per layer (20 layers, 5  $\mu$ m depth) and the number of stained  $\gamma$ -H2AX foci in each positive cell (100 cell nuclei) in each PDT. Both the percentage of  $\gamma$ -H2AX-positive cells per layer and the number of  $\gamma$ -H2AX foci in each cell nucleus were significantly increased by the repetitive irradiation (Figure 2B). We have also observed that 8 Gy irradiation effected more DSBs than 4 Gy irradiation in radiosensitive PDTs (Figure 1A).



**Figure 2.** X-ray irradiation-induced DNA DSBs in PDTs. (A) Immunofluorescence analyses performed on cryosection of PDTs with  $\gamma$ -H2AX antibody. Scale bar: 100  $\mu$ m. (B) Quantitative analyses of DNA DSBs in PDTs. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### 3.2. Identification of Different Dose–Responses of Lung Cancer PDTs to Cisplatin-Based Chemotherapy

To validate our PDT model for chemotherapy, PDTs formed from ten patients were treated at day four with cisplatin. Three distinct groups were identified with cell viability assays after 4 days of treatment (Figure 3A). Resistance to cisplatin treatment was observed in the PDTs formed from patients 21T226, 21T201 and 21T176 ( $IC_{50} > 30 \mu$ M). Good dose–response curves were obtained in the PDTs formed from patients 21T518, 21T581, 20T222, 21T080 and 21T362, while the PDTs formed from patients 20T428 and 22T017 were very sensitive to cisplatin treatment ( $IC_{50} < 7 \mu$ M). H&E staining revealed that the PDT structures and size were gradually destroyed and decreased, respectively, with an increasing dose of cisplatin in the PDTs formed from patients 21T080 and 21T581 (Figure 3B). Not surprisingly, the structure of the PDTs formed from patient 21T017 was damaged at  $5 \mu$ M, while the PDTs formed from patient 21T226 still maintained their structure even with  $20 \mu$ M of cisplatin (Figure 3B). Quantitative PCR analyses were performed on the PDTs to investigate the expression of the pro-inflammatory genes Caspase 3 and Bcl-2-associated X protein (BAX). As shown in Figure 3C, the expression of these two genes increased with cisplatin treatment. However, compared to that of 21T362, a weaker expression of Caspase 3 and BAX was observed in the PDTs formed from patient 21T201, in which a resistance to treatment was detected.



**Figure 3.** Validation of cisplatin-based chemotherapy in PDT model. (A) Dose–response of PDTs formed from 10 patients’ tumor samples with IC<sub>50</sub>. (B) Hematoxylin and eosin (H&E) staining performed on cryosection of PDTs 4 days post-treatment. Scale bar: 100 μm. (C) Quantitative PCR analyses on pro-apoptosis genes Caspase 3 and BAX. (D) Dose–response comparison between cisplatin and cisplatin + vinorelbine treatment in PDTs formed from four patients.

In clinical chemotherapy treatment for lung cancer, cisplatin (or carboplatine) is administrated to patients with another drug, such as vinorelbine, pemetrexed or paclitaxel (double platinum-based chemotherapy). Thus, PDTs were treated with the combination of cisplatin and vinorelbine. No significant effect was observed with vinorelbine alone (10 μM); however, compared to the treatment with cisplatin alone, the combined treatment decreased the IC<sub>50</sub> of the PDTs formed from patients 21T226 (IC<sub>50</sub>: 26.1 μM), 21T080 (IC<sub>50</sub>: 11 μM) and 21T581 (IC<sub>50</sub>: 6.5 μM), indicating that the combined cisplatin/vinorelbine treatment provided a better efficiency (Figure 3D). Interestingly, a resistance to the combined

chemotherapy was also observed in the PDTs formed from patient 20T222 ( $IC_{50}$ : 17.6  $\mu$ M), in which the treatment with cisplatin alone gave a better dose response.

### 3.3. Correlation of Bench Results from PDT Models with Clinical Outcome Assessment

Since different “sensitive–resistant” profiles were observed in patients upon either radiation therapy or chemotherapy, which are commonly administrated to NSCLC patients in clinics, we investigated whether there is a correlation between the results obtained from PDT models and the clinical outcome assessments from the patients. Up to two years of follow-up was pursued for all the patients included in this study to evaluate the clinical outcome of the treatments decided after the tumor board meeting.

According to these data, adjuvant microscopic margins involvement radiation was proposed for patient 21T117 upon pneumonectomy in March 2021 because of the observation of hilar lymph node invasion. Although there was no macroscopic target after surgery to assess the response to adjuvant radiation therapy in this patient, no cancer relapse despite the advanced stage was detected in February 2023, which indirectly suggests a good response to radiation treatment. In agreement with the clinical outcome of this patient, the PDTs formed from this patient showed a good response to radiation (Figures 1 and 2). For patient 21T324, who had a lobectomy in June 2021, a lymph node recurrence/progression was observed and pathologically confirmed in February 2022. Since then, stereotactic body radiation therapy (SBRT) was performed on this patient. Our PDT model indicated that tumor cells from this patient presented radioresistance (Figures 1 and 2), while the clinical results showed the size of the mediastinal lymphadenopathy was not reduced after SBRT completion. Thus, it could be possible that the recurrent carcinoma cells found in the lymph nodes were resistant to radiation therapy. Patient 22T017, having had neoadjuvant chemotherapy before the lobectomy, had an encouraging response to platinum treatment. A very sensitive dose response was also revealed in our PDT model of this patient (Figure 3A,B). On the contrary, an increase in the tumor size was observed for patient 21T226, who received neoadjuvant cisplatin and vinorelbine chemotherapy before surgery, indicating that this patient is resistant to chemotherapy. In our PDT models, cisplatin and vinorelbine in combination ( $IC_{50}$ : 26.1  $\mu$ M) appeared to be more efficient than cisplatin alone ( $IC_{50}$ : 30.4  $\mu$ M); however, resistance to chemotherapy was observed in both treatments (Figure 3A,B,D). Patients 21T080 and 21T362, who had surgery in February 2021 and July 2021, respectively, both benefited from cisplatin and vinorelbine adjuvant chemotherapy, and no relapse has been detected until now for these two patients. A good dose response was observed in our PDT model for both patient 21T080 and patient 21T362 with cisplatin treatment, while an even more efficient treatment with cisplatin and vinorelbine chemotherapy occurred for patient 21T080.

## 4. Discussion

Patient-derived normal tissue or tumor organoid models have been reported to be able to predict the sensitivity of radiotherapy in several cancer types [26–37]; however, no PDT model had been demonstrated to predict the clinical outcome in lung cancer. In this study, we aimed to evaluate the potential benefit of the NSCLC PDT model previously published with X-ray-based radiation therapy treatment. Upon irradiation, DNA DSBs were observed in radiosensitive PDTs within 24 h (Figure 2A) and could be effectively enhanced either by an increased dose or by repetitive irradiation (Figure 2B). These DNA DSBs further led to cell apoptosis in 4 days (Figure 1A,B). On the contrary, DNA DSBs could not be well-detected in radioresistant PDTs, which did not permit us to conduct quantitative analyses; consequently, little cell death were found 96 h post-irradiation (Figures 1 and 2).

The KRAS mutation is detected in 30% of NSCLCs [38] and was reported to be associated with resistance to radiation therapy in NSCLC [39,40]. Among the 11 patients who were included in this study of radiation therapy of their PDTs, KRAS mutations were detected in needle biopsies of four patients (see Table 2). The PDTs formed from three of the four patients (20T222, 20T401 and 21T099) were analyzed with Droplet Digital PCR

(ddPCR) to investigate the presence of KRAS mutations in the PDTs. Not surprisingly, the same KRAS mutations were detected in all PDTs: KRAS G12C in 20T222 (37.86% in PDTs vs. 4.7% in needle biopsy), KRAS G12V in 20T401 (33.9% in PDTs vs. 60% in needle biopsy) and KRAS G12D in 21T099 (6.14% in PDTs vs. 16% in needle biopsy). In agreement with these previous reports, resistance to radiation therapy was indeed observed in our PDT models.

Different dose responses were observed in the PDTs after cisplatin-based chemotherapy. A KRAS G12C mutation was detected in five patients (see Table 2). Interestingly, among these five patients, resistance to cisplatin treatment was revealed in the PDTs formed from patients 21T226, 21T201 and 21T176, whereas a good dose response was observed to PDTs formed from other two patients (20T222 and 21T518) (Figure 3A). Clinical trials demonstrated that KRAS wild-type lung cancer patients exhibited better responses to chemotherapy than KRAS mutant patients; however, the difference was not significant [41–43]. Thus, KRAS status could not be used as an indicator to predict the efficiency of chemotherapy in lung cancer. In this study, although PDTs were formed only from a small cohort of ten patients, a significant dose–response profile could be distinguished to predict the efficiency of chemotherapy in NSCLC.

The resistance or sensitivity to radiotherapy or chemotherapy observed in our PDT models formed from other patients, who were not mentioned in the previous results and discussion, could not be concluded with their clinical outcomes, because these patients did not receive either radiotherapy or chemotherapy before or after the surgery. Although prospective trials evaluating the response to adjuvant therapy with a surrogate such as PDTs are needed, our model appears to identify patients with different response profiles that appear to be related to the clinical response for many. Our model also has the advantage of versatility, as it allows for the evaluation of the response to chemotherapy and also to radiotherapy. Our model can also evaluate the response to tyrosine kinase inhibitors (upcoming publication) and may allow the evaluation of immunotherapy treatment by considering the tumor microenvironment in the future.

One limitation of our PDT model is that these PDTs were formed with tumor samples from the surgery, but not from a lung needle biopsy. It obviously made more sense to start with surgical specimens for feasibility reasons, but this limits the transferability of our model to advanced-stage lung cancer patients. Further work using needle biopsies will be required and would allow us to assess the response to treatment in neoadjuvant therapy settings.

In the era of personalized treatments, our PDT model is a valuable aid to therapeutic decision making. The clinical presentation as well as the molecular and histological evaluation of the tumor will allow us to decide the treatment panel to be tested on organoids. Our model will then allow us to decide on the best treatment from the first line of therapy, and if possible, improve the overall survival of our patients. This approach could be part of a prospective trial where the therapeutic decision made at the tumor board would be guided by our evaluation on PDTs.

## 5. Conclusions

Our patient-derived PDT model allows us to evaluate the response to different treatments offered for lung cancer (chemotherapy, radiation therapy). This robust and straightforward model already allows us to obtain different response profiles depending on the patient and the therapy evaluated. We believe that this type of tool will be a valuable aid in the therapeutic decision in the future of personalized lung cancer treatments.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.B.-J. and G.H.; formal analysis, V.L.; resources, A.O. and P.-E.F.; data curation, A.N., J.S., C.P., J.D., E.P. and M.B.-F.; writing—original draft preparation, J.S., N.B.-J. and G.H.; writing—review and editing, A.N., J.S., C.P., J.D., Y.I.-G., J.-M.B., E.Q., H.B., G.N., F.F., N.B.-J. and G.H.; supervision, N.B.-J. and G.H.; project administration, N.B.-J. and G.H.; funding acquisition, N.B.-J. and G.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research is funded by Transgene SA (Illkirch Graffenstaden, France). A.N. had a Ph.D. fellowship from the Morocco government and was financially supported by the University of Strasbourg, Faculty of Dental Surgery.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Grand Est, France (CNRIPH No. 20.11.12.42058).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank Eloy Santos Pujol for his contribution to this project during his internship in our laboratory. The authors thank the Centre de Ressources Biologiques (CRB) department of Strasbourg University Hospital (MP Chenard) and the photonic microscopy platform of IGBMC (Erwan Grandgirard and Bertrand Vernay). We thank Carole Mura and Joyce Azzi from Centre Paul Strauss (Strasbourg) for the X-ray radiation and helpful discussion, and we thank Hervé Gegout and Laetitia Paulen for technical support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30. [[CrossRef](#)]
2. Biring, S.S.; Peake, M.D. Symptoms and the Early Diagnosis of Lung Cancer. *Thorax* **2005**, *60*, 268–269. [[CrossRef](#)]
3. Ray, M.R.; Jablons, D.; He, B. Lung Cancer Therapeutics That Target Signaling Pathways: An Update. *Expert Rev. Respir. Med.* **2010**, *4*, 631–645. [[CrossRef](#)]
4. Liello, R.D.; Ciaramella, V.; Barra, G.; Venditti, M.; Corte, C.M.D.; Papaccio, F.; Sparano, F.; Viscardi, G.; Iacovino, M.L.; Minucci, S.; et al. Ex Vivo Lung Cancer Spheroids Resemble Treatment Response of a Patient with NSCLC to Chemotherapy and Immunotherapy: Case Report and Translational Study. *ESMO Open* **2019**, *4*, e000536. [[CrossRef](#)]
5. Vinod, S.K.; Hau, E. Radiotherapy Treatment for Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Respirology* **2020**, *25*, 61–71. [[CrossRef](#)]
6. Pechoux, C.L.; Pourel, N.; Barlesi, F.; Lerouge, D.; Antoni, D.; Lamezec, B.; Nestle, U.; Boisselier, P.; Dansin, E.; Paumier, A.; et al. Postoperative Radiotherapy versus No Postoperative Radiotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer and Proven Mediastinal N2 Involvement (Lung ART, IFCT 0503): An Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2022**, *23*, 104–114. [[CrossRef](#)]
7. Oun, R.; Moussa, Y.E.; Wheate, N.J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653. [[CrossRef](#)]
8. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive Molecular Profiling of Lung Adenocarcinoma. *Nature* **2014**, *511*, 543–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Xie, M.; Xu, X.; Fan, Y. KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 672612. [[CrossRef](#)]
10. Kwak, E.L.; Bang, Y.-J.; Camidge, D.R.; Shaw, A.T.; Solomon, B.; Maki, R.G.; Ou, S.-H.I.; DeZube, B.J.; Jänne, P.A.; Costa, D.B.; et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1693–1703. [[CrossRef](#)]
11. Bergethon, K.; Shaw, A.T.; Ignatius Ou, S.-H.; Katayama, R.; Lovly, C.M.; McDonald, N.T.; Massion, P.P.; Siwak-Tapp, C.; Gonzalez, A.; Fang, R.; et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 863–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Drilon, A.; Wang, L.; Hasanovic, A.; Suehara, Y.; Lipson, D.; Stephens, P.; Ross, J.; Miller, V.; Ginsberg, M.; Zakowski, M.F.; et al. Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 630–635. [[CrossRef](#)]
13. Stephens, P.; Hunter, C.; Bignell, G.; Edkins, S.; Davies, H.; Teague, J.; Stevens, C.; O’Meara, S.; Smith, R.; Parker, A.; et al. Intragenic ERBB2 Kinase Mutations in Tumours. *Nature* **2004**, *431*, 525–526. [[CrossRef](#)]
14. Massarelli, E.; Papadimitrakopoulou, V.; Welsh, J.; Tang, C.; Tsao, A.S. Immunotherapy in Lung Cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **2014**, *3*, 53–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Topalian, S.L.; Hodi, F.S.; Brahmer, J.R.; Gettinger, S.N.; Smith, D.C.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Carvajal, R.D.; Sosman, J.A.; Atkins, M.B.; et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2443–2454. [\[CrossRef\]](#)
16. Brahmer, J.R.; Tykodi, S.S.; Chow, L.Q.M.; Hwu, W.-J.; Topalian, S.L.; Hwu, P.; Drake, C.G.; Camacho, L.H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2455–2465. [\[CrossRef\]](#)
17. Chan, B.A.; Hughes, B.G.M. Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Current Standards and the Promise of the Future. *Transl. Lung Cancer Res.* **2015**, *4*, 36–54. [\[CrossRef\]](#)
18. van Maldegem, F.; Downward, J. Mutant KRAS at the Heart of Tumor Immune Evasion. *Immunity* **2020**, *52*, 14–16. [\[CrossRef\]](#)
19. Dijkstra, K.K.; Cattaneo, C.M.; Weeber, F.; Chalabi, M.; van de Haar, J.; Fanchi, L.F.; Slagter, M.; van der Velden, D.L.; Kaing, S.; Kelderman, S.; et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-Culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* **2018**, *174*, 1586–1598.e12. [\[CrossRef\]](#)
20. Kim, M.; Mun, H.; Sung, C.O.; Cho, E.J.; Jeon, H.-J.; Chun, S.-M.; Jung, D.J.; Shin, T.H.; Jeong, G.S.; Kim, D.K.; et al. Patient-Derived Lung Cancer Organoids as in Vitro Cancer Models for Therapeutic Screening. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3991. [\[CrossRef\]](#)
21. Yokota, E.; Iwai, M.; Yukawa, T.; Yoshida, M.; Naomoto, Y.; Haisa, M.; Monobe, Y.; Takigawa, N.; Guo, M.; Maeda, Y.; et al. Clinical Application of a Lung Cancer Organoid (Tumoroid) Culture System. *NPJ Precis Oncol.* **2021**, *5*, 29. [\[CrossRef\]](#)
22. Delom, F.; Begiristain, I.; Grenier, T.; Begueret, H.; Soulet, F.; Siegfried, G.; Khatib, A.-M.; Robert, J.; Fessart, D. Patients Lung Derived Tumoroids (PLDTs) to Model Therapeutic Response. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 118808. [\[CrossRef\]](#)
23. Seitlinger, J.; Nounsi, A.; Idoux-Gillet, Y.; Santos Pujol, E.; Lê, H.; Grandgirard, E.; Olland, A.; Lindner, V.; Zaupa, C.; Balloul, J.-M.; et al. Vascularization of Patient-Derived Tumoroid from Non-Small-Cell Lung Cancer and Its Microenvironment. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1103. [\[CrossRef\]](#)
24. Li, Z.; Qian, Y.; Li, W.; Liu, L.; Yu, L.; Liu, X.; Wu, G.; Wang, Y.; Luo, W.; Fang, F.; et al. Human Lung Adenocarcinoma-Derived Organoid Models for Drug Screening. *iScience* **2020**, *23*, 101411. [\[CrossRef\]](#)
25. Moroni, M.; Maeda, D.; Whitnall, M.H.; Bonner, W.M.; Redon, C.E. Evaluation of the Gamma-H2AX Assay for Radiation Biodosimetry in a Swine Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 14119–14135. [\[CrossRef\]](#)
26. Yao, Y.; Xu, X.; Yang, L.; Zhu, J.; Wan, J.; Shen, L.; Xia, F.; Fu, G.; Deng, Y.; Pan, M.; et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 17–26.e6. [\[CrossRef\]](#)
27. Wang, Y.; Li, Y.; Sheng, Z.; Deng, W.; Yuan, H.; Wang, S.; Liu, Y. Advances of Patient-Derived Organoids in Personalized Radiotherapy. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 888416. [\[CrossRef\]](#)
28. Ganesh, K.; Wu, C.; O'Rourke, K.P.; Szeglin, B.C.; Zheng, Y.; Sauv e, C.-E.G.; Adileh, M.; Wasserman, I.; Marco, M.R.; Kim, A.S.; et al. A Rectal Cancer Organoid Platform to Study Individual Responses to Chemoradiation. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1607–1614. [\[CrossRef\]](#)
29. Karakasheva, T.A.; Gabre, J.T.; Sachdeva, U.M.; Cruz-Acu a, R.; Lin, E.W.; DeMarshall, M.; Falk, G.W.; Ginsberg, G.G.; Yang, Z.; Kim, M.M.; et al. Patient-Derived Organoids as a Platform for Modeling a Patient's Response to Chemoradiotherapy in Esophageal Cancer. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21304. [\[CrossRef\]](#)
30. Hubert, C.G.; Rivera, M.; Spangler, L.C.; Wu, Q.; Mack, S.C.; Prager, B.C.; Couce, M.; McLendon, R.E.; Sloan, A.E.; Rich, J.N. A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found in Vivo. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 2465–2477. [\[CrossRef\]](#)
31. Sundar, S.J.; Shakya, S.; Barnett, A.; Wallace, L.C.; Jeon, H.; Sloan, A.; Recinos, V.; Hubert, C.G. Three-Dimensional Organoid Culture Unveils Resistance to Clinical Therapies in Adult and Pediatric Glioblastoma. *Transl. Oncol.* **2021**, *15*, 101251. [\[CrossRef\]](#)
32. Driehuis, E.; Kolders, S.; Spelier, S.; L ohmussaar, K.; Willems, S.M.; Devriese, L.A.; de Bree, R.; de Ruyter, E.J.; Korving, J.; Begthel, H.; et al. Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 852–871. [\[CrossRef\]](#)
33. Putker, M.; Millen, R.; Overmeer, R.; Driehuis, E.; Zandvliet, M.M.J.M.; Clevers, H.; Boj, S.F.; Li, Q.-X. Medium-Throughput Drug- and Radiotherapy Screening Assay Using Patient-Derived Organoids. *J. Vis. Exp.* **2021**, *170*, e62495. [\[CrossRef\]](#)
34. Lucky, S.S.; Law, M.; Lui, M.H.; Mong, J.; Shi, J.; Yu, S.; Yoon, D.K.; Djeng, S.K.; Wang, J.; Lim, C.M.; et al. Patient-Derived Nasopharyngeal Cancer Organoids for Disease Modeling and Radiation Dose Optimization. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 622244. [\[CrossRef\]](#)
35. Hacker, B.C.; Rafat, M. Organoids as Complex In Vitro Models for Studying Radiation-Induced Cell Recruitment. *Cell Mol. Bioeng.* **2020**, *13*, 341–357. [\[CrossRef\]](#)
36. Hua, G.; Wang, C.; Pan, Y.; Zeng, Z.; Lee, S.G.; Martin, M.L.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z.; Paty, P.B.; Kolesnick, R. Distinct Levels of Radioresistance in Lgr5+ Colonic Epithelial Stem Cells versus Lgr5+ Small Intestinal Stem Cells. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2124–2133. [\[CrossRef\]](#)
37. Pasch, C.A.; Favreau, P.F.; Yueh, A.E.; Babiarz, C.P.; Gillette, A.A.; Sharick, J.T.; Karim, M.R.; Nickel, K.P.; DeZeeuw, A.K.; Sprackling, C.M.; et al. Patient-Derived Cancer Organoid Cultures to Predict Sensitivity to Chemotherapy and Radiation. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 5376–5387. [\[CrossRef\]](#)
38. Reita, D.; Pabst, L.; Pencreach, E.; Guérin, E.; Dano, L.; Rimelen, V.; Voegeli, A.-C.; Vallat, L.; Masciaux, C.; Beau-Faller, M. Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance. *Cancers* **2022**, *14*, 1321. [\[CrossRef\]](#)

39. Wang, M.; Han, J.; Marcar, L.; Black, J.; Liu, Q.; Li, X.; Nagulapalli, K.; Sequist, L.V.; Mak, R.H.; Benes, C.H.; et al. Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin-EGFR Pathway. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2018–2028. [[CrossRef](#)]
40. Yang, L.; Shen, C.; Estrada-Bernal, A.; Robb, R.; Chatterjee, M.; Sebastian, N.; Webb, A.; Mo, X.; Chen, W.; Krishnan, S.; et al. Oncogenic KRAS Drives Radioresistance through Upregulation of NRF2-53BP1-Mediated Non-Homologous End-Joining Repair. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 11067–11082. [[CrossRef](#)]
41. Zalcman, G.; Beau-Faller, M.; Creveuil, C.; de Fraipont, F.; Mounawar, M.; Richard, N.; Bergot, E.; Favrot, M.; Morin, F.; Milleron, B. Use of Ras Effector RASSF1A Promoter Gene Methylation and Chromosome 9p Loss of Heterozygosity (LOH) to Predict Progression-Free Survival (PFS) in Perioperative Chemotherapy (CT) Phase III Trial IFCT-0002 in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 7500. [[CrossRef](#)]
42. Tsao, M.-S.; Aviel-Ronen, S.; Ding, K.; Lau, D.; Liu, N.; Sakurada, A.; Whitehead, M.; Zhu, C.-Q.; Livingston, R.; Johnson, D.H.; et al. Prognostic and Predictive Importance of P53 and RAS for Adjuvant Chemotherapy in Non Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 5240–5247. [[CrossRef](#)]
43. Ghimessy, A.; Radeckzy, P.; Laszlo, V.; Hegedus, B.; Renyi-Vamos, F.; Fillinger, J.; Klepetko, W.; Lang, C.; Dome, B.; Megyesfalvi, Z. Current Therapy of KRAS-Mutant Lung Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 1159–1177. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### 3. Discussion

Plusieurs études antérieures ont décrit l'utilisation de modèles d'organoïdes dérivés de tissus normaux ou de tumeurs de patients pour prédire la sensibilité à la radiothérapie dans différents types de cancer. Cependant, jusqu'à présent, aucun modèle de PDT n'avait été démontré pour prédire les résultats cliniques dans le cancer du poumon. Dans cette étude, il a été cherché à évaluer les avantages potentiels du modèle de PDT précédemment publié pour le carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) dans le contexte du traitement par radiothérapie à base de rayons X (Yao Y., *et al.*, 2020 ; Wang Y., *et al.*, 2022 ; Karakasheva T.A., *et al.*, 2021 ; Sundar S.J., *et al.*, 2021 ; Putker M., *et al.*, 2021 ; Lucky S.S., *et al.*, 2021 ; Hacker B.C., *et al.*, 2020 ; Hua, G., *et al.*, 2017 ; Pasch C.A., *et al.*, 2019).

Après l'administration de la radiothérapie, nous avons observé des cassures des doubles brins de l'ADN (CDB) dans les PDT considérés comme "sensibles à la radiothérapie" dans les 24 heures suivant le traitement. De plus, ces cassures de l'ADN pouvaient être augmentées de manière significative soit en augmentant la dose de radiations, soit en administrant des irradiations répétées. Ces CDB de l'ADN ont ensuite conduit à l'apoptose cellulaire dans les 4 jours suivant le traitement.

En revanche, dans les PDT considérées comme "résistantes à la radiothérapie", les CDB de l'ADN étaient rapidement réparés et n'étaient pas détectables. Ceci explique le faible nombre de cellules mortes observées 96 heures après l'irradiation. Ces résultats suggèrent que notre modèle de PDT peut jouer un rôle crucial dans la prédiction de la réponse à la radiothérapie chez les patients atteints de CPNPC.

D'autre part, la présence de mutations du gène KRAS est associée à une résistance à la radiothérapie dans le carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), et elle est détectée chez environ 30 % des patients atteints de CPNPC (Reita D., *et al.*, 2022 ; Wang M., *et al.*, 2017 ; Yang L., *et al.*, 2021). Dans notre étude, parmi les 11 patients inclus pour l'analyse de l'effet de la radiothérapie sur les modèles de PDT, des mutations KRAS ont été identifiées dans les biopsies à l'aiguille de 4 patients. Nous avons ensuite utilisé la PCR digitale en gouttelettes

(ddPCR) pour analyser la présence de ces mutations KRAS dans les modèles de PDT formés à partir de trois de ces patients (20T222, 20T401 et 21T099).

Dans ce sens, les mêmes mutations KRAS ont été détecté dans les 3 PDT : KRAS G12C dans le cas de 20T222 (37,86 % dans les PDT contre 4,7 % dans la biopsie à l'aiguille), KRAS G12V dans le cas de 20T401 (33,9 % dans les PDT contre 60 % dans la biopsie à l'aiguille), et KRAS G12D dans le cas de 21T099 (6,14 % dans les PDT contre 16 % dans la biopsie à l'aiguille). Ces résultats sont en accord avec les études antérieures et soutiennent l'idée que la présence de mutations KRAS est associée à une résistance à la radiothérapie dans notre modèle de PDT's. Ces modèles PDT ont une réponse différente au traitement de chimiothérapie à base de platine. Parmi les patients inclus dans l'étude, cinq présentaient la mutation KRAS G12C. De manière intéressante, parmi ces cinq patients, les modèles de PDT formés à partir des patients 21T226, 21T201 et 21T176 ont montré une résistance au traitement à la cisplatine, tandis que les modèles de PDT formés à partir des deux autres patients (20T222 et 21T518) ont montré une bonne réponse à ce traitement.

Cependant, des essais cliniques antérieurs suggèrent que les patients atteints de cancer du poumon sans mutation KRAS présentent de meilleures réponses à la chimiothérapie que ceux porteurs de la mutation KRAS. Cette différence n'a pas été statistiquement significative. Par conséquent, le statut KRAS seul ne peut pas être utilisé comme un indicateur fiable pour prédire l'efficacité de la chimiothérapie dans le cancer du poumon (Zalcman G., et *al.*, 2008 ; Tsao M.-S., et *al.*, 2007 ; Ghimessy A., et *al.*, 2020).

Cependant, dans cette étude, bien que nos modèles de PDT n'aient été formés qu'à partir d'une petite cohorte de 10 patients, nous avons pu observer un profil significatif de réponse à la dose qui pourrait potentiellement prédire l'efficacité de la chimiothérapie dans le CPNPC.

Ces résultats soulignent l'importance de considérer des modèles de PDT personnalisés pour évaluer l'efficacité des traitements et permettre une prise de décision plus précise dans le contexte clinique du cancer du poumon.

Il est important de noter que les observations de résistance ou de sensibilité à la radiothérapie et à la chimiothérapie dans nos modèles de PDT ne peuvent pas être directement extrapolées aux résultats cliniques des patients. En effet, ceux-ci n'ont pas été soumis à ces traitements spécifiques avant ou après la chirurgie. Cependant, nos modèles de PDT semblent être capables d'identifier des profils de réponse différents qui pourraient potentiellement être liés à la future réponse clinique chez de nombreux patients.

Il convient de souligner que des essais prospectifs sont nécessaires pour évaluer de manière plus approfondie la réponse à une thérapie adjuvante en utilisant des substituts tels que les

modèles de PDT. Malgré cela, notre modèle présente plusieurs avantages et une certaine polyvalence. Il permet d'évaluer la réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Nos travaux futurs devront inclure également l'évaluation de la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase. De plus, il sera possible d'évaluer la réponse au traitement par immunothérapie.

Ainsi, bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour valider pleinement la valeur clinique de notre modèle de PDT, il offre des perspectives prometteuses pour l'évaluation de différentes modalités thérapeutiques.

En revanche, une limitation importante de notre modèle de PDT est qu'il est basé sur des échantillons tumoraux prélevés lors de l'exérèse chirurgicale complète, plutôt que lors de biopsies pulmonaires à l'aiguille. Cette approche était choisie principalement pour des raisons de faisabilité et d'accès aux échantillons. Cependant, cela peut limiter la généralisation de notre modèle aux patients atteints de cancer du poumon avancés qui sont généralement évalués à l'aide de biopsies pulmonaires à l'aiguille.

Il est clair que des travaux supplémentaires sont nécessaires pour étendre notre modèle et inclure l'utilisation de biopsies pulmonaires à l'aiguille. Cette approche permettrait d'évaluer la réponse au traitement dans le cadre d'une thérapie néoadjuvante, où les patients reçoivent une chimiothérapie ou une radiothérapie avant la chirurgie. L'inclusion de cette population de patients plus avancés serait essentielle pour évaluer pleinement l'utilité clinique et la transférabilité de notre modèle de PDT.

Dans l'ère des traitements personnalisés, notre modèle de PDT représente un outil précieux pour guider la prise de décision thérapeutique. En intégrant les données cliniques, moléculaires et histologiques de la tumeur, nous sommes en mesure de sélectionner un panel de traitements potentiels à tester sur les organoïdes. Cette approche nous permet d'identifier le meilleur traitement dès la première ligne de thérapie, avec l'objectif ultime d'améliorer la survie de nos patients.

L'utilisation de notre modèle PDT pourrait être intégrée dans un essai prospectif, où les décisions thérapeutiques prises lors des réunions de concertation pluridisciplinaire seraient soutenues par notre évaluation sur les PDT. Cela permettrait de renforcer l'approche personnalisée en fournissant des informations supplémentaires basées sur les caractéristiques spécifiques de chaque patient et de leur tumeur. En utilisant notre modèle de PDT, nous pourrions ainsi optimiser les choix thérapeutiques et potentiellement améliorer les résultats cliniques.

Enfin, il est important de souligner que cette approche nécessiterait une collaboration étroite entre les cliniciens, les chercheurs et les équipes médicales, afin de garantir une mise en œuvre appropriée et d'évaluer l'efficacité de notre modèle dans un cadre clinique réel.

#### **4. Conclusion**

Notre modèle PDT dérivé des patients permet d'évaluer la réponse à différents traitements proposés dans le cancer du poumon (chimiothérapie, radiothérapie). Ce modèle robuste et simple nous permet déjà d'obtenir différents profils de réponses en fonction du patient et de la thérapie évaluée. Nous pensons que ce type d'outil constituera une aide précieuse dans la prise de décision thérapeutique dans l'avenir des traitements personnalisés du cancer du poumon.

***Chapitre IV : La vascularisation des tumeurs dérivées  
des patients du cancer du poumon non à petites cellules  
et de leur microenvironnement***

## **Chapitre IV : La vascularisation des tumeurs dérivées des patients du cancer du poumon non à petites cellules et de leur microenvironnement**

### **1. Contexte et objectif**

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité à l'échelle mondiale, avec près de 10 millions de décès enregistrés en 2020. Il existe deux principales formes de cancer du poumon primaire, qui sont classées en fonction du type de cellules dans lesquelles la tumeur commence à se développer : le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) qui représente plus de 87% des cas, et le cancer du poumon à petites cellules. Les cancers du poumon non à petites cellules peuvent être ensuite divisés en trois sous-types sur la base de leurs caractéristiques histologiques : le carcinome épidermoïde, l'adénocarcinome et le carcinome à grandes cellules. Parmi ces trois sous-types, l'adénocarcinome est le plus fréquent chez les patients non-fumeurs (Herbst R.S., *et al.*, 2008 ; Samet J.M., *et al.*, 2009).

Cependant, de nombreux cancers pourraient être guéris s'ils étaient détectés précocement et traités efficacement. Heureusement, grâce à la découverte et au développement de nouveaux médicaments anticancéreux, le taux de décès liés au cancer a connu une baisse significative (32%) au cours des trois dernières décennies. Malgré cela, le processus de développement de médicaments est devenu de plus en plus complexe et coûteux. Malheureusement, le taux de réussite global dans le développement de médicaments prometteurs pour les tumeurs solides reste inférieur à 10% (Takebe T., *et al.*, 2018 et Maeda, H., *et al.*, 2018).

Les premiers modèles établis pour le criblage des médicaments étaient les lignées cellulaires en deux dimensions (2D) et les xénogreffes dérivées de patients (PDX). Les essais *in vitro* classiques utilisant des cellules cancéreuses en monocouche 2D sont simples, rapides, polyvalents, facilement reproductibles et économiques par rapport aux modèles animaux. Cependant, ces modèles ne parviennent pas à reproduire pleinement la structure tridimensionnelle (3D) des tumeurs d'origine et donc ne préservent pas les profils mutationnels spécifiques des tumeurs d'origines. En raison de l'absence d'une architecture tissulaire spécifique, les modèles cellulaires en 2D ne peuvent pas reproduire de manière précise le microenvironnement complexe rencontré par les cellules tumorales ni reproduire de manière fiable la sensibilité ou la résistance aux médicaments observée dans la tumeur primaire. Les modèles PDX conservent le spectre pathologique et mutationnel ainsi que l'organisation en 3D, mais leur élaboration est inefficace, laborieuse et prend généralement plusieurs mois par cas,

rendant ainsi leur utilisation peu pratique pour guider la médecine de précision (Cukierman E., et *al.*, 2001).

Au cours des dernières années, la culture cellulaire tridimensionnelle (3D) *in vitro* a connu un développement prometteur et est devenue un modèle intéressant pour le criblage des médicaments. Ce modèle présente des caractéristiques intéressantes au niveau de l'hétérogénéité, leur plasticité et leur composition avec la présence de noyaux nécrotiques et de leurs régions hypoxiques. De plus, il permet de reproduire les interactions dynamiques entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC), ce qui imite de manière plus fidèle le microenvironnement naturel de la tumeur (MET). Le MET, qui est impliqué dans la tumorigenèse, est composé de la MEC, des cellules stromales (comme les fibroblastes, les cellules neuroendocrines et les cellules inflammatoires immunitaires) et des réseaux vasculaires lymphatiques. Il joue également un rôle crucial dans la différenciation fonctionnelle des organes et est responsable de la fonction et de la structure appropriées des tissus (Thoma C.R., et *al.*, 2014 ; Langhans S.A., 2018 ; Hickman, J.A., et *al.*, 2014 ; Balkwill F.R., et *al.*, 2012).

De plus, il est bien établi que le microenvironnement tumoral (MET) peut avoir un impact significatif sur la sensibilité des cellules tumorales aux médicaments. Des études ont montré que le MET peut modifier la réponse des cellules tumorales aux traitements. Par conséquent, en plus de cibler les cellules tumorales elles-mêmes, le MET représente une cible thérapeutique importante. Ainsi, la reconstruction précise du MET est essentielle pour comprendre la progression tumorale, le développement des métastases et pour évaluer l'effet des médicaments anticancéreux. Les modèles 3D basés uniquement sur des lignées cellulaires cancéreuses ont des capacités prédictives limitées et peuvent ne pas être entièrement prédictifs de la réponse clinique attendue (Klemm, F., et *al.*, 2015 ; Jin M.-Z., et *al.*, 2020).

D'autre part, les tumoroïdes dérivés de patients (PDT's) représentent des modèles de culture cellulaire 3D plus avancés qui ont démontré leur capacité à reproduire les caractéristiques histologiques et mutationnelles des tumeurs d'origine, et à être utilisés pour tester les médicaments anti-cancéreux. L'inefficacité du transport et le défaut de délivrance des médicaments sélectifs aux tumeurs sont l'une des principales raisons de l'échec des tests des médicaments anticancéreux et de l'apparition de résistance aux traitements cliniques. En plus des aspects pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments, le transport des molécules thérapeutiques vers les tumeurs solides dépend du réseau de microvaisseaux présent à l'intérieur de la tumeur, ainsi que des propriétés des tissus environnants. Par conséquent, le développement d'un réseau microvasculaire fonctionnel à l'intérieur et autour de la tumeur revêt

une importance fondamentale pour assurer l'efficacité des traitements (Kim M., et *al.*, 2019 ; Driehuis E., et *al.*, 2020 ; Senapati S., et *al.*, 2018 ; Dewhirst M.W., et *al.*, 2017).

Dans cette deuxième partie du projet, nous présentons un modèle amélioré de PDT vascularisé et enrichi d'un microenvironnement tumoral. Pour reproduire une organisation spatiale plus complexe, nous avons ajouté des cellules de fibroblastes pulmonaires humains aux cellules tumorales de patients atteints de CPNPC. Ensuite, nous avons vascularisé les PDT en utilisant des cellules endothéliales humaines primaires et les avons reliés à une matrice pré-vascularisée afin de recréer l'environnement réel *in vivo*.

## **2. Résultats**

### **2.1. Les PDT du cancer du poumon conservent les caractéristiques histopathologiques du tissu cancéreux d'origine**

Pour évaluer la préservation des caractéristiques histopathologiques du tissu cancéreux d'origine dans les PDT formés à partir de cellules dissociées de biopsies de cancer du poumon, nous avons comparé les analyses d'immunohistochimie effectuées sur les coupes congelées avec celles réalisées directement sur le tissu cancéreux par le laboratoire de pathologie de l'hôpital (sections histologiques en miroir). Les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine ont révélé la présence d'un carcinome invasif non à petites cellules disposé en feuillets de cellules atypiques modérées, entourées d'un stroma fibreux contenant des cellules inflammatoires dans le tissu tumoral. En revanche, le tissu pulmonaire normal présentait des structures bronchiques et alvéolaires, avec un tissu interstitiel conjonctif parsemé de quelques macrophages et lymphocytes. Les PDT tumorales présentaient des cellules néoplasiques au centre, susceptibles de causer la croissance tumorale, entourées de cellules inflammatoires en périphérie. Cette caractéristique n'était cependant pas observée dans les PDT dérivées du tissu sain.

D'autre part, les analyses d'immunohistochimie (IH) ont révélé une coloration plus intense des kératines, des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales, dans le tissu tumoral et les PDT correspondants par rapport au tissu sain et ses PDT correspondants. Les cellules carcinomateuses du cancer du poumon présentaient une forte expression des kératines, tandis que dans le tissu pulmonaire normal, elles étaient principalement exprimées dans l'épithélium respiratoire et alvéolaire. La protéine Ki67 est couramment utilisée comme marqueur de la prolifération des cellules tumorales humaines. Sans surprise, une forte expression de Ki67 a été

observée dans le tissu cancéreux du poumon et dans ses PDT correspondantes, contrairement au tissu normal et à ses PDT correspondants. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) sont associés à un bon pronostic, notamment en ce qui concerne l'immunothérapie, dans le cancer du poumon. Les analyses d'IH utilisant des anticorps CD45 ont montré la présence de cellules immunitaires (probablement des TIL) tant dans les tissus cancéreux que sains, ainsi que dans leurs PDT correspondantes. Cependant, le facteur de transcription thyroïdien 1 (TTF-1) est exprimé dans plus de 70 % des adénocarcinomes, mais rarement dans les carcinomes épidermoïdes. L'immunofluorescence a montré que les PDT formés avec des cellules d'adénocarcinome contenaient des cellules positives pour TTF-1. De plus, ces cellules positives pour TTF-1 exprimaient Ki67, ce qui indique que ces cellules d'adénocarcinome positives pour TTF-1 étaient en phase de prolifération.

## **2.2. Les cellules endothéliales s'infiltrent dans les PDT à partir du microenvironnement vasculaire normal**

Le réseau vasculaire est un élément crucial du microenvironnement tumoral. Étant donné que la vascularisation tumorale diffère considérablement de la vascularisation normale, caractérisée par des vaisseaux sanguins bien organisés et uniformément répartis. Dans la tumeur, le transport de l'oxygène et des nutriments est entravé en raison de la présence de vaisseaux immatures présentant des renflements anormaux et une géométrie irrégulière. Cette situation conduit à une résistance aux thérapies cliniques actuelles. Les analyses d'immunohistochimie ont révélé la présence de cellules endothéliales positives pour CD31 à la fois dans les échantillons d'adénocarcinomes pulmonaires et dans le tissu sain, ainsi que dans les PDT correspondants. De manière intéressante, les PDT formés à partir de tissus sains présentaient une quantité significativement plus élevée de cellules endothéliales positives pour CD31 par rapport à ceux formés à partir de tissus tumoraux.

Pour créer un réseau vasculaire, nous avons tout d'abord combiné des cellules HUVEC (marquées au Green Fluorescent Protein (GFP)), des cellules hMSC et des cellules HPF avec de la fibrine pour former un réseau vasculaire. Après trois jours de culture, le réseau vasculaire s'est développé avec des vaisseaux d'un diamètre variant de 20 à 60 µm. Ensuite, nous avons déposé les PDT sur cette matrice de fibrine vascularisée et les avons laissés se développer pendant sept jours. Les HUVEC marquées avec GFP ont formé un réseau de microvaisseaux

entourant les PDTs. L'analyse microscopique confocale et la reconstruction 3D ont confirmé l'infiltration des PDTs par les microvaisseaux. Ces résultats démontrent de manière concluante que le réseau vasculaire environnant peut pénétrer les PDTs.

### **2.3. Les cellules endothéliales s'infiltrent dans le microenvironnement environnant normal à partir des PDT vascularisés**

Pour examiner si les cellules endothéliales pouvaient inversement infiltrer le microenvironnement non vascularisé environnant des PDTs, nous avons d'abord créé des PDTs pré-vascularisés en ajoutant des HUVEC marquées par GFP à chaque puits contenant un PDT au troisième jour. Après trois jours de co-incubation, nous avons collecté les PDTs et les avons fixés soit dans de l'OCT pour réaliser des coupes à congélées, soit dans du PFA pour une coloration en montage entier. L'immunofluorescence utilisant l'anticorps CD31 sur les coupes histologiques congelées a révélé la présence de cellules endothéliales à la fois à la périphérie et à l'intérieur des PDTs. La coloration GFP a confirmé que les HUVEC marquées au GFP se trouvaient principalement sur la partie périphérique des PDTs, mais quelques-unes d'entre elles avaient effectivement infiltré les PDTs en trois jours. Toutes les cellules CD31 positives ne présentaient pas de marquage GFP, ce qui confirme la présence de cellules endothéliales endogènes dans les PDTs. Nous avons également effectué une coloration en montage entier sur les PDTs. La coloration à la phalloïdine a permis de visualiser les cellules fibroblastiques de la matrice extracellulaire des PDTs, tandis que la coloration GFP a confirmé la présence de HUVEC marquées au GFP infiltrées à l'intérieur des PDTs. Ces résultats démontrent que les cellules endothéliales ajoutées à la culture des PDTs peuvent infiltrer les PDTs.

Ensuite, des PDTs pré-vascularisés avec des HUVEC marquées au RFP ont été placés sur un gel de fibrine non vascularisé. Après sept jours de culture, une angiogenèse s'est produite dans le gel de fibrine, les HUVEC marquées au RFP formant un réseau microvasculaire dans la matrice de fibrine environnante.

### **2.4. La connexion du réseau vasculaire entre le microenvironnement vascularisé et le PDT vascularisé**

L'objectif principal de cette étude est de connecter les PDTs pré-vascularisées avec le microenvironnement vascularisé. Par conséquent, des PDTs pré-vascularisées avec des

HUVEC marquées au Red Fluorescent Protein (RFP) ont été placés sur une matrice de fibrine préalablement vascularisée avec des HUVEC marquées par GFP. Sept jours plus tard, des analyses en microscopie confocale ont confirmé que les microvaisseaux développés par les HUVEC marquées au GFP et au RFP étaient connectés et formaient un réseau vasculaire unique, et que le réseau vasculaire rouge (RFP) provenant des PDTs s'étendait et rejoignait le réseau vasculaire vert développé par les cellules de HUVEC marquées au GFP dans la matrice de fibrine. Il est important de noter que les HUVEC marquées au GFP de la matrice de fibrine pouvaient atteindre et infiltrer les PDTs. Les reconstructions 3D obtenues à partir des analyses en microscopie confocale confirment que ces microvaisseaux présentent une lumière.



Article

# Vascularization of Patient-Derived Tumoroid from Non-Small-Cell Lung Cancer and Its Microenvironment

Joseph Seitlinger <sup>1,2,†</sup>, Anasse Nounsi <sup>1,3,4,†</sup>, Ysia Idoux-Gillet <sup>1,3,4,†</sup>, Eloy Santos Pujol <sup>1,3,4</sup>, Hélène L e <sup>1,3,4,5</sup>, Erwan Grandgirard <sup>6</sup>, Anne Olland <sup>1,2</sup>, Véronique Lindner <sup>1,2</sup>, Cécile Zaupa <sup>5</sup>, Jean-Marc Balloul <sup>5</sup>, Eric Quemeneur <sup>5</sup>, Gilbert Massard <sup>1,2,4</sup>, Pierre-Emmanuel Falcoz <sup>1,2,4</sup>, Guoqiang Hua <sup>1,3,4</sup> and Nadia Benkirane-Jessel <sup>1,3,4,\*</sup>

- <sup>1</sup> INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine, CRBS, 1 Rue Eugène Boeckel, 67000 Strasbourg, France; jo.seitlinger@gmail.com (J.S.); anasse.nounsi@etu.unistra.fr (A.N.); yidouxgillet@unistra.fr (Y.I.-G.); eloy.santos@etu.unistra.fr (E.S.P.); le@transgene.fr (H.L.); anne.olland@chru-strasbourg.fr (A.O.); veronique.lindner@chru-strasbourg.fr (V.L.); gilbert.massard@unistra.fr (G.M.); pefalcoz@gmail.com (P.-E.F.); g.hua@unistra.fr (G.H.)
- <sup>2</sup> 1 Place de l'Hôpital, University Hospital Strasbourg (HUS), 67000 Strasbourg, France
- <sup>3</sup> Faculty of Dental Surgery, University of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France
- <sup>4</sup> Faculty of medicine, University of Strasbourg, 67000 Strasbourg, France
- <sup>5</sup> Transgene SA, 400 Boulevard Gonthier d'Andernach-Parc d'Innovation-CS80166, 67405 Illkirch Graffenstaden, France; zaupa@transgene.fr (C.Z.); balloul@transgene.fr (J.-M.B.); quemeneur@transgene.fr (E.Q.)
- <sup>6</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS, UMR 7104, Inserm U 1258, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Graffenstaden, France; grandgie@igbmc.fr
- \* Correspondence: nadia.jessel@inserm.fr
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Seitlinger, J.; Nounsi, A.; Idoux-Gillet, Y.; Santos Pujol, E.; L e, H.; Grandgirard, E.; Olland, A.; Lindner, V.; Zaupa, C.; Balloul, J.-M.; et al. Vascularization of Patient-Derived Tumoroid from Non-Small-Cell Lung Cancer and Its Microenvironment. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1103. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051103>

Academic Editor:  
Elmina Mammadova-Bach

Received: 31 March 2022  
Accepted: 5 May 2022  
Published: 10 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:**   2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Patient-derived tumoroid (PDT) has been developed and used for anti-drug screening in the last decade. As compared to other existing drug screening models, a PDT-based in vitro 3D cell culture model could preserve the histological and mutational characteristics of their corresponding tumors and mimic the tumor microenvironment. However, few studies have been carried out to improve the microvascular network connecting the PDT and its surrounding microenvironment, knowing that poor tumor-selective drug transport and delivery is one of the major reasons for both the failure of anti-cancer drug screens and resistance in clinical treatment. In this study, we formed vascularized PDTs in six days using multiple cell types which maintain the histopathological features of the original cancer tissue. Furthermore, our results demonstrated a vascular network connecting PDT and its surrounding microenvironment. This fast and promising PDT model opens new perspectives for personalized medicine: this model could easily be used to test all therapeutic treatments and could be connected with a microfluidic device for more accurate drug screening.

**Keywords:** patient-derived tumoroid; vascularization; tumor microenvironment; lung cancer

## 1. Introduction

Cancer is one of the leading causes of death all over the world. Although almost 10 million people died from cancers in 2020, many cancers detected in their early phase could have been cured with effective treatments. With the discovery and the development of new anti-cancer drugs, the overall cancer death rate has significantly declined (32%) over the last three decades. Controversially, drug development has become more and more difficult and complex, which leads to a more than tenfold increase in the cost necessary to develop a drug to the approval stage [1]. Nevertheless, the average success rate to develop promising drugs against solid tumors remains below 10% [2].

Two-dimensional (2D) cell lines and patient-derived xenografts (PDXs) were the first models established for drug screening. Conventional in vitro drug discovery assays

using 2D monolayer cancer cells are simple, fast, versatile, easily reproducible, and cost-effective as compared to animal models; however, they do not fully recapitulate the three-dimensional (3D) structure of the original tumors and do not retain the mutational profiles of their parental tumors. Due to the lack of tissue-specific architecture, these 2D cell models cannot reflect the complex microenvironment for cells encountered in tumor [3], nor the comparable sensitivity or resistance to drugs as the primary tumor. The PDX model retains the pathological and mutational spectrum and the 3D organization, but the establishment of this model is inefficient and labor intensive and usually takes several months per case, which makes it impractical to apply this model to guide precision medicine.

The *in vitro* three-dimensional (3D) cell culture has developed well and become promising models for drug screening in the last decade, and has demonstrated distinct characteristics in heterogeneity, plasticity and morphology (necrotic nuclei, hypoxia regions), as well as dynamic cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions which mimic the natural tumor microenvironment (TME) [4–6]. The TME involved in tumorigenesis is comprised of ECM, stromal cells (such as fibroblasts, neuroendocrine cells, and immune-inflammatory cells), and lymphatic vascular networks [7,8], and is also important in directing the functional differentiation of organs and dictating the proper tissue function and structure [9]. Moreover, it is known that the TME may significantly change the susceptibility of tumor cells to drugs [10,11]. With these emerging examples of TME's implication, TME constitutes a great therapeutic target besides tumor cells. Consequently, to reconstitute TME becomes a primordial task to understand tumor progression, metastasis and to screen anti-cancer drugs. Thus, 3D models based solely on cancer cell lines offer limited drug screening abilities and may not be fully predictive of the clinical response.

Patient-derived tumoroids (PDTs) are more advanced 3D cell culture models. They have been shown to recapitulate histological and mutational characteristics of corresponding tumors and allow for drug screening [12,13]. Poor tumor-selective drug transport and delivery is one of the major reasons for both the failure of anti-cancer drug screens and the resistance in clinical treatment [2,14]. Besides the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the drug, the transport of therapeutical molecules to solid tumors depends not only on the microvessel network established inside the tumor, but also on the properties of the extravascular tissue component [15]. Thus, to develop a functional microvascular network surrounding and within the tumor is fundamental for an efficient treatment.

Lung cancer is the most common cause of global cancer-related mortality; almost 25% of all cancer deaths are due to lung cancer in the US [16]. Two main forms of primary lung cancer are classified according to the cell types in which the cancer starts growing: non-small-cell lung cancer (>87% of cases, NSCLC) and small-cell lung cancer [17]. Based on the histologic characteristics, non-small-cell lung cancers can be subsequently divided into three subtypes: squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and large cell carcinoma. Among the three subtypes of NSCLC, adenocarcinoma is the most common type detected in never-smoked patients [18].

In this study, we describe an improved model for vascularized PDTs and their microenvironment. Human lung fibroblast cells were first added to the tumor cells from NSCLC patients to form more complex PDTs to model spatial organization. The PDTs were then vascularized with primary human endothelial cells to finally be connected to a pre-vascularized matrix to mimic the real *in vivo* environment. Our promising results suggested that this innovative method could be further connected to the microfluidic device and be used for the screening of personalized medicine against cancer. Precision medicine in oncology will ultimately lead to improved overall survival, better quality of life, and a reduction in the medical and economic impact of these treatments.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Human Specimens, Tissue Preparation and PDT Formation

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Grand Est, France (CNRIPIH N° 20.11.12.42058). Samples

were taken from patients who underwent major lung resection for localized lung cancer in the Thoracic Surgery Department of Strasbourg University Hospital. All written informed consent was obtained from patients the day before the surgery. As soon as the lung resection was performed, an adenocarcinomas sample (a 5 mm by 5 mm fragment) was freshly taken by a pathologist without interfering with the clinical pathological diagnosis. A healthy tissue sample was systematically taken from the lung parenchyma from the tumor of the same patient. These two biopsies were then immediately transported in cold culture medium to the laboratory for the formation of PDTs. After being washed with PBS three times, samples were cut into small pieces using sterile instruments, and mixed with 20 mL of digestion medium (DMEM/F12, 0.4% fungizone, 1% antibiotics, 500 µg/mL collagenase I, 25 µg/mL DNase I, 25 µg/mL elastase, 100 µg/mL hyaluronidase) for 1 h at 37°, 5% CO<sub>2</sub> in the incubator with agitation (300 rpm). After incubation, the suspension was passed through 70-µm cell strainers (Corning, Durham, NC, USA), and the strained cells were centrifuged at 240 × g for 4 min, and the pellet was resuspended in 2 mL of ACK buffer (0.1 mM EDTA, 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>) and incubated for 10 min at room temperature with gentle agitation. After having been centrifuged again at 240 × g for 4 min, the pellet was resuspended in DMEM/F12 + 10% FCS. After cell counting, cells can be either frozen at −80 °C or be resuspended in DMEM/F12 supplemented with 10% FCS, 20 ng/µL bFGF, 50 ng/µL human EGF, 2% B27 and 1% N2 to directly form patient derived tumoroids.

Five thousand primary human pulmonary fibroblasts (HPF, CP3300-SC, CliniSciences, Nanterre, France) were mixed with 5000 patient derived cells from either tumor sample or healthy tissue in 150 µL of mixed medium (50% of HPF medium + 50% of DMEM/F12 supplemented with 10% FCS, 20 ng/µL bFGF, 50 ng/µL human EGF, 2% B27 and 1% N2) in each well of a 96-well round bottom Ultra-low attachment (ULA) plate (S-bio, Tokyo, Japan). PDT were photographed using EVOS TM XL Core microscope (Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA, USA).

## 2.2. Vascularization of Fibrin Matrix and PDTs

The fibrinogen (F3879-1G, Sigma-Aldrich™, Saint-Quentin-Fallavier, France) was mixed with  $2.5 \times 10^5$  /mL of HPF,  $1.25 \times 10^5$  /mL Human umbilical vein endothelial cells (GFP-HUVECs, PB-CAP-0001GFP, PELOBiotech) and  $1.25 \times 10^5$  /mL human mesenchymal stem cells (hMSCs C-14092, Promocell, Heidelberg, Germany) from adipose tissue were added to fibrinogen. VEGF was added to a final concentration of 500 ng/mL (Human VEGF-165 Recombinant Protein, PHC9394, Life Technologies, Illkirch-Graffenstaden, France) and mixed gently with the fibrinogen and cells. Thrombin (T6884-1KU, Sigma-Aldrich™, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added with a final concentration of 4IU/mL, and mixed gently with the mix of fibrinogen and cells, and quickly dropped into the culture insert (ThinCert™ 12 well, pore size 1 µm, 665610, Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) to polymerize the fibrinogen and obtain a fibrin gel included with the cells. When the fibrin gel is polymerized, 700 µL of medium was added to the bottom of the well. Inserts were cultured in the incubator overnight and 150 µL of culture medium was added on the gel the next morning. Cells in a fibrin matrix were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for three days.

After three days of culturing the PDTs in the ULA plates,  $4 \times 10^3$  endothelial cells labeled GFP or RFP (RFP-HUVECs, PB-CAP-0001RFP, PELOBiotech) were added to each of the wells to cover the PDTs to “pre-vascularize” the PDTs and favor its vascularization. PDTs were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for an additional three days before the deposition on the matrix. Seven days after the deposition, the matrix with PDTs was fixed and followed as indicated in Section 2.5.

### 2.3. Combination of Vascularized Fibrin Matrix and Vascularized PDTs

After three days of separate culture of pre-vascularization for both fibrin matrix and PDTs to develop the vascularization in each compartment, the vascularized fibrin gel and PDTs were combined. Several PDTs were deposited on the fibrin matrix in the culture inserts and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for seven days. At day seven, culture inserts were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min. Two hundred nM DAPI solution (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added for 20 min. The samples were observed under an epifluorescence microscope (Leica DM4000 B, Nanterre, France) and confocal microscope (Leica SP8x, objective HC FLUOTAR 25X/0,95, Nanterre, France).

### 2.4. Histologic Examination

Patient biopsies and PDTs were fixed in 10% neutral-buffered formalin and then processed for histologic examination including paraffin embedding, sectioning, and staining with hematoxylin and eosin. Sections from selected paraffin blocks for each specimen were used for immunohistochemical analysis. Slides of 4- $\mu$ m-thick tissue sections were incubated at room temperature in an antigen retrieval process (EDTA citrate buffer, pH 8.3, Cell Conditioning Solution (CC1), Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA), revealed with 'Ultra View' Universal DAB Detection kit (Roche Diagnostics SA, Rotkreuz, Switzerland). They were treated on BenchMark ULTRA automated slide-staining instrument (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) with the following monoclonal antibodies: pan-keratin (Clone SPT24, Novocastra/Leica, Nanterre, France), Ki67 (Clone Mib-1, Dako, Santa Clara, CA, USA), CD45 (Clone 2B11+PD7/26, Dako, Santa Clara, CA, USA) and CD31 (Clone EP78, CliniSciences, Nanterre, France).

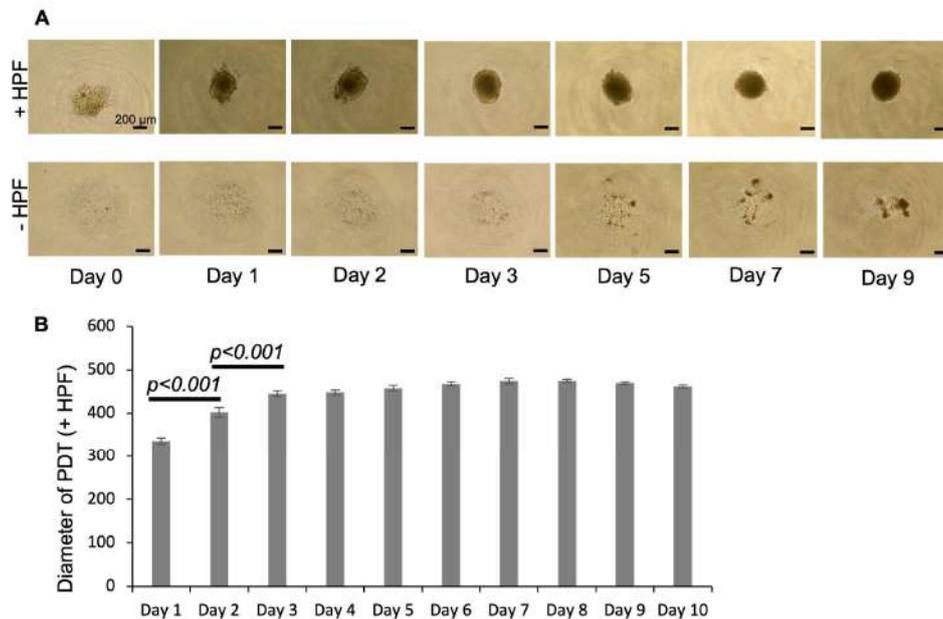
### 2.5. Immunofluorescence Staining

PDTs were fixed in Tissue-Tek<sup>®</sup> OCT (Optimum Cutting Temperature, Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and frozen at −20 °C. 10- $\mu$ m sections made with cryostat (Leica, CM3000, Nanterre, France) were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at 4 °C, washed three times with PBS and then incubated in PBS containing 1% BSA and 0,1% Triton X-100 for 30 min at room temperature (RT). After wash, sections were incubated with indicated primary antibodies: anti-CD31 (ab28364, Abcam, Paris, France), Ki67 (ab279653, Abcam, Paris, France), TTF1 (D2E8, Cell signaling) overnight at 4 °C. Primary antibodies were detected by incubating with Alexa Fluor<sup>™</sup> 488- (A11001, Invitrogen, Illkirch-Graffenstaden, France) and Alexa Fluor<sup>™</sup> 555-conjugated (A31572, Invitrogen, Illkirch-Graffenstaden, France) secondary antibodies for 1 h at RT. After washing, sections were incubated with Alexa Fluor<sup>™</sup> 555-conjugated Phalloidin (A34055, Invitrogen, Illkirch-Graffenstaden, France) for 20 min at RT. Samples were washed with PBS before incubation with 200 nM DAPI (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 10 min at RT. The slides were observed under an epifluorescence microscope (Leica DM4000 B, Saint-Quentin-Fallavier, France) and confocal microscope (Leica SP8x, objective HC FLUOTAR 25X/0,95, Saint-Quentin-Fallavier, France). For the whole-mount IF analyses, except for the PBS wash, all incubations were performed overnight.

## 3. Results

### 3.1. Lung Cancer PDTs Maintain Histopathological Features of Original Cancer Tissue

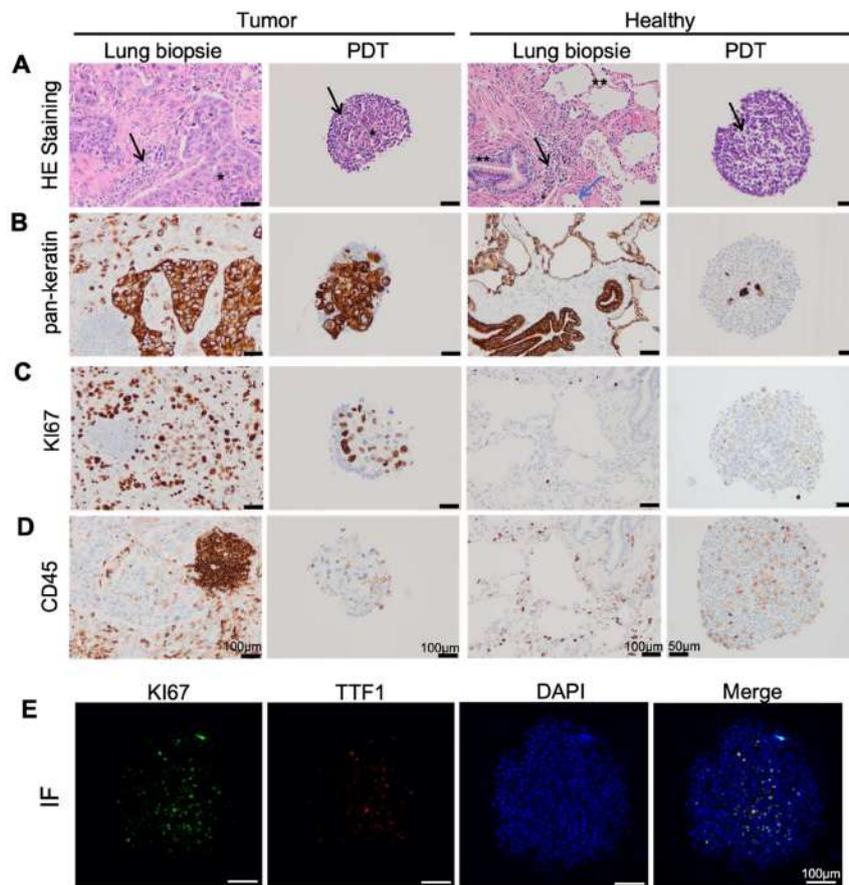
Twenty-six lung adenocarcinoma samples were harvested for the formation of PDTs with a 100% rate of success. PDTs were formed within 24 h in a 96-well ULA (ultra-low attachment) cell plate; the size of the PDTs was significantly increased during the first three days and reached its maximum at D3 (Figure 1A,B). However, without adding human fibroblast, the PDTs could not be formed in 10 days using cells dissociated from the patient's biopsy alone (Figure 1A).



**Figure 1.** Formation of patient-derived tumoroids (PDTs). (A) Daily microscopic observation of the PDTs with or without HPF cells. (B) The diameter of 24 PDTs were measured every day using FIJI software (Version: 2.0.0-rc-69/1.52p). Measurements were repeated for PDTs formed from three biopsies.

In order to investigate whether the PDTs formed with cells dissociated from lung cancer biopsies maintain the histopathological features of the original cancer tissue, we compared the immunohistochemistry analyses performed from the frozen section with those performed directly on cancer tissue by the pathology laboratory of the hospital (histological mirror sections). Hematoxylin and eosin stains showed the invasive non-small cell carcinoma arranged in large sheets of moderate atypical cells surrounded by a fibrous stroma with inflammatory cells in tumor tissue, while bronchial and alveolar structures with conjunctive interstitial tissue punctuated by some macrophages and lymphocytes in the normal lung tissue (Figure 2A). The neoplastic cells which could cause tumor growth were found located in the center of tumor PDT with inflammatory cells in the periphery; however, this feature was not observed in PDT derived from healthy tissue (Figure 2A).

Immunohistochemistry analyses (IH) showed a stronger staining of keratins, specific markers for epithelial cells, in tumor tissue and corresponding PDTs than in healthy tissue and its corresponding PDTs (Figure 2B). Keratins were highly expressed in carcinomatous cells in lung cancer, while they mainly expressed in the respiratory and alveolar epithelium in normal lung tissue (Figure 2B). The Ki67 protein is commonly used as a proliferation marker for human tumor cells. Not surprisingly, a high expression of Ki67 was observed in lung cancer tissue and its corresponding PDTs in contrast to that observed in the normal tissue and its corresponding PDTs (Figure 2C). Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) have been associated with a good prognosis, especially for immunotherapy, in lung cancer [19,20]. IHC analyses using CD45 antibodies demonstrated the presence of immune cells (possibly TILs) in both cancers and healthy tissues and their corresponding PDTs (Figure 2D).



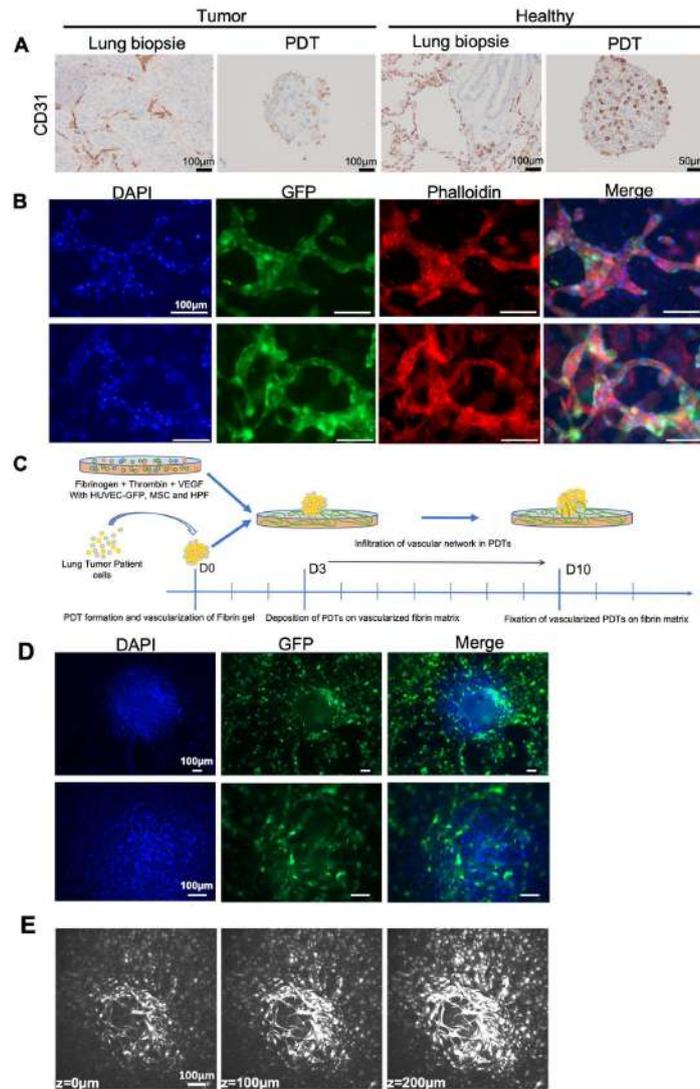
**Figure 2.** Characterization of patient-derived tumoroids (PDTs). (A–D) Immunohistochemistry analyses performed on the lung biopsy and its corresponding PDTs with indicated specific antibodies. \*: epithelial tumoral cells, \*\*: epithelial non tumoral cells (normal respiratory and alveolar epithelium), black arrow: inflammatory cells, blue arrow: endothelial contingent. (E) Immunofluorescence analyses performed on PDTs with indicated stainings.

Thyroid transcription factor 1 (TTF-1) is expressed in more than 70% of adenocarcinoma, but rarely in squamous cell carcinoma. Immunofluorescence showed that PDTs formed with adenocarcinoma cells contained TTF-1 positive cells (Figure 2E). In addition, these TTF-1 positive cells expressed Ki67, indicating that these TTF-1 positive adenocarcinoma cells were proliferating (Figure 2E).

### 3.2. Endothelial Cells Infiltrate PDT from Normal Vascular Microenvironment

The vascular network is an important component of the tumor microenvironment. Since the tumor vasculature is significantly different from the normal vasculature which is made from well-organized and evenly distributed blood vessels, the oxygen and nutrients cannot be transported due to its immature vessel with abnormal bulges and irregular geometry, which leads to the resistance to current clinical therapies. Immunohistochemistry analyses showed the presence of CD31 positive endothelial cells in both lung adenocarci-

noma samples and in healthy tissue, as well as in their corresponding PDTs (Figure 3A). Interestingly, the CD31 positive endothelial cells are found significantly more in the PDTs formed with healthy tissue than in those formed with tumor cells (Figure 3A).



**Figure 3.** Endothelial cells infiltrate PDT from normal vascular microenvironment. (A) Immunohistochemistry analyses performed on the lung biopsy and its corresponding PDTs with CD31 antibody. (B) Immunofluorescence analyses showing the vascular network developed in fibrin gel. (C) Experimental scheme for the combination of vascularized fibrin gel and PDTs. (D,E) Infiltration of endothelial cells into the PDTs. (D) Immunofluorescence analyses; (E) Confocal microscopic Z-Stack analyses.

We first mixed the GFP-labelled HUVEC, hMSC and HPF cells with the fibrin matrix to prepare a vascular network to mimic the normal surrounding microenvironment *in vivo*. As shown in Figure 3B, the vascular network was established after a three-day culture, and the diameter of vessels varied from 20 to 60  $\mu\text{m}$ . We then deposited the PDT on this vascularized fibrin matrix for seven days (Figure 3C). The microvessel network developed by GFP-labeled HUVECs encompassed the PDTs (Figure 3D). Confocal microscopic analysis and 3D reconstruction confirmed that the microvessels infiltrated PDTs (Figure 3E, Supplementary Figure S1). These results clearly indicated that the surrounding vascular network could infiltrate the PDTs.

### 3.3. Endothelial Cells Infiltrate Normal Surrounding Microenvironment from Vascularized PDT

In order to investigate whether endothelial cells could in reverse infiltrate the non-vascularized surrounding microenvironment from PDT, we first established pre-vascularized PDT with GFP-labeled HUVECs added to each well containing a PDT at day three. Three days after the co-incubation, PDTs were collected and fixed either in OCT for frozen section or in PFA for whole mount staining. Immunofluorescence using CD31 antibody on frozen sections revealed endothelial cells both on the peripheric and inside PDTs (Figure 4A). GFP staining confirmed that GFP-labeled HUVECs were mainly on the peripheric part of the PDTs; however, few GFP-labeled HUVECs indeed infiltrated the PDTs in three days (Figure 4B). Not all CD31 positive cells are GFP positive, thus confirming the presence of endogenous endothelial cells in the PDTs. Whole mount IF staining was further performed on the PDTs. Phalloidin staining showed the extracellular matrix of the PDT, while GFP staining confirmed the presence of infiltrated GFP-labeled HUVECs inside the PDTs. These results demonstrated that endothelial cells added to the PDT culture could infiltrate the PDTs.

Next, pre-vascularized PDTs with RFP-labeled HUVECs were placed on top of non-vascularized fibrin gel (Figure 4C and Supplementary Figure S2A). After seven days of culture, angiogenesis occurred in fibrin gel as the RFP-labeled HUVECs developed a microvascular network in the surrounding fibrin matrix (Figure 4D and Supplementary Figure S2B).

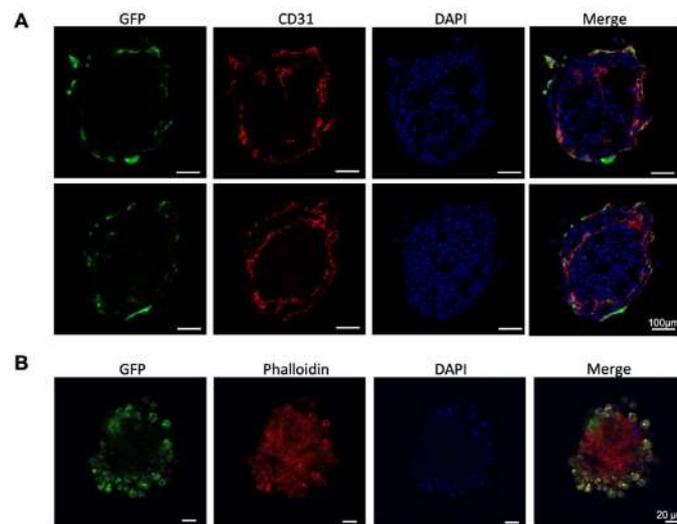
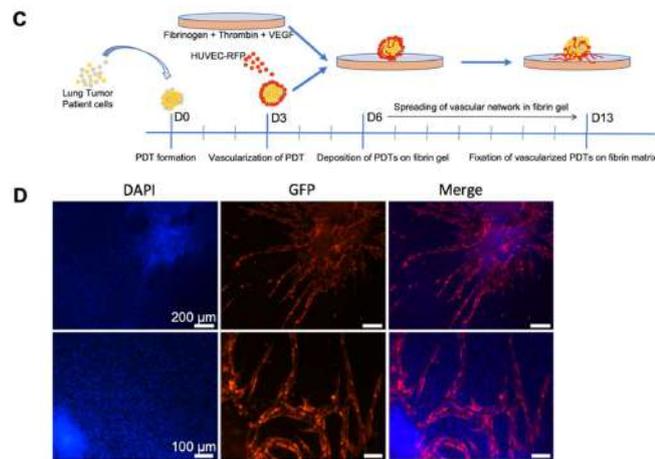


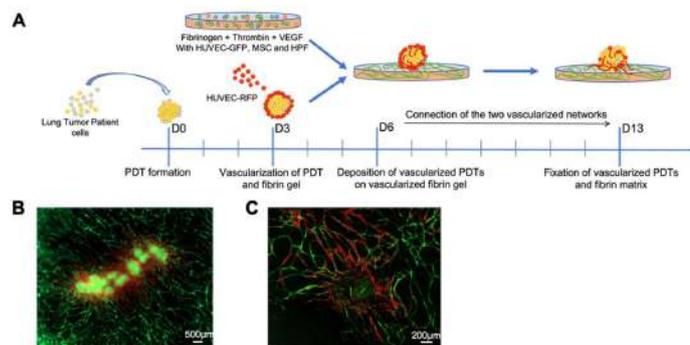
Figure 4. *Cont.*



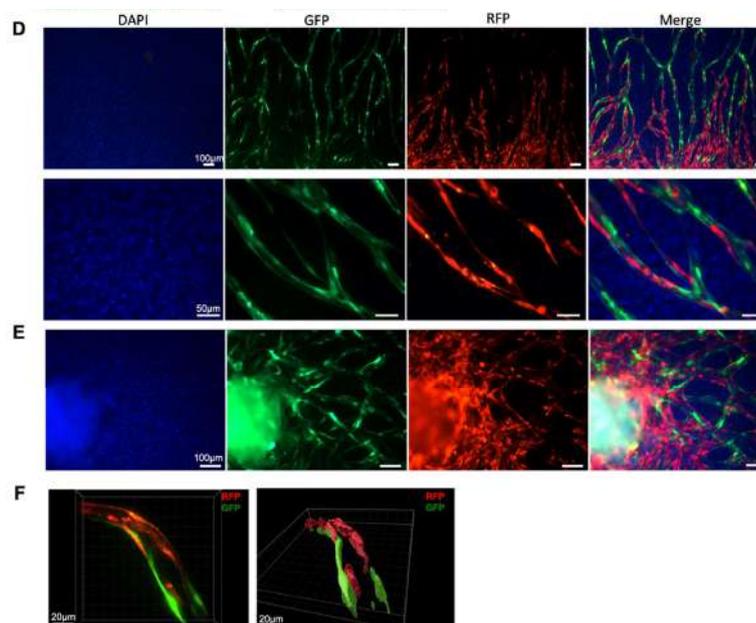
**Figure 4.** Endothelial cells infiltrate the normal surrounding microenvironment from vascularized PDT. Immunofluorescence analyses for vascularized PDTs. (A) cryosection staining; (B) whole mount staining. (C) Experimental scheme for the combination of vascularized PDT and fibrin gel. (D) infiltration of endothelial cells from PDO to fibrin gel.

#### 3.4. Vascular Network Connection between Vascularized Microenvironment and Vascularized PDT

The main purpose of this study is to connect the pre-vascularized PDT with the vascularized microenvironment. Consequently, PDTs pre-vascularized with RFP-labeled HUVECs were laid on a fibrin matrix previously vascularized with GFP-labeled HUVECs (Figure 5A). Seven days later, confocal microscopy analyses confirmed that microvessels developed by both GFP- and RFP-labeled HUVECs connected together and formed a single vascular network (Figure 5B–E), and that the red vascular network originating from PDTs extended and joined the green vascular network developed by the GFP-labeled HUVEC cells in the fibrin matrix (Figure 5B–D). Importantly, GFP-labeled HUVECs from the fibrin matrix could reach and infiltrate the PDT (Figure 5E). The 3D reconstructions obtained from the confocal microscopy analyses confirm that these microvessels presented a lumen (Figure 5F and Supplementary Figure S3).



**Figure 5.** Cont.



**Figure 5.** Vascular network connection between the vascularized microenvironment and vascularized PDT. Immunofluorescence analyses showing (A) Experimental scheme for the combination of vascularized PDTs and vascularized fibrin gel. (B) the global vascular network connecting PDTs and the fibrin gel; (C) the global vascular network surrounding one PDT; (D,E) the connection of two different original vascular networks in the fibrin gel (D) and inside the PDO (E); (F) 3D-reconstruction of one vessel developed by both GFP- and RFP-labeled endothelial cells.

#### 4. Discussion

Patient-derived tumoroids (PDT) or patient-derived organoids (PDO) have gained in importance over the last few years, and these models are now widely used for drug screening and anti-resistance research in various diseases, including several cancer types [12,21–27]. Most of the organoids used in these studies were formed in Matrigel, which supplies the extracellular matrix proteins preparation scaffold. However, this approach could not be easily standardized because the concentrations of growth factors and other biologically active components in Matrigel may vary from different references, even different batches and the overall composition remains unknown [28]. In this paper, patient-derived tumoroids were formed from NSCLC without adding an additional extracellular matrix, but only with primary human pulmonary fibroblasts which are isolated from human lung tissue. By adding the HPF cells into the culture, we increased the success rate of the PDT formation (without failure) and decreased the time needed to form PDT as compared to previously published research [29].

Personalized medicine, also called precision medicine, is not designed to create new drugs which are unique to each patient, but rather to propose the most efficient treatment according to their individual characteristics. The current 3D patient-derived organoid models have been validated for drug screens and could also be used to predict the personalized treatment [30]. These organoids are very beneficial for drug screening, gaining mechanistic insight and the creation of cryobanks for both research and clinical purposes. However, protocols using Matrigel or other matrixes usually need weeks or months to generate the patient-derived organoids, which is a drawback in giving a “back-to-patient” treatment within two to three weeks after the reception of a biopsy from the patient. We have demon-

strated in this paper that the PDTs formed in this model maintain the histopathological features of the original cancer tissue (Figure 2A–D). The presence of CD 45+ cells within the PDTs indicates that tumor infiltrating lymphocytes (TILs) could be present in PDTs. Consequently, it would be interesting to test the checkpoint inhibitors (PD-1/PD-L1) with these PDTs. In addition, the preliminary results from the genomic mutation analyses demonstrated that each specific KRAS mutation from the tumor has been successfully detected in PDTs (data not shown), which suggests that our model is also suitable for screening targeted therapies. Most importantly, the vascularized PDTs could be formed in six days (Figures 1A and 4A,B), allowing us to propose a “back-to-patient” personalized treatment within two to three weeks.

The most common treatments, such as chemotherapy or target specific therapies for cancer patients in clinic are either perfusion or oral administration. At the end, therapeutical molecules reach the tumor through the blood vessels. Although many PDTs-based anti-cancer drug screening models have been established, the PDTs were directly treated in culture in most of these models. In this study, we established a vascularized model to mimic the tumor microenvironment in vivo. Our results revealed that neovascularized vessels could indeed infiltrate into PDTs (Figure 3E, Figure S1), which is in agreement with the previous report [31]. In addition, we have further demonstrated that endothelial cells from the PDTs infiltrated into the surrounding tumor environment and grew rapidly to form a vascular network. It is worth noting that from the same endothelial cells, the neovascularization inside the PDT was not well developed (Figure 4A,B), whereas the surrounding vascular network in the hydrogel had progressed significantly (Figure 4D). This observation could reflect the real situation in vivo where the tumor with an immature vasculature inside was surrounded by the normal microenvironment with well-organized and evenly distributed blood vessels. Finally, we have successfully shown that the vessels neovascularized in the fibrin could indeed be connected with those neovascularized in the PDTs (Figure 5E,F and Supplementary Figure S3). The micro-scale dimension and easy control of fluid make a microfluidic device a perfect partner to 3D cell culture, thus allowing for the creation and mimicking of the dynamic in vivo microenvironment for drug screening [32–34]. Since the normalization of the tumor vasculature could be helpful to optimize the current clinical treatment [35], our model would thus be of great interest to be connected with a microfluidic device for drug screening.

## 5. Conclusions

In this study, we have formed patient-derived tumoroids from non-small-cell lung cancer in four days which could be further vascularized and connected to a prevascularized fibrin hydrogel to mimic the real vascular network involved inside the tumor and its microenvironment. This model could be immediately used to test conventional therapies such as radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy or virotherapy for personalized medicine, or could be further implemented in a microfluidic device to perform drug screening for personalized medicine.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10051103/s1>, Figure S1: 3D-reconstruction of vascular network connection between vascularized microenvironment and vascularized PDT; Figure S2: Infiltration of endothelial cells from PDT to fibrin gel; Figure S3: 3D-reconstruction of one vessel developed by both GFP and RFP labeled endothelial cells.

**Author Contributions:** J.S., A.N., Y.I.-G. contributed equally to this work. This project was conceived by J.S. and N.B.-J. The experiments were designed by Y.I.-G., G.H. and N.B.-J. The biopsies were provided by A.O., P.-E.F. and G.M., and histologically analyzed by V.L., J.S., A.N., E.S.P. and H.L. formed the PDT. and performed the IF. and IHC. analyses. Y.I.-G. prepared, vascularized the fibrin gel, and connected the PDT. with fibrin gel. E.G. performed the confocal microscopic observation. Y.I.-G., V.L., C.Z., J.-M.B., E.Q., G.H. and N.B.-J. analyzed the data. J.S., Y.I.-G., G.H. and N.B.-J. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research is funded by Transgene SA (Illkirch Graffenstaden, France). A.N. had a Ph.D fellowship from the Morocco government. E.S.P. was financially supported by Erasmus fellowship (European Union) and Mobint fellowship (Catalan government).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by Ethics Committee of Grand Est, France (CNRIPIH N° 20.11.12.42058).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors thank the Centre de Ressources Biologiques (CRB) department of Strasbourg University Hospital (MP Chenard) and the photonic microscopy platform of IGBMC (Bertrand Vernay).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Takebe, T.; Imai, R.; Ono, S. The Current Status of Drug Discovery and Development as Originated in United States Academia: The Influence of Industrial and Academic Collaboration on Drug Discovery and Development. *Clin. Transl. Sci.* **2018**, *11*, 597–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Maeda, H.; Khatami, M. Analyses of Repeated Failures in Cancer Therapy for Solid Tumors: Poor Tumor-Selective Drug Delivery, Low Therapeutic Efficacy and Unsustainable Costs. *Clin. Transl. Med.* **2018**, *7*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cukierman, E.; Pankov, R.; Stevens, D.R.; Yamada, K.M. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* **2001**, *294*, 1708–1712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Thoma, C.R.; Zimmermann, M.; Agarkova, I.; Kelm, J.M.; Krek, W. 3D Cell Culture Systems Modeling Tumor Growth Determinants in Cancer Target Discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *69–70*, 29–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Langhans, S.A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 6. [[CrossRef](#)]
6. Hickman, J.A.; Graeser, R.; de Hoogt, R.; Vidic, S.; Brito, C.; Gutekunst, M.; van der Kuip, H. IMI PREDECT Consortium Three-Dimensional Models of Cancer for Pharmacology and Cancer Cell Biology: Capturing Tumor Complexity in Vitro/Ex Vivo. *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 1115–1128. [[CrossRef](#)]
7. Whiteside, T. The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth. *Oncogene* **2008**, *27*, 5904–5912. [[CrossRef](#)]
8. Balkwill, F.R.; Capasso, M.; Hagemann, T. The Tumor Microenvironment at a Glance. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5591–5596. [[CrossRef](#)]
9. Mroue, R.; Bissell, M.J. Three-Dimensional Cultures of Mouse Mammary Epithelial Cells. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *945*, 221–250. [[CrossRef](#)]
10. Klemm, F.; Joyce, J.A. Microenvironmental Regulation of Therapeutic Response in Cancer. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 198–213. [[CrossRef](#)]
11. Jin, M.-Z.; Jin, W.-L. The Updated Landscape of Tumor Microenvironment and Drug Repurposing. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kim, M.; Mun, H.; Sung, C.O.; Cho, E.J.; Jeon, H.-J.; Chun, S.-M.; Jung, D.J.; Shin, T.H.; Jeong, G.S.; Kim, D.K.; et al. Patient-Derived Lung Cancer Organoids as in Vitro Cancer Models for Therapeutic Screening. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Driehuis, E.; Kretzschmar, K.; Clevers, H. Establishment of Patient-Derived Cancer Organoids for Drug-Screening Applications. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 3380–3409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Senapati, S.; Mahanta, A.K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dewhirst, M.W.; Secomb, T.W. Transport of Drugs from Blood Vessels to Tumour Tissue. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 738–750. [[CrossRef](#)]
16. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30. [[CrossRef](#)]
17. Herbst, R.S.; Heymach, J.V.; Lippman, S.M. Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1367–1380. [[CrossRef](#)]
18. Samet, J.M.; Avila-Tang, E.; Boffetta, P.; Hannan, L.M.; Olivo-Marston, S.; Thun, M.J.; Rudin, C.M. Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2009**, *15*, 5626–5645. [[CrossRef](#)]
19. Brambilla, E.; Le Teuff, G.; Marguet, S.; Lantuejoul, S.; Dunant, A.; Graziano, S.; Pirker, R.; Douillard, J.-Y.; Le Chevalier, T.; Filipits, M.; et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1223–1230. [[CrossRef](#)]
20. Buisseret, L.; Garaud, S.; de Wind, A.; Van den Eynden, G.; Boisson, A.; Solinas, C.; Gu-Trantien, C.; Naveaux, C.; Lodewyckx, J.-N.; Duvillier, H.; et al. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Composition, Organization and PD-1/ PD-L1 Expression Are Linked in Breast Cancer. *Oncimmunology* **2016**, *6*, e1257452. [[CrossRef](#)]

21. Salgueiro, L.; Kummer, S.; Sonntag-Buck, V.; Weiß, A.; Schneider, M.A.; Kräusslich, H.-G.; Sotillo, R. Generation of Human Lung Organoid Cultures from Healthy and Tumor Tissue to Study Infectious Diseases. *J. Virol.* **2022**, *96*, e0009822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sandhya, S.; Hogenson, T.L.; Fernandez-Zapico, M.E. Patient-Derived Organoids, Creating a New Window of Opportunities for Pancreatic Cancer Patients. *EMBO Mol. Med.* **2022**, *14*, e15707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tuveson, D.; Clevers, H. Cancer Modeling Meets Human Organoid Technology. *Science* **2019**, *364*, 952–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lee, S.H.; Hu, W.; Matulay, J.T.; Silva, M.V.; Owczarek, T.B.; Kim, K.; Chua, C.W.; Barlow, L.J.; Kandoth, C.; Williams, A.B.; et al. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell* **2018**, *173*, 515–528. [[CrossRef](#)]
25. Fatehullah, A.; Tan, S.H.; Barker, N. Organoids as an in Vitro Model of Human Development and Disease. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 246–254. [[CrossRef](#)]
26. Yao, Y.; Xu, X.; Yang, L.; Zhu, J.; Wan, J.; Shen, L.; Xia, F.; Fu, G.; Deng, Y.; Pan, M.; et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 17–26. [[CrossRef](#)]
27. Drost, J.; Clevers, H. Organoids in Cancer Research. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 407–418. [[CrossRef](#)]
28. Kozłowski, M.T.; Crook, C.J.; Ku, H.T. Towards Organoid Culture without Matrigel. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 1387. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, Z.; Wang, H.; Ding, Q.; Xing, Y.; Xu, Z.; Lu, C.; Luo, D.; Xu, L.; Xia, W.; Zhou, C.; et al. Establishment of Patient-Derived Tumor Spheroids for Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194016. [[CrossRef](#)]
30. Aboulkheyr Es, H.; Montazeri, L.; Aref, A.R.; Vosough, M.; Baharvand, H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 358–371. [[CrossRef](#)]
31. Han, S.; Kim, S.; Chen, Z.; Shin, H.K.; Lee, S.-Y.; Moon, H.E.; Paek, S.H.; Park, S. 3D Bioprinted Vascularized Tumour for Drug Testing. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Song, C.; Gao, D.; Yuan, T.; Chen, Y.; Liu, L.; Chen, X.; Jiang, Y. Microfluidic Three-Dimensional Biomimetic Tumor Model for Studying Breast Cancer Cell Migration and Invasion in the Presence of Interstitial Flow. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, *30*, 1038–1042. [[CrossRef](#)]
33. Li, X.; Valadez, A.V.; Zuo, P.; Nie, Z. Microfluidic 3D Cell Culture: Potential Application for Tissue-Based Bioassays. *Bioanalysis* **2012**, *4*, 1509–1525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Van Duinen, V.; Trietsch, S.J.; Joore, J.; Vulto, P.; Hankemeier, T. Microfluidic 3D Cell Culture: From Tools to Tissue Models. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 118–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Schaaf, M.B.; Garg, A.D.; Agostinis, P. Defining the Role of the Tumor Vasculature in Antitumor Immunity and Immunotherapy. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 115. [[CrossRef](#)]

### 3. Discussion

Au cours des dernières années, les tumoroides dérivés de patients (PDT) ou les organoïdes dérivés de patients (PDO) ont gagné en importance et sont désormais largement utilisés dans le criblage de médicaments et la recherche sur l'anti-résistance dans différentes maladies, notamment dans divers types de cancer (Kim M., et *al.*, 2019 ; Salgueiro L., et *al.*, 2022 ; Tuveson D., et *al.*, 2019 ; Lee S.H., et *al.*, 2018 ; Fatehullah A., et *al.*, 2016 ; Drost J., et *al.*, 2018).

Cependant, la plupart de ces études ont utilisé du Matrigel® comme support pour la formation des organoïdes, car il fournit une matrice extracellulaire contenant des protéines nécessaires à leur croissance. Cependant, il est difficile de standardiser cette approche car les concentrations de facteurs de croissance et d'autres composants biologiquement actifs dans le Matrigel® peuvent varier entre différentes sources et même entre différents lots, et sa composition globale reste inconnue (Kozlowski M.T., et *al.*, 2021).

Dans cette deuxième partie, nous avons formé des tumoroides dérivés de patients à partir de CPNPC sans utiliser de matrice extracellulaire supplémentaire, mais en utilisant uniquement des fibroblastes pulmonaires primaires humains isolés à partir de tissu pulmonaire humain. En ajoutant les cellules HPF à la culture, nous avons amélioré le taux de succès de formation des PDT (sans échec) et réduit le temps nécessaire pour obtenir les PDT par rapport aux études précédemment publiées (Zhang Z., et *al.*, 2018).

Cependant, l'objectif de la médecine personnalisée, également connue sous le nom de médecine de précision, n'est pas de développer de nouveaux médicaments spécifiques à chaque patient, mais plutôt de recommander le traitement le plus efficace en fonction de leurs caractéristiques individuelles. Les modèles d'organoïdes dérivés de patients en 3D actuellement disponibles ont été validés pour le criblage de médicaments et pourraient également servir à prédire le traitement personnalisé (Aboukheyr Es H., et *al.*, 2018).

Ces organoïdes sont extrêmement bénéfiques pour le criblage de médicaments, l'acquisition d'une compréhension mécanistique et la création de cryobanques à des fins cliniques de recherche et cliniques. En revanche, les protocoles utilisant du Matrigel® ou d'autres matrices nécessitent souvent plusieurs semaines voire plusieurs mois pour générer des organoïdes dérivés de patients, ce qui constitue un inconvénient pour pouvoir proposer un traitement personnalisé dans un délai de deux à trois semaines après la réception d'une biopsie du patient. Dans notre étude, nous avons démontré que les PDT formés dans notre modèle conservent les caractéristiques histopathologiques du tissu cancéreux d'origine. De plus, la présence de cellules

CD45+ dans les PDT suggère la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILS). Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité des inhibiteurs de points de contrôle (PD-1/PD-L1) sur ces PDT.

De plus, les résultats de notre première étude sur les analyses de mutations génomiques ont révélé la détection réussie de chaque mutation spécifique de KRAS présente dans la tumeur au sein des PDT. Cela indique que notre modèle est également adapté pour le criblage des thérapies ciblées. De manière plus significative, nous avons pu former des PDT vascularisés en seulement six jours, ce qui nous permet de proposer un traitement personnalisé "adapté au patient" dans les deux à trois semaines suivant la réception de la biopsie.

Les traitements couramment utilisés en clinique, tels que la chimiothérapie ou les thérapies ciblées, sont administrés par perfusion intraveineuse ou par voie orale. Ces molécules thérapeutiques atteignent finalement la tumeur en passant par les vaisseaux sanguins. Bien que de nombreux modèles de criblage de médicaments anticancéreux basés sur les PDT aient été développés, la plupart de ces modèles traitent directement les PDT en culture. Dans notre étude, nous avons mis en place un modèle vascularisé visant à imiter le microenvironnement tumoral *in vivo*. Nos résultats ont confirmé que de nouveaux vaisseaux sanguins pouvaient effectivement pénétrer les PDT, ce qui est en accord avec les constatations antérieures (Han S., et al., 2020).

D'autre part, nous avons observé que les cellules endothéliales issues des PDTs s'infiltraient dans l'environnement tumoral environnant et se développaient rapidement pour former un réseau vasculaire. Il convient de noter qu'à partir des mêmes cellules endothéliales, la néovascularisation à l'intérieur des PDTs était moins développée que le réseau vasculaire environnant dans l'hydrogel avait progressé de manière significative. Cette observation reflète probablement la situation réelle *in vivo*, où la tumeur présente une vascularisation immature à l'intérieur, entourée d'un microenvironnement normal avec des vaisseaux sanguins bien organisés et uniformément répartis. Enfin, nous avons réussi à démontrer que les vaisseaux néovascularisés dans la fibrine pouvaient effectivement se connecter à ceux présents dans les PDTs. Les dispositifs microfluidiques, en raison de leurs dimensions à l'échelle micrométrique et de la facilité de contrôle des fluides, se révèlent être des partenaires idéaux pour la culture cellulaire 3D, permettant ainsi de créer et de reproduire le microenvironnement dynamique *in vivo* pour le criblage de médicaments. Étant donné que la normalisation de la vascularisation tumorale peut contribuer à optimiser les traitements cliniques actuels, notre modèle présente un fort potentiel pour être associé à un dispositif micro-fluidique dans le cadre du criblage de médicaments notamment des molécules anti-cancéreuses.

## **4. Conclusion**

Dans cette étude, nous avons formé des tumoroides dérivés de patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules en quatre jours, qui pourraient ensuite être vascularisés et connectés à un hydrogel de fibrine pré-vascularisé pour imiter le réseau vasculaire réel présent à l'intérieur de la tumeur ainsi que son microenvironnement. Ce modèle pourrait être immédiatement utilisé pour tester des traitements conventionnels tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la virothérapie dans le cadre de la médecine personnalisée, ou pourrait être mis en œuvre connecté à un dispositif micro-fluidique pour réaliser un criblage de médicaments dans le cadre de la médecine personnalisée.

## Conclusion générale et perspectives

Notre objectif est d'optimiser une plateforme de criblage de molécules anti-cancéreuses, en vue de développer une médecine de précision et personnalisée.

Une première étude, a été consacrée à la conception d'un modèle de tumeurs dérivées de patients (PDT's) atteints de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).

Nos tumeurs ont été formés en seulement quatre jours, ce qui est considérablement plus rapide que les protocoles précédemment proposés et qui est tout à fait stratégique du point de vue du temps clinique. En utilisant des cellules de fibroblastes pulmonaires humains et les cellules tumorales des patients, des tumeurs plus complexes ont pu être formés qui reproduisent l'organisation spatiale et les caractéristiques histopathologiques des tumeurs d'origine. De plus, notre modèle de PDT's représente une avancée significative dans l'évaluation de l'efficacité des traitements du cancer du poumon, car ils permettent d'évaluer également la réponse à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Ainsi, ce modèle de tumeur est le premier à évaluer l'effet de la radiothérapie chez les patients atteints du cancer de poumon à non petites cellules. Ce modèle, à la fois robuste et simple permet d'obtenir des profils de réponses spécifiques à chaque patient et à chaque thérapie et chaque combinaison de thérapies. Grâce à cette approche, ce modèle a une valeur prédictive de l'efficacité des différentes options thérapeutiques. Il offre la possibilité d'analyser les différentes combinaisons de traitements pour définir celles qui seront les plus favorables. Par exemple, une molécule anti-cancéreuse pourra être optimisée par la radiothérapie et pas une autre dont l'efficacité sera inchangée (Boustani J., et al., 2021).

L'utilisation de ce modèle de PDT offre de nombreux avantages dans le contexte des traitements personnalisés du cancer du poumon. Tout d'abord, il permet d'obtenir des informations préliminaires sur la réponse d'un patient à une thérapie spécifique avant de la mettre en œuvre, ce qui contribue à une prise de décision éclairée. En évaluant la réponse des PDT aux traitements, les options thérapeutiques les plus prometteuses peuvent être identifiées pour chaque patient, en prenant en compte les caractéristiques individuelles de sa tumeur.

De plus, le modèle de PDT proposé ici offre une approche plus rapide et moins coûteuse pour évaluer l'efficacité potentielle des traitements. Plutôt que de procéder à des essais cliniques coûteux et potentiellement longs, ce modèle peut être utilisé *in vitro* pour obtenir des résultats préliminaires plus rapidement et à moindre coût. Cela permet également de réduire les risques pour les patients, en évitant l'administration de traitements inefficaces et ainsi limiter la perte de chance liée à un défaut de ciblage thérapeutique.

D'autre part, ce modèle de PDT pourrait également être adapté à d'autres types de cancer du poumon tels que le cancer du poumon à petites cellules (CPPC), qui représente 15 à 20% de tous les cancers du poumon. Le CPPC reste l'un des types de cancer les plus fatals, avec une prolifération rapide et une grande malignité. Il présente généralement une tendance aux métastases précoces et étendues (Molina J.R. et *al.*, 2008 ; Demedts I.K. et *al.*, 2010 ; Yang S. et *al.*, 2019). Diverses études ont montré la possibilité de former des organoïdes à partir de cellules de patients atteints de ce cancer du poumon à petites cellules. Cependant, la reconstitution en modèle tridimensionnel présente plusieurs difficultés. Les obstacles sont le taux de croissance variable des CPPC et la présence de cellules nécrotiques au sein de leur organoïde. De plus, la nature agressive des cellules du CPPC, qui se caractérise par une croissance rapide, rend leur maintien en culture tridimensionnelle plus complexe. Ainsi, la plupart de ces facteurs rendent difficile la culture *in vitro* tridimensionnelle des cellules du CPPC et donc la transposition de notre protocole de PDT établi pour les CPNPC (Kim M. et *al.*, 2019 ; Choi SY., et *al.*, 2021).

Dans une seconde étude, ce modèle de tumeur reconstitué en 3D *in vitro* a été optimisé en introduisant une composante vasculaire. Cette dernière est le point faible de la majorité des modèles 3D et elle représente une caractéristique clé de la modélisation tumorale.

Ainsi, des tumoroides vascularisés plus complexes qui reproduisent l'organisation spatiale et les caractéristiques histopathologiques des tumeurs d'origine ont été obtenues.

Premièrement, il a été mis en évidence qu'un réseau vasculaire environnant peut pénétrer nos PDT's. De plus, il a été montré une connexion entre les vaisseaux néo-vascularisés des tumoroides et ceux de l'hydrogel de fibrine environnant, reproduisant ainsi mieux l'environnement complexe de la tumeur.

La vascularisation de notre modèle de PDT obtenue en 15 jours peut se maintenir pendant une semaine. Cette durée limitée du modèle représente une limite de notre modèle mais ceci pourrait être surmonté avec une perfusion qui permettrait un flux continu de milieu pour entretenir régulièrement les cellules. En effet, les vaisseaux formés ont un diamètre de 30 à 40µm et ils présentent une lumière ce qui prouve le potentiel de perfusion.

La formation de micro-vaisseaux a été possible à l'intérieur de nos tumoroides, en mimant ainsi le réseau vasculaire tumoral. Cette vascularisation va nous permettre d'étudier les interactions entre les cellules tumorales et les vaisseaux sanguins, ainsi que l'effet des molécules anti-cancéreuses sur la dynamique de ces deux compartiments tumoraux.

Ce modèle de tumeurs vasculaires offre plusieurs avantages pour la médecine personnalisée. Il permet de tester rapidement et efficacement des traitements conventionnels tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la virothérapie. Ceci peut aider à déterminer la meilleure approche thérapeutique pour chaque individu.

Dans l'avenir des traitements personnalisés du cancer du poumon, il est à penser que ce type de modèle de PDT dérivés des patients, jouera un rôle crucial dans la prise de décision thérapeutique. En intégrant ces informations dans le processus décisionnel, une approche de traitement plus ciblée peut s'offrir aux patients augmentant ainsi les chances de succès des traitements et donc leur espérance de vie. Cependant, il est important de continuer à développer et à valider ce modèle avec des études cliniques et des données supplémentaires pour en maximiser son potentiel et sa fiabilité. Enfin, il est important de souligner que cette approche nécessiterait une collaboration étroite entre les cliniciens, les chercheurs et les équipes médicales, afin de garantir une mise en œuvre appropriée et d'évaluer l'efficacité de notre modèle dans un cadre clinique réel.

En termes de perspectives, il sera intéressant de pousser notre modèle à reproduire la complexité de l'environnement tumoral. Ainsi, ce modèle pourrait être intégré dans un dispositif micro-fluidique, permettant de réaliser des criblages de molécules anti-cancéreuses dans des conditions plus proches de la physiologie tumorale.

Les puces micro-fluidiques sont des méthodes qui offrent la possibilité d'étudier en détail les caractéristiques de la vascularisation tumorale, notamment l'angiogenèse tumorale et le développement de métastases. Grâce à ces systèmes miniaturisés, il est possible de recréer des conditions dynamiques similaires à l'environnement *in vivo*, permettant ainsi d'explorer les mécanismes complexes de la vascularisation tumorale (Lim J., et *al.*, 2021).

En effet, les puces micro-fluidiques, en simulant les conditions *in vivo*, permettent une meilleure évaluation de l'efficacité des médicaments pour les patients atteints de CPNPC. Ces puces permettent un criblage dynamique des médicaments, offrant une surveillance en temps réel de leur effet grâce à l'imagerie, un contrôle précis de la durée d'exposition et la possibilité d'appliquer des combinaisons de traitements (Lê H., et *al.*, 2022 ; Yildiz-Ozturk E., Schuster B., 2020).

Cette porte qui sera ouverte par le dispositif micro-fluidique devrait ainsi permettre une avancée considérable de notre modèle, permettant l'analyse de nombreuses combinaisons de traitements presque illimitées. Cette possibilité d'analyse de l'effet simultané de différentes molécules est tout à fait avantageuse. En effet, pouvoir bénéficier de l'effet synergique de différentes

molécules anti-cancéreuses et prévenir leurs effets potentiels antagonistes est tout à fait cruciale (Lutz J.C et *al.*, 2019 ; Liu et *al.*, 2017 ; Peng F., et Chen M., 2010).

Ainsi, ce dispositif alliant notre modèle PDT à une technique microfluidique de criblage jouera un rôle crucial lors du criblage des molécules anti-cancéreuses. Il sera un modèle abouti qui englobe la composante vasculaire et matriciel de l'environnement de la tumeur.

L'ajout de la technologie micro-fluidique constituerait une avancée majeure, car il sera possible d'explorer de nombreuses options pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer et faire gagner un temps précieux aux patients atteints de cancer du poumon.

De plus, notre modèle pourrait être enrichie en intégrant la composante immunitaire, qui orchestre le développement tumoral et la résistance aux médicaments. Le microenvironnement tumoral est le siège d'interactions complexes entre les cellules cancéreuses et le système immunitaire. La compréhension de ces mécanismes aiderait aussi à mieux cibler les thérapeutiques. Ainsi, l'étude des interactions entre les cellules tumorales et le système immunitaire est stratégique, car les cellules cancéreuses les plus agressives ont la capacité d'échapper au système immunitaire. En comprenant ces mécanismes, il sera possible de concevoir des approches visant à renforcer la réponse immunitaire anti-cancéreuse et à améliorer l'efficacité des traitements.

L'immunothérapie représente un avenir prometteur pour le traitement du cancer du poumon. En intégrant cette dimension à notre modèle, des tests d'immunothérapie pourraient être développés. Ceci pourrait transformer l'approche du traitement de cette maladie et permettre d'élaborer des stratégies thérapeutiques plus efficaces.

A l'avenir, combiner la technologie du dispositif micro-fluidique à la composante immunitaire dans notre modèle, permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes du cancer et de développer des approches thérapeutiques innovantes pour lutter contre le cancer du poumon. Cela ouvrirait la voie à des traitements plus efficaces et personnalisés, améliorant ainsi les perspectives de guérison pour les patients atteints de cancer du poumon.

## Références bibliographiques

Aboukheyr Es H., Montazeri L., Aref A.R., Vosough M., Baharvand H. Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends Biotechnol.* 2018, 36, 358–371.

Ahlskog J., Paganelli G., et Neri D. Vascular tumor targeting. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2006 Dec;50(4):296-309.

Aggarwal B, Danda D, Gupta S, Gehlot P. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 1083-94.

Al-Kattan K, Sepsas E, Fountain SW, et al. Disease recurrence after resection for stage I lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; 12:380-4.

Allendorf J.D., Lauerman M., Bill A., DiGiorgi M., et *al.*, Neoadjuvant chemotherapy and radiation for patients with locally unresectable pancreatic adenocarcinoma: feasibility, efficacy, and survival, *J. Gastrointest. Surg.* 12 (1) (2008) 91-100.

Almatroodi S.A., McDonald,C.F., Darby I.A., Pouniotis D.S. Characterization of M1/M2 tumour-associated macrophages (TAMs) and Th1/Th2 cytokine profiles in patients with NSCLC. *Cancer Microenviron.* 2016, 9, 1–11.

American Cancer Society. Surgery for Non-Small Cell Lung Cancer. 2022, 1.8000.227.2345. [Cancer.org](https://www.cancer.org).

American Society of Clinical Oncology (ASCO), prostate cancer guide 2023. [www.cancer.net](https://www.cancer.net).

Amini A, Yeh N, Gaspar LE, et al. Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer patients previously treated with conventional radiotherapy: a review. *Radiat Oncol* 2014;9:210.

Anand P., Kunnumakkara AB., Sundaram C., Harikumar KB., Tharakan ST., Lai OS., Sung B., Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.* 2008 Sep;25(9):2097-116.

Anderson N.M., et Simon M.C., The tumor microenvironment *Current Biology* 30, R905–R931, August 17, 2020.

Andrade de Mello R., Moisés Neves N., Tadokoro H., Araújo Amaral G., Castelo-Branco P and André de Almeida Zia V. New Target Therapies in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of the Literature and Future Perspectives. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 3543.

Arcangelo M., et Cappuzzo F. Focus on the potential role of ficlatuzumab in the treatment of non-small cell lung cancer *Biologics. Targets Ther.* 2013;7:61.

Arranz-Nicolás, J., Martín-Salgado, M., Adán-Barrientos, I., Liébana, R., del Carmen Moreno-Ortiz, M., Leitner, J., et al. (2021). Diacylglycerol Kinase  $\alpha$  Inhibition Cooperates with PD-1-Targeted Therapies to Restore the T Cell Activation Program. *Cancer Immunol. Immunother.* doi:10.1007/s00262-021-02924-5

Arneth, B. Tumor Microenvironment. *Medicina* 2019, 56, 15.

Aslam M.S., Naveed S., Ahmed A., Abbas Z., Gull I., et Athar M.A., Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 2014 ; 5, 817-822.

Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Vansteenkiste JF, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:1675–84.

Asghar W., El Assal R., Shafiee H., Pitteri S., Paulmurugan R., et Demirci U. Engineering cancer microenvironments for *in vitro* 3-D tumor models. *Mater Today (Kidlington)*. 2015 ;18(10):539-553.

Axelsson. Occupational and environmental exposure to radon : cancer risks. *Annu Rev Public Health* 1991;12: 235–255.

Azimi T., Loizidou M., et Dwek, M. V. Cancer cells grown in 3D under fluid flow exhibit an aggressive phenotype and reduced responsiveness to the anti-cancer treatment doxorubicin. *Sci. Rep.* 2020; 10:12020.

Bai, R.; Chen, N.; Li, L.; Du, N.; Bai, L.; Lv, Z.; Tian, H.; Cui, J. Mechanisms of Cancer Resistance to Immunotherapy. *Front. Oncol.* 2020, 10, 1290.

Balch, C.M., et al., Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 2001. 19(16): p. 3635-48.

Balkwill, F.R., Capasso M., Hagemann T. The Tumor Microenvironment at a Glance. *J. Cell Sci.* 2012, 125, 5591–5596.

Bains MS. Surgical treatment of lung cancer. *Chest*. 1991;100(3):826-37. PMID: 1889280; <https://doi.org/10.1378/chest.100.3.826>.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.

Baudino, T.A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug. Discov. Technol.* 2015, 12, 3–20.

Baxevasanos, P.; Mountzios, G. Novel chemotherapy regimens for advanced lung cancer: Have we reached a plateau? *Ann. Transl. Med.* 2018, 6, 139.

Beck F, Richard J-B. Alcohol use in France. *Presse Med.* 2014;43(10 Pt 1): 1067–79. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.02.027>.

Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 2006 ; 6, 702– 713.

- Berghmans T., Grigoriu B., Giroux-Leprieur E., Revel M.-P. La classification TNM en pratique. *Revue des maladies respiratoires actualités*. 2020, 12, 2S53-2S60.
- Bergers, G., et Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 401–410.
- Bergethon K., Shaw A.T., Ignatius Ou S.-H., Katayama R., Lovly C.M., McDonald N.T., Massion P.P., Siwak-Tapp C.; Gonzalez A., Fang R., et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J Clin Oncol* **2012**, 30, 863–870.
- Bernard-Tessier A., Bonnet C., Lavaud P., et Gizzi M., Lorient Y., et Massard C. Atézolizumab (Tecentriq®): Activité, indication et modalités d'utilisation dans les carcinomes urothéliaux localement avancés ou métastatiques. *Bull Cancer* 2018, 105, 140–145.
- Bessa X, Elizalde JJ, Boix L, et al. Lack of prognostic influence of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;120:1084-92.
- Bezjak A, Temin S, Franklin G, Giaccone G, Govindan R, Johnson ML, et al. Definitive and Adjuvant Radiotherapy in Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*, 2015;33(18):2100-5.
- Bhatia R, Lopipero P, Smith AH. Diesel exposure and lung cancer . *Epidemiology* 1998;9:84–91.
- Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug;32(8):760-72. Shemesh J., Jalilian I., Shi A., Yeoh G., Tate K.M.L., et Warkiani ME.. Flow-induced stress on adherent cells in microfluidic devices. *Lab Chip*. 2015; 15, 4114–4127.
- Bi YA., Kazolias D., et Duignan DB. Use of cryopreserved human hepatocytes in sandwich culture to measure hepatobiliary transport. *Drug Metab Dispos*. 2006. 34: 1658–1665.
- Biernacka A., Tsongalis PD., Peterson JD., de Abreu FB., Black CC., Gutmann EJ., et al. The potential utility of re-mining results of somatic mutation testing: KRAS status in lung adenocarcinoma. *Cancer Genet*.2016 ;209(5):195–8.
- Black, R.C.; Khurshid, H. NSCLC: An Update of Driver Mutations, Their Role in Pathogenesis and Clinical Significance. *Rhode Isl. Med. J*. 2015, 98, 25–28.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018:
- Brambilla C, Laffaire J, Lantuejoul S, et al. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. *Clin Cancer Res* 2014; 20(22):5777–86.
- Breslin S., et O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 2013; 18: 240-9.

Birgersdotter A., Sandberg R., et Ernberg I. Gene expression perturbation *in vitro* – a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 405-12.

Birring S.S., Peake M.D. Symptoms and the Early Diagnosis of Lung Cancer. *Thorax* **2005**, *60*, 268–269.

Bonnesoeur S., Morin-Grognet, S., Thoumire O., Le Cerf D., Boyer, O., Vannier, J. P., et al. Hyaluronan-based hydrogels as versatile tumor-like models: tunable ECM and stiffness with genipin-crosslinking. *J. Biomed. Mater. Res. A*; 2020; 108, 1256–1268.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;373:1627-39.

Boustani J, Lecoester B, Baude J, Latour C, Adotevi O, Mirjolet C, Truc G. Anti-PD-1/Anti-PD-L1 Drugs and Radiation Therapy: Combinations and Optimization Strategies. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 29;13(19):4893.

Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62:6997-7000.

Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):5813-20. PMID: 10229815.

Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, Gasser TC, Mihatsch MJ. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 2000;31:578–83.

Bui T.M., Yalom L.K., Sumagin R. Tumor-associated neutrophils: Orchestrating cancer pathobiology and therapeutic resistance. *Expert Opin. Ther. Targets* 2021, *25*, 573–583.

Butturini G. , Stocken D.D., Wente M.N., et *al.*, Influence of resection margins and treatment on survival in patients with pancreatic cancer: meta-analysis of randomized controlled trials, *Arch. Surg.* 143 (1) (2008) 75-83.

*CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

*CA: Cancer J Clin.* 2018; 68 :394-424. © 2018 American Cancer Society.

Chalmers AW., Patel S., Boucher K., Cannon L., Esplin M., Luckart J, et al. Phase I trial of targeted EGFR or ALK therapy with ipilimumab in metastatic NSCLC with long-term follow-up. *Target Oncol.* 2019;14(4):417–21.

Camarda R., Williams J., Malkov S., Zimmerman L.J.et Manning S., Aran D., Beardsley A., Van de Mark D., Chen Y., et Berdan,C.A. Tumor cell-adipocyte gap junctions activate lipolysis and are essential for breast tumorigenesis. *bioRxiv* 2018, 277939.

Campbell N.E., Kellenberger L., Greenaway J., et Moorehead, R.A. Linnerth-Petrik, N.M.; Petrik, J. Extracellular Matrix Proteins and Tumor Angiogenesis. *J. Oncol.* 2010, 2010, 586905.

Campos D. F. D., Marquez A. B., O'seanain, C., Fischer H., Blaeser A., et Vogt, M., et al. Exploring cancer cell behavior *in vitro* in three-dimensional multicellular bioprintable collagen-based hydrogels. *Cancers*. 2019; 11:180.

Cancer.gov, (2007). Cancer.gov (2007) What Is Cancer? [online] Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> [Accessed 10 Jun. 2021].

Cardarella S, Ogino A, Nishino M, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19:4532-40.

Cardenal F, Lopez-Cabrerizo M, Anton A et al.: Randomized phase III study of gemcitabine-cisplatin versus etoposide- cisplatin in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 17(1), 12–18 (1999).

Carnio S, Novello S, Papotti M, et al. Prognostic and predictive biomarkers in early stage non-small-cell lung cancer: tumor based approaches including gene signatures. *Transl Lung Cancer Res* 2013; 2:372-81.

Castellanos, E.; Feld, E.; Horn, L. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2017, 12, 612–623.

Catalán, D.; Mansilla, M.A.; Ferrier, A.; Soto, L.; Oleinika, K.; Aguillón, J.C.; Aravena, O. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front. Immunol.* 2021, 12, 611795.

Cawkill D., et Eaglestone SS. Evolution of cell-based reagent provision. *Drug Discov Today* 2007 ; 12: 820-5.

Centre International de Recherche sur le Cancer- OMS. Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018 [Internet]. 2018 sept p. 3. Report No.: Communiqué de presse n°263. Disponible sur: [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_F.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_F.pdf)

Chakraborty T., Chatterjee A., Rana A., Dhachinamoorthi D., Kumar P A., et Chatterjee M. Carcinogen-induced early molecular events and its implication in the initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats: chemopreventive role of vanadium on this process. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:48-59.

Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:565-94. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.565. PMID: 11244047.

Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JCH, Han JY, Hochmair MJ, et al. Brigatinib versus crizotinib in advanced ALK inhibitor-naïve ALKpositive non-small cell lung cancer: second interim analysis of the phase III ALTA-1L trial. *J Clin Oncol.* 2020;38(31):3592–603.

Charles M-A, Eschwège E, Basdevant A. Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(9): 2182–6. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.285>.

Chater.A. Cancer broncho pulmonaire et thérapeutique. Thèse de doctorat, université Abou BekrBelkaid. Tlemcen, Algérie. 2014 ; 129p.

Chatzis C, Danaka G, Linos A, Kales SN, Christiani DC. Lung cancer and occupational risk factors in Greece. *J Occup Environ Med* 1999;41:29–35.

Cheema U., Rong, Z., Kirresh, O., MacRobert, A. J., Vadgama, P., et Brown, R. A. Oxygen diffusion through collagen scaffolds at defined densities: implications for cell survival in tissue models. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012; 6, 77–84.

Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2005;13:5043–5054.

Chen J.J., Lin, Y.-C., Yao P.-L., Yuan A., Chen H.-Y., Shun C.-T., Tsai M.-F., Chen C.-H., Yang P.-C. Tumor-associated macrophages: The double-edged sword in cancer progression. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 953–964.

Chen, S., Zhang, Z., Zheng, X., Tao, H., Zhang, S., Ma, J., et al. Response Efficacy of PD-1 and PD-L1 Inhibitors in Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.* 2021; 11, 562315. doi:10.3389/fonc.2021.562315

Chen, V.E.; Greenberger, B.A.; Taylor, J.M.; Edelman, M.J.; Lu, B. The Underappreciated Role of the Humoral Immune System and B Cells in Tumorigenesis and Cancer Therapeutics: A Review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2020, 108, 38–45.

Chen, X.; Jensen, P.E. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2008, 56, 77–83.

Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, D.A. and St Clair, D.K. (2007) Collateral Damage in Cancer Chemotherapy: Oxidative Stress in Nontargeted Tissues. *Molecular Interventions*, 7, 147-156.

Cheng Y., Zhang T., Xu Q. Therapeutic advances in non-small cell lung cancer: Focus on clinical development of targeted therapy and immunotherapy. *MedComm.* 2021; 2:692–729.

Chiu D.K.-C., Tse A.P.-W., Xu I.M.-J., Di Cui J., Lai R.K.-H., Li L.L., Koh, H.-Y., et Tsang F.H.-C.; Wei, L.L.; Wong, C.-M. Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1–12.

Choi SY, Cho YH, Kim DS, Ji W, Choi CM, Lee JC, Rho JK, Jeong GS. Establishment and Long-Term Expansion of Small Cell Lung Cancer Patient-Derived Tumor Organoids. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 29, 22(3):1349.

Clevers H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018 ; 11;172(1-2):373-386.

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz J-M, De Angelis R, Capocaccia R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008;9(8):730-56.

Cowppli-Bony A, Colonna M, Ligier K, Jooste V, Defossez G, Monnereau A, et al. Épidémiologie descriptive des cancers en France métropolitaine : incidence, survie et prévalence. *Bull Cancer (Paris)* [Internet]. 2019. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007455119300670>

Corsiero, E.; Delvecchio, F.R.; Bombardieri, M.; Pitzalis, C. B cells in the formation of tertiary lymphoid organs in autoimmunity, transplantation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 2019, 57, 46–52.

Costa EC., Moreira AF., de Melo-Diogo D., Gaspar VM., Carvalho MP., et Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv.* 2016; 34(8):1427-1441.

Cox T.R., et Erler J.T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model. Mech.* 2011, 4, 165–178.

Cox, T.R. The matrix in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2021, 21, 217–238.

Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 2001, 294,1708–1712.

Cucherousset J., et Cucherousset N. Nouvelle classification anatomopathologique des cancers pulmonaires. *Le nouveau Cancérologue.* 2014, Volume 07 / Numéro 01, 25-30.

Cui JJ., Rogers E., Zhai D., Deng W., Ung J., Nguyen V., et al. Abstract 5226: TPX-0131: A next generation macrocyclic ALK inhibitor that overcomes ALK resistant mutations refractory to current approved ALK inhibitors. *Can Res.* 2020;80(16 Supplement):5226.

Cuppens K., et Vansteenkiste J. Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2014;26(2):165–70.

Dagogo-Jack I, Shaw AT, Riely GJ. Optimizing treatment for patients with anaplastic lymphoma kinase-positive lung cancer. *Clin Pharmacol Ther* (2017) 101(5):625–33.

Daenen LGM, Roodhart JML, van Amersfoort M, Dehnad M, Roessingh W, Ulfman LH, et al. Chemotherapy enhances metastasis formation via VEGFR-1-expressing endothelial cells. *Cancer Res* 2011;71:6976–85.

Danson S, Middleton MR, O’Byrne KJ et al.: Phase III trial of gemcitabine and carboplatin versus mitomycin, ifosfamidewild-type cisplatin or mitomycin, vinblastinewild-type cisplatin in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. 2003, *Cancer* 98(3), 542–553.

Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, et al. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 1994;19:474-80.

Däster S., Amatruda N., Calabrese D., Ivanek R., Turrini E., Droeser RA., Zajac P., Fimognari C., Spagnoli GC., Iezzi G., Mele V., et Muraro MG. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):1725-1736.

Datta P., Ayan B., et Ozbolat IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta Biomater*. 2017 Mar 15;51:1-20.

Davies G., Cunnick, G.H., Mansel R.E.; Mason M.D., et Jiang, W.G. Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 2004, 21, 31–37.

De Angelis, M. L., Bruselles, A., Francescangeli, F., Pucilli, F., Vitale, S., Zeuner, A., et al. Colorectal cancer spheroid biobanks: multi-level approaches to drug sensitivity studies. *Cell Biol. Toxicol*. 2018 ; 34, 459–469.

Dees, S.; Ganesan, R.; Singh, S.; Grewal, I.S. Regulatory T cell targeting in cancer: Emerging strategies in immunotherapy. *Eur. J. Immunol*. 2021, 51, 280–291.

Delom F., Begiristain I., Grenier T., Begueret H., Soulet F., Siegfried G., Khatib A.-M., Robert J., Fessart D. Patients Lung Derived Tumoroids (PLDTs) to Model Therapeutic Response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2020**, 1867, 118808, doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118808.

Del Re, M. ; Crucitta, S.; Gianfilippo, G.; Passaro, A.; Petrini, I.; Restante, G.; Michelucci, A.; Fogli, S.; de Marinis, F.; Porta, C.; et al. Understanding the Mechanisms of Resistance in EGFR-Positive NSCLC: From Tissue to Liquid Biopsy to Guide Treatment Strategy. *Int. J. Mol. Sci*. 2019, 20, 3951.

Demedts I.K., Vermaelen K.Y., van Meerbeeck J.P. Treatment of extensive-stage small cell lung carcinoma: Current status and future prospects. *Eur. Respir. J*. 2010;35:202–215.

De Mello, R.A.; Neves, N.M.; Amaral, G.A.; Lippo, E.G.; Castelo-Branco, P.; Pozza, D.H.; Tajima, C.C.; Antoniou, G. The Role of MET Inhibitor Therapies in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Clin. Med*. 2020, 9, 1918.

Denoix PF. Règles générales de classification des cancers et de présentation des résultats thérapeutiques. *Acad Chir Paris* 1959 ;85:415–24.

Denotte.M. L'utilisation de la thérapie ciblée dans les cancers bronchique.Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté de pharmacie. 2009 ; 85p.

Denton A.E., Roberts E.W., et Fearon D.T. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2018, 1060, 99–114.

De Palma M., Biziato D., et Petrova T. V., “Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8,2017; pp. 457–474.

Derda R, Laromaine A, Mammoto A, et al. Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(44):18457–18462.

DES pneumologie. le cancer pulmonaire-anatomp-pathologie-. 2018./ [http://des-pneumo.org/wp-content/uploads/2018/02/cancer\\_histo.pdf](http://des-pneumo.org/wp-content/uploads/2018/02/cancer_histo.pdf)

De Ruyscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AWM & Hegi-Johnson F. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5, 13.

De Sanctis F., Ugel S., Facciponte J., et Facciabene A. The dark side of tumor-associated endothelial cells. In *Proceedings of the Seminars in Immunology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 35–47.

Dewhirst M.W., Secomb T.W. Transport of Drugs from Blood Vessels to Tumour Tissue. *Nat. Rev. Cancer* 2017, 17, 738–750.

Díaz-Serrano A., Sánchez-Torre A., et Paz-Ares L. Necitumumab for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*. 2019 Mar;15(7):705-716.

Díaz, L., Zambrano-González, E., Flores, M. E., Contreras, M., Crispín, J. C., Alemán, G., et al. Ethical considerations in animal research: the principle of 3R's. *Rev. Invest. Clin*. 2020.

Dietrich, M.F.; Gerber, D.E. Chemotherapy for Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Treat. Res*. 2016, 170, 119–149.

Di Martino J.S., Mondal C., et Bravo-Cordero J.J, “Textures of the tumour microenvironment,” *Essays Biochem.*, vol. 63, no. 5, pp. 619–629, 2019.

Dijkstra K.K., Cattaneo C.M., Weeber F., Chalabi M., van de Haar J., Fanchi L.F., Slagter M., van der Velden D.L., Kaing S., Kelderman S., et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-Culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* **2018**, 174, 1586-1598.e12, doi:10.1016/j.cell.2018.07.009.

Doetschman T. GI GEMs: genetically engineered mouse models of gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 2011; 140:380-385.e2.

Doll R, Hill AB. A study of the aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J* 1952;2:1271–1286.

Dockery DW, Trichopoulos D. Risk of lung cancer from environmental exposures to tobacco smoke. *Cancer Causes Control* 1997;8:333–345.

Dörr W & van der Kogel AJ. Normal tissue tolerance and the effect of dose inhomogeneities. In *Basic Clinical Radiobiology*.2018; pp. 182–187. CRC Press, Boca Raton, FL.

Drilon A., Wang L., Hasanovic A., Suehara Y., Lipson D., Stephens P., Ross J., Miller V., Ginsberg M., Zakowski M.F., et al. Response to Cabozantinib in Patients with RET Fusion-Positive Lung Adenocarcinomas. *Cancer Discov* **2013**, 3, 630–635.

Driehuis E., Kretzschmar K., Clevers H. Establishment of Patient-Derived Cancer Organoids for Drug-Screening Applications. *Nat. Protoc.* 2020, 15, 3380–3409.

Drost J., et Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer.* 2018; 18, 407–418.

Duchêne C.C. Cancer bronchique. *J Func Vent Pulm* 2013 ;04(12):4-21

Duma N., Santana-Davila R., and R.Molina J. NoneSmall Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-1640.

Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M., Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., et Piccolo S. Role of YAP/ TAZ in mechanotransduction. *Nature* .2011, 474: 179– 183.

Du Souich P., Fradette C. The effect and clinical consequences of hypoxia on cytochrome P450, membrane carrier proteins activity and expression. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2011, 7, 1083–1100.

Dutta D., Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med.* 2017;23(5):393-410.

Duval K., Grover H., Han LH., Mou Y., Pegoraro AF., Fredberg J., et Chen Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda).* 2017 ;32(4):266-277.

Dzobo, K.; Leaner, V.D.; Parker, M.I. Feedback regulation of the alpha2(1) collagen gene via the Mek-Erk signaling pathway. *IUBMB Life* 2012, 64, 87–98.

Dzobo, K. Taking a Full Snapshot of Cancer Biology: Deciphering the Tumor Microenvironment for Effective Cancer Therapy in the Oncology Clinic. *Omics* 2020, 24, 175–179.

Dzobo K. Recent trends in multipotent human mesenchymal stem/stromal cells: Learning from history and advancing clinical applications. *OMICS A J. Integr. Biol.* 2021, 25, 342–357.

Dzobo, K., Turnley T., Wishart A., Rowe A., Kallmeyer K., Van Vollenstee F.A., Thomford N.E., Dandara C., Chopera D., et Pepper M.S. Fibroblast-derived extracellular matrix induces chondrogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1259.

Dzobo. K., Senthebane D.A., et Dandara C. The Tumor Microenvironment in Tumorigenesis and Therapy Resistance Revisited. *Cancers* 2023, 15, 376.

Eberhardt WEE, Mitchell A, Crowley J, Kondo H, Kim YT, Turrisi A, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2015;10:1515–22.

Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014, 207–218.

Elkin EB, Marshall DA, Kulin NA, et al. Economic evaluation of targeted cancer interventions: critical review and recommendations. *Genet Med.* 2011; 13.

El-Kenawi A., Hänggi K., and Ruffell B., “The immune microenvironment and cancer metastasis,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 10, no. 4, pp. 1–24, 2020.

Elkord, E.; Sasidharan Nair, V. T-Regulatory Cells in Health and Disease. *J. Immunol. Res.* 2018, 2018, 5025238.

Eno M. S., Brubaker J. D., Campbell J. E., De Savi C., Guzi T. J., Williams, B. D., et al. Discovery of BLU-945, a reversible, potent, and wild-type-sparing next-generation EGFR mutant inhibitor for treatment-resistant non-small-cell lung cancer. *J. Med. Chem.* 2022, 65 (14), 9662–9677.

Épidémiologie du cancer du sein - Europa Donna France [Internet]. Europa Donna. Disponible sur: <https://www.europadonna.fr/le-cancer-du-sein/epidemiologie-cancer-du-sein/>

Ettinger, D.S.; Wood, D.E.; Aisner, D.L.; Akerley, W.; Bauman, J.; Chirieac, L.R.; D’Amico, T.A.; DeCamp, M.M.; Dilling, T.J.; Dobelbower, M.; et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2017, 15, 504–535.

Fang Y., Pan H., Lu S., Hu H., et Lu Q. A phase I study to evaluate safety, tolerability, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of TQ-B3101. *J Clin Oncol.* 2020 ;38(15\_suppl) : e21705-e.

Fatehullah A., Tan S.H., Barker N. Organoids as an *in Vitro* Model of Human Development and Disease. *Nat. Cell Biol.* 2016, 18, 246–254.

Felip E, Rosell R, Maestre JA, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3138-45.

Ferlay J, Bray F, Parkin DM, Pisani P, eds (2001) *Globocan 2000: Cancer Incidence and Mortality Worldwide (IARC Cancer Bases No. 5)*, Lyon, IARC Press.

Fan H., Demirci U., et Chen, P. Emerging organoid models: leaping forward in cancer research. *J Hematol Oncol.* 2019 **12**, 142.

Finger E.C., et Giaccia A.J. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 2010, 29, 285–293.

Forde PM., Kelly RJ., et Brahmer JR. New strategies in lung cancer: translating immunotherapy into clinical practice. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:1067.

Frese KK., Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 2007;7:645-58.

Fu C., et Jiang,A. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2018, 9, 3059.

Fu J., Wang YK., Yang MT., Desai RA., Yu X., Liu Z., et Chen CS. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*. 2011. 7: 733–736.

Gao, B., Sun, Y, Zhang, J, Ren, Y, Fang, R, Han, X, Shen, L, Liu, X, Pao, W, Chen, H Ji, H Spectrum of LKB1, EGFR, and KRAS mutations in chinese lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2010, 5:1130-1135.

Gao Y., Chen X., He Q. Gimple R.C., Liao, Y., Wang L., Wu R., Xie Q., Rich J.N., et Shen K. Adipocytes promote breast tumorigenesis through TAZ-dependent secretion of Resistin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020, 117, 33295–33304.

Gavhane Y. N., Shete A. S., Bhagat A. K., Shinde V. R., Bhong K. K., Khairnar G. A., Yadav A. V., b. Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* Vol.2(1), P:1-12.

Gautschi, O., Pauli, C, Strobel, K, Hirschmann, A, Printzen, G, Aebi, S Diebold, J. A patient with BRAF V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. 2012 .*J Thorac Oncol* 7:e23-4.

Gajewski T.F., Schreiber, H.; Fu, Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol*. 2013, 14, 1014–1022.

Garon EB., Ciuleanu T-E., Arrieta O., Prabhash K., Syrigos KN., Goksel T., et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second- line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, doubleblind, randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 2014;384(9944):665–73.

GBD 2016., Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national agesex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390(10100):1151–210.

Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res*. 2002;7:271 306.

Ghimessy A., Radeckzy P., Laszlo V., Hegedus B., Renyi-Vamos F., Fillinger, J., Klepetko W., Lang C., Dome B., Megyesfalvi Z. Current Therapy of KRAS-Mutant Lung Cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2020, 39, 1159–1177, doi:10.1007/s10555-020-09903-9.

Ghosh, D.; Jiang, W.; Mukhopadhyay, D.; Mellins, E.D. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Curr. Opin. Immunol*. 2021, 70, 129–137.

Gopinathan J., and Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater. Res*. 2018; 22:11.

Gilkes D.M., Bajpai S., Chaturvedi P., Wirtz D., et Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2013, 288, 10819–10829.

Gilkes D.M., Semenza G.L., et Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: Drivers of tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2014, 14, 430–439.

Girard, N. Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC: Which tyrosine kinase inhibitor and when? *Future Oncol.* 2018, 14, 1117–1132.

Giraud J., Bouriez D., et Seeneevassen L., et al. Orthotopic patient-derived xenografts of gastric cancer to decipher drugs effects on cancer stem cells and metastatic dissemination. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4):560.

GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.

GLOBOCAN 2018. World Fact Sheets [Internet]. Disponible sur:  
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>

Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017; 3: 524-48.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Christina Fitzmaurice, Tomi F. Akinyemiju, Faris Hasan Al Lami, Tahiya Alam, Reza Alizadeh-Navaei, Christine Allen, et al. 2018. ‘Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study’. *JAMA Oncology* 4 (11): 1553–68. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>.

GLOBOCAN 2018. World Fact Sheets [Internet]. Disponible sur:  
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>

GLOBOCAN, 2020. Word Fact Sheets [Internet]. Disponible sur : (écrire pour cancer dans le monde les liens et pour la France prour le cancer de la prostate, poumon, sein, colon.

Giraud P, Lacornerie T, Mornex F. Radiothérapie des cancers primitifs du poumon. *Cancer/Radiothérapie*, 20, 2016, pp 147-156.

Galdiero, M.R.; Bonavita, E.; Barajon, I.; Garlanda, C.; Mantovani, A.; Jaillon, S. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 2013, 218, 1402–1410.

Galli G., Rossi G. Lung cancer histology-driven strategic therapeutic approaches. *Shanghai Chest* 2020, 4:29.

Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016;11:39–51.

Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706–14.

Gort, E.; Johnson, M.L.; Hwang, J.J.; Pant, S.; Dünzinger, U.; Riemann, K.; Kitzing, T.; Janne, P.A. A phase I, open-label, dose-escalation trial of BI 1701963 as monotherapy and in combination with trametinib in patients with KRAS mutated advanced or metastatic solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2020, 38, TPS3651.

Graziano, S.L., Gamble, G.P, Newman, N.B, Abbott, L.Z, Rooney, M, Mookherjee, S, Lamb, M.L, Kohman, L.J Poiesz, B.J. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1999, 17:668-675.

Green AK. Challenges in assessing the cost-effectiveness of cancer immunotherapy . *JAMA Netw Open.* 2021, 4:e2034020.

Gridelli, C., Rossi, A., Carbone D.P., Guarize, J., Karachaliou N., Mok T., Petrella F., Spaggiari L., Rosell R. Non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015, 1, 1–16.

Griffith LG., et Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 211-24.

Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* 2013;13:5. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23390376; PMCID: PMC3559193.

Grutters JP, Kessels AG, Pijls-Johannesma M, et al. Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Radiother Oncol* 2010;95:32-40.

Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):402-18.

Hacker B.C., Rafat M. Organoids as Complex *In Vitro* Models for Studying Radiation-Induced Cell Recruitment. *Cell Mol Bioeng* 2020, 13, 341–357, doi:10.1007/s12195-020-00625-0.

Halldorsson S., Lucumi E., Gómez-Sjöberg R., et Fleming RMT. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens Bioelectron.* 2015; 63:218-231.

Han S., Kim S., Chen Z., Shin H.K., Lee S.-Y., Moon H.E., Paek S.H., Park S. 3D Bioprinted Vascularized Tumour for Drug Testing. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 2993.

Han S., Huang K., Gu Z., et Wu J. Tumor immune microenvironment modulation-based drug delivery strategies for cancer immunotherapy. *Nanoscale* 2020, 12, 413–436.

Hanahan D., et Weinberg R., The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100, 2000, 57-70.

Harris A.L. Hypoxia—A key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2002, 2, 38–47.

Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, et al. Significant increase in circulating tumour cells in pulmonary venous blood during surgical manipulation in patients with primary lung cancer. 27<sup>th</sup> European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), 2013, Vienna, Austria (abstract #090).

Hassell BA, Goyal G., Lee E., Sontheimer-Phelps A., Levy O., Chen CS., et Ingber DE. Human Organ Chip Models Recapitulate Orthotopic Lung Cancer Growth, Therapeutic Responses, and Tumor Dormancy *In Vitro*. *Cell Rep.* 2017 Oct 10;21(2):508-516. Ma, Y.-H.V., Middleton K., You L., et Sun Y. A review of microfluidic approaches for investigating cancer extravasation during metastasis. *Microsystems Nanoeng.* 2018; 4: 17104.

Hayashi N, Egami H, Kai M, et al. No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery* 1999;125:369-74.

Hefetz-Sela S., et Scherer P.E. Adipocytes: Impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* 2013, 138, 197–210.

Henke E., Nandigama R., et Ergün S., “Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 6, no. January. 2020, pp. 1–24.

Herbst, R.S.; Heymach, J.V.; Lippman, S.M. Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 1367–1380.

Herbst, R.S.; Morgensztern, D.; Boshoff, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018, 553, 446–454.

Heusinkveld, M.; van Der Burg, S.H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J. Transl. Med.* 2011, 9, 1–14.

Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H. IMI PREDECT Consortium Three-Dimensional Models of Cancer for Pharmacology and Cancer Cell Biology: Capturing Tumor Complexity *in Vitro/Ex Vivo*. *Biotechnol. J.* 2014, 9, 1115–1128.

Hill C, Laplanche A. Evolution de la consommation de cigarettes en France par sexe, 1900-2003. *Bull Epidemiol Hebd.* 2005;21–22:94–7.

Hijioka S., Shimizu Y., Mizuno N., et al., Can long-term follow-up strategies be determined using a nomogram-based prediction model of malignancy among intraductal papillary mucinous neoplasms of the Pancreas 43 (3) (2014), 367-372.

Hinshaw, D.C.; Shevde, L.A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 2019, 79, 4557–4566.

Hiroshima Y, Zhang Y, Zhang N, et al. Establishment of a patient-derived orthotopic Xenograft (PDOX) model of HER-2-positive cervical cancer expressing the clinical metastatic pattern. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117417.

Hoffman R. Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nat Rev Cancer* 15, 451–452 (2015).

Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet* 2000;355:479-85.

Hoarau-Véchet J., Rafii A., Touboul C., et Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 181.

Holle A.W., Young J.L., et Spatz J.P. *In vitro* cancer cell-ECM interactions inform in vivo cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, 97, 270–279.

Hong, D.S.; Fakih, M.G.; Strickler, J.H.; Desai, J.; Durm, G.A.; Shapiro, G.I.; Falchook, G.S.; Price, T.J.; Sacher, A.; Denlinger, C.S.; et al. KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 1207–1217.

Houghton, A.M. The paradox of tumor-associated neutrophils: Fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* 2010, 9, 1732–1737.

Howington JA, Blum MG, Chang AC, et al. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:e278S-e313S.

Hu YY, Zheng MH, Zhang R, Liang YM, Han H. Notch signaling pathway and cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:186–98.

Hua, G., Wang C., Pan Y., Zeng Z., Lee S.G., Martin M.L., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Paty P.B., Kolesnick R. Distinct Levels of Radioresistance in Lgr5+ Colonic Epithelial Stem Cells versus Lgr5+ Small Intestinal Stem Cells. *Cancer Res* 2017, 77, 2124–2133, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2870.

Huang M, Shen A, Ding J, et al. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35(1): 41–50.

Huang P.Y., Guo S.S., Zhang Y., Lu J.B., Chen Q.Y., Tang L.Q., Zhang L., Liu L.T., Zhang L., Mai H.Q., Tumor CTLA-4 overexpression predicts poor survival in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 7, 2016 ; 13060–13068, doi: 10.18632/oncotarget.7421.

Hughes C. S., Postovit L. M., et Lajoie G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 2010; 1886–1890.

Hughes, P. E., Caenepeel, S., and Wu, L. C. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer. *Trends Immunol.* 2016; 37 (7), 462–476. doi:10.1016/j.it.2016.04.010

Hunt, J.D., Strimas, A, Martin, J.E, Eyer, M, Haddican, M, LUCKETT, B.G, Ruiz, B, Axelrad, T.W, Backes, W.L Fontham, E.T.H. Differences in KRAS mutation spectrum in lung cancer cases between African Americans and Caucasians after occupational or environmental exposure to known carcinogens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002, 11:1405-1412.

Imbrnon.E, Goldberg.M, Spyckerelle.Y et al. Use of a job-exposure matrix for the screening of occupacionalexposure to asbestos. *Revue Epidemiol Sante Publique* 2004 ; 25 : 7-17

INCa, 2016.Institut national du cancer, Les traitements des cancers de la prostate, collection

INCa, 2016.Guide patients Cancer info, Inca, octobre 2016.

INCa, 2020 .Institut national du cancer, Guide patients des traitements des Cancer du côlon. Septembre 2020. 1-146.

INSITUT NATIONAL DU CANCER, Les cancers en France, .dition 2015, , avril 2016, 240p.

INSTITUT NATIONAL DU CANCER, Ouvrage collectif, Les cancers en France édition 2013 (Boulogne-Billancourt), 2013, 258p ; INSTITUT NATIONAL DU CANCER, .épidémiologie des cancers, <http://www.ecancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-descancers> 05/02/2016.

INCa (Institut National Du Cancer). Mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon : mise en évidence d'une cible moléculaire permettant un accès spécifique aux thérapies ciblées, INCa, Boulogne-Billancourt, 2010, 25 p.

INCa, 2022. Institut National du cancer, Juillet 2022 – [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr).

Ihalainen TO., Aires L., Herzog FA., Schwartlander R., Moeller J., et Vogel V. Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat Mater.* 2015. 14: 1252–1261.

Igarashi K, Kawaguchi K, Kiyuna T, et al. Patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model of adult rhabdomyosarcoma invades and recurs after resection in contrast to the subcutaneous ectopic model. *Cell Cycle.* 2017;16(1):91–94.

Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* 2010; 31:135-48.

Jabłońska-Trypuć A., Matejczyk M., Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(sup1):177-183.

Jakka S., et Rossbach M. An economic perspective on personalized medicine. *The HUGO Journal.* 2013; 7(1): 1.

Janku F., Iyer G., Spreafico A., Yamamoto N., Bang Y-J, Elez E., et al. A phase I study of LXH254 in patients (pts) with advanced solid tumors harboring MAPK pathway alterations. *J Clin Oncol.* 2018;36(15\_suppl):2586.

Jänne PA, Rybkin II, Spira AI, Riely GJ, Papadopoulos KP, Sabari JK, et al. 3LBA late breaking-KRYSTAL-1: activity and safety of adagrasib (MRTX849) in advanced/metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring KRAS G12C mutation. *Eur J Cancer.* 2020;138:S1–2.

Jaracz. S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2005;13:5043–5054.

Jayasingam, S.D.; Citartan, M.; Thang, T.H.; Mat Zin, A.A.; Ang, K.C.; Cheng, E.S. Evaluating the polarization of tumor-associated macrophages into M1 and M2 phenotypes in human cancer tissue: Technicalities and challenges in routine clinical practice. *Front. Oncol.* 2020, 9, 1512.

Jensen C., et Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front. Mol. Biosci.* 2020. 7, 33.

Jia W., Gungor-Ozkerim PS., Zhang YS., Yue K., Zhu K., Liu W., Pi Q., Byambaa B., Dokmeci MR., Shin SR., et Khademhosseini A. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials.* 2016;106:58-68.

Jianan Zhuyan, Mingyu Chen, Tianhao Zhu, Xunxia Bao, Timing Zhen, Kaichen Xing, Qiubo Wang and Sibao Zhu. Critical steps to tumor metastasis: alterations of tumor microenvironment and extracellular matrix in the formation of pre-metastatic and metastatic niche. *Cell Biosci* (2020) 10:89.

Jin M.-Z., Jin W.-L. The Updated Landscape of Tumor Microenvironment and Drug Repurposing. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020, 5, 166.

Jing X., Yang F., Shao C., Wei K., Xie M., Shen, H., et Shu Y. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol. Cancer* 2019, 18, 157.

Jiro Okami. *Journal of Thoracic Disease.* 2019;11(Suppl 7): S987-S997.

Jockel KH, Ahrens W, Bolm-Audorff U, Jahn Pohlabein H. Occupationally-induced lung cancer : a quantitative evaluation for the North Germany area. *Gesundheitswesen* 1997; 59:275–278.  
Kalluri R. et Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6, 392-401.

Johnson, D. B., Rioth, M. J. & Horn, L. Immune checkpoint inhibitors in NSCLC. *Current treatment options in oncology* 15. 2014; 658–669, doi: 10.1007/s11864-014-0305-5 .

Jones KD. Whence lepidic? The history of a Canadian neologism. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:1822–4.

Kang K H., Okoye C C., Patel R B., Siva S., Biswas T., Ellis R J., Yao M., Machtay M., et Lo S S. 2015. Complications from Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Cancer, *Cancers*, 7, 981-1004.

Kang Y., Armstrong AJ., Hsu DS. An autologous humanized patient-derived xenograft (PDX) model for evaluation of nivolumab immunotherapy in renal cell cancer: a case report. *Stem Cell Investig.* 2022 Nov 8;9:8.

Kantor G, Chauvet B, Lartigau E. La radiothérapie en France en 2010. *La revue du Praticien*, 61, 2011, pp 70-84.

Kapałczyńska M., Kolenda T., Przybyła W., Zajączkowska M., Teresiak A., Filas V., Ibbs M., Bliźniak R., Łuczewski Ł., et Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910-919.

Karakasheva T.A., Gabre J.T., Sachdeva U.M., Cruz-Acuña R.; Lin E.W., DeMarshall M., Falk G.W., Ginsberg G.G., Yang Z., Kim M.M., et al. Patient-Derived Organoids as a Platform for Modeling a Patient's Response to Chemoradiotherapy in Esophageal Cancer. *Sci Rep* 2021, 11, 21304, doi:10.1038/s41598-021-00706-8.

Kass L., Erler, J.T., Dembo, M., et Weaver V.M. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007, 39, 1987–1994.

Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with progression on or after platinum-based chemotherapy. *Oncologist* 2016;21:634-42.

Keshavarz-Fathi M., et Rezaei N. Chapter 2—Immunotherapeutic Approaches in Cancer. In *Vaccines for Cancer Immunotherapy*; Rezaei, N., Keshavarz-Fathi, M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 19–44.

Klemm F., Joyce J.A. Microenvironmental Regulation of Therapeutic Response in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2015, 25, 198–213.

Kelly P, Balter P A, Rebuena N, Sharp H J, Liao Z, Komaki R and Chang J Y. Stereotactic body radiation therapy for patients with lung cancer previously treated with thoracic radiation, *Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys.* 2010; 78(5) 1387–1393.

Kelly RJ, Giaccone G. Lung cancer vaccines. *Cancer J (Sudbury, Mass.)*. 2011;17(5):302–8.

Keysar SB., Astling DP., et Anderson RT., et al. A patient tumor transplant model of squamous cell cancer identifies PI3K inhibitors as candidate therapeutics in defined molecular bins. *Mol Oncol.* 2013;7(4):776–790.

- Kim J., Lee H., and. Huang BW. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *American Family Physician*, 2022. ;Volume 105, 488-494.
- Kim M., Mun H., Sung C.O., Cho E.J., Jeon H.-J., Chun S.-M., Jung D.J., Shin T.H., Jeong G.S., Kim D.K., et al. Patient-Derived Lung Cancer Organoids as *in Vitro* Cancer Models for Therapeutic Screening. *Nat. Commun.* 2019, 10, 3991.
- Kim WJ., Lee JW., Quan C., Youn HJ., Kim HM., et Bae SC. Nicotinamide inhibits growth of carcinogen induced mouse bladder tumor and human bladder tumor xenograft through up-regulation of RUNX3 and p300. *J Urol.* 2011;185:2366-75.
- Kimlin, L. C., Casagrande, G., et Virador, V. M. *In vitro* threedimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol. Carcinog.* 2013; 52,167–182.
- Kogita A, Togashi Y, Hayashi H, Sogabe S, Terashima M, De Velasco MA, et al. Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK rearrangement via epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol* (2014) 45(4):1430–6.
- Kozlowski M.T., Crook C.J., Ku H.T. Towards Organoid Culture without Matrigel. *Commun. Biol.* 2021, 4, 1387.
- Krajewski KM, Braschi-Amirfarzan M, DiPiro PJ, et al. Molecular Targeted Therapy in Modern Oncology: Imaging Assessment of Treatment Response and Toxicities. *Korean J Radiol.* 2017; 18(1): 28–41.
- Kwak E.L., Bang Y.-J., Camidge, D.R., Shaw A.T., Solomon B., Maki R.G., Ou S.-H.I., Dezube B.J., Jänne P.A., Costa D.B., et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, 363, 1693–1703.
- Lahiri A., Maji A., D. Potdar Pravin, Singh N., Parikh P., Bisht B., Mukherjee A. et K. Paul M. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Molecular Cancer.* 2023 ; 22:40.
- Langhans S.A. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* 2018; 9:6.
- Lantuejoul.S, Rouquette.I, Brambilla.E, Travis.D-W. New WHO classification of lung adenocarcinoma and preneoplasia. *Annales de pathologie* 2016 ; 36 : 5-14.
- Lantuéjoul S., Salameire D., Brambilla E. classification histologique des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités.* 2011 3, 295-301.
- Latimer KM, Mott TF. Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *Am Fam Physician.* 2015; 91(4): 250-256.
- Lê H., Ponté C., Desforges J., Hua G., Idoux-Gillet Y., LindnerV., Olland A., Falcoz P.E., Zaupa C., Quéméneur E., Balloul J.M., Jessel N. Vascularized patient-derived tumoroids supplemented with immune cells to predict response towards treatment for lung cancer patients, 22 February 2023, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2560741/v1].

Lê H., Seitlinger J., Lindner V., Olland A., Falcoz P.E., Benkirane-Jessel N., et Quéméneur E. Patient-Derived Lung Tumors—An Emerging Technology in Drug Development and Precision Medicine. *Biomedicines* 2022, 10, 1677.

Le X., Paz-Ares LG., Van Meerbeeck J., Viteri S., CabreraGalvez C., Vicente- Baz D., et al. Tepotinib in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with MET amplification (METamp). *J Clin Oncol.* 2021;39(15\_suppl):9021.

Lee, J.G.; Kim, H.C.; Choi, C.-M. Recent Trends of Lung Cancer in Korea. *Tuberc. Respir. Dis.* 2021, 84, 89–95.

Lee, S.H. Chemotherapy for Lung Cancer in the Era of Personalized Medicine. *Tuberc. Respir. Dis.* 2019, 82, 179–189.

Lee S.H., Hu W., Matulay J.T, Silva M.V., Owczarek T.B., Kim K., Chua C.W., Barlow L.J., Kandoth C., Williams A.B., et al. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell* 2018, 173, 515–528.e17.

Lee Y.S., Radford K.J. The role of dendritic cells in cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2019, 348, 123–178.

Lemmer ER., Vessey CJ., Gelderblom WC., Shephard EG., Van Schalkwyk DJ., Van Wijk RA., Marasas WF., Kirsch RE., et Hall Pde L. Fumonisin B1-induced hepatocellular and cholangiocellular tumors in male Fischer 344 rats: potentiating effects of 2-acetylaminofluorene on oval cell proliferation and neoplastic development in a discontinued feeding study. *Carcinogenesis.* 2004; 25:1257-64.

Leong, S.P., et al., Clinical patterns of metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. 25(2): p. 221-32.

Le Péchoux C., Moukasse Y., Botticella A., Berthelot K., Sun R., Levy A., Reste-t-il une place pour la radiothérapie adjuvante dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules ? Non, de façon systématique, mais oui dans une approche personnalisée..., *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 2022, Volume 14, Issue 2, Supplement 1, 2S133-2S137.

Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, et al. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer* 2014;120(18):2883–92.

Li, G.; Dai, W.-R.; Shao, F.-C. Effect of ALK-inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2017, 21, 3496–3503.

Li, J.; Yuan, Z.; Wang, Q.; Fan, W.; Zhang, G. Meta-analysis of overall incidence and risk of ALK inhibitors-induced liver toxicities in advanced non-small-cell lung cancer. *Medicine* 2019, 98, e13726.

Li S., Wu J., Zhu S., Liu Y.J., et Chen, J. Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Frontiers in immunology.* 2017, 8, 1268.

Li S., Zhu S., Wei H., Zhu P., Jiao Y., Yi M., et al. (2022). The prospect of combination therapies with the third-generation EGFR-TKIs to overcome the resistance in NSCLC. *Biomed. Pharmacother.* 156, 113959.

Liello R.D., Ciaramella V., Barra G., Venditti M., Corte C.M.D., Papaccio F., Sparano F., Viscardi G., Iacovino M.L., Minucci S., et al. Ex Vivo Lung Cancer Spheroids Resemble Treatment Response of a Patient with NSCLC to Chemotherapy and Immunotherapy: Case Report and Translational Study. *ESMO Open* 2019, 4, e000536.

Lim J., Ching H., Yoon J.-K., Jeon N.L., Kim Y. Microvascularized Tumor Organoids-on-Chips: Advancing Preclinical Drug Screening with Pathophysiological Relevance. *Nano Converg.* 2021, 8, 12.

Lim, S.M.; Westover, K.D.; Ficarro, S.B.; Harrison, R.A.; Choi, H.G.; Pacold, M.E.; Carrasco, M.; Hunter, J.; Kim, N.D.; Xie, T.; et al. Therapeutic targeting of oncogenic K-Ras by a covalent catalytic site inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014, 53, 199–204.

Lin, L.; Bivona, T.G. Mechanisms of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors and Novel Therapeutic Strategies to Overcome Resistance in NSCLC Patients. *Chemother. Res. Pract.* 2012, 2012, 817297.

Lin S., Huang G., et Cheng L., et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy. *MAbs.* 2018;10(8):1301–1311.

Lindau, D.; Gielen, P.; Kroesen, M.; Wesseling, P.; Adema, G.J. The immunosuppressive tumour network: Myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 2013, 138, 105–115.

Lito, P.; Solomon, M.; Li, L.S.; Hansen, R.; Rosen, N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* 2016, 351, 604–608.

Liu Hb, Wu Y, Lv Tf, et al. Skin rash could predict the response to EGFR tyrosine kinase inhibitor and the prognosis for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8(1): e55128.

Liu J., Chen Z., Li Y., Zhao W., Wu J., et Zhang Z. PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Frontiers in Pharmacology.* 2021 ; September 2021, Volume 12, Article 731798, 1- 8.

Li X, Chen Y, Li PC. A simple and fast microfluidic approach of same-single-cell analysis (SASCA) for the study of multidrug resistance modulation in cancer cells. *Lab Chip.* 2011;11(7):1378–1384.

Li XJ, Li PCH. Microfluidic selection and retention of a single cardiac myocyte, on-chip dye loading, cell contraction by chemical stimulation, and quantitative fluorescent analysis of intracellular calcium. *Anal. Chem.* 2005;77(14):4315–4322.

Li XJ, Chen Y, Li PCH. Modulation of Multidrug Resistance on the Same Single Cancer Cell in a Microfluidic Chip: Intended for Cancer Stem Cell Research. In: Shostak S, editor. *Cancer Stem Cells- The Cutting Edge*. InTech, Croatia; 2011. pp. 529–554.

Liu, J.F.; Barry, W.T.; Birrer, M.J.; Lee, J.-M.; Buckanovich, R.J.; Fleming, G.F.; Rimel, B.; Buss, M.K.; Nattam, S.R.; Hurteau, J. Overall survival and updated progression-free survival results from a randomized phase 2 trial comparing the combination of olaparib and cediranib against olaparib alone in recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol.* 2017, 35, 5535.

Liu T., Han C., Wang S., Fang P., Ma Z., Xu L., et Yin R., “Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2019.

Lopes, G.L.; de Vattimo, E.F.; de Castro, G., Jr. Identifying activating mutations in the EGFR gene: Prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J. Bras. Pneumol.* 2015, 41, 365–375.

Lortet-Tieulent, Joannie, Elisenda Renteria, Linda Sharp, Elisabete Weiderpass, Harry Comber, Paul Baas, Freddie Bray, Jan Willem Coebergh, and Isabelle Soerjomataram. 2015. ‘Convergence of Decreasing Male and Increasing Female Incidence Rates in Major Tobacco-Related Cancers in Europe in 1988-2010’. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 51 (9): 1144– 63. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.10.014>.

Lu P., Weaver V.M., et Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 2012, 196, 395–406.

Lu, T.; Yang, X.; Huang, Y.; Zhao, M.; Li, M.; Ma, K.; Yin, J.; Zhan, C.; Wang, Q. Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades. *Cancer Manag. Res.* 2019, 11, 943–953.

Lucendo-Villarin, B., Meseguer-Ripolles, J., Drew, J., Fischer, L., Ma, E., Flint, O., et al. Development of a cost-effective automated platform to produce human liver spheroids for basic and applied research. 2020; *Biofabrication.* 13:015009.

Luch A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.*2005; 5:113-25.

Lucky S.S., Law M., Lui M.H., Mong J., Shi J., Yu S., Yoon D.K., Djeng S.K., Wang J., Lim C.M., et al. Patient-Derived Nasopharyngeal Cancer Organoids for Disease Modeling and Radiation Dose Optimization. *Front Oncol* 2021, 11, 622244, doi:10.3389/fonc.2021.622244.

Lugano R., Ramachandran M., et Dimberg A. “Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 9, pp. 1745–1770, 2020.

Luo Y., Luo G., Gelinsky M., Huang P., et Ruan C. (2017). 3D bioprinting scaffold using alginate/polyvinyl alcohol bioinks. *Mater. Lett.* 189, 295–298.

Lutz J.C., Harmouch E., Fernandez Del Grado G., Seitlinger J., Bouhout S., Bornert F., Stoltz J.F., Idoux-Gillet Y., Benkirane-Jessel N., Fioretti F. Innovative Strategies Targeting the

Neovascularization of Solid Tumor Volume 79: stem Cells and Regenerative Medicine. 2019, 163 – 173.

Lussier, D. M., O’Neill, L., Nieves, L. M., McAfee, M. S., Holechek, S. A., Collins, A. W., et al. Enhanced T-Cell Immunity to Osteosarcoma through Antibody Blockade of PD-1/pd-L1 Interactions. *J. Immunother.* 2015 ; 38 (3),96–106. doi:10.1097/CJI.0000000000000065.

Lurje, G. Lenz, H. EGFR signaling and drug discovery. 2009. *Oncology* 77:400-410.

Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2012; 30:2046-54.

Maeda H., Khatami M. Analyses of Repeated Failures in Cancer Therapy for Solid Tumors: Poor Tumor-Selective Drug Delivery, Low Therapeutic Efficacy and Unsustainable Costs. *Clin. Transl. Med.* 2018, 7, 11.

Magdeldin T., López-Dávila V., Pape J., Cameron G. W. W., Emberton M., Loizidou M., et al. Engineering a vascularised 3D *in vitro* model of cancer progression. *Sci. Rep.*2017; 7:44045.

Maimela, N.R.; Liu, S.; Zhang, Y. Fates of CD8+ T cells in tumor microenvironment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019, 17, 1–13.

Majeed U., Manochakian R., Zhao Y. *et al.* Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: current advances and future trends. *J Hematol Oncol* **14**, 108 (2021).

Malvezzi M., Bertuccio P., Levi F., *et al.*, European cancer mortality pre- dictions for the year 2014, *Ann. Oncol.* 25 (8) (2014), 1650-1656.

Mak I.W., Evaniew N., et Ghert M. Lost in translation: Animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* 2014, 6, 114–118.

Marangoni E., Vincent-Salomon A., et Auger N, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(13):3989–3998.

Massarelli E., Papadimitrakopoulou V., Welsh J., Tang C., Tsao A.S. Immunotherapy in Lung Cancer. *Transl Lung Cancer Res* **2014**, 3, 53–63.

Masucci, M.T.; Minopoli, M.; Carriero, M.V. Tumor associated neutrophils. Their role in tumorigenesis, metastasis, prognosis and therapy. *Front. Oncol.* 2019, 9, 1146.

Mayor, S. Osimertinib effective in EGFR T790M-positive lung cancer. *Lancet Oncol.* 2017, 18, e9.

Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 2011; 480–489, doi: 10.1038/nature10673.

- Melissaridou S., Wiechec E., Magan M., Jain MV., Chung MK., Farnebo L., et Roberg K. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.* 2019 Jan 14;19:16.
- Menvielle G, Kulhánová I, Bryère J, Launoy G, Eilstein D, Delpierre C, et al. Tobacco-attributable burden of cancer according to socioeconomic position in France. *Int J Cancer.* 2018;143(3):478–85.
- Mendes N., Dias Carvalho P., et Martins F., et al. Animal models to study cancer and its microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1219:389–401.
- Metro, G., Chiari, R, Duranti, S, Siggillino, A, Fischer, M.J, Giannarelli, D, Ludovini, V, Bennati, C, Marcomigni, L, Baldi, A, Giansanti, M, Minotti, V Crin., L. Impact of specific mutant KRAS on clinical outcome of EGFR-TKI-treated advanced non-small cell lung cancer patients with an EGFR wild type genotype. *Lung Cancer.* 2012, 78:81-86. Minami, S.; Kijima, T. Pemetrexed in maintenance treatment of advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015, 6, 13–25.
- Meyers J., Craig J., et Odde DJ. Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Curr Biol* 2003; 16: 1685-93.
- Meyvantsson I, Beebe DJ. Cell Culture Models in Microfluidic Systems. *Annu Rev Anal Chem.* 2008;1:423–449.
- Min H-Y., et Lee H-Y. Mechanisms of resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Arch. Pharm. Res.* 2021 ; 44:146–164.
- Mohanty S., Larsen L. B., Trifol J., Szabo P., Burri H. V. R., et Canali, C., et al. (2015). Fabrication of scalable and structured tissue engineering scaffolds using water dissolvable sacrificial 3D printed moulds. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 55, 569–578.
- Mok TSK, Lawler WE, Shum MK, Dakhil SR, Spira AI, Barlesi F, et al. KRYSTAL-12: a randomized phase 3 study of adagrasib (MRTX849) versus docetaxel in patients (pts) with previously treated non-smallcell lung cancer (NSCLC) with KRASG12C mutation. *J Clin Oncol.* 2021;39(15\_suppl):TPS9129-TPS.
- Mollica P. A., Booth-Creech E. N., Reid J. A., Zamponi, M., Sullivan, S. M., Palmer, X. L., et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroidin human mammary derived ECM hydrogels. *Acta Biomater.* 2019; 95, 201–213.
- Molina J.R., Yang P., Cassivi S.D., Schild S.E., Adjei A.A. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 2008; 83:584–594.
- Morandeira. S, R. et al. Solid pseudopapillar tumour of the pancreas. *Cir Esp.* 2008, 84(1):47-49.
- Morabia A, Markowitz S, Garibaldi K, Wynder EL. Lung cancer and occupation: result of a multicentre case- control study. *Br J Ind Med* 1992 ;49 :721–727.

Moreau.D. Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules pharmaco modulées par des substances originales naturelles et synthétiques.Thèse de doctorat. Université de Nantes, Faculté de pharmacie. 2006 ; 321p.

Morin P.J. Drug resistance and the microenvironment: Nature and nurture. *Drug Resist. Updates Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 2003, 6, 169–172.

Morton CL., et Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc.* 2007;2(2):247–250.

Morton JJ, Bird G, Keysar SB, et al. XactMice: humanizing mouse bone marrow enables microenvironment reconstitution in a patient-derived xenograft model of head and neck cancer. *Oncogene.* 2016;35(3):290–300.

Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997; 111:1710–7.

Mseka T., Bamberg JR., et Cramer LP. ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. *J Cell Sci* 2007; 120: 4332-44.

Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol* 2011;35(1):15–25.

Multhoff G., et Vaupel P. “Hypoxia compromises anti-cancer immune responses,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1232, pp. 2020; 131–143.

Nadal E., Chen G., Prensner JR., Shiratsuchi H., Sam C., Zhao L., et al. KRASG12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014;9(10):1513–22.

Najafi M., Majidpoor J., Toolee H., Mortezaee. The current knowledge concerning solid cancer and therapy. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021; e22900. 1 of 26. <https://doi.org/10.1002/jbt.22900>

Nan, X.; Xie, C.; Yu, X.; Liu, J. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017, 8, 75712.

Nath S., et Devi, G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* 2016; 163, 94–108.

Naylor E.C., Desani J.K., Chung, P.K. Targeted Therapy and Immunotherapy for Lung Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2016, 25, 601–609.

Ni Y., Wang H., Chen F., Li J, DeKeyzer F., Feng Y, Yu J., Bosmans H., et Marchal G. Tumor models and specific contrast agents for small animal imaging in oncology. *Methods* 2009; 48:125-38.

Nichols, L.; Saunders, R.; Knollmann, F.D. Causes of Death of Patients with Lung Cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2012, 136, 1552–1557.

Nicholson S.E., Keating N., et Belz G.T. Natural killer cells and anti-tumor immunity. vol. 110, no. July 2017, pp. 40–47, 2019.

Niederhuber, J.E., Colon and rectum cancer. Patterns of spread and implications for workup. *Cancer*, 1993. 71(12 Suppl): p. 4187- 92.

Nieman K.M., Romero I.L., et Van Houten B. et Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Biol. Lipids* 2013, 1831, 1533–1541.

Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., et Kojiro M. “Angiogenesis in cancer,” *Vasc. Health Risk Manag.*, vol. 2, no. 3, 2006, pp. 213–219.

Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12493-12498.

Ntikoudi E., Kiagia M., Boura P., et Syrigos K. Hormones of adipose tissue and their biologic role in lung cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2014, 40, 22–30.

Nyga A., Cheema, U., et Loizidou, M. 3D tumour models: novel *in vitro* approaches to cancer studies. *J. Cell Commun. Signal.* 2011 ; 5, 239–248.

OMS | Cancer du sein : prévention et lutte contre la maladie [Internet]. WHO.2019. Disponible sur : <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/fr/index1.html>

Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., Carey V.J., Richardson A.L., et Weinberg R.A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005, 121, 335–348.

Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013; 503:548-51.

Ostrem, J.M.; Peters, U.; Sos, M.L.; Wells, J.A.; Shokat, K.M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013, 503, 548–551.

Ostrem, J.M.; Shokat, K.M. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: From structural insights to mechanism-based design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016, 15, 771–785.

Oun R., Moussa Y.E., Wheate N.J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalton Trans* 2018, 47, 6645–6653.

Owonikoko TK., Zhang G., Kim HS., et al. Patient-derived xenografts faithfully replicated clinical outcome in a Phase II co-clinical trial of arsenic trioxide in relapsed small cell lung cancer. *J Transl Med.* 2016;14(1):111.

Paik PK, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol* 2011; 29:2046-51.

Palma D A., Senan S., Haasbeek C J., Verbakel W., Vincent A et Lagerwaard F. Radiological and clinical pneumonitis after stereotactic lung radiotherapy: a matched analysis of three dimensional conformal and volumetric-modulated arc therapy techniques, *Int. J. Rad. Onc. Biol.* 2010; *Phys.*, 80(2) 506–513.

Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 839-45.

Pan, C., Yang, H., Lu, Y., Hu, S., Wu, Y., He, Q., et al. (2021). Recent advance of Peptide-Based Molecules and Nonpeptidic Small-Molecules Modulating PD-1/PD-L1 Protein-Protein Interaction or Targeting PD-L1 Protein Degradation. *Eur. J. Med. Chem.* 213, 113170. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113170

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:329-40.

13. Siene W, Seen-Hibler R, Mutschler W, et al. Tumour cells in the tumour draining vein of patients with non-small cell lung cancer: detection rate and clinical significance. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 23:451-6.

Papadopoulos KP., Ou S-HI., Johnson ML., Christensen J., Velastegui K., Potvin D., et al. A phase I/II multiple expansion cohort trial of MRTX849 in patients with advanced solid tumors with KRAS G12C mutation. *J Clin Oncol.* 2019;37(15\_suppl):TPS3161-TPS.

Pape J., Magdeldin, T., Ali M., Walsh C., Lythgoe M., Emberton, M., et al. Cancer invasion regulates vascular complexity in a threedimensional biomimetic model. *Eur. J. Cancer.* 2019 ; 119, 179–193.

Paris C. Facteurs de risques professionnels et extraprofessionnels des cancers bronchiques. In : Thiberville L, editor. *Oncologie thoracique, synthèse des connaissances et perspectives.* Paris: Margaux Orange; 2002. p. 35–43.

Park H.K, Han J. , Kwon C.Y. , Yeo M.K., et Bae G.E.. Patterns of Extrathoracic Metastasis in Lung Cancer Patients. *Cancer Patients. Curr. Oncol.* 2022, 29, 8794–8801.

Pairon JC, Brochard P. Cancers broncho-pulmonaires professionnels. *Encycl Méd Chir* 1996 :1–10 (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Toxicologie-Pathologie professionnelle, 16-540-H-30.

Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:807–39.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:252-64.

Park T.-E., Mustafaoglu N., Herland A., Hasselkus R., Mannix, R., et FitzGerald, E.A. Prantil-Baun, R.; Watters, A.; Henry, O.; Benz, M. Hypoxia-enhanced Blood-Brain Barrier Chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nat. Commun.* 2019, 10, 1–12.

Pasch C.A., Favreau P.F., Yueh A.E., Babiarz C.P., Gillette A.A., Sharick J.T., Karim M.R., Nickel K.P., DeZeeuw A.K., Sprackling C.M., et al. Patient-Derived Cancer Organoid Cultures to Predict Sensitivity to Chemotherapy and Radiation. *Clin Cancer Res* **2019**, *25*, 5376–5387, doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-3590.

Pasquini, G.; Giaccone, G. c-MET inhibitors for advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2018, *27*, 363–375.

Papait A., Stefani F.R., Cargnoni A., Magatti M., Parolini O., et Silini A.R. The multifaceted roles of MSCs in the tumor microenvironment: Interactions with immune cells and exploitation for therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, *8*, 447.

Peggs KS., Quezada SA., Chambers CA., Korman AJ., et Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med.* 2009;206(8):1717–25.

Peiffer.G, Underner.M, Perriot.J et al. Smoking cessation. *Revue des maladies respiratoire actualité* 2013 ; 5 : 5-15.

Peng F, Chen M. Antiangiogenic therapy: a novel approach to overcome tumor hypoxia. *Chin J Cancer.* 2010 Aug;29(8):715-20. Review.

Pêgo-Fernandes, P.M., Haddad, F.J., Imaeda, C.J. and Sandrini, M., (2021) The role of the surgeon in treating patients with lung cancer. An updating article. *Sao Paulo Medical Journal*, 1393, pp.293–300.

Planchard D, Le Pechoux C. Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment. *Eur J Cancer* 2011;47(Suppl 3): S272–83.

Planchard D., Smit EF., Groen HJM., Mazieres J., Besse B., Helland ., et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an openlabel, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1307–16.

Potentia S., Zeisberg E., et Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br. J. Cancer* 2008, *99*, 1375–1379.

Praktiknjo S. D., B. Obermayer, Q. Zhu, L. Fang, H. Liu, H. Quinn, M. Stoeckius, C. Kocks, W. Birchmeier, N. Rajewsky, *Nat. Commun.* 2020, *11*(1), 1.

Pratilas CA, Hanrahan AJ, Halilovic E, et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; *68*:9375-83.

Prior, I.A., Lewis, P.D Mattos, C.A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012, *72*:2457-2467.

Putker M., Millen R., Overmeer R., Driehuis E., Zandvliet M.M.J.M., Clevers H., Boj S.F., Li Q.-X. Medium-Throughput Drug- and Radiotherapy Screening Assay Using Patient-Derived Organoids. *J Vis Exp* **2021**, doi:10.3791/62495.

Quevauvillers, *Dictionnaire médical, 6ème édition*, MASSON, Septembre 2009, Pages: 1608.

Quijano-Rubio A., Ulge U.Y., Walkey C.D., et Silva D.-A. The advent of de novo proteins for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020, 56, 119–128.

Quoix.E, Lemarié.E. Epidemiological novelties in lung cancer. *Des maladies respiratoires* 2011 ; 28 : 1048-1058.

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.* 2011 Apr 29;332(6029):600-3. doi: 10.1126/science.1202947. Epub 2011 Apr 7. PMID: 21474713; PMCID: PMC3198051.

Raez LE., Cassileth PA., Schlesselman JJ., Sridhar K., Padmanabhan S., Fisher EZ, et al. Allogeneic vaccination with a B7.1 HLA-A gene-modified adenocarcinoma cell line in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2800–7.

Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014; 9:1618–24.

Rastogi, I.; Jeon, D.; Moseman, J.E.; Muralidhar, A.; Potluri, H.K.; McNeel, D.G. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front. Immunol.* 2022, 13, 954936.

Ray M.R., Jablons D., He B. Lung Cancer Therapeutics That Target Signaling Pathways: An Update. *Expert Rev Respir Med* **2010**, 4, 631–645.

Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csőszi, T.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cu e, S.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016, 375, 1823–1833.

Reita D., Pabst L., Pencreach E., Guérin E., Dano L., Rimelen V., Voegeli A.-C.; Vallat, L., Mascaux C., Beau-Faller M. Direct Targeting KRAS Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on Resistance. *Cancers (Basel)* **2022**, 14, 1321, doi:10.3390/cancers14051321.

Reintgen, D., R. Giuliano, and C. Cox, Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Cancer J*, 2002.

Reintgen, D., et al., The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg*, 1994.

Richard JB, Beck F. Tendances de long terme des consommations de tabac et d'alcool en France, au prisme du genre et des inégalités sociales. *Bull Epidémiol Hebd.* 2016;7–8:126–33.

Richmond A., et Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech* 2008; 1:78-82.

Riely, G.J.; Ou, S.H.I.; Rybkin, I.; Spira, A.; Papadopoulos, K.; Sabari, J.; Johnson, M.; Heist, R.S.; Bazhenova, L.; Barve, M.; et al. 990 PR KRYSTAL-1: Activity and preliminary pharmacodynamic (PD) analysis of adagrasib (MRTX849) in patients (Pts) with advanced non–

small cell lung cancer (NSCLC) harboring KRASG12C mutation. *J. Thorac. Oncol.* 2021, 16, S751–S752.

Riely GJ, Ladanyi M. KRAS mutations: an old oncogene becomes a new predictive biomarker. *J Mol Diagn* 2008; 10:493-5.

Riely, G.J., Kris, M. G, Rosenbaum, D, Marks, J, Li, A, Chitale, D.A, Nafa, K, Riedel, E.R, Hsu, M, Pao, W, Miller, V.A Ladanyi, M. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008, 14:5731- 5734.

Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6:201-5.

Roberts, P.J. Der, C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007, 26:3291-3310.

Rodrigues J., Heinrich MA., Teixeira LM., et Prakash J. 3D *In Vitro* Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer.* 2021 Mar;7(3):249-264.

Rohaam M.W., Wilgenhof S., et Haanen J.B.A.G. Adoptive cellular therapies: The current landscape. *Virchows Archiv.* 2019, 474, 449–461.

Rohwer N., et Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updates Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 2011, 14, 191–201.

Rong Z., Cheema U., et Vadgama P. Needle enzyme electrode based glucose diffusive transport measurement in a collagen gel and validation of a simulation model. *Analyst.* 2006; 131, 816–821.

Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol.* 2014;32(4):364–372.

Rothbauer M., Zirath H., et Ertl P. Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies. *Lab Chip.* 2018; 18 :249–270.

Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4:568–77.

Rud AK, Borgen E, Mælandsmo GM, et al. Clinical significance of disseminated tumour cells in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2013; 109:1264-70.

Saavedra D, Crombet T. CIMAvax-EGF: a new therapeutic vaccine for advanced non-small cell lung cancer patients. *Front Immunol.* 2017; 8:269.

Sachs N de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bounova G., Weeber F., Balgobind AV., Wind K., Gracanin A., Begthel H., Korving J., van Boxtel R., Duarte AA., Lelieveld D., van Hoeck A.,

Ernst RF., Blokzijl F., Nijman IJ., Hoogstraat M., van de Ven M., Egan DA., Zinzalla V., Moll J., Boj SF., Voest EE., Wessels L., van Diest PJ., Rottenberg S., Vries RGJ., Cuppen E., et

Sahai E., Astsaturov I., Cukierman E., DeNardo D. G., Egeblad M., Evans R. M., Fearon D., Greten F. R., Hingorani S. R., Hunter T., Hynes R. O., Jain R. K., Janowitz T., Jorgensen C., Kimmelman A. C., Kolonin M. G., Maki R. G., Powers R. S., Puré E., Ramirez D. C., Scherz-Shouval R., Sherman M. H., Stewart S., Tlsty T. D., Tuveson D. A., Watt F. M., Weaver V., A Weeraratna. T., et Werb Z., “A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 20, no. 3. 2020, pp. 174–186.

Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell* (2011) 19(5):679–90.

Salgia, R. MET in Lung Cancer: Biomarker Selection Based on Scientific Rationale. *Mol. Cancer Ther.* 2017, 16, 555–565.

Salgueiro L., Kummer S., Sonntag-Buck V., Weiß A., Schneider M.A., Kräusslich H.-G., Sotillo R. Generation of Human Lung Organoid Cultures from Healthy and Tumor Tissue to Study Infectious Diseases. *J. Virol.* 2022, 96, e0009822.

Salieb-Beugelaar GB, Simone G, Arora A, Philippi A, Manz A. Latest developments in microfluidic cell biology and analysis systems. *Anal. Chem.* 2010;82(12):4848–4864.

Samet J.M., Avila-Tang E., Boffetta P., Hannan L.M., Olivo-Marston S., Thun M.J., Rudin C.M. Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2009, 15, 5626–5645.

Sanchez.M-L, Couraud.S, Souquet.P-J. Updated data on epidemiology of lung cancer. *Revue des maladies respiratoires* 2015; 7: 285-289.

Sanchez JN., Wang T., et Cohen MS. BRAF and MEK inhibitors: use and resistance in BRAF-mutated cancers. *Drugs.* 2018;78(5):549–66.

Sankar K., Gadgeel S. M., et Qin A. (2020). Molecular therapeutic targets in nonsmallcell lung cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 20 (8), 647–661.

Santegoets. S. J. A. M., Stam A.G.M., Loughheed S.M., Gall H., Scholten P.E.T., Reijm M., Jooss K., Sacks N., Hege K., Lowy I., Cuillerot J.M., Von Blomberg B.M.E., Scheper R.J., van Den Eertwegh A.J.M., Gerritsen W.R., et de Gruijl T.D., T cell profiling reveals high CD4+CTLA-4+ T cell frequency as dominant predictor for survival after Prostate GVAX/ipilimumab treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62:245–256.

Santini D., Hilbe W., Pall G., Kocher F., Pircher A., Zabernigg A., et al. Multicenter phase II study evaluating two cycles of docetaxel cisplatin and cetuximab as induction regimen prior to surgery in chemotherapy- naive patients with NSCLC stage IB-IIIa (INN06-Study). *PloS one.* 2015;10(5):0125364.

Sanyal S. Culture and assay systems used for 3D cell culture. *Corning* 2014; 9: 1-18.

- Scarci M, Crisci R, Minervini F. Lung surgery in elderly patients: are we doing enough?. *J Thorac Dis.* 2018;10(2):693-694.
- Schalm SS., Dineen T., Lim SM., Park CW., Hsieh J., Woessner R, et al. 1296P BLU-945, a highly potent and selective 4th generation EGFR TKI for the treatment of EGFR T790M/C797S resistant NSCLC. *Ann Oncol.* 2020;31:S839.
- Scheff RJ, Schneider BJ. Non-small-cell lung cancer: treatment of late stage disease: chemotherapeutics and new frontiers. *Semin Intervent Radiol.* 2013; 30:191–198.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331:1565-70.
- Schuster, B.; Junkin, M.; Kashaf, S.S.; Romero-Calvo, I.; Kirby, K.; Matthews, J.; Weber, C.R.; Rzhetsky, A.; White, K.P.; Tay, S. Automated Microfluidic Platform for Dynamic and Combinatorial Drug Screening of Tumor Organoids. *Nat. Commun.* 2020, 11, 5271.
- Schuchert MJ, Abbas G, Pennathur A, et al. Sublobar resection for early- stage lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;22(1):22-31. PMID: 20813313; <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2010.04.004>.
- Seegobin K., Majeed U., Wiest N., Manochakian R., Lou Y., et Zhao Y. Immunotherapy in non-small cell lung cancer with actionable mutations other than EGFR. *Front Oncol.* 2021; 11:750657.
- Seitlinger J., Nounsi A., Idoux-Gillet Y., Santos Pujol E., Lê H., Grandgirard E., Olland A., Lindner V., Zaupa C., Balloul J.-M., et al. Vascularization of Patient-Derived Tumoroid from Non-Small-Cell Lung Cancer and Its Microenvironment. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1103.
- Sellars MC, Wu CJ, Fritsch EF. Cancer vaccines: Building a bridge over troubled waters. *Cell.* 2022; 185:2770.
- Selvaggi G., Wakelee HA., Mok T., Wu YL., Reck M., Chiappori A, et al. ID:1882 phase III randomized study of ensartinib vs crizotinib in anaplastic lymphoma kinase (ALK) POSITIVE NSCLC patients: eXalt3. *J Thorac Oncol.* 2020;15(10, Supplement):e41–2.
- Senthebane D.A., Jonker T., Rowe A., Thomford N.E., Munro D., Dandara C., Wonkam A., Govender D., Calder B., et Soares N.C., et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2861.
- Senapati S., Mahanta A.K., Kumar S., Maiti P. Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2018, 3, 7.
- Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog* 2013; 18:43–73.
- Shafer P., Kelly LM., et Hoyos V. Cancer therapy with TCR-Engineered Tcells: current strategies, challenges, and prospects. *Front Immunol.* 2022;13:835762.

Shaul, M.E.; Fridlender, Z.G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2019, 16, 601–620.

Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, Felip E, Goto Y, Liu G, et al. First-line lorlatinib or crizotinib in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(21):2018–29.

Shembrey C., Huntington N.D., et Hollande F. Impact of tumor and immunological heterogeneity on the anti-cancer immune response. *Cancers (Basel)*., vol. 11, no. 9, pp. 1–24, 2019.

Shield KD, Marant Micallef C, Hill C, Touvier M, Arwidson P, Bonaldi C, et al. New cancer cases in France in 2015 attributable to different levels of alcohol consumption. *Addiction.* 2018;113(2):247–56. <https://doi.org/10.1111/add.14009>.

Shirvani SM, Jiang J, Chang JY, et al. Lobectomy, sublobar resection, and stereotactic ablative radiotherapy for early-stage non-small cell lung cancers in the elderly. *JAMA Surg* 2014; 149:1244–53.

Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., et Takeyama H. “Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth,” *Cancers (Basel)*., vol. 7, no. 4. 2015, pp. 2443–2458.

Sicklick JK, Leonard SY, Babicky ML, et al. Generation of orthotopic patient-derived xenografts from gastrointestinal stromal tumor. *J Transl Med.* 2014; 12:41.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 7–30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019: cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7–34.

Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2020, 70, 7–30.

Sirica A.E., et Gores G.J. Desmoplastic stroma and cholangiocarcinoma: Clinical implications and therapeutic targeting. *Hepatol. (Baltim. Md.)* 2014, 59, 2397.

Simpson SG, Comstock GW. Lung cancer and housing characteristics. *Arch Environ Health* 1983; 38:248–251.

Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced nonsmall-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;378(2):113–25.

Soria, J.-C.; Ohe, Y.; Vansteenkiste, J.; Reungwetwattana, T.; Chewaskulyong, B.; Lee, K.H.; Dechaphunkul, A.; Imamura, F.; Nogami, N.; Kurata, T.; et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378, 113–125.

Solinas, G.; Germano, G.; Mantovani, A.; Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2009, 86, 1065–1073.

Sontheimer-Phelps A., Hassell BA., et Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer*. 2019 ;19(2):65-81.

Sun L., Chen L., et Li H. Checkpoint-modulating immunotherapies in tumor treatment: Targets, drugs, and mechanisms. *Int. Immunopharmacol*. 2019, 67, 160–175.

Sung K.E. et Beebe D.J. Microfluidic 3D models of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2014; 79, 68–78.

Spaans JN, Goss GD. Drug resistance to molecular targeted therapy and its consequences for treatment decisions in non-small-cell lung cancer. *Front Oncol*. 2014; 4: 190.

Soerjomataram I, Shield K, Marant-Micallef C, Vignat J, Hill C, Rogel A, et al. Cancers related to lifestyle and environmental factors in France in 2015. *EuJ Cancer*. 2018; 105:103–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.09.009>.

Srivatsan S., Patel JM., Bozeman EN., Imasuen IE., He S., Daniels D., et al. Allogeneic tumor cell vaccines: the promise and limitations in clinical trials. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(1):52–63.

Stein, J.N.; Rivera, M.P.; Weiner, A.; Duma, N.; Henderson, L.; Mody, G.; Charlot, M. Sociodemographic Disparities in the Management of Advanced Lung Cancer: A Narrative Review. *J. Thorac. Dis*. 2021, 13, 3772–3800.

Steenland K., Sanderson W. Lung cancer among industrial sand workers exposed to crystalline silica. *Am J Epidemiol* 2001; 153:695–703.

Steinkamp, M. P., Lagutina, I., Brayer, K. J., Schultz, F., Burke, D., Pankratz, V. S., ... & Wandinger-Ness, A. (2023). Humanized Patient-derived Xenograft Models of Disseminated Ovarian Cancer Recapitulate Key Aspects of the Tumor Immune Environment within the Peritoneal Cavity. *Cancer Research Communications*, 3(2), 309-324.

Stephens P., Hunter C., Bignell G., Edkins S., Davies H., Teague J., Stevens C.; O’Meara S., Smith R., Parker A., et al. Intragenic ERBB2 Kinase Mutations in Tumours. *Nature* **2004**, 431, 525–526,

Stewart, E.L.; Tan, S.Z.; Liu, G.; Tsao, M.-S. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Transl. Lung Cancer Res*. 2015, 4, 67–81.

Stockis J., Roychoudhuri R., et Halim T. Y. F., “Regulation of regulatory T cells in cancer,” *Immunology*, vol. 157, no. 3, pp. 219–231, 2019.

Streeter I., et Cheema U. Oxygen consumption rate of cells in 3D culture: the use of experiment and simulation to measure kinetic parameters and optimise culture conditions. *Analyst*. 2011; 136, 4013–4019.

Stupack D.G., et Cheresch D.A. ECM remodeling regulates angiogenesis: Endothelial integrins look for new ligands. *Sci. STKE* 2002, 2002, pe7.

Sundar S.J., Shakya S., Barnett A., Wallace L.C., Jeon H., Sloan A., Recinos V., Hubert C.G. Three-Dimensional Organoid Culture Unveils Resistance to Clinical Therapies in Adult and Pediatric Glioblastoma. *Transl Oncol* **2021**, *15*, 101251, doi:10.1016/j.tranon.2021.101251.

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021, *71*, 209–249.

Tacha D, Yu C, Bremer R, et al. A 6-antibody panel for the classification of lung adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20(3):201–7.

Taefehshokr S, Parhizkar A, Hayati S, et al.: Cancer immunotherapy: challenges and limitations. *Pathol Res Pract.* 2022, 229:153723.

Takebe T., Imai R., Ono S. The Current Status of Drug Discovery and Development as Originated in United States Academia: The Influence of Industrial and Academic Collaboration on Drug Discovery and Development. *Clin. Transl. Sci.* 2018, *11*, 597–606.

Tan, C.-S.; Kumarakulasinghe, N.B.; Huang, Y.-Q.; Ang, Y.L.E.; Choo, J.R.-E.; Goh, B.-C.; Soo, R.A. Third generation EGFR TKIs: Current data and future directions. *Mol. Cancer* 2018, *17*, 29.

Tan, S., Zhang, C. W., and Gao, G. F. Seeing Is Believing: Anti-PD-1/pd-L1 Monoclonal Antibodies in Action for Checkpoint Blockade Tumor Immunotherapy. *Signal. Transduct Target. Ther.* 2016, *1*, 16029. doi:10.1038/sigtrans.2016.29

Tanner K., et Gottesman, M. M. Beyond 3D culture models of cancer. *Sci. Transl. Med.* 2015; *7*, 7–10.

Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, et al. Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009 ;15:6980-6.

Tanaskovic O., Verga Falzacappa MV., Pelicci PG., et Kim CH. Human cord blood (hCB)-CD34+ humanized mice fail to reject human acute myeloid leukemia cells. *PLoS One.* 2019; *14*(9): e0217345.

Takayama S, Thorgeirsson UP, et Adamson RH. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008; *84*:176-88.

Teleanu R. I., Chircov C., Grumezescu A. M., et Teleanu D. M., “Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment,” *J. Clin. Med.*, 2019; vol. 9, no. 1, p. 84,

Theocharis, A. D., Vynios, D. H., Papageorgakopoulou, N., Skandalis, S. S., et Theocharis, D. A. Altered content composition and structure of glycosaminoglycans and proteoglycans in gastric carcinoma. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2003; *35*, 376–390.

Thiberville.L, Paris.C. Epidemiology and risk factors of primary lung cancer. *Pneumologie* 2004; *1* : 7-18.

Thoma C.R., Zimmermann M., Agarkova I., Kelm J.M., Krek W. 3D Cell Culture Systems Modeling Tumor Growth Determinants in Cancer Target Discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014, 69–70, 29–41.

Tolle F., Umansky V., Utikal, J., Kreis S., Bréchar, S. Neutrophils in Tumorigenesis: Missing Targets for Successful Next Generation Cancer Therapies? *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6744.

Tomasini P, Khobta N, Greillier L, Barlesi F. Ipilimumab: its potential in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2012 Mar;4(2):43-50. doi: 10.1177/1758834011431718. PMID: 22423263; PMCID: PMC3296082.

Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R., Gettinger S.N., Smith D.C.; McDermott D.F., Powderly J.D., Carvajal R.D., Sosman J.A., Atkins M.B., et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine* **2012**, 366, 2443–2454.

Travis LB, Ng AK, Allan JM, Pui CH, Kennedy AR, Xu XG, Purdy JA, Applegate K, Yahalom J, Constine LS, Gilbert ES, Boice JD Jr. Second malignant neoplasms and cardiovascular disease following radiotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Mar 7;104(5):357-70. doi: 10.1093/jnci/djr533. Epub 2012; Feb 6. PMID: 22312134; PMCID: PMC3295744.

Travis, W. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol* **25** (Suppl 1), S18–S30 (2012).

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, et al. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization classification of tumours, series 7. Lyon (France): IARC Press; 2004.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th edition. Lyon (France): IARC Press; 2015.

Truffi, M., Sorrentino, L., and Corsi, F. (2020). Fibroblasts in the tumor microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1234, 15–29.

Tsao AS, Scagliotti GV, Bunn PA Jr, et al. Scientific advances in lung cancer 2015. *J Thorac Oncol.* 2016;11(5):613-638.

Tsao M.-S., Aviel-Ronen S., Ding K., Lau D., Liu N., Sakurada A., Whitehead M., Zhu C.-Q., Livingston R., Johnson D.H., et al. Prognostic and Predictive Importance of P53 and RAS for Adjuvant Chemotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **2007**, 25, 5240–5247, doi:10.1200/JCO.2007.12.6953.

Tuveson D., Clevers H. Cancer Modeling Meets Human Organoid Technology. *Science* 2019, 364, 952–955.

UICC. TNM classification of malignant tumours. Geneva Union Int Contre Cancer 1968

Uramoto H, Nakanishi R, Fujino Y, et al. Prediction of pulmonary complications after a lobectomy in patients with non-small cell lung cancer. *Thorax* 2001; 56:59-61.

Uramoto H, Takenoyama M, Hanagiri T. Simple prophylactic fixation for lung torsion. *Ann Thorac Surg* 2010; 90:2028-30.

Uramoto H, Tanaka F. Prediction of recurrence after complete resection in patients with NSCLC. *Anticancer Res* 2012; 32:3953-60.

Valkenburg, K. C., De Groot, A. E., and Pienta, K. J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018 ;15, 366–381.

Van der Heyden, J. H. A., M. M. Schaap, A. E. Kunst, S. Esnaola, C. Borrell, B. Cox, M. Leinsalu, et al. 2009. 'Socioeconomic Inequalities in Lung Cancer Mortality in 16 European Populations'. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 63 (3): 322–30. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.06.006>.

Van Maldegem F., Downward J. Mutant KRAS at the Heart of Tumor Immune Evasion. *Immunity* 2020, 52, 14–16,

Van Luijk P, Pringle S, Deasy JO, Moiseenko VV, Faber H, Hovan A, Baanstra M, Van Der Laan HP, Kierkels RGJ, Van Der Schaaf A et al. Sparing the region of the salivary gland containing stem cells preserves saliva production after radiotherapy for head and neck cancer. *Sci Transl Med.* 2015; 7, 305ra147.

Vargo-Gogola T., et Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:659-72.

Vasconcellos, V.F.; Marta, G.N.; da Silva, E.M.; Gois, A.F.; de Castria, T.B.; Riera, R. Cisplatin versus carboplatin in combination with third-generation drugs for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020, 1, CD009256.

Veatch JR., Simon S., et Riddell SR. Tumor-infiltrating lymphocytes make inroads in non-small-cell lung cancer. *Nat Med.* 2021;27(8):1339–41.

Vicari A.P., Caux,C., Trinchieri G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. In *Proceedings of the Seminars in Cancer Biology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2002; pp. 33–42.

Vignaud J-M. Squamous cell carcinoma, basaloid squamous cell carcinoma and adeno squamous carcinoma in the lung. *Annales de pathologie* 2016; 36: 15-23.

Vinod K.S., et Hau E. Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Asian Pacific Society of Respiriology, Respiriology.* 2020; 25, 61–71. doi: 10.1111/resp.13870

Visvader J. E., G. J. Lindeman, *Nat. Rev. Cancer* 2008, 8(10), 755.

Visconti, R.; Morra, F.; Guggino, G.; Celetti, A. The between Now and Then of Lung Cancer Chemotherapy and Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1374.

Vinod S.K.; Hau, E. Radiotherapy Treatment for Lung Cancer: Current Status and Future Directions. *Respirology* 2020, 25, 61–71.

Voskoglou-Nomikos T., Pater J.L., et Seymour L. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 4227–4239.

Vuagnat P., et Champiat S. Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux. *MCED n°95 – Décembre 2018; 5-10.*

Walker C., Mojares E., et Del Río Hernández A. *Role of extracellular matrix in development and cancer progression*, vol. 19, no. 10. 2018.

Wang J., Zou ZH., Xia HL., He JX., Zhong NS., et Tao AL. Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. *PLoS ONE.* 2012 ; 7(3): e32695.

Wang M., Han J., Marcar L., Black J., Liu Q., Li X., Nagulapalli K., Sequist L.V., Mak R.H., Benes C.H., et al. Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin-EGFR Pathway. *Cancer Res* **2017**, 77, 2018–2028, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0808.

Wang, Q.; Yang, S.; Wang, K.; Sun, S.Y. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2019, 12, 63.

Wang, S.; Cang, S.; Liu, D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2016, 9.

Wang S., Song Y., et Liu D. EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Lett.* 2017;385:51–4.

Wang X, Qi Z, Wei H, Tian Z, Sun R. Characterization of human B cells in umbilical cord blood-transplanted NOD/SCID mice. *Transpl Immunol.* 2012;26(2–3):156–162.

Wang, Y.; Li, L.; Han, R.; Jiao, L.; Zheng, J.; He, Y. Clinical analysis by next-generation sequencing for NSCLC patients with MET amplification resistant to osimertinib. *Lung Cancer* 2018, 118, 105–110.

Wang Y., Li, Y., Sheng Z., Deng W., Yuan H., Wang S., Liu Y. Advances of Patient-Derived Organoids in Personalized Radiotherapy. *Front Oncol* **2022**, 12, 888416, doi:10.3389/fonc.2022.888416.

Wang Z., Q. Xu, N. Zhang, X. Du, G. Xu, X. Yan, *Signal Transduction Targeted Ther.* 2020, 5(1), 1.

WCRF, 2018. World Cancer Research Fund. – [www.cancer-environnement.fr](http://www.cancer-environnement.fr).

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

Weigelt, B., Ghajar, C. M., and Bissell, M. J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014; 69–70, 42–51.

Welch DR. Defining a cancer metastasis In: Research AAFc, editor. AACR Education Book 2006. Philadelphia: AACR; 2006 p 111–5.

Welch HG, Kramer BS, Black WC. Epidemiologic signatures in cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(14):1378–86.

Weng TY, Yen MC, Huang CT, Hung JJ, Chen YL, Chen WC, et al. DNA vaccine elicits an efficient antitumor response by targeting the mutant Kras in a transgenic mouse lung cancer model. *Gene Ther.* 2014 ;21(10):888–96.

Wheeler AR, Thronset WR, Whelan RJ, et al. Microfluidic device for single-cell analysis. *Anal. Chem.* 2003;75(14):3581–3586.

Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology.* 2001 ;166:3-10.

Wissler.MP. Bilan de l'analyse du statut mutationnel EGFR de 1000 patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires pris en charge par la plateforme d'oncologie moléculaire du CHU\_CAV de Nancy. Université de Lorraine. Thèse de doctorat. Université de Nancy. 2012, 113p.

Wolf J., Seto T, Han JY, Reguart N, Garon EB, Groen HJM, et al. Capmatinib in MET exon 14-mutated or MET-amplified non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(10):944–57.

Woo T., Okudela K, Mitsui H, et al. Prognostic value of the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in stage I disease of Japanese cases. *Pathol Int* 2012;62(12):785–91.

World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by region, 2000-2019. WHO; 2020. Accessed December 11, 2020. [who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gh-leading-causes-of-death](https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gh-leading-causes-of-death)

Wu L., Saxena, S., Awaji M., Singh R.K. Tumor-associated neutrophils in cancer: Going pro. *Cancers* 2019, 11, 564.

Wu, S.-G.; Shih, J.-Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* 2018, 17, 38.

Xiangming Guan, 2020. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2015, 5(5): 402-418.

Xie M., Xu X., Fan Y. KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*.

Xu X., Wang W., Kratz K., Fang L., Li Z., Kurtz A., Ma N., et Lendlein A. Controlling major cellular processes of human mesenchymal stem cells using microwell structures. *Adv Healthc Mater.* 2014, *3*:1991–2003.

Yakavets I., Jenard S., Francois A., Maklygina, Y., Loschenov V., Lassalle H.-P., et al. Stroma-rich co-culture multicellular tumor spheroids as a tool for photoactive drugs screening. *J. Clin.* 2019; *Med.* *8*:1686.

Yamashita T, Uramoto H, Onitsuka T, et al. Association between lymphangiogenesis-/micrometastasis- and adhesion-related molecules in resected stage I NSCLC. *Lung Cancer* 2010; *70*:320-8.

Yang J-J., Zhou J., Yang N., Wu Z., Sun J., Hui A-M., et al. SAF-189s in previously treated patients with advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC): results from the dose-finding portion in a single-arm, first-in-human phase I/II study. *J Clin Oncol.* 2020;*38*(15\_suppl):e21689-e.

Yehya, A.H.S., Asif M., Petersen S.H., Subramaniam A.V., Kono, K., Majid, A.M.S.A., et Oon, C.E. Angiogenesis: Managing the culprits behind tumorigenesis and metastasis. *Medicina* 2018, *54*, 8.

Yamamoto N., Harada H., Okamoto I., Masuda N., Hayakawa K., Satouchi M., et al. Phase 2 study of nimotuzumab in combination with concurrent chemoradiotherapy in patients with locally advanced non-smallcell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2021;*22*(2):134–41.

Yanagawa N, Shiono S, Abiko M, et al. New IASLC/ATS/ERS classification and invasive tumor size are predictive of disease recurrence in stage I lung adeno- carcinoma. *J Thorac Oncol* 2013;*8*(5):612–8.

Yang L., Shen C., Estrada-Bernal A., Robb R., Chatterjee M., Sebastian N., Webb A., Mo X., Chen W., Krishnan S., et al. Oncogenic KRAS Drives Radioresistance through Upregulation of NRF2-53BP1-Mediated Non-Homologous End-Joining Repair. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49*, 11067–11082,

Yang S., Zhang Z., Wang Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2019; *12*:47.

Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest.* 2015, *125*:3335-7.

Yang Z., Xu, H., et Zhao X. Designer self-assembling peptide hydrogels to engineer 3D cell microenvironments for cell constructs formation and precise oncology remodeling in ovarian cancer. *Adv. Sci.* 2020; *7*:1903718.

Yano M, Yoshida J, Koike T. The Outcomes of a Limited Resection for Non-Small Cell Lung Cancer Based on Differences in Pathology. *World J Surg.* 2016;*40*(11):2688-97. PMID: 27365098; <https://doi.org/10.1007/s00268-016-3596-9>.

Yao Y., Xu X., Yang L., Zhu J., Wan J., Shen L., Xia F., Fu G., Deng Y., Pan M., et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 17-26. e6, doi:10.1016/j.stem.2019.10.010.

Yildiz-Ozturk E., Saglam-Metiner, P., Yesil-Celiktas O. Lung Carcinoma Spheroids Embedded in a Microfluidic Platform. *Cytotechnology* **2021**, *73*, 457–471.

Yokota E., Iwai M., Yukawa T., Yoshida M., Naomoto Y., Haisa M., Monobe Y., Takigawa N., Guo M., Maeda Y., et al. Clinical Application of a Lung Cancer Organoid (Tumoroid) Culture System. *NPJ Precis Oncol* **2021**, *5*, 29, doi:10.1038/s41698-021-00166-3.

Youn, J.I., and Gabrilovich, D.I. (2010). The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European journal of immunology* *40*, 2969-2975.

Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* **2011**;24(5):653–64.

Yu H., Yang J., Jiao S., Li Y., Zhang W., et Wang J. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunol Immunother* **2015**; *64*. 2015; 853–860, doi: 10.1007/s00262-015-1696-2.

Zalcman G., Beau-Faller M., Creveuil C., de Fraipont F., Mounawar M., Richard N., Bergot E., Favrot M., Morin F., Milleron B. Use of Ras Effector RASSF1A Promoter Gene Methylation and Chromosome 9p Loss of Heterozygosity (LOH) to Predict Progression-Free Survival (PFS) in Perioperative Chemotherapy (CT) Phase III Trial IFCT-0002 in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *JCO* **2008**, *26*, 7500–7500, doi:10.1200/jco.2008.26.15\_suppl.7500.

Zhang, M.; Li, G.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhao, S.; Haihong, P.; Zhao, H.; Wang, Y. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: A meta-analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.

Zhang S., Wan Z., Kim D.R. Vascularized organoids on a chip: strategies for engineering organoids with functional vasculature. *Lab Chip.* **2021**, *21*, 473–488.

Zhang, Y.-L.; Yuan, J.-Q.; Wang, K.-F.; Fu, X.-H.; Han, X.-R.; Threapleton, D.; Yang, Z.-Y.; Mao, C.; Tang, J.-L. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78985–78993.

Zhang Z., Wang H., Ding Q., Xing Y., Xu Z., Lu C., Luo D., Xu L., Xia W., Zhou C., et al. Establishment of Patient-Derived Tumor Spheroids for Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194016.

Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, Boutsikou E, Machairiotis N, Tsakiridis K, Katsikogiannis N, Kougioumtzi I, Karapantzios I, Huang H, Spyrtatos D. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Dis* **2013**; *5*(S4):S389-S396.

Zatloukal P., Heo DS., Park K, Kang J., Butts C, Bradford D., et al. Randomized phase II clinical trial comparing tremelimumab (CP-675,206) with best supportive care (BSC) following first-line platinum-based therapy in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer

(NSCLC). *J Clin Oncol*. 2009;27(15\_suppl):8071.

Zheng Min, Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 25 2016 447–468.<http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>

Zheng P.-P., Kros J.M., et Li J. Approved CAR T cell therapies: Ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts.*Drug Discov. Today* 2018, 23, 1175–1182.

Zhong L, Goldberg MS, Parent ME, Hanley JA. Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2000; 27:3–18.

Zhou B., Lawrence T., Liang Y. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Cancers. *Front. Immunol*. 2021, 12, 749190.

## Anasse Nounsi

# Optimisation d'une plateforme de criblage de molécules anti-cancéreuses adaptée aux patients et basée sur un modèle de tumeur 3D vascularisé

### Résumé en Français

Le cancer est actuellement l'une des principales causes de décès à travers le monde. Une guérison peut être obtenue dans différents types de cancers grâce aux traitements actuels. Malheureusement, environ 85% des nouvelles molécules thérapeutiques échouent lors des essais cliniques. Ces échecs entraînent des pertes importantes de temps et d'investissements. Pour remédier à cette situation, une solution prometteuse consiste à développer un modèle *in vitro* capable de reproduire au mieux la vascularisation et l'environnement tumoral, afin d'améliorer la sélection des molécules thérapeutiques d'intérêt pour réduire l'agressivité tumorale.

Notre projet de recherche a pour but de créer des tumoroïdes dérivés de patients (PDT's) atteints de cancer du poumon. Ce modèle sera utilisé pour évaluer l'efficacité des traitements standards tels que la radiothérapie et la chimiothérapie à base de platine. Ainsi, ce modèle pourrait avoir une valeur prédictive de la réponse des traitements de radiothérapie et de chimiothérapie chez les patients atteints du cancer du poumon. De plus, il a été incorporé à ce modèle une vascularisation permettant de mieux mimer la complexité de l'environnement tumoral. Notre modèle de tumeur reconstruite en 3D est un outil rapide à obtenir qui est prometteur. Il pourrait être relié à un système micro-fluidique, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour les tests précliniques.

En effet, cette plateforme centrée sur notre modèle 3D pourrait ouvrir la voie à différents tests de médicaments anti-cancéreux directement sur les tumeurs reconstruites *in vitro* de chaque patient. Notamment, cela pourrait permettre différents tests évaluant la pertinence des associations moléculaires. Cette approche faciliterait le développement d'une médecine de précision personnalisée, où les traitements pourraient être adaptés spécifiquement aux tumeurs de chaque patient.

**Mots clés :** Tumoroïdes dérivés du patient, cancer du poumon, microenvironnement tumoral, radiothérapie, chimiothérapie, vascularisation, médecine personnalisée.

## Résumé en anglais

Cancer is currently one of the leading causes of death worldwide, and finding effective treatments is a significant challenge. Unfortunately, approximately 85% of new therapeutic molecules fail in clinical trials, resulting in wasted time and resources. To address this issue, one promising solution is the development of an in vitro model that can accurately replicate the tumor environment and vascularization, enabling better selection of therapeutic molecules to reduce tumor aggressiveness.

This research project focuses on creating patient-derived tumoroids (PDTs) for lung cancer. This model will be used to assess the effectiveness of standard treatments such as radiotherapy and platinum-based chemotherapy. By using this model, we aim to predict the response of lung cancer patients to these treatments. Furthermore, we have incorporated vascularization into our model to better mimic the complex tumor environment.

This new 3D reconstructed tumor model is a fast and promising tool. It can be coupled with a microfluidic system, which offers new possibilities for preclinical testing. This platform, could facilitate various tests of anti-cancer drugs directly on the in vitro reconstructed tumors of individual patients. Specifically, it could enable assessments of the effectiveness of different molecular combinations. This approach would support the development of personalized precision medicine, where treatments can be adapted to each patient's specific tumor characteristics.

**Keywords:** Patient-derived tumoroids, lung cancer, tumor microenvironment, radiotherapy, chemotherapy, vascularization, personalized medicine.