

Université de Montréal

Développement d'un modèle de co-culture en trois dimensions de cellules de cancer du
poumon et de fibroblastes

Par

Emmanuel Sy

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Août 2022

© Sy Emmanuel, 2022

Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, CHU St-Justine

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé(e)

Développement d'un modèle de co-culture en trois dimensions de cellules de cancer du poumon et de fibroblastes

Présenté par

Emmanuel Sy

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Maja Krajinovic

Président-rapporteur

Dr. Noël Raynal

Directeur de recherche

Dr. Jean-François Gauchat

Membre du jury

Résumé

Le cancer du poumon non-à-petites-cellules (CPNPC) représente 85% des cas de cancer du poumon. Cependant, les modèles utilisés de culture cellulaire en deux dimensions (2D) représentent partiellement les caractéristiques physiopathologiques du CPNPC. Notre objectif est de réaliser un modèle *in vitro* plus représentatif des caractéristiques de ce type de cancer. La culture tridimensionnelle (3D) dans laquelle les cellules forment un sphéroïde, est considérée comme un modèle plus fidèle aux tumeurs retrouvées chez les patients grâce à la structure et aux interactions intercellulaires du modèle. Pour mieux représenter le microenvironnement tumoral, nous intégrons une lignée cellulaire de fibroblastes dans le sphéroïde de CPNPC, afin d'imiter l'interaction entre cellules cancéreuses et cellules stromales. En effet, bien que les fibroblastes représentent un faible pourcentage des cellules au sein des tumeurs de CPNPC, elles jouent un rôle prépondérant dans la biologie tumorale et la réponse aux médicaments.

Nous avons testé différentes lignées de fibroblastes et différents ratios de co-culture afin de déterminer les conditions optimales de notre modèle de co-culture 3D. Après 7 jours de co-culture, les cellules cancéreuses démontrent un potentiel migratoire plus élevé lorsque mesuré dans des chambres de Boydens. Cet effet n'est dépendant ni de la prolifération, ni d'un changement de phase dans le cycle cellulaire. Nous avons caractérisé la localisation des fibroblastes au sein du sphéroïde par des expériences de microscopie à fluorescence. L'expression de la protéine α -SMA du cytosquelette a aussi été déterminée par immunofluorescence. Nous avons par la suite établi un modèle de co-culture sur 24 jours afin de maximiser la communication entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes. Ce modèle de co-culture long terme a par la suite été analysé selon son contenu en cytokines, chimiokines et métabolites. Enfin, nous avons réalisé un criblage de médicaments au jour 24 de notre co-culture long terme afin d'évaluer une réponse thérapeutique des cellules cancéreuses, dans des conditions plus semblables au microenvironnement tumoral.

Mots-clés : Cancer du poumon, Culture 3D, Co-culture, Fibroblastes, Pharmacologie.

Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 85% of all lung cancer cases. However, the two-dimensional (2D) cell culture models used represent partially the pathophysiological characteristics of NSCLC. Our goal is to develop an *in vitro* model that is more representative of the characteristics of this type of cancer. The three-dimensional (3D) culture, in which the cells form a spheroid, is considered to be a model more faithful to the tumors found in patients due to the structure and intercellular interactions of the model. In order to better represent the tumor microenvironment, we are integrating a fibroblast cell line into the spheroid of NSCLC to mimic the interaction between cancer cells and stromal cells. Although fibroblasts represent a small percentage of cells in NSCLC tumors, they play a major role in tumor biology and drug response.

We tested different fibroblast cell lines and co-culture ratios to determine the optimal conditions of our 3D co-culture model. After 7 days of co-culture, the cancer cells show a higher migratory potential when measured in Boydens chambers. This effect is not dependent on proliferation or change of phase in the cell cycle. We characterized the localization of fibroblasts within the spheroid by fluorescence microscopy experiments. The expression and localization of the cytoskeletal protein α -SMA was also determined by immunofluorescence. We then established a 24-day co-culture model to maximize communication between cancer cells and fibroblasts. This long-term co-culture model was subsequently analyzed for cytokine, chemokine and metabolite content. Finally, we performed drug screening on day 24 of our long-term co-culture to evaluate a therapeutic response of cancer cells under conditions more similar to the tumor microenvironment.

Keywords : Lung cancer, NSCLC, 3D culture, spheroid, co-culture, fibroblasts, pharmacology

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles et abréviations	11
Remerciements	18
Chapitre 1 – Introduction	20
1) Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).....	20
1) 1. Données épidémiologiques.....	20
1) 1. a. Statistiques	20
1) 1. b. Types de cancer du poumon	22
1) 2. Tumorigénèse et mutations du cancer du poumon	23
1) 2. a. Étude de cas : la fonderie Horne de Rouyn-Noranda	23
1) 2. b. Mutations promotrices du cancer du poumon	24
1) 3. Épigenétique du cancer du poumon	27
1) 3. a. L'épigenétique de la différenciation cellulaire	27
1) 3. a. I. La méthylation des cytosines.....	28
1) 3. a. II. Les modifications post-traductionnelles des histones.....	28
1) 3. a. III. Les enzymes épigénétiques	31
1) 3. a. IV. Dérégulation épigénétique du CPNPC.....	32
1) 4. Hétérogénéité clonale des cellules tumorales du CPNPC	34

1) 4. a. Cellules souches cancéreuses.....	35
2) Microenvironnement tumoral	36
2) a. Les cellules immunitaires	37
2) b. Les cellules stromales : les fibroblastes.....	38
2) b. I. Effet anti-tumoral des fibroblastes	39
2) b. II. Effet pro-tumoral des fibroblastes: fibroblastes associés au carcinome.....	40
2) c. La matrice extracellulaire (ECM).....	44
3) Pharmacologie du CPNPC.....	46
3) a. Traitement standard.....	46
3) b. Médecine personnalisée du CPNPC	47
3) b. I. Thérapies dirigées contre l'EGFR.....	47
3) b. II. Thérapies dirigées contre KRAS.....	48
3) b. III. Thérapies dirigées contre la translocation EML4-ALK	48
3) c. Innovations et nouvelles approches de traitement.....	49
3) c. I. Immunothérapie du cancer	49
3) c. II. Thérapie épigénétique du cancer	50
3) d. Découverte de nouveaux composés pharmaceutiques	52
3) d.I. Criblage à haut débit	52
4) Modèles <i>in vitro</i> du cancer du poumon	53
4) a. Culture cellulaire 2D	53
4) b. Culture cellulaire 3D.....	53
4) c. Modéliser le microenvironnement tumoral <i>in vitro</i>	54
Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs.....	58
1. Hypothèse	58

2. Objectifs	58
Chapitre 3 – Matériel et méthode.....	60
Chapitre 4 – Résultats	70
1) Choix de la lignée cellulaire de fibroblastes	70
2) Établissement de la proportion cellulaire de fibroblastes en co-culture monocouche et sphéroïde	73
3) Caractérisation de la co-culture sphéroïde par rajout de fibroblastes	79
4) Mesure de l’expression des protéines et de la capacité migratoire du modèle de co-culture en sphéroïde	81
5) Analyse des métabolites sécrétés selon les conditions de culture	89
6) Mesure des cytokines et chimiokines sécrétées selon les conditions de culture	95
7) Réponse thérapeutique du modèle de co-culture au criblage de composés épigénétiques	102
Chapitre 5 - Discussion	105
Conclusion	111
Références bibliographiques.....	112
Annexes.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1. – Anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot et immunofluorescence (IF).....	65
Tableau 2. – Concentrations des cytokines selon les conditions et les temps de culture ...	129
Tableau 3. – Intensité normalisée des métabolites dans les différentes conditions et temps de culture.....	130
Tableau 4. – . Métabolites différentiellement exprimés dans la monoculture ou co-culture au jour 24.....	133
Tableau 5. – Molécules épigénétiques du criblage à haut débit et leur cible d’inhibition ..	135

Liste des figures

Chapitre 1 - Introduction

Figure 1. –	Incidence et mortalité mondiale des différents types de cancer en 2021	21
Figure 2. –	Incidence et mortalité du cancer du poumon en 2022 au Canada.....	22
Figure 3. –	Les différents stades d'avancement du cancer du poumon (selon la classification TNM)	25
Figure 4. –	Mutations promotrices retrouvées dans le cancer du poumon CPNPC.....	25
Figure 5. –	Modifications post-traductionnelles des histones et recrutement des domaines associés aux complexes de régulation des gènes.....	31
Figure 6. –	L'hétérogénéité cellulaire de la tumeur.....	37
Figure 7. –	Implication du microenvironnement tumoral dans la progression du cancer.....	40
Figure 8. –	L'effet paracrine des fibroblastes associé au carcinome dans la progression tumorale.....	42
Figure 9. –	Les voies métaboliques dérégulées dans la cellule cancéreuse	43
Figure 10. –	Les différents traitements dans la thérapie personnalisée du cancer CPNPC...	49
Figure 11. –	Avantages et limitations des différents types de modèles <i>in vitro</i>	56

Chapitre 4 - Résultats

Figure 1. –	Caractérisation du modèle de co-culture 3D selon la lignée de fibroblastes.....	71
Figure 2. –	Modèle de co-culture en 2D avec cellules tumorales A549 et fibroblastes MRC-5 marquées au CFSE.....	73
Figure 3. –	Étude de la proportion de fibroblastes MRC-5 CFSE ⁺ , dans le modèle de co-culture sphéroïde sur 7 jours	76
Figure 4. –	Maintien du ratio de co-culture dans les sphéroïdes, par rajout de MRC-5 CFSE ⁺ au 3ème jour.....	79
Figure 5. –	Effet de la co-culture sur l'expression de la α -SMA et la capacité migratoire des cellules.....	82

Figure 6. – Analyse des niveaux d’expression protéiques liés à la régulation épigénétique et à la matrice extracellulaire, induit par la co-culture à long terme de sphéroïdes	85
Figure 7. – HeatMap des métabolites produits par la monoculture 2D de cellules A549 ainsi que la monoculture et co-culture de sphéroïdes à différents temps de culture	89
Figure 8. – Analyse différentielle des métabolites sécrétés par les sphéroïdes de monoculture et de co-culture et analyse d’enrichissement des voies métaboliques associées.....	92
Figure 9. – Cytokines et chimiokines sécrétés par la co-culture et la monoculture en 2D et 3D.....	96
Figure 10. – Niveaux d’enrichissement des cytokines et chimiokines sécrétés différemment par les sphéroïdes de co-culture au jour 10 et au jour 24	99
Figure 11. – Réponse thérapeutique du modèle de co-culture long terme aux composés épigénétiques.....	102

Annexes

Figure 1. – Proportion des types cellulaires retrouvés chez le patient atteints de CPNPC...128	128
Figure 2. – Analyse des effets de classe des composés épigénétiques en 2D, 3D et 3D co-culture.....	134

Liste des sigles et abréviations

2D : 2 Dimensions

3D : 3 Dimensions

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : "Protein kinase B" ; Protéine Kinase B

ALK : Kinase du lymphome anaplastique

ANOVA : "Analysis of Variance" ; Analyse de Variance

ARN : Acide ribonucléique

bFGF : "b Fibroblast Growth Factor" ; Facteur de croissance b des fibroblastes

BRAF : "v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B" B-Raf proto-oncogène

BSA : Albumine sérique bovine

CAF : "Carcinoma associated fibroblasts" ; Fibroblastes associés au carcinome

CDK : "Cycline dépendante kinases" ; Kinases dépendantes du cycle cellulaire

CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CO₂ : Dioxyde de Carbone

CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules

CPPC : Cancer du poumon à petites cellules

CSC : Cellules souches cancéreuses

CTLA-4 : "Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4" ; Protéine 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques

DAPI : "4',6-diamidino-2-phenylindole" ; 4',6-diamidino-2-phénylindole

DAPK : "Death Associated protein kinase" ; Protéine kinase associée à la mort

DMSO : Dimethyl sulfoxide ; Diméthylesulfoxide

DNMT : Méthyltransférase de l'ADN

DNMT1 : "DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1" ; Méthyltransférase 1 de l'ADN (Cytosine-5')

DTT : Dithiothréitol

ECL : Électrochimiluminescence

ECM : "Extracellular matrix" ; Matrice extracellulaire

EDTA : " Ethylenediaminetetraacetic acid " ; Acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EED : "Embryon ectoderm developement " ; Développement de l'ectoderme embryonnaire

EGF : "Epidermal growth factor" ; Facteur de croissance épidermique

EGFR : "Epidermal growth factor receptor" ; Récepteur du facteur de croissance épidermique

ELISA : " enzyme-linked immunosorbent assay " ; Dosage immuno-enzymatique

EML4-ALK : EML4-kinase du lymphome anaplastique

ERK : "Extracellular signal-related kinase" ; Kinase reliée au signal extracellulaire

EZH2 : "Enhancer Zest Homolog 2" ; Homologue 2 d'exhausteur du zeste

FBS : Sérum fœtal bovin

FDA : "Food and Drug Administration" ; Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FGF : "Fibroblast Growth Factor" ; Facteur de croissance des fibroblastes

GTPase : Guanine triphosphate phosphatase

h : Heure

H1 : Histone 1

H2A : Histone 2A

H2B : Histone 2B

H3 : Histone 3

H4 : Histone 4

HAT : Histone acétyltransferases

HDAC : Histones désacétylases

HeLA : Henrietta Lacks

HER2 : "Human epidermal growth factor" ; Récepteur 2 du facteur de croissance épidermal humain

HGF : "Hepatocyte growth factor" ; Facteur de croissance des hépatocytes

HPV : Papillomavirus Humain

HRP : Horse Radish Peroxydase

HTS : "High Throughput Screening" ; Criblage à haut débit

IF : Immunofluorescence

IL : Interleukines

ITGB5 : Intégrine β 5

K : Lysines

K-RAS : Sarcome du rat Kristen

KDM : Lysines déméthylase

KMT : Lysine méthyltransférase

LSD1 : Déméthylase spécifique aux lysines

MAPK : "Mitogen-activated protein kinase" ; Protéine kinase activée par des agents mitogènes

MEK : Kinase de MAPK/ERK

MET : met proto-oncogène

MET/TME : Micro-environnement tumoral

MGMT : "O-6-methylguanine-DNA methyltransferase " ; méthyltransférase de la Methylguanine-O-6 de l'ADN

min : minutes

ml : millilitre

mm : millimètre

mM : Milimolaire

MMP : "Matrix metalloproteinase" ; Metalloprotéinase de la matrice

mTOR : " Mammalian target of rapamycin " ; Cible de la rapmycine chez le mammifère

NaCl : Chlorure de Sodium

ng : nanogramme

NK : "Natural killer"

NSCLC : "Non small cell lung cancer"

OCT : Optimum cutting temperature

ONU : Organisation des Nations Unies

PAGE : "Polyacrylamide gel electrophoresis" ; Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS : "Phosphate-buffered Saline" ; Solution Saline de tampon phosphate salin

PRC1/2 : Complexe de répression Polycomb

PD-1 : "Protein Death 1" ; Protéine de mort 1

PDGFR : "Platelet-derived Growth factor receptor" ; Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDL-1 : "protéine Protein Death Ligand 1 " ; Ligand 1 de la protéine de mort

PFA : Paraformaldéhyde

pg : picogramme

PI : Iodure de propidium

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PTM : Modifications post-traductionnelles

PVDF : "Polyvinylidene Fluoride" ; Polyfluorure de vinylidène

R : arginines

RAF : "rapidly accelerated fibrosarcoma" ; Fibrosarcome rapidement accéléré

Rme2s : Diméthylarginine symétrique

Rme2as : Diméthylarginine asymétrique

RPM : Rotation par minute

SDF1 : "Stromal cell derived factor 1" ; Facteur 1 dérivé de cellules stromales

SDS : "Sodium dodecyl-sulfate" ; Dodécylsulfate de sodium

SUZ12 : "SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit" ; Sous-unité SUZ12 du complexe de répression Polycomb

TBS-T : "Tris-buffered saline with Tween" ; Solution saline tamponnée au Tris avec du Tween

TGF- β : "Tumor Growth Factor β " ; Facteur de croissance tumorale β

TIMP : "Tissue inhibitor of metalloprotease" ; Inhibiteurs des métalloprotéases du tissu

TKI : Inhibiteurs de tyrosine kinase

TNM : "Tumor, Node, Metastasis" ; Tumeur, nodule, métastase

TSG : Gènes suppresseurs de tumeurs

Ug : Microgramme

ul : microlitre

um : micromètre

uM : Micromolaire

V : Volt

VEGF : "Vascular endothelial growth factor" ; Facteur de croissance vaculaire endothélial

Wnt : "Wingless/Integrated"

α -SMA : "Alpha smooth muscle Actine" ; Actine alpha du muscle lisse

À Emma Mariam

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps mon directeur de recherche, **Dr. Noël Raynal**, pour son expertise et son support dans mon projet de recherche. Merci de m'avoir encadré dans mes recherches et de m'avoir encouragé dans les moments les plus challengeants. Tu m'as appris à surmonter la difficulté et à repousser mes limites, un pas à la fois. Merci aussi pour ta patience et tes conseils durant ces 2 ans.

Je remercie les membres de mon jury **Dr. Jean-François Gauchat** et **Dr. Maja Krajinovic**, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du **Département de pharmacologie et de physiologie**, qui permettent à de nombreux étudiants chaque année de pouvoir se former et s'épanouir parmi des membres éminents de la communauté scientifique. Merci pour cette journée Gabriel L.Plaa, qui permet de mettre en contact tous les étudiants et professeurs du département, plus nombreux qu'il n'y paraît. J'ai pu y apprécier l'interaction sociale et humaine en science qui m'a grandement manqué pendant cette pandémie.

Merci au **Dr. Moutih Rafei** pour ses conseils éclairés concernant les cytokines et chimiokines de mon modèle de co-culture ainsi que les membres du laboratoire du **Dr. Christian Beauséjour**.

Je tiens à remercier **tous mes collègues de laboratoire**, avec qui j'ai partagé tant de moments durant ces deux dernières années.

Walid, merci d'avoir été là, collègue et ami, je suis reconnaissant de t'avoir rencontré et que nous ayons pu nous soutenir mutuellement dans les temps durs, comme dans les bons temps. À toutes nos discussions sur la pluie et le beau temps, sur la vie, la société ; À toutes ces fois où toi seul pouvait comprendre ma situation, merci de m'avoir changé les idées quand c'était nécessaire. Merci pour tout.

Anaïs, merci pour tout, pour ton support pendant la période de révision de mon mémoire, mais aussi pour ton aide et ton expertise plus que nécessaire à la réussite de mon mémoire. J'ai

apprécié mon temps passé en ta compagnie, à discuter des milliers de parcs, randonnées et excursion du Québec. Tu m'as donné envie de voyager et de découvrir l'arrière-pays de cette belle région que je n'ai pu explorer pendant mes études.

Maryia, tu faisais partie du trio des étudiants du laboratoire, la « team Piou-Piou » ! J'espère que tout se passe bien dans ton nouvel emploi, merci pour tous ces rires aux éclats, nos nombreuses pause-lunch ensemble m'ont permis de mettre de la gaieté dans mes journées.

Je tiens à remercier **ma famille** : « Loin des yeux, près du cœur ». Cette expression, si représentative de la situation actuelle, arrive bientôt à terme. Cette maîtrise, couplée à la pandémie du Covid m'a fait réaliser à quel point vous avoir à mes côtés était important pour moi, pour mes racines.

Enfin, je tiens à remercier ma partenaire, **Emma**, pour son support inconditionnel durant ces 3 dernières années et sans qui je n'aurais probablement pas pu arriver au terme de mon mémoire.

Chapitre 1 – Introduction

1) Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC)

1) 1. Données épidémiologiques

1) 1. a. Statistiques

Le cancer du poumon est le second type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué en 2021 à l'échelle mondiale, tout sexe confondu selon les récentes données de l'ONU.(1) En effet, il est précédé du cancer du sein qui est le plus fréquemment diagnostiqué mondialement, avec 11,7% des nouveaux cas de cancer qui lui sont attribué. Le cancer du poumon se classe juste au-dessous avec un taux d'incidence qui s'élève à 11,4% des cas sur les 19,3 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2021. Ce cancer est aussi le type cancer le plus mortel en 2021. Sur les 9,9 millions de morts causées par le cancer en 2021, environ 1,8 millions ont été causées par le cancer du poumon, soit 18% des morts reliées au cancer. De plus, ce type de cancer possède un faible taux de survie au-dessus de 5 ans. En effet, selon une récente étude américaine, seul 26,9% des patients atteints du cancer du poumon atteignent les 5 ans de survie après la date du diagnostic.(2) Ceci peut s'expliquer par le dépistage tardif de la maladie mais aussi par le manque de thérapie ciblée efficace pour éradiquer la maladie.(2-5) En effet, les chances de survie du patient sont meilleures si le cancer est diagnostiqué à un stade peu avancé(5, 6), par exemple les chances de survie sur 5 ans d'un patient diagnostiqué avec un cancer de stade I sont de 68,4% contre 5,8% si le cancer était au stade IV au moment du diagnostic.(2)

Tous sexes confondus

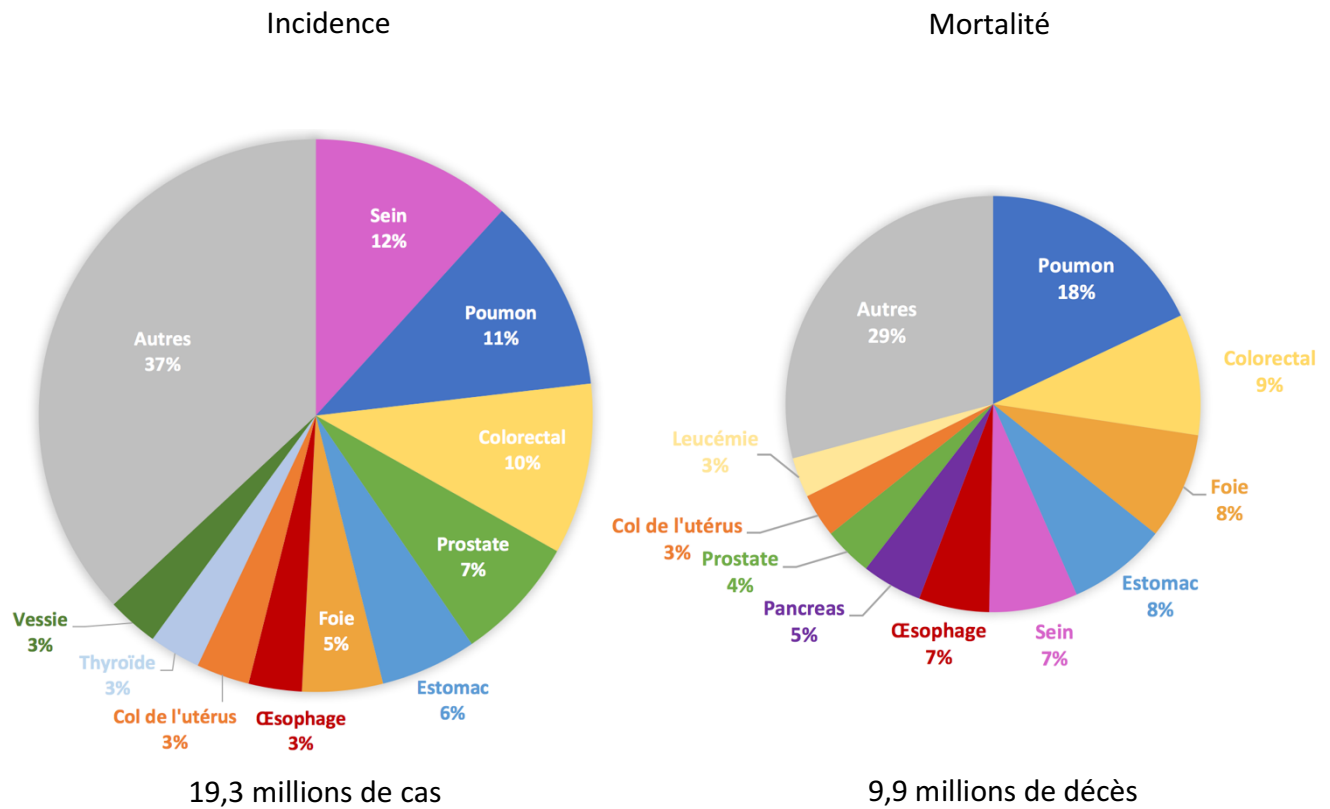


Figure 1. – Incidence et mortalité mondiale des différents types de cancer en 2021

Adapté de référence (1)

Ces statistiques font du cancer du poumon une priorité quand il en vient à améliorer la survie des patients. En effet, selon la société canadienne du cancer, on estime que 30 000 Canadiens se verront diagnostiquer un cancer du poumon en 2022, soit 13% de la totalité des nouveaux cas diagnostiqués. La même année, 20 700 Canadiens décèderont suite au cancer du poumon, soit à plus de 24% de la totalité des morts liés au cancer.(7) Ces statistiques alarmantes en font une cible d'intérêt pour l'amélioration des dépistages au stade précoce du cancer ainsi que la découverte de nouveaux composés thérapeutiques pouvant améliorer la survie et le taux de rémission des patients atteints de cancer du poumon.(8)

Tous sexes confondus en 2022

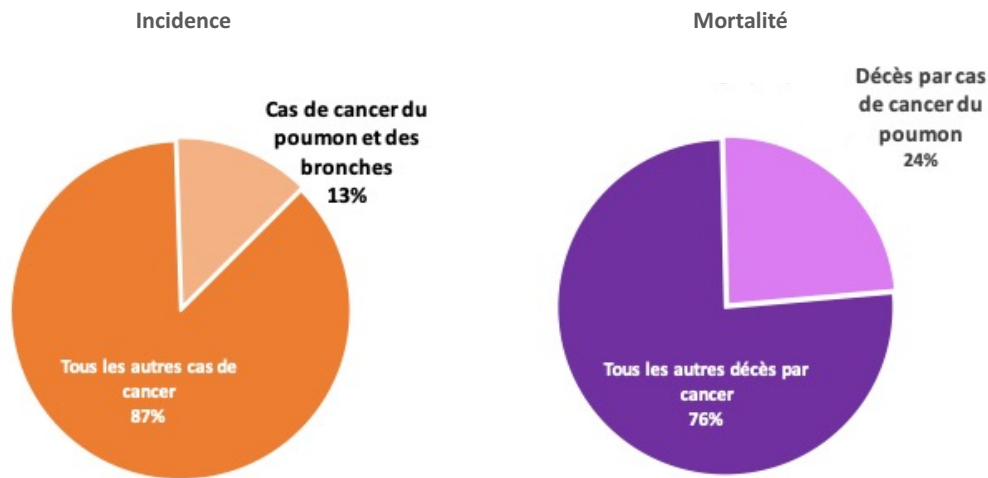


Figure 2. – Incidence et mortalité du cancer du poumon en 2022 au Canada

Les chiffres annuels sont issus de la Société canadienne du cancer®.

1) 1. b. Types de cancer du poumon

Il existe deux types histologiques de cancer du poumon : le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) et le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).(9) La différence majeure entre les deux, réside dans le type de cellule qui subit le tumorigénèse. Pour le CPPC, ce sont les cellules hormonales qui sont les cellules neuroendocrines pulmonaires, situées dans les régions centrales hilaires du poumon près de la trachée, qui deviennent cancéreuses.(10) Le CPNPC apparaît dans les cellules de la voie respiratoire périphérique comme les bronches et les cellules à mucus de l'épithélium.(11, 12) Le CPNPC représente 85% de la totalité des cas de cancer du poumon.(13) Ce type de cancer est lui-même séparé en trois sous-catégories : les adénocarcinomes, les carcinomes à cellules squameuses et les carcinomes à cellules larges.(14)

Les carcinomes à cellules squameuses apparaissent dans les cellules épithéliales des bronches principales du poumon.(12) Les carcinomes à cellules larges ne comptent que pour 5% des cas de cancer du poumon au total et 5,8% des cas de CPNPC. Ils ne présentent pas de marqueurs des carcinomes à cellules squameuses ni des marqueurs d'adénocarcinome.(15)

Les adénocarcinomes, sont des cancers qui apparaissent dans les régions périphériques aux bronches comme les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiolaire. Pour le reste de mon mémoire, je mettrais l'emphase sur les adénocarcinomes qui comptent pour 40% des cas de cancer du poumon de manière générale et 47% des cas de CPNPC.(11, 16)

1). 2. Tumorigénèse et mutations du cancer du poumon

L'apparition de la cellule tumorale se fait en plusieurs étapes. Dans la majorité des cas, les cellules sont exposées à des composés toxiques et mutagènes, comme la fumée de cigarette (17), ou des composés chimiques volatiles comme la poudre d'amiante, la silice, le radon ou encore les vapeurs d'arsenic.(18) Cette exposition s'effectue majoritairement dans les voies respiratoires inférieures et crée des lésions pulmonaires.(19) Ceci explique la grande prévalence des adénocarcinomes dans le cancer du poumon car ce sont les cellules épithéliales des voies respiratoires qui sont les premières exposées aux composés carcinogènes inhalés.

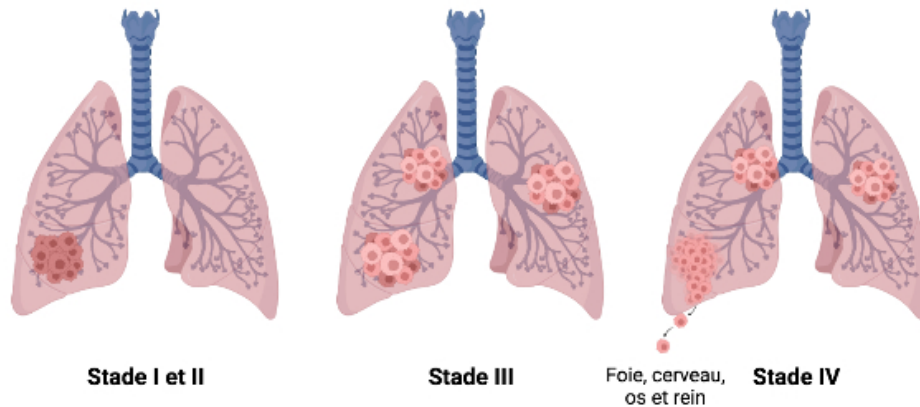
1). 2. a. Étude de cas : la fonderie Horne de Rouyn-Noranda

Un récent scandale sanitaire a éclaté dans la ville de Rouyn-Noranda au Québec où la fonderie de métal Horne a émis des quantités d'arsenic et de cadmium supérieures aux normes de sécurité depuis 1991.(20) Les émissions d'arsenic dans l'air ont été estimées à 33 fois le niveau d'émission autorisé par la province.(21) L'espérance de vie des habitants du Quartier de Notre-Dame, proche de la fonderie Horne, est estimée à 77,4 ans. Ce qui est inférieur de 5 ans à la moyenne de vie provinciale qui s'élevait à 82,3 ans entre 2014 et 2018.(21) De plus, cette commune a vu son taux d'incidence de cancer du poumon augmenter à 140,3 cas pour 100 000 habitants contre 107,7 cas pour 100 000 habitants pour la moyenne provinciale entre 2013 et 2017.(22) Cette exposition chronique à l'arsenic et au cadmium induit de sérieux risque pour la santé des résidents de cette ville avec notamment des risques de développer des maladies pulmonaires obstructives chroniques 48% supérieures à la moyenne provinciale.(20, 21) Cette étude de cas souligne donc bien l'importance de l'exposition environnementale à des composés carcinogènes dans la tumorigénèse du cancer du poumon.

1). 2. b. Mutations promotrices du cancer du poumon

La cellule pré-cancéreuse subit de nombreuses modifications génétiques successives qui déterminent alors un contexte mutationnel précis des cellules qui, à terme, deviennent des cellules tumorales.(23) La caractérisation de cette signature mutationnelle permet le développement de nouvelles thérapies ciblées et ouvre la voie aux thérapies personnalisées.

La tumeur, une fois installée, peut alors évoluer, proliférer et métastaser au sein du patient. On classe alors les tumeurs selon leur taille et leur avancement en 4 stades.(9, 11) La classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) se repose sur la taille de la tumeur primaire (T), la présence de cellules cancéreuses dans les nodules lymphatiques autour de la tumeur (N) et la présence de métastases (M).(24)



	Tumeur	Nodule lymphatique envahi	Métastase
Stade I	T1a < 2 cm T1b > 2-3 cm T2a > 3 – 5 cm	Non	Non
Stade II	T2b > 5-7 cm	Non	Non
	T1a et T1b T2a > 3-5 cm T2b > 5-7 cm T3	Oui	
Stade III	T4	Non ou 1 seul nodule atteint	Non
	Toutes les tailles	2 ou 3 nodules atteints	MAIS invasion tissus périphériques
Stade IV	Toutes les tailles	N'importe quel nombre de nodules atteints	Oui (Foie, Os, Cerveau et rein)

Figure 3. – Les différents stades d’avancement du cancer du poumon (selon la classification TNM)

Adapté de référence (11)

Le passage d’une cellule pré-cancéreuse à une cellule néoplasique se fait par l’accumulation de mutations pro-tumorales. L’une des plus largement retrouvée est la mutation du gène *p53*, retrouvée dans plus de 50% des cas de cancer du poumon et corrèle avec un mauvais pronostic (25). Les mutations promotrices du cancer se situent principalement aux niveaux de gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes, ce qui va induire une prolifération cellulaire accrue et permettre l’augmentation du pool de cellules cancéreuses.(26) Il y a notamment des mutations activatrices dans la voie des récepteurs aux facteurs de croissance épidermique comme l’*EGF* (*EGFR* muté) mais aussi l’activation continue du facteur de transcription K-Ras, le sarcome du rat Kirsten.(27)

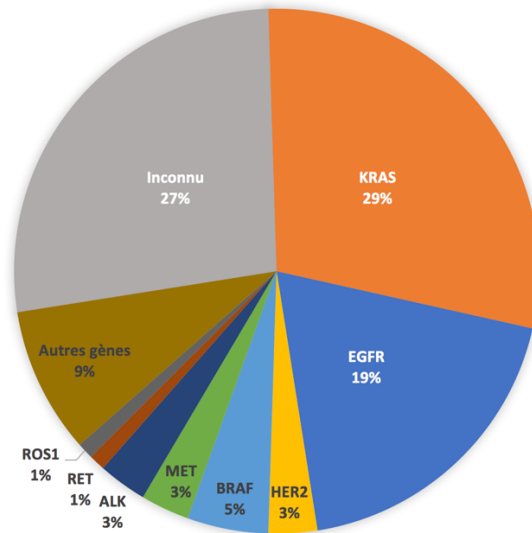


Figure 4. – Mutations promotrices retrouvées dans le cancer du poumon CPNPC

Adapté de référence (28)

Parmi les mutations promotrices retrouvées dans le CPNPC, on retrouve principalement les mutations du facteur de transcription *KRAS* (sarcome du rat de Kristen) dans 29% des cas et des

mutations dans le récepteur à l'*EGF* (facteur de croissance épidermique) dans 19% des cas. Enfin, il existe des mutations promotrices retrouvées plus rarement dans le CPNPC comme des translocations activatrices de la kinase du lymphome anaplastique *ALK* (3%), des mutations activatrices du récepteur à l'œstrogène *HER2* (3%), des mutations du gène *MET* (3%) et des mutations du gène *BRAF* (5%).(28)

Les mutations retrouvées dans le récepteur à l'*EGFR* sont généralement associées aux patients non-fumeurs.(29, 30) Elles sont caractérisées par des délétions dans l'exon 19 de la protéine ainsi que certains variants L858R et L861Q dans l'exon 21 du *EGFR*.(31) Ces mutations ont pour effet d'induire une activation constante de la protéine membranaire et donc un signal de prolifération qui deviendra constitutif dans la cellule tumorale.

Chez les patients fumeurs, on retrouve un enrichissement dans la mutation de la petite protéine GTPase *KRAS*, messenger central dans la voie de prolifération de la cellule.(29, 30) L'activation oncogénique de *KRAS* est retrouvée dans 30% des cas de CPNPC, ce qui en fait la mutation promotrice la plus communément diagnostiquée chez les patients atteints de ce sous-type.(32) K-RAS interagit avec de nombreux effecteurs en aval comme la voie MAPK, PI3K-AKT ou Wnt et a donc un fort impact sur la capacité proliférative de la cellule, mais aussi sur leur capacité de survie, de résistance à l'apoptose, de signalisation et de migration.(30, 31, 33) La mutation la plus fréquente G12C se situe sur le codon 12 de l'exon 2 de la protéine et induit un gain de fonction. Elle est retrouvée majoritairement chez les fumeurs et plus rarement chez les patients non-fumeurs.(30) Tandis que la mutation G12D, plus rare, se retrouve plus enrichie dans les cas de cancer du poumon chez les non-fumeurs. (30) Suite à cette mutation, la protéine K-Ras est alors constitutivement active et la cellule entrera dans une phase de prolifération incontrôlée.

De manière intéressante, les mutations de *KRAS* et de l'*EGFR* sont mutuellement exclusives.(34) Ceci est dû au fait que ces protéines se trouvent dans la même voie de signalisation. Ainsi si une protéine est constitutivement activée, la cellule n'aura pas besoin d'une autre mutation activatrice dans la même voie signalétique, déjà suractivée par la première protéine mutée.

Ces différents statuts de mutation permettront d'identifier le type de thérapie qui sera la plus adaptée pour le patient. Des études cliniques ont montré une meilleure survie des patients

présentant une mutation du gène *EGFR* lorsque traités avec des inhibiteurs de tyrosine kinases en comparaison à la chimiothérapie standard au carboplatine.(35)

1) 3. Épigénétique du cancer du poumon

1) 3. a. L'épigénétique de la différenciation cellulaire

En plus de présenter des aberrations génétiques, la cellule cancéreuse développe au cours du temps des modifications au niveau de l'épigénome.(36, 37) L'épigénome définit l'ensemble des modifications réversibles du génome qui affectent la transcription, sans altérer la séquence de l'ADN.(37, 38) L'étude de ces modifications est appelée l'épigénétique. Le terme « épi » provient du grec et signifie « au-dessus », ainsi, l'épigénome caractérise la modulation du niveau d'expression des gènes par des modifications qui se situe au-dessus de la séquence génomique en elle-même.(38) Ces modifications sont réversibles et peuvent être transmises de la cellule-mère à la cellule fille.(39) Ces modifications peuvent avoir lieu au niveau d'une cellule souche ou d'une cellule progénitrice. Comme les modifications épigénétiques sont transmissibles, la cellule fille, après la division cellulaire possédera aussi ces mêmes modifications. Ceci induira une différenciation cellulaire par modification épigénétique de l'expression des gènes de la cellule fille. Ces modifications persisteront au cours des divisions cellulaires subséquentes et seront impliquées dans l'identité de la cellule. Au cours de l'ontogénèse, de nombreuses cellules progénitrices vont acquérir des modifications épigénétiques et générer des cellules filles différenciées. Celles-ci posséderont donc une empreinte épigénétique provenant des cellules progénitrices, qui définira leurs destins et leurs rôles dans l'organisme. Ainsi l'épigénétique permet entre autre, à partir d'un génome identique d'obtenir différents phénotypes cellulaires qui permettent le fonctionnement d'un organisme multi-cellulaire.(40).

Dans le noyau, le matériel génétique est extrêmement bien organisé. La double hélice d'ADN qui renferme le code génétique est enroulée autour de nucléosomes constitués d'un octamère d'histones. Les nucléosomes sont organisés en fibres de nucléosomes arrangées en boucles pour former les chromosomes. On appelle chromatine l'ensemble de l'ADN avec les nucléosomes.

On distingue deux formes de chromatine en fonction du niveau de compaction. La première est l'euchromatine et correspond à un état décondensé de l'ADN qui facilite le recrutement de facteurs de transcription. Elle est associée à un état transcriptionnel actif. À l'inverse, l'hétérochromatine est une forme condensée de l'ADN, qui est un état défavorable à la transcription. Par exemple, dans la chromatine des cellules femelles présentant deux chromosomes sexuels X (XX), on retrouve le corpuscule de Barr qui correspond à un état surcondensé du second chromosome X qui est alors inactivé de manière permanente. (41) Les modifications épigénétiques influencent la structure de la chromatine et permettent le passage dynamique de l'un à l'autre des états.

1) 3. a. I. La méthylation des cytosines

Il existe différents types de modifications épigénétiques. On retrouve la méthylation des bases cytosine de l'ADN qui précèdent une guanine (site CpG). Ces sites peuvent être méthylés et recrutent des enzymes et des protéines qui vont modifier, et généralement inhiber l'expression des gènes aux alentours du site.(42) On estime que plus de 50% de l'inhibition d'expression génique de la cellule est reliée à une méthylation des îlots CpG.(43) L'enzyme DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) est une enzyme chargée de transférer le groupement méthyle sur les cytosines. Elle possède une affinité pour l'ADN hémiméthylé et est impliquée dans le procédé de transfert de l'empreinte parentale au moment de la division cellulaire.(44)

1) 3. a. II. Les modifications post-traductionnelles des histones

Il y a aussi des modifications post-traductionnelles des chaînes latérales d'histone. Les histones sont les sous-unités du nucléosome qui permettent l'enroulement et la compaction de la séquence d'ADN. Chaque nucléosome est entouré de 146 paires de bases de l'ADN.(45) Un nucléosome est un octamère composé d'un tétramère d'histones H3/H4 et de deux dimères H2A/H2B, ces dernières sont les histones situées au cœur du nucléosome. L'ensemble est stabilisé par l'histone H1.(45) Les histones H3 et H4, situées plus à l'extérieur du nucléosome, sont les dimères qui peuvent porter des modifications post-traductionnelles et moduler la compaction de l'ADN.(43) Les modifications post-traductionnelles des acides aminés des chaînes latérales d'histone, comme les lysines ou les arginines entraînent une compaction ou décompaction de la chromatine. Les

principales modifications des histones impliqués dans la régulation génique sont la méthylation et l'acétylation des acides aminés présents sur les chaînes latérales d'histones.(46) Cependant, il existe un grand nombre de modifications post-traductionnelles d'histones dont la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation.(46) L'acétylation change la charge électrostatique du nucléosome et modifie son affinité avec la molécule d'ADN chargée négativement. Cette déstabilisation permet l'ouverture de la chromatine favorable au recrutement de facteurs de transcription.

Les lysines (K) et les arginines (R) des chaînes latérales d'histones peuvent subir des modifications épigénétiques. Ces résidus d'acides aminés possèdent des charges positives qui sont propices aux réactions nucléophiles. Les histones méthyl-transférases sont des enzymes chargées d'ajouter des groupements méthyles sur ces acides aminés. Les lysines peuvent posséder un, deux ou trois groupements méthyles comme modification post-traductionnelle (PTM). Les lysines triméthylées sont considérées comme hyperméthylées. Les arginines peuvent posséder un ou deux groupement méthyle, cette méthylation est médiée par les protéines arginine methyltransférase (PRMT). Le transfert du groupement méthyle sur la chaîne latérale de l'arginine est issu du co-facteur S-adénosylméthionine (SAM). Il existe 2 classes de PRMT, dépendamment du type de méthylation effectué lors du rajout du second groupe méthyle, toutes les PRMT catalysent l'ajout du premier groupement méthyle (-CH₃) sur la chaîne latérale de l'arginine. Les PRMT de classe I (PRMT 2, 3, 4, 6, 8) catalysent l'ajout du second groupement méthyle sur le même atome d'azote portant le premier -CH₃, ce qui amène à une diméthylation asymétrique du résidu d'arginine (Rme2a). Les PRMT de classe II (PRMT 5 et 7) ajoutent ce groupement sur le second atome d'azote qui ne porte pas de groupement -CH₃, ce qui amène à la forme diméthylée symétrique du résidu d'arginine (Rme2s).(47) Il existe donc 2 formes d'arginines diméthyles, la forme symétrique, où les groupements méthyle sont portés par les 2 atomes d'azote de la chaîne latérale et la forme asymétrique où les 2 groupements méthyle sont sur le même atome d'azote de la chaîne latérale. Ces différentes formes de méthylation vont induire différents effets biologiques sur la cellule, par exemple, la méthylation asymétrique de l'arginine 3 de l'histone 4 va mener à la répression du gène associé tandis que la méthylation asymétrique de ce résidu va mener à l'expression du gène associé.(48)

L'enzyme PRMT5 a été retrouvé surexprimé dans le cancer du poumon et possède donc un rôle important dans la progression tumorale et le faible pronostic de survie des patients atteints de CPNPC.(49)

Dépendamment de la position de l'acide aminé dans la queue d'histone et du type d'histone en question, l'ajout de la méthylation permettra une expression ou une inhibition des gènes associés à la chromatine. De manière générale, on associe les marques d'acétylation à une activation de la transcription. Il existe donc une nomenclature pour chaque marque d'histone qui associe l'acide aminé et l'histone ciblée à un niveau d'expression génique (42). Par exemple, la marque H3K27me3 signifie que la lysine 27 de l'histone 3 porte une tri-méthylation. Cette marque est souvent retrouvée dans les cancers et est associée à la condensation de la chromatine et à la répression des gènes suppresseurs de tumeurs.(50)

Les modifications post-traductionnelles des nucléosomes peuvent recruter des complexes de repositionnement des nucléosomes via la reconnaissance des modifications par des chromodomaine, tudordomaine et bromodomaines. Ces complexes protéiques vont alors impacter la condensation de la chromatine aux alentours du site de modification. Cela peut alors moduler l'expression des gènes situés dans cette région génomique. Enfin, certains ARN non-codants peuvent lier des séquences du génome pour recruter des modificateurs épigénétiques.

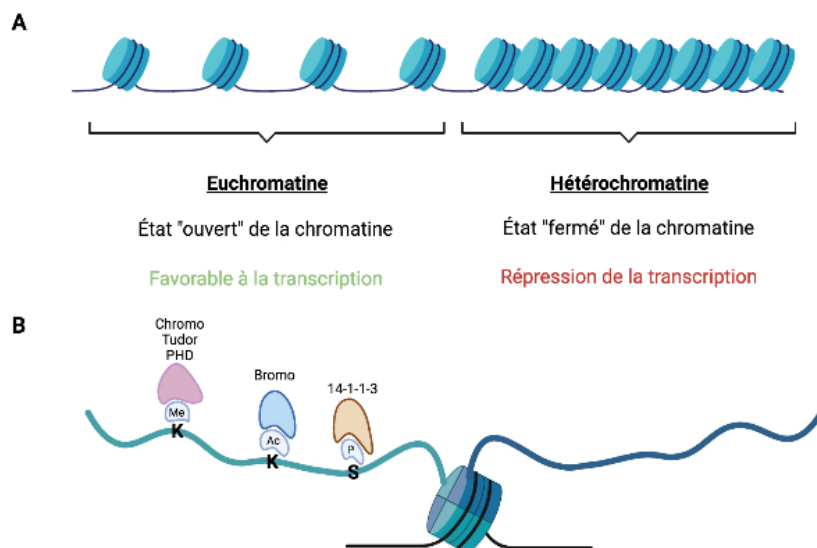


Figure 5. – Modifications post-traductionnelles des histones et recrutement des domaines associés aux complexes de régulation des gènes

Adapté de référence (46)

1) 3. a. III. Les enzymes épigénétiques

Ces modifications épigénétiques sont rendues possibles grâce à 3 types de régulateurs épigénétiques. Dans un premier temps, on retrouve les enzymes qui ajoutent des marques épigénétiques, ces enzymes permettent de catalyser l'ajout d'une modification au niveau de la cytosine de la séquence d'ADN mais aussi au niveau des queues des histones. Par exemple, les histones méthyltransférases sont des enzymes chargées d'ajouter des groupements méthyles sur les lysines et les arginines des chaînes latérales d'histone et les ADN méthyltransférases méthylent les cytosines des sites CpG.(40, 46, 51) Dans le même ordre d'idée, on peut retrouver des enzymes histones acétyltransférases qui ajoutent des groupements acétyles et des kinases qui ajoutent des groupements phosphoryles aux chaînes latérales d'histones.(46, 51)

Il existe aussi des enzymes qui enlèvent les modifications épigénétiques. On retrouve donc des déméthylases, des désacétylases et des phosphatases qui enlèvent respectivement les groupements méthyles, acétyles et phosphoryles des chaînes latérales d'histones.(46, 51) La déméthylation des cytosines de l'ADN peut se faire par un mécanisme passif où la marque épigénétique n'est pas transmise à la cellule fille ou par l'action d'enzymes déméthylases de l'ADN.(52)

Enfin, après avoir ajouté ou supprimé les marques épigénétiques, il faut des protéines capables de lire et de transmettre les signaux épigénétiques. Ces protéines, appelées « readers » vont reconnaître les marques épigénétiques et vont recruter à travers différents mécanismes des complexes protéiques de remodelage, de compaction ou de décompaction de l'ADN. Par exemple, les protéines composées d'un bromodomaine pourront reconnaître les résidus acétylés et celles avec un chromodomaine, les résidus méthylés.(42, 46)

Au cours de la tumorigénèse, il a été démontré que des dérégulations épigénétiques participent à l'initiation et à la progression de la tumeur.(37, 53) Ces altérations épigénétiques, aussi appelées

épi-mutations, peuvent impacter des processus clefs liés à la prolifération et à la survie de la cellule. Par exemple, on peut retrouver dans de nombreux types de tumeurs une hyperméthylation locale des promoteurs associés aux gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui inhibera l'expression de ces derniers. Ceci aura pour effet de pousser la cellule à se diviser plus rapidement, tout en échappant au contrôle du cycle cellulaire et à l'apoptose. De manière plus générale, on peut aussi retrouver une hypométhylation globale du génome. Ces niveaux diminués de méthylation du génome de manière globale se retrouvent tout au long de la séquence d'ADN et notamment dans l'ADN non-codant, qui contient les rétrotransposons (SINE, LINE et LTR) et les autres séquences répétées, normalement réduits au silence par la méthylation des cytosines de ces dernières.(54) L'hypométhylation globale retrouvée dans les tumeurs entraînera l'activation des séquences répétées comme les rétrotransposons, qui vont alors effectuer des translocations au sein du génome. Ceci mènera à une instabilité génomique propice à l'apparition des nouvelles mutations oncogéniques.

1) 3. a. IV. Dérégulation épigénétique du CPNPC

Il a été démontré dans le cadre du cancer du poumon que les altérations épigénétiques étaient plus fréquentes que les mutations somatiques dans les stades précoces de l'oncogenèse.(37, 55)

L'épigénétique joue donc un rôle clé dans la progression du cancer du poumon chez le patient.(56)

On retrouve notamment une surexpression des enzymes histone déacétylases (HDAC) dans le cancer du poumon. Les HDAC vont enlever des groupements acétyles et peuvent alors participer au processus d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (TSG). Cela peut aussi perturber le patron d'acétylation du génome en débalançant l'équilibre entre acétylation par les histones acétyltransferases (HAT) et la déacétylation du génome par les HDAC surexprimés. Par exemple, il a été reporté dans le cancer du poumon que les protéines HDAC1 et HDAC3 sont surexprimées dans les cellules tumorales. Ces augmentations d'expression corréleront avec la progression du cancer et les faibles pronostics.(57, 58) Certains inhibiteurs de HDAC comme le Trichostatin A et le Vorinostat (SAHA) ont démontré une forte activité anti-tumorale dans des lignées cellulaires de cancer du poumon.(59)

Les lysines tri-méthylées et les arginines di-méthylées sont considérés comme hyperméthylées. Cette modification post traductionnelle permet de recruter les protéines « readers » qui modifieront le niveau de compaction de la chromatine. Par exemple, la marque H3K27me3 est souvent retrouvée dans les cancers et est associée à la condensation de la chromatine et à la répression des gènes suppresseurs de tumeurs.(50) L'ajout de cette modification est catalysé par l'enzyme EZH2 (« Enhancer Zest Homolog 2 ») qui est une lysine méthyltransférase (KMT) faisant partie du complexe de répression PolyComb PRC1/2. Cette enzyme, et par extension la marque d'histone répressive qui lui est associée, est fréquemment surexprimée dans le CPNPC et corrèle avec un mauvais pronostic.(50, 60, 61) Le complexe de répression PolyComb est un complexe protéique composé de différentes enzymes épigénétiques. Ensemble, ces enzymes permettent de réguler l'expression des gènes par l'ajout de marques répressives sur les histones et le recrutement de protéine de compaction de la chromatine. Le complexe de répression PolyComb est notamment impliqué dans la répression des gènes associés à la différenciation cellulaire. Ce complexe est actif au cours du développement de l'organisme et est impliqué dans le maintien de l'état indifférencié (« Stemness ») des cellules souches. Ce complexe comprend entre autres l'histone méthyltransférase EZH2 qui est la sous-unité catalytique du complexe PRC2, elle catalyse la mono, di et tri-méthylation des lysines, mais PRC2 comprends aussi des protéines facilitant la méthylation des résidus lysines comme SUZ12 et EED.(62) Ces dernières permettent le fonctionnement optimal de l'activité méthyltransférase de EZH2, qui ne possède pas d'activité catalytique lorsque sous forme de monomère, mais qui présente une activité lorsqu'elle interagît avec EED et SUZ12.(63)

Les enzymes lysines déméthylase (KDM) permettent d'enlever les marques épigénétiques ajoutées par les KMT. La déméthylase spécifique aux lysines (LSD1 ou KDM1) enlève les groupements méthyles des marques d'histones H3K4 et H3K9. LSD1 est fréquemment surexprimée dans les cas de cancer du poumon CPNPC.(64)

Dans ce sous-type de cancer, l'augmentation des enzymes de méthylation de l'ADN (DNMT) est aussi observée. Ces enzymes causent notamment l'hyperméthylation des gènes promoteurs de tumeurs. Il a été observé dans le cancer du poumon une méthylation aberrante de gènes liés au cycle cellulaire (*p16*), à l'apoptose (*DAPK*, *Caspase 8*), à la réparation des dommages à l'ADN

(*MGMT*) mais aussi à la transition épithélio-mésenchymateuse (méthylation du promoteur de la *E-cadhérine*).^(65, 66) Ces changements sont majoritairement causés par la surexpression de la DNMT1 dans le CPNPC (58, 65). Des études cliniques ont démontré que la surexpression de *DNMT1* dans le cancer du poumon est corrélée à une diminution de la survie des patients ayant subi une résection tumorale.^(67, 68)

La meilleure compréhension des modifications épigénétiques et de leurs rôles dans la tumorigénèse ouvre la porte aux traitements personnalisés. En effet, ces dernières décennies, plusieurs inhibiteurs épigénétiques ont fait leur apparition sur le marché de l'oncologie. Par exemple, la FDA (The Food and Drug administration) a approuvé l'usage d'inhibiteurs HDAC pour le traitement de certaines hémopathies malignes ou syndrome myélodysplasiques. Le Vorinostat est un pan-inhibiteur de la famille HDAC approuvé en 2006 pour le traitement des lymphomes cutanés à cellules T. Le belinostat est aussi un pan-inhibiteur approuvé en 2014 pour le traitement des lymphomes périphériques à cellules T. Enfin, le panobinostat a été approuvé en 2015 pour le traitement des myélomes multiples.⁽⁶⁹⁾

Il est aussi possible de cibler l'expression des protéines du PRC2, dont l'une des fonctions la plus largement reportée est la catalyse de la tri-méthylation H3K27me3. Le Tazemetostat est un composé inhibant l'activité de EZH2, il a été approuvé par la FDA en 2020 pour le traitement des sarcome épithélioïde et du lymphome folliculaire.^(70, 71) Cet agent induit *in vitro* un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une apoptose des cellules de lymphome folliculaire à travers la réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs comme *p21* et *CDKN2A*.⁽⁷²⁾ Il possède donc un effet inhibiteur sur l'activité du complexe PRC2 et est considéré comme composé thérapeutique potentiel pour cibler et diminuer les marques épigénétiques de méthylation associées dérégulées dans le cancer.

1) 4. Hétérogénéité clonale des cellules tumorales du CPNPC

La division cellulaire incontrôlée des cellules cancéreuses augmente le risque d'erreurs lors de la réplication et d'apparition de mutations supplémentaires dans le génome des cellules. En effet, les cellules vont se diviser indépendamment des signaux prolifératifs, les cycles de division

deviendront plus courts et la cellule va accumuler des erreurs de réplication lors des divisions.(73, 74) Ces erreurs peuvent induire l'apoptose de la cellule mais elles peuvent aussi lui donner un avantage prolifératif par rapport aux autres cellules cancéreuses. Il y a alors émergence de sous-populations clonales tumorales au sein de la tumeur possédant différentes propriétés répliquatives, angiogéniques et immunosuppressives.(74, 75) Par exemple, la protéine Protein Death Ligand 1 (PD-L1) est exprimée dans 24 à 60% des cas de CPNPC.(76) Cette protéine permet d'empêcher les cellules T cytotoxiques de s'activer au contact de la tumeur, en inhibant les kinases impliquées dans l'activation des cellules T. Ces sous-populations peuvent prendre le dessus sur les autres cellules tumorales et devenir le sous-type principal de la tumeur grâce à la pression de sélection. On classe les sous-types de tumeurs selon leurs mutations génétiques et les voies signalétiques qui en sont impactées. Ceci permet de mieux cibler et d'optimiser la réponse du patient aux thérapies personnalisées.

1) 4. a. Cellules souches cancéreuses

En plus de posséder des sous-types tumoraux, de récentes études ont suggéré l'existence d'une population de cellules souches cancéreuses (CSC) dans le cancer du poumon.(77, 78) Les cellules souches cancéreuses constituent une rare population de cellules cancéreuses indifférenciées. Elles ont été identifiées grâce à des marqueurs de cellules indifférenciées, comme l'expression du récepteur CD133, mais aussi grâce à leurs caractéristiques spécifiques des CSC comme la capacité à former des sphéroïdes et des nouvelles colonies *in vitro*.(79) Ces cellules souches cancéreuses possèdent un potentiel de réplication illimité, une capacité d'auto-renouvellement ainsi qu'un potentiel pour générer des cellules filles différenciées, la pluripotence. Cette population permettrait de maintenir et d'agrandir le pool de cellules cancéreuses au sein de la tumeur. De plus, ces cellules présentent une grande résistance aux composés chimiothérapeutiques et seraient impliquées dans la récurrence du cancer chez les patients après les premiers traitements. (80) Finalement, les CSC ont démontré une expression spécifique de certains facteurs de croissance et cytokines en comparaison aux cellules tumorales classiques. Parmi ces molécules sécrétées, on peut observer une augmentation de 2 à 3 fois des niveaux de VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »), bFGF (« Fibroblast growth factor b »), HGF (« Hepatocyte growth

factor »), Il-6 (« Interleukine 6 » ; IFN β 2) , Il-8 (« Interleukine 8 » ; CXCL8) et du PDGFR-BB (« Platelet derived growth factor receptor »).(81)

Les sous-clones tumoraux et les cellules souches cancéreuses permettent la progression de la maladie chez le patient, avec une augmentation de l'agressivité du cancer, une immunosuppression accrue et aussi l'acquisition d'un caractère invasif, pour certaines cellules tumorales, qui amènera en bout de ligne à l'apparition de métastases.(74, 78, 80)

2) Microenvironnement tumoral

La tumeur contient différents types de cellules cancéreuses comme expliqué précédemment, mais elle est aussi composée de nombreuses cellules non-tumorales qui jouent un rôle important dans la progression de la maladie. Le microenvironnement tumoral (MET) regroupe les cellules et structures intercellulaires, comme la matrice extracellulaire, retrouvée à l'intérieur et autour de la tumeur.(82) Le MET est une entité dont la composition varie selon le type de cancer mais aussi le stade d'avancement de la maladie. Il comprend les cellules immunitaires qui se sont infiltrées dans la tumeur mais aussi les cellules résidentes du tissu comme les cellules stromales et les cellules endothéliales. Également, la vascularisation joue un rôle important dans le MET. L'organisation et le nombre de vaisseaux au sein de la tumeurs influencent les niveaux d'hypoxie et la présence de différentes cytokines dans l'espace intra-tumoral.(83)

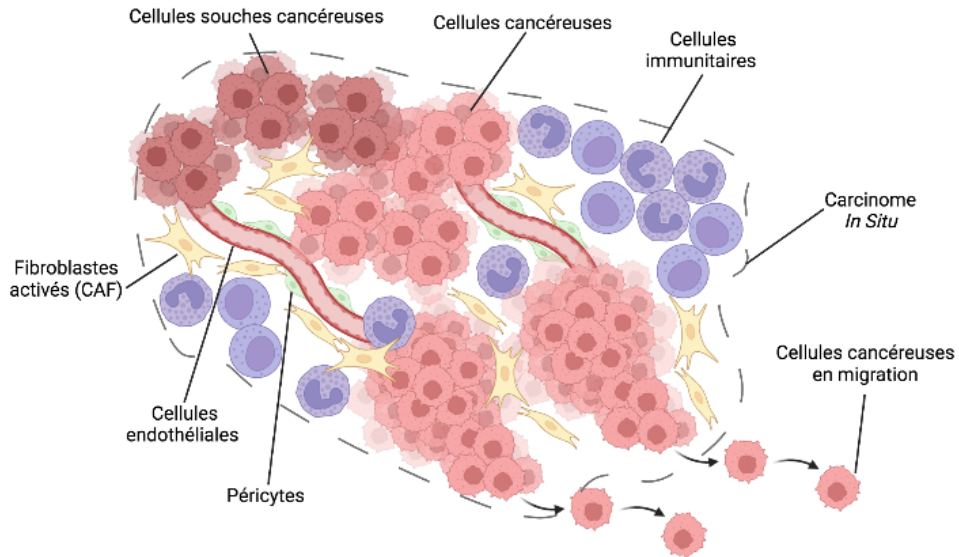


Figure 6. – L'hétérogénéité cellulaire de la tumeur

Adapté de référence (84)

2) a. Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires peuvent s'infiltrer au sein de la tumeur afin d'éliminer les cellules tumorales. Parmi ces cellules immunitaires, on retrouve les cellules cytotoxiques comme les cellules T CD8⁺ et les cellules Natural Killer (NK). (85, 86)

Ces cellules permettent d'éliminer les cellules cancéreuses grâce à leurs activités cytotoxiques qui consistent en la sécrétion de perforine, de granzymes et d'autres molécules cytotoxiques. Il y a aussi une infiltration des cellules immunitaires de support comme les cellules B, les macrophages et les cellules dendritiques.(87-89) Ces dernières permettent une meilleure reconnaissance des cellules tumorales par les cellules cytotoxiques. Ceci se fait à travers la production d'anticorps pour les cellules B et la présentation d'antigène tumoraux, aussi appelés antigènes anormaux du soi par les macrophages et cellules dendritiques. De nombreuses études démontrent l'importance de la composition et de la densité de la tumeur en cellules immunitaires pour le pronostic du patient. (90-93)

Une récente étude a établi la composition et la proportion de cellules immunitaires infiltrant la tumeur dans une cohorte de 68 patients atteints du CPNPC. Cette étude a déterminé qu'en moyenne, 49,5% des cellules immunitaires de la tumeur sont des cellules T, 18% sont des cellules B et 4,5% sont des NK. Parmi les leucocytes du système immunitaire inné infiltrant la tumeur, cette étude a retrouvé 4,7% de macrophages, 2,1% de cellules dendritiques et 10% de granulocytes.(94)

De récents avancements en immunothérapie du cancer ont démontré une efficacité des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. Ces composés ont pour but de réactiver les cellules immunitaires et ainsi favoriser l'élimination des cellules cancéreuses. Dépendamment du contexte immunitaire du patient, des anticorps inhibiteurs de CTLA-4, PD-1 et PD-L1 peuvent être des traitements efficaces pour les patients atteints de CPNPC.(95-98)

2) b. Les cellules stromales : les fibroblastes

Parmi les cellules stromales retrouvées dans les tumeurs, les fibroblastes en sont les principaux composants. Les fibroblastes sont normalement impliqués dans la cicatrisation des plaies et sont des cellules impliquées dans la sécrétion et la production de la matrice extracellulaire (ECM).(99) Les fibroblastes sont notamment impliqués dans la production de fibronectine, protéoglycans, glycosaminoglycans et des collagènes de type I, II et V de la matrice extracellulaire.(100, 101) Ils sécrètent aussi le collagène de type VI et la laminine qui sont des protéines qui composent la membrane basale des tissus.(102, 103) Lors d'une blessure, les fibroblastes quiescents du tissu s'activent pour permettre la cicatrisation de la plaie et le remodelage du tissu. Ces fibroblastes actifs sont appelés myofibroblastes et possèdent des caractéristiques phénotypiques spécifiques comme des fibres de stress, la production *de novo* de l'isoforme alpha de l'actine du muscle lisse (α -SMA) et la variant ED-A de la molécule d'adhésion qui est la fibronectine. (100) Les proto-myofibroblaste sont des fibroblastes qui expriment des fibres de stress mais qui manquent la α -SMA pour être complètement activés. Cette activation est complétée par l'interaction de la fibronectine avec le tissu environnant et la présence de TGF- β .(100)

2) b. I. Effet anti-tumoral des fibroblastes

Dans les stades précoces de la tumeur, certaines études suggèrent que les fibroblastes modulent le micro-environnement tumoral de manière à limiter la progression de la tumeur.(104) En effet, dans un contexte normal, les fibroblastes jouent un rôle important dans la diminution de l'inflammation, la régulation de la différenciation des cellules épithéliales et la formation de la matrice extracellulaire.(105-107) Lorsque la tumeur apparaît et commence à s'installer, ces caractéristiques normo-physiologiques des fibroblastes peuvent limiter la progression de la tumeur aux stades précoces. Cependant, au fur et à mesure que le cancer se développe, les fibroblastes et cellules immunitaires du tissu ont de plus en plus de mal à contenir et à diminuer l'inflammation induite par les cellules cancéreuses. Avec la progression tumorale, les cellules stromales et immunitaires perdent leurs capacités à contenir l'inflammation reliée à la tumeur, et perdent donc leur effet anti-tumoral. Des expériences *in vitro* récapitulant les stades précoces de la tumeur ont démontrés un effet anti-tumoral des cellules stromales.(108-111) En effet, il a été rapporté que les cellules du cancer du col de l'utérus HeLA et des cellules de mélanomes présentaient une diminution de la croissance cellulaires lorsque cultivées avec des fibroblastes normaux et une croissance augmentée en co-culture avec des fibroblastes issus de tumeurs de stades avancés de la maladie. D'autres expériences utilisant des fibroblastes embryonnaires en co-culture avec des cellules de cancer du sein ont mis en évidence une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'une re-différenciation des cellules cancéreuses mammaires due à la présence des fibroblastes.(112, 113) Une récente étude *in vivo* a aussi démontré une diminution de la croissance tumorale des cellules pancréatiques quand injectées dans des modèles murins avec des fibroblastes normaux en comparaison à une co-injection avec des CAF (Fibroblastes associés au cancer). (114) De la même manière, d'autres cellules stromales saines, comme les kératinocytes, possèdent des propriétés anti-tumorales dans un contexte de développement précoce de cellules épidermiques pré-cancéreuses, infectées avec le papillomavirus humain (HPV). (115) Cette même étude a aussi mis en évidence une sélection clonale des cellules stromales favorisant la croissance tumorale après plusieurs passages cellulaires. Les propriétés anti-tumorales des cellules stromales saines constitueraient une potentielle approche intéressante dans le développement d'immunothérapie dans le cadre des tumeurs solides.(116)

Il est par exemple possible d’injecter des cellules stromales modifiées au site tumoral d’un patient afin que ces dernières délivrent des composés thérapeutiques de manière ciblée.(117) Ces cellules stromales modifiées peuvent aussi posséder un effet anti-inflammatoire favorable à la régression de la tumeur et peuvent aussi causer une redifférenciation des cellules tumorales, les rendant ainsi plus sensibles à la chimiothérapie.

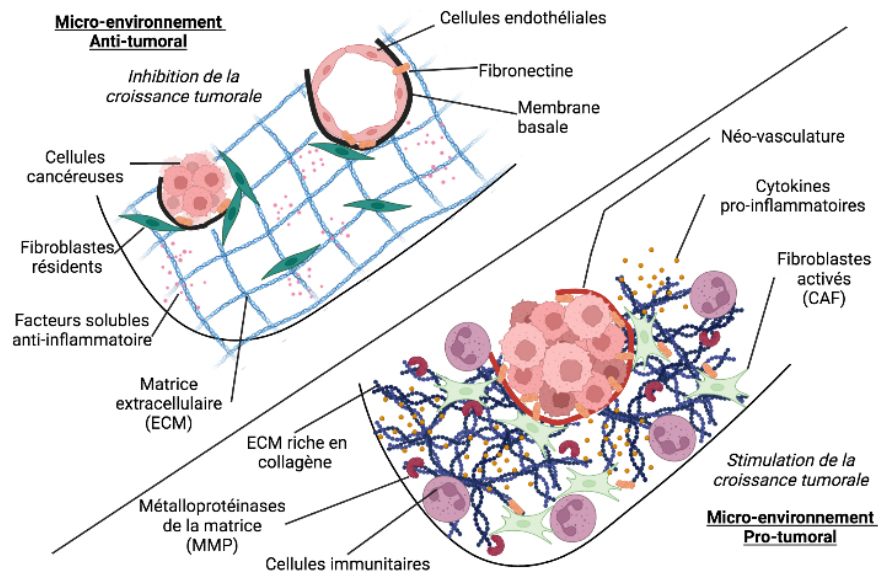


Figure 7. – Implication du microenvironnement tumoral dans la progression du cancer

Adapté de référence (118)

2) b. II. Effet pro-tumoral des fibroblastes: fibroblastes associés au carcinome

La sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules tumorales engendre une reprogrammation épigénétique des fibroblastes en fibroblastes associés aux carcinomes (CAF). Les tumeurs solides sont considérées comme des « blessures qui ne guérissent jamais ». (119) De ce fait, les CAF partagent des propriétés communes avec les myofibroblastes. Les CAF sont une sous-population de fibroblastes qui possèdent un phénotype de myofibroblaste, qui sont plus rigide, notamment à travers la surexpression de certaines protéines du cytosquelette comme l’isoforme d’actine Alpha du muscle lisse (α -SMA).(120, 121) Les CAF possèdent des propriétés pro-tumorales qui vont favoriser la progression du cancer. Par exemple, les CAF peuvent sécréter

des molécules pro-tumorales comme des facteurs de croissance et des cytokines. Dans le cancer du poumon, les principaux facteurs sécrétés par les CAF sont des facteurs de croissance comme le TGF- β (« Tumor Growth factor β »), le FGF, le HGF ou encore le VEGF.(122, 123)

Ces facteurs de croissance favorisent la capacité proliférative de la tumeur, l'angiogenèse et l'agressivité de la tumeur. Le TGF- β possède différents effets sur la croissance cellulaire. Dans une étude portant sur le cancer du poumon à cellules squameuses, les hauts niveaux de TGF- β sécrétés par les CAF ont été associés à un meilleur pronostic.(124) À l'opposé, les patients possédant des CAF exprimant plus faiblement le TGF- β possédaient une espérance de vie plus faible. Cette observation clinique a été confirmée par des expériences *in vitro*, où la co-culture des cellules cancéreuses avec des CAF présentant un knockdown du TGF- β a démontré une croissance cellulaire plus élevée que le groupe contrôle. À l'inverse, les cellules cancéreuses cultivées dans des milieux conditionnés issus de la culture des CAF exprimant des hauts niveaux de TGF- β , possédaient un niveau de croissance plus faible que le contrôle. De plus, des expériences *in vivo* ont confirmé ces mêmes observations. Les souris co-injectées avec des cellules cancéreuses et des CAF présentant un knockdown du TGF- β ont développé des tumeurs plus grosses que le groupe où la co-injection contenait des CAF surexprimant le TGF- β .(124)

Ces résultats soulignent bien la dualité du TGF- β dans la progression tumorale de manière dose-dépendante. En effet, des faibles niveaux de ce facteur de croissance sont associés à la progression tumorale tandis que des trop hauts niveaux de TGF- β induirait un effet anti-tumoral.

Des cytokines pro-tumorales sont aussi sécrétées par les CAF comme les Interleukines 6, 8, 10 et 13.(125) Celles-ci ont des effets immunosuppressifs et permettent la survie des cellules tumorales. De récentes études ont aussi démontré que les CAF sécrètent certaines chimiokines comme le SDF1 (CXCL12) qui est un agent chimiotaxique. Cette molécule peut induire une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules tumorales et favoriser la métastase. Le SDF-1 peut aussi promouvoir l'angiogenèse à travers le recrutement des progéniteurs de cellules endothéliales, ce qui permet la création de nouveau capillaire, appelé néo-angiogenèse. Enfin, le SDF-1 induit une augmentation de la prolifération des cellules tumorales en liant le récepteur CXCR4 des cellules tumorales.(121) De plus certaines interleukines comme l'IL-8 (CXCL8) et l'IL-

10 (CSIF « Cytokine synthesis inhibitory factor ») peuvent avoir un effet pro-tumoral en favorisant l'inflammation et ainsi permettre la progression du cancer dans des stades avancés et métastatiques.(126, 127)

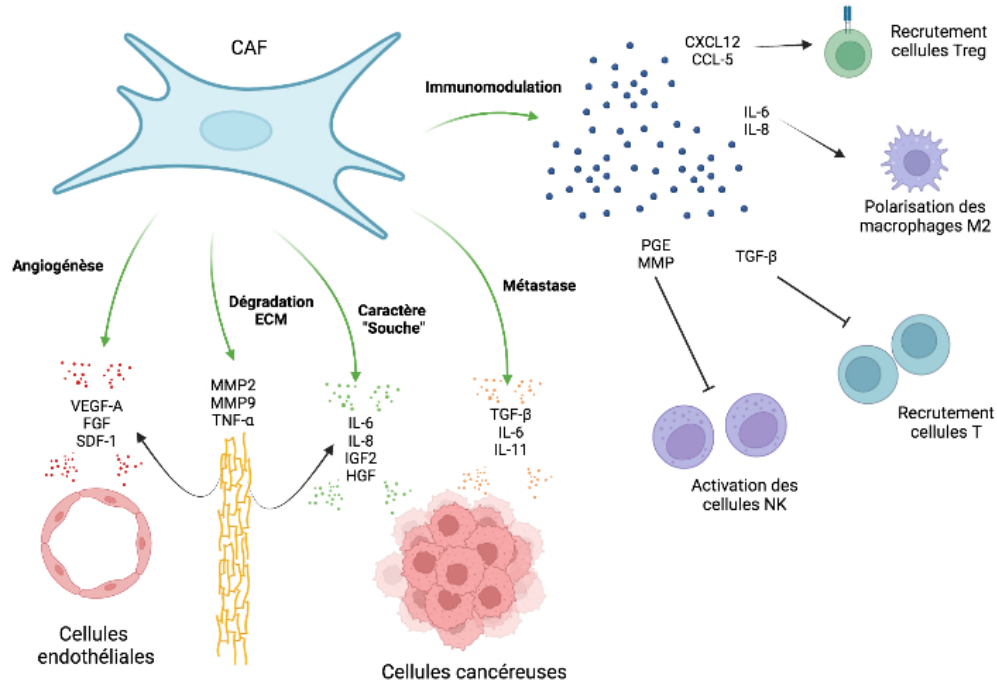


Figure 8. – L’effet paracrine des fibroblastes associés au carcinome dans la progression tumorale

Adapté de référence (128)

L’interaction entre les cellules cancéreuses et les CAF se fait aussi à travers la modification des métabolites présents dans le micro-environnement tumoral.(129) La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses est désormais considérée comme un marqueur clé des cellules cancéreuses.(84) En effet, la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses leurs donnent un avantage prolifératif et de survie.(130) Il existe trois voies métaboliques majeures qui sont souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses. La première est la glycolyse aérobie qui est augmentée, aussi connue sous le nom d’effet Warburg. Cet effet permet aux cellules de générer plus d’énergie par les premières étapes de dégradation du glucose et rend ces dernières sensibles au niveau de glucose présent. L’effet Warburg permet aussi de produire des acides aminés nécessaires à la prolifération cellulaire incontrôlée des cellules. Au détriment de la glycolyse anaérobie mitochondriale qui, même si elle génère plus d’énergie, ne laisse pas

d'acides aminés utilisables par les cellules à la fin du cycle de Krebs. Deux autres voies sont majoritairement dérégulées, ce sont le catabolisme et l'anabolisme des acides gras et des acides aminés. La figure suivante représente la régulation des voies cataboliques et comment ces dernières s'influencent entre elles. (Figure 9)

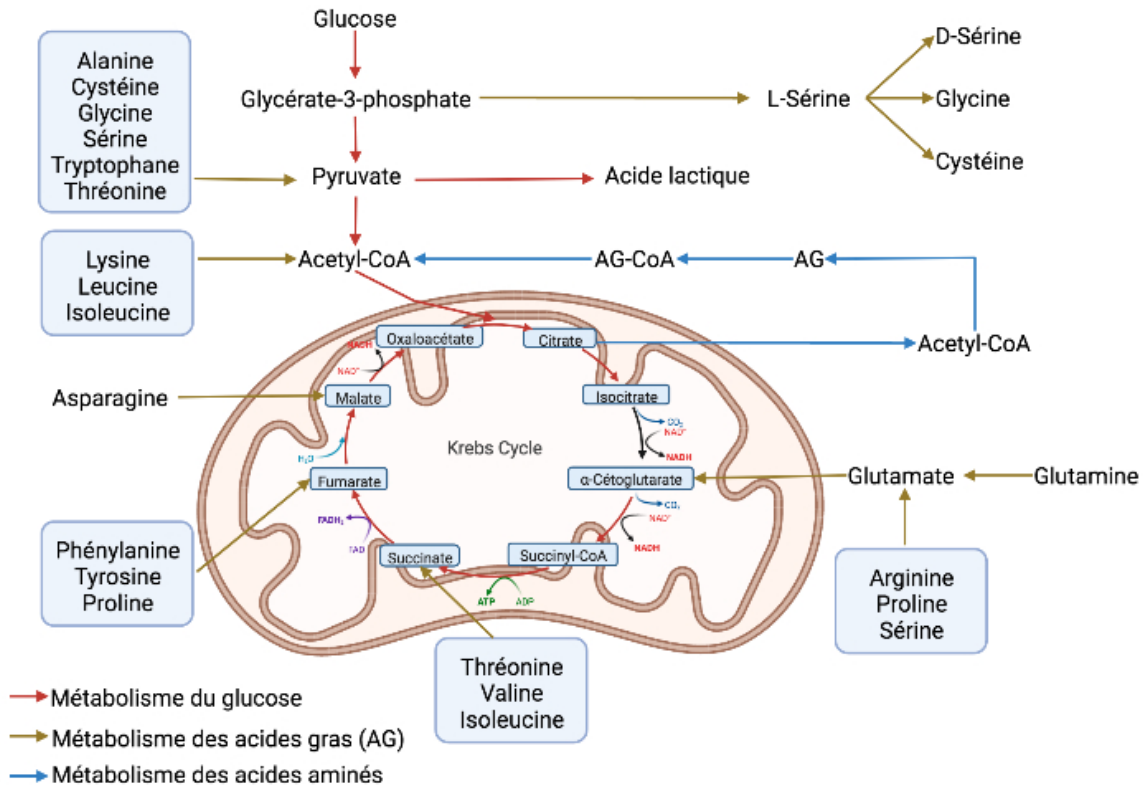


Figure 9. – Les voies métaboliques dérégulées dans la cellule cancéreuse

Adapté de référence (130)

En résumé, les CAF's peuvent participer à la progression du cancer en favorisant la croissance tumorale, l'agressivité des cellules tumorales et l'apparition de métastases. Néanmoins, les fibroblastes résidants dans un contexte de développement précoce de la tumeur peuvent avoir une activité anti-tumorale à travers la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et la réorganisation de la matrice extracellulaire. Avec le développement de la tumeur et l'évolution clonale du cancer, ces mêmes caractéristiques sont tournées à l'avantage de la tumeur grâce à une reprogrammation des fibroblastes en fibroblastes associés au carcinome.

2) c. La matrice extracellulaire (ECM)

L'ECM compose les espaces interstitiels entre les tissus et organes. Elle permet de maintenir une balance entre la flexibilité et la rigidité des tissus et est considérée comme un réservoir de facteurs de croissance. De ce fait, elle est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques cellulaires comme l'homéostasie, la différenciation, la prolifération, l'adhésion et la migration.(131, 132) Elle est composée de protéines structurales; comme le collagène, l'élastine, les protéoglycans et des protéines d'adhésion : la fibriline, la fibronectine et la laminine. Ces dernières permettent aux cellules en migration de pouvoir se mouvoir à travers le tissu. En effet, elles font office d'ancrage aux cellules en migration, qui pourront alors former des points d'adhésion pour avancer dans la matrice extracellulaire. La composition et les propriétés physiologiques de la matrice extracellulaire varient en fonction du type de tissu et de ses besoins. Par exemple, la membrane basale, retrouvée autour des vaisseaux sanguins, est une matrice extracellulaire spécialisée qui est rigide et dense afin de supporter la pression sanguine. Elle permet notamment la polarisation ainsi que le support structural des cellules endothéliales du vaisseau sanguin et agit comme barrière entre le vaisseau sanguin et le compartiment stromal.(133) Elle possède néanmoins des protéines d'adhésion comme la laminine pour permettre la diapédèse des leucocytes.(132) Les fibroblastes jouent un rôle majeur dans la production des protéines de la matrice extracellulaire.

Les CAF ont aussi un rôle dans la composition de la matrice extracellulaire. En effet, les CAF sécrètent des métallo-protéases de la matrice (MMP) qui induisent la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette dégradation permet le relâchement de facteurs chimiotactiques mais ouvre aussi la voie pour la migration des cellules tumorales. Par exemple, une importante augmentation des niveaux de MMP-9, produits par les fibroblastes, est observée dans le cancer du poumon.(134) La protéine MMP-2 a aussi été démontré comme surexprimée et colocalisée avec les fibroblastes présents dans la tumeur.(135) MMP-2 est une enzyme soluble secrété sous sa forme inactive dans la matrice extracellulaire. Après s'être complexée avec TIMP2 (Inhibiteur 2 des métallo-protéase du tissu), MMP-2 peut être activée par le clivage protéolytique de MMP-14. (136) La forme active de MMP-2 appartient à la famille des gélatinases, qui sont donc capable de cliver la gélatine, la forme dénaturée du collagène.MMP-2 est versatile et peut cliver de

nombreux de substrats, comme la gélatine, les collagènes de type I, IV et V ainsi que l'élastine et la vitronectine (137)

MMP-9 appartient aussi à la famille des gélatinases et est capable de cliver la majorité des substrats clivés par MMP-2, néanmoins elle ne peut pas cliver le collagène de type I. (138) MMP-9 est aussi sécrétée sous une forme inactive et peut être activée par les autres protéines MMP ou les sérines protéases présentes dans la matrice extracellulaire.

Les métallo-protéases de la matrice ont aussi pour fonction de libérer les proto-formes de cytokines et facteurs de croissance stockées dans la matrice extracellulaire. Par exemple, MMP-9, aussi appelé gélatinase B, clive et induit la forme active du VEGF. MMP-2 quant à elle, peut cliver la forme proactives de l'IL 1 β et induire la forme pro-inflammatoire active de l'IL 1 β . (139)

De la même manière, MMP-9 peut cliver l'Interleukine 8 afin de générer une forme plus active de celle-ci ainsi que du TGF- β . (137) MMP-9 est donc impliquée dans l'angiogenèse et peut permettre, dans un contexte physiopathologique, l'évolution de la tumeur. Finalement, les niveaux de MMP-9 corrélerent avec la faible survie des patients atteints de CPNPC, suggérant que MMP-9 pourrait être utilisée comme marqueur du pronostic de survie. (140) Les inhibiteurs des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (TIMP) jouent aussi un rôle dans la progression du cancer. En plus de pouvoir moduler l'activation des MMP, les TIMP possèdent des effets indépendants de l'interaction avec les MMP. En effet, TIMP 1 et 2 peuvent par exemple stimuler la croissance tumorale. (141) Dans le cancer du poumon CPNPC, les niveaux d'expression de TIMP1 corrélerent négativement avec le pronostic de survie. (142)

Ces observations démontrent l'importance du remodelage de la matrice extracellulaire pour la progression du cancer du poumon. Ceci démontre aussi l'importance de la coopération des cellules stromales, et particulièrement des fibroblastes dans les procédés de métastase et de transition épithélio-mésenchymateuse des cellules de cancer du poumon.

De nombreuses études soulignent donc l'importance du micro-environnement tumoral dans la progression du cancer. Cette composante devrait être plus largement prise en compte dans la biologie tumorale et le développement de nouvelles thérapies. Le micro-environnement tumoral

pourrait être considéré comme une potentielle cible thérapeutique afin de limiter la progression du cancer et l'apparition de métastases chez les patients.

3) Pharmacologie du CPNPC

3) a. Traitement standard

Pour traiter un patient atteint du cancer, les trois types de thérapies communément utilisées sont la résection de la tumeur, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans le premier cas, la tumeur est retirée de manière chirurgicale. Cette opération ne peut être effectuée que dans les cas où la tumeur est accessible et ne pose pas un risque pour le patient.(143) Le retrait de la tumeur peut être total ou incomplet, dépendamment de l'avancement de la maladie. Les niveaux de morbidités importants associés à l'opération chirurgicale incitent aussi les chirurgiens à minimiser le volume de tissus retiré.(144) Dans le contexte du cancer du poumon, la résection chirurgicale peut être suffisante pour guérir les patients au stade précoce de la maladie (Stade I et II).(145, 146) Dans le cas des stades plus avancés, les patients présentant une infiltration des cellules tumorales dans les nodules lymphatiques entourant la tumeur. La résection de la tumeur et des nodules lymphatiques positifs envahis par les cellules tumorales est généralement suivie d'un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie.(146) Ceci permet de maximiser l'effet de l'intervention et de minimiser au maximum les taux de rechute.(147, 148) En effet, cette seconde intervention a pour objectif d'éliminer les cellules cancéreuses restantes qui auraient pu ne pas être retirées lors de la résection.

La chimiothérapie consiste à utiliser des composés anti-cancéreux non-spécifiques comme le cisplatine, qui est un agent alkylant de l'ADN. Le cisplatine lie les purines de l'ADN, entraîne des dommages à l'ADN et induit l'apoptose de la cellule. En effet, les voies de réparations impliquées lors du dommage vont alors induire l'activation de la protéine p53.(149) Cette protéine a de nombreux partenaires d'interaction comme p21, qui va arrêter le cycle cellulaire en inhibant les CDK (Cycline dépendante kinases), essentielles pour la prolifération cellulaire. De plus, p53 interagit avec de nombreuses protéines apoptotiques comme la caspase 6. L'activation de celle-

ci entrainera la cellule dans la cascade apoptotique conduisant à sa mort. De nombreux effets secondaires sont associés à l'usage du cisplatine, ce qui a conduit au développement de composés dérivés du platine comme le carboplatine ou l'oxaliplatine.

Enfin, la radiothérapie a pour but de détruire les cellules cancéreuses en les exposants à des radiations (rayons X et rayons Gamma). En effet, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à l'irradiation que les cellules saines. Ceci aura pour effet de détruire de manière sélective les cellules cancéreuses.

Néanmoins, ces thérapies conventionnelles induisent de nombreux effets secondaires chez le patient.(150) Dans le cadre de la chimiothérapie, on observe de nombreux effets secondaires comme la nausée, les vomissements et les diarrhées.(150, 151) De plus, les cellules immunitaires ayant un haut taux de division, se retrouvent impactées par l'utilisation des composés intercalants à l'ADN. On peut ainsi observer des effets sur les cellules immunitaires comme la neutropénie, la thrombopénie et la lymphopénie. Ainsi, cet impact sur le système immunitaire cause une hypersensibilité du patient aux infections et peut aussi favoriser sa rechute puisque les cellules cancéreuses auront moins de pression immunologique. Afin de pallier à ces complications, des thérapies personnalisées contre le cancer du patient sont utilisées.

3) b. Médecine personnalisée du CPNPC

Après avoir identifié les mutations spécifiques au cancer du patient, il est possible d'utiliser des composés thérapeutiques adaptés au patient. Ceci aura pour effet d'améliorer la réponse thérapeutique ainsi que de diminuer les effets secondaires, précédemment décrits.(35)

3) b. I. Thérapies dirigées contre l'EGFR

Dans le cancer du poumon, on retrouve par exemple des mutations du récepteur à l'*EGF* (*EGFR*). Ce récepteur est une tyrosine kinase et sa mutation induit une prolifération incontrôlée de la tumeur. Il est alors possible d'utiliser des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) afin de cibler plus spécifiquement les cellules cancéreuses. Le premier inhibiteur de tyrosine kinase approuvé en 2003 par la FDA, pour le traitement du cancer du poumon à des stades avancés et métastatique,

est le gefitinib.(152) De nos jours, de nouveaux TKI ont été développés et présentent de meilleurs résultats et moins d'effets secondaires comme l'erlotinib, l'osmaritinib et l'afatinib.

3) b. II. Thérapies dirigées contre KRAS

La mutation oncogénique de la protéine *KRAS* a longtemps été considérée comme une cible thérapeutique sans aucun inhibiteur spécifique. Pendant plus de 40 ans, les efforts de recherche pour trouver une molécule inhibant *KRAS* n'ont pas réussi à trouver des composés probants. En réponse à ces efforts, des composés inhibant les voies de *KRAS* en aval comme les voies RAF-MEK-ERK et PI3K-AKT-mTOR ont été développés.(153) Néanmoins le sotorasib (AMG510) a récemment été découvert comme inhibiteur sélectif de la *KRAS*, des essais cliniques de phase I ont rapportés une réponse objective de 32,2% (rémission totale ou partielle) et 88,1% des patients atteints de CPNPC présentaient un contrôle de la maladie (réponse objective ou pas de progression de la maladie) après traitement à l'AMG510.(154) Ces résultats ont alors mené à une nouvelle thérapie ciblée pour le CPNPC approuvée par la FDA le 24 mai 2021. (155) Cette molécule lie de manière covalente et irréversible la cystéine 12 de la protéine mutée G12C, qui est l'isoforme oncogénique majeure retrouvée chez les patients atteints de CPNPC avec une mutation de *KRAS*.

3) b. III. Thérapies dirigées contre la translocation EML4-ALK

D'autres mutations promotrices du CPNPC peuvent être ciblées, comme la translocation EML4-ALK. Cette translocation induit une expression aberrante de la kinase ALK par une fusion du gène avec la partie N-terminale de la protéine EML4. Cette protéine chimérique qui en résulte, possède une forte activité oncogénique et proliférative via la signalisation induite par la kinase du lymphome anaplastique.(156)

Lorsque cette mutation est identifiée chez les patients, il est alors possible d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de la kinase ALK comme le crizotinib, le ceritinib et l'alectinib.(157, 158) Malgré ces thérapies ciblées, les cellules cancéreuses peuvent développer des résistances secondaires suite à l'apparition de mutations dans les voies signalétiques en jeu, conférant une résistance aux composés thérapeutiques ou l'activation d'une différente voie de signalisation oncogénique.(159) L'apparition de ces résistances secondaires chez le patient justifie l'usage de nouveaux composés, plus puissants et sélectifs. On parle de médicaments de seconde, troisième

et quatrième génération avec des propriétés pharmacologiques supérieures se traduisant par une meilleure sélectivité, pharmacocinétique et des doses d'administrations plus basses.(160) Ces résistances poussent aussi le milieu de la découverte de médicament à innover de plus en plus afin de diversifier les cibles thérapeutiques des cellules cancéreuses.

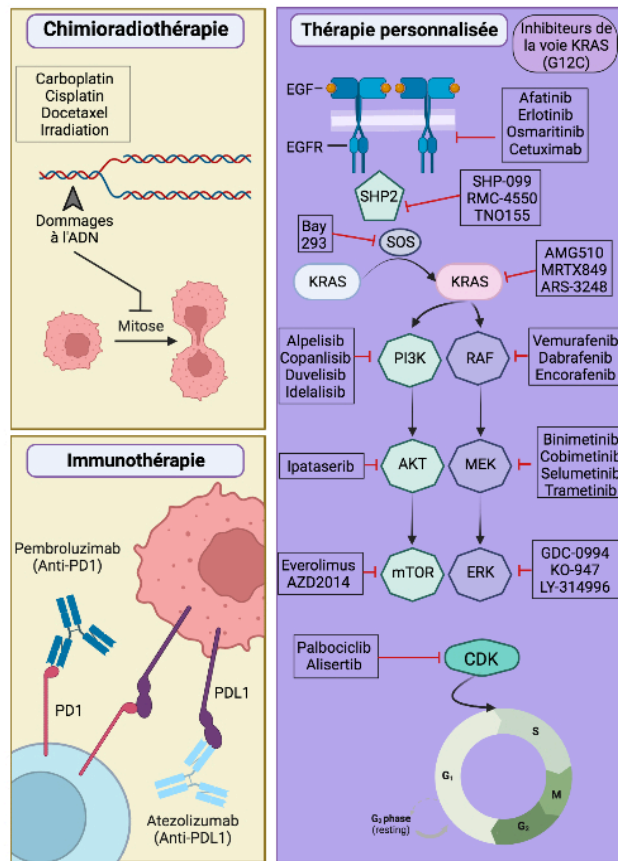


Figure 10. – Les différents traitements dans la thérapie personnalisée du cancer CPNPC

Adapté de référence (153)

3) c. Innovations et nouvelles approches de traitement

3) c. I. Immunothérapie du cancer

Les cellules cancéreuses ont développé de nombreux mécanismes pour échapper à la surveillance et l'élimination par les cellules du système immunitaire. Parmi ces mécanismes d'évasion immunitaire, il a par exemple été montré que les cellules CPNPC, peuvent surexprimé des protéines qui bloquent l'activation et la prolifération des cellules immunitaires. La protéine PD-

L1 exprimée par les cellules tumorales, peut lier le récepteur PD1 des cellules immunitaires et bloquer l'activation et la prolifération de ces dernières.(76) Cette protéine a été retrouvée surexprimée chez les patients atteints de CPNPC.(161, 162) Dans le même ordre d'idée, les cellules tumorales peuvent aussi augmenter la présentation membranaire de la protéine CTLA-4 afin de lier les molécules d'activation CD80 et CD86 des cellules présentatrices d'antigènes. Celles-ci ne sont alors pas disponibles pour induire l'activation de la cellule T cytotoxique via la liaison de la molécule activatrice CD28. L'interaction avec CTLA-4 empêche donc la co-activation des cellules T à travers la liaison des molécules CD80 et CD86 des cellules dendritiques.(163)

Au vu de ces observations, des anticorps inhibiteurs ciblant ces protéines d'évasion immunitaire ont été développés dans le but de réactiver les cellules immunitaires et leur permettre d'éliminer les cellules tumorales.

L'inhibiteur de la protéine PD-1, le nivolumab a été approuvé en 2015 comme thérapie de 2nd ligne du CPNPC après l'échec de la chimiothérapie. De même, le Pembrolizumab, un autre inhibiteur de PD-1 est aussi utilisé pour traiter le CPNPC afin de diminuer l'effet de déplétion immunitaire causé par les protéines PD-L1 des cellules cancéreuses.(163, 164) Les inhibiteurs de PD-L1 approuvés, l'atezolizumab et le durvalumab ont démontré avoir une meilleure réponse thérapeutique en comparaison à la chimiothérapie standard.(165, 166) De récentes études ont aussi démontré un avantage thérapeutique à utiliser la chimiothérapie en combinaison avec des inhibiteurs de PD-L1, dans des traitements de première ligne, des patients atteints de cancer CPNPC avec des hauts niveaux d'expression de PD-L1.(166)

Enfin, des inhibiteurs de la protéine CTLA-4 comme l'Ipilimumab, ont démontré des effets thérapeutiques prometteurs sur les patients atteints de CPNPC métastatique en combinaison à la chimiothérapie (paclitaxel et carboplatin).(167)

3) c. II. Thérapie épigénétique du cancer

Étant donné les dérégulations épigénétiques observées dans les cellules cancéreuses, des études se sont portées sur l'usage de composés modulant le dépôt et le retrait de certaines marques d'histones ainsi que de méthylation de l'ADN. Pour cela, ces inhibiteurs ciblent les enzymes de modification des marques épigénétiques.(168) Au vu des hauts niveaux de méthylation du

génomique des cellules cancéreuses, l'inhibition des enzymes ADN méthyltransférases permet une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs réprimés par une méthylation excessive au niveau de leur promoteur.(169, 170) Les agents hypométhylants de l'ADN comme l'azacitidine et la décitabine sont des analogues de la cytidine et inhibent la méthylation des cytosines par les enzymes DNMT.(171) Ces agents induisent aussi une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs mais aussi des gènes reliés à l'immunogénicité des cellules cancéreuses comme le PD-L1.(172) Cette étude ouvre la porte à un potentiel traitement épigénétique combiné à de l'immunothérapie ou de la chimiothérapie. (173)

Les histones desacétylases sont aussi retrouvées sur-exprimées dans le CPNPC, ce qui mène à une accessibilité réduite de la chromatine et une inhibition de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. De ce fait, les inhibiteurs des HDAC ont donc un effet dans la réactivation de ces gènes suppresseurs de tumeurs et de l'immunogénicité des cellules tumorales.(174) Actuellement, 2 inhibiteurs de HDAC sont approuvés par la FDA pour le traitement de cancers hématologiques ; il s'agit du Vorinostat (SAHA) et du Romidepsin. Lors des essais pré-cliniques, ils ont induit un arrêt du cycle cellulaire entraînant l'apoptose des cellules CPNPC ainsi qu'une différenciation des cellules tumorales ayant survécu.(174-176)

Une étude japonaise a déterminé que l'inhibition de la méthyltransférase EZH2 avec le 3-deazaneplanocin A, un inhibiteur d'EZH2 et du complexe PRC2, induisait une diminution de la prolifération tumorale des lignées de cellules cancéreuses CPNPC. (50) Afin d'augmenter l'impact de l'inhibition pharmacologique épigénétique, cette étude a aussi effectué une combinaison du 3-deazaneplanocin A avec le Vorinostat, un agent inhibiteur des HDAC. Cette combinaison d'inhibiteurs épigénétiques a totalement abrogé la prolifération des cellules tumorales dans toutes les lignées. Elle s'est avérée être plus efficace que la monothérapie avec l'inhibiteur de EZH2.(50) D'autres études ont aussi démontré que l'inhibition de EZH2 dans des modèles in vitro induit une re-sensibilisation des cellules à la chimiothérapie.(177) Ces résultats soulignent donc la pertinence des traitements épigénétiques dans la recherche de nouveaux composés thérapeutiques contre le cancer du poumon CPNPC.

3) d. Découverte de nouveaux composés pharmaceutiques

3) d.I. Criblage à haut débit

De nombreuses étapes sont nécessaires pour pouvoir développer et commercialiser un médicament. Parmi elles, la phase pré-clinique et la phase clinique sont les étapes où le médicament est respectivement testé en laboratoire (ainsi que sur les animaux) et sur des patients.(178) Malheureusement, la validation de ces composés par la phase clinique ne dépasse pas les 3,4% selon une récente étude.(179) Ce faible taux de réussite dans les phases cliniques, en partie dans le domaine de l'oncologie, est dû à un manque de précision et de réalisme des modèles précliniques.(180) Les essais de composés dans des modèles murins est un exemple d'un procédé onéreux et chronophage. Également, certaines approches précliniques, ne permettent pas de définir avec précision la pharmacocinétique, la toxicité ou encore la biodisponibilité du médicament.(178) Ces exemples sont d'autant plus de raisons qui participent à l'échec de la validation des composés lors des phases cliniques ultérieures. Ces échecs entraînent une perte de temps et d'argent pour les compagnies menant les tests. En effet, les approches précliniques actuelles utilisent des modèles qui sont trop peu représentatifs de la biologie des maladies retrouvées chez les patients. (181, 182)

Le modèle utilisé, *in vitro* ou *in vivo*, se doit de représenter avec rigueur les caractéristiques de la maladie. Une fois que le modèle préclinique a été choisi, il est soumis à des tests avec plusieurs molécules d'intérêts thérapeutiques. Le criblage haut débit de composés pharmaceutiques est une technique largement utilisée dans le domaine de la découverte de nouveaux médicaments.(183) Cette technique, aussi connue sous le nom de HTS (« High Throughput Screening »), permet de tester la réponse biologique *in vitro* d'une multitude de composés, dans un temps réduit et simultanément.(183, 184) Ce processus a été rendu possible grâce à l'automatisation des manipulations, aux robots et aux nouvelles technologies.(185) Cela permet aussi d'améliorer la structure chimique d'un médicament pré-existant ; notamment en déterminant la structure optimale de ce dernier, afin d'obtenir la meilleure réponse sur une lignée cellulaire déterminée.(186) Il est donc important, lors des criblages à haut débits, d'observer et de caractériser une réponse biologique précise du modèle. Il convient aussi de fixer et d'identifier

les possibles facteurs de variations dans la réponse cellulaire observée (lignée cellulaire, température, concentration du composé testé, durée de traitement).

4) Modèles *in vitro* du cancer du poumon

4) a. Culture cellulaire 2D

Lors des essais biologiques *in vitro*, la majorité des cellules utilisées sont issues de culture cellulaire deux dimensions (2D), cultivées dans des flasques plastiques et, dans le cas des cellules adhérentes, formant une monocouche cellulaire.(187) Néanmoins ces cultures en 2D ne sont pas représentatives de la condition *in vivo* des cellules.(187) Par exemple, dans des flasques adhérentes, les cellules adoptent un caractère polarisé, avec une membrane cellulaire qui fait le contact avec la surface adhérente, et le reste qui interagit avec le milieu de culture.(188) D'autres études mettent l'accent sur le manque d'interaction cellulaire, ou encore, sur la faible pertinence du microenvironnement des cultures 2D. (188-190)

4) b. Culture cellulaire 3D

Les lacunes que présente la culture 2D ont incité les chercheurs à innover afin de trouver un modèle plus représentatif des caractéristiques de la maladie du patient. L'émergence de la culture cellulaire 3D en sphéroïdes, vient de ce constat.(189, 190) Cette technique semble être plus représentative de l'organisation et des interactions qu'ont les cellules dans le cadre, par exemple, d'une tumeur *in vivo*.(188-190) En effet de nombreuses études ont démontré un patron d'expression génétique différent selon que les cellules sont cultivées en 2D versus en 3D.(191, 192) De plus, les cellules cancéreuses semblent avoir une sensibilité différente aux agents chimiothérapeutiques, lorsqu'elles sont cultivées sous forme de sphéroïdes.(191, 193-195) Cette donnée suggère que la culture 3D impose un remaniement de l'expression des gènes, qui peut être expliqué par des modifications épigénétiques, ainsi qu'à l'activation de nouvelles voies de signalisation et de facteurs de transcription.(188, 193, 195) Les sphéroïdes, une fois formés vont se compacter et entraîner l'augmentation des interactions cellules-cellules comparativement au 2D.(196) Les cellules cultivées en 3D ont démontré avoir une expression plus élevée des

molécules d'adhésion, telle que les E-Cadhérine. (196, 197) Ce nouveau microenvironnement, est considéré comme plus représentatif des interactions cellules-cellules et de l'architecture du tissu *in vivo*.(198)

4) c. Modéliser le microenvironnement tumoral *in vitro*

Le micro-environnement est une entité complexe et dynamique avec un rôle clé dans la croissance tumorale. Il est donc difficile de le représenter avec fidélité dans des modèles de culture simplifiés *in vitro*, mais il est cependant possible de récapituler certains de ses aspects d'intérêts. Comme mentionné précédemment, en comparaison à la culture cellulaire 2D, la culture cellulaire 3D récapitule donc mieux la structure et les interactions cellulaires retrouvées dans une tumeur d'un patient. Les cellules sont polarisées, organisées de manière organotypique et présentent un patron d'expression des gènes distincts de la culture standard en 2D.(187, 199-202) Il est possible de générer des sphéroïdes avec différentes manipulations physiques comme la rotation, la formation de gouttelette ou l'usage de couche à faible adhérence pour induire une formation spontanée du sphéroïde par agrégation des cellules tumorales entre elles. (203-205) L'utilisation des gels à base de collagène et de protéines issues de la matrice extracellulaire permet d'améliorer la complexité et la représentativité clinique du modèle. En effet, la composition du gel peut être modifiée et enrichie avec certains types de protéines et facteurs de croissance de la matrice extracellulaire.(199-201, 206) Cet aspect de la culture 3D avec matrigel permet d'adapter le modèle de culture au besoin spécifique de la lignée cellulaire et du type de cancer étudié. Néanmoins, ces modèles présentent beaucoup de variabilité d'un réplicat à l'autre pendant la fabrication, de par la complexité de composition du gel. Ceci cause des variabilités dans les réponses biologiques observées et participe à la faible reproductibilité du modèle.(207)

Ces modèles à base de gel ne permettent donc pas d'utiliser la technique de criblage à haut débit pour la découverte de médicament comme les techniques de formation spontanée de sphéroïde sans gel le permettent.(204) Il convient donc de bien choisir son modèle de culture 3D dépendamment de l'aspect tumoral et des objectifs de recherche du projet en question.

De plus, afin de complexifier le système, il est possible de cultiver différentes lignées cellulaires, comme des cellules tumorales et des cellules stromales dans un même modèle 3D.(206) Ceci

permettra de récapituler au mieux les interactions cellules-cellules qui peuvent s'effectuer entre ces types de cellules ainsi que d'induire une communication paracrine des cellules. Il est toutefois ardu de distinguer les effets de contact cellulaire et les effets paracrines d'une lignée cellulaire sur l'autre.

D'autres modèles permettent aussi de modéliser différents aspects du micro-environnement. Par exemple, les chambres de Boyden modifiées permettent de laisser passer les métabolites et les molécules de signalisation (cytokines et facteurs de croissance) au travers d'un filtre alors que les cellules sont dans des compartiments distincts. Ce modèle permet de modéliser l'interaction paracrine entre des cellules tumorales et d'autres types de cellules comme des cellules stromales ou immunitaires. Ces chambres de Boyden modifiées ont été utilisées pour démontrer l'effet de la sécrétion de la molécule de leptine par les CAF sur les cellules de CPNPC A549 et H1299. La leptine sécrétée par les CAF traverse le filtre de la chambre de Boyden et induit une activation de la voie PI3K/AKT ainsi que MAPK/ERK1/2 dans les cellules tumorales. Cette activation des voies se traduit par une augmentation de la prolifération et de la capacité de migration des cellules tumorales.(208) Une autre étude utilisant des chambres de Boyden modifiées a démontré l'impact de la sécrétion de TGF- β par les fibroblastes MRC-5 sur l'activation des voies PI3K/AKT/mTOR et l'induction d'une résistance pharmacologique des cellules A549 en comparaison à la monoculture.(209)

Il est aussi possible d'utiliser des chambres de Boyden avec des filtres qui laissent passer les cellules afin de mesurer l'aspect chimioattractif d'un type cellulaire sur l'autre. (210, 211)

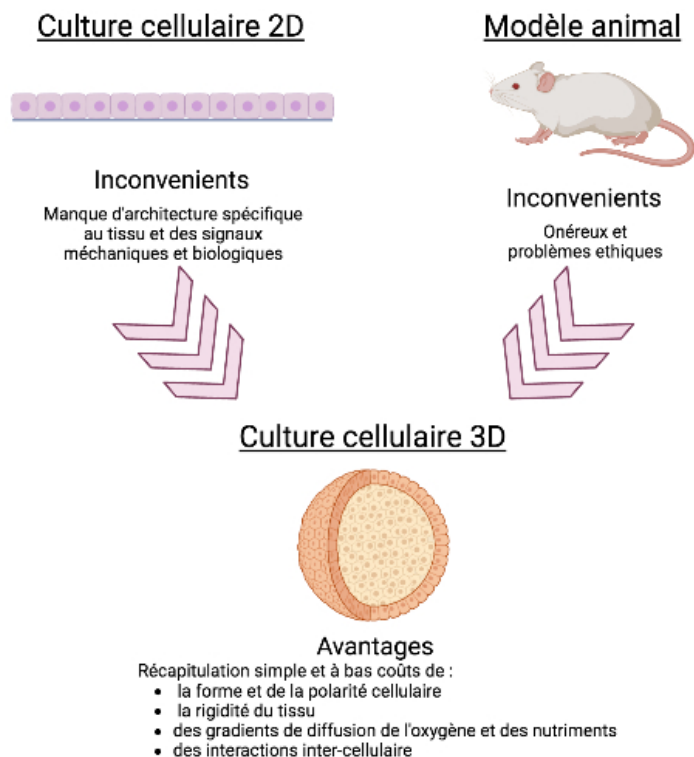


Figure 11. – Avantages et limitations des différents types de modèles *in vitro*

Adapté de référence (212)

Afin de représenter l'effet paracrine de la co-culture de cellules, il est aussi possible d'utiliser du milieu conditionné provenant d'une culture cellulaire afin de cultiver les lignées tumorales. Dans ce contexte, les cellules tumorales seront en présence de métabolites et de facteurs de croissance issus d'autres types cellulaires. L'effet paracrine de la lignée de co-culture peut aussi être étudié dans ce contexte de milieu conditionné. Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence que la sécrétion d'IL-6 stromale des CAF induisait une augmentation de la production de TGF- β ainsi qu'une induction de la résistance à la chimiothérapie des cellules CPNPC. (213, 214)

Enfin, il est aussi possible de cultiver les cellules tumorales dans des chambres de culture soumises à un courant de micro-fluide.(215) Ceci permet de représenter la tension et la pression biologique des fluides interstitiels des tumeurs des patients. Cette méthode peut être couplée à de la co-culture, mais aussi à l'usage de milieu conditionné ou de facteurs de croissance. Finalement, ces chambres à micro-fluides peuvent aussi être utilisées pour caractériser les effets

de l'administration de médicaments dans un contexte physiologique plus similaire à celui retrouvé chez le patient.(215)

Chapitre 2 – Hypothèse et objectifs

1. Hypothèse

De plus en plus d'études démontrent l'importance du microenvironnement tumoral dans la progression du CPNPC. Parmi les cellules stromales présentes au sein de la tumeur, une sous-population de fibroblastes a été identifiée comme possédant des capacités pro-tumorigénique. Ces fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) possèdent un sécrétome et un phénotype permettant l'induction de cellules tumorales les rendant plus agressives et métastatiques.

Les modèles *in vitro* de cancer du poumon ne représentent que faiblement les caractéristiques physiologiques de la tumeur. À la vue des lacunes que présentent les modèles de culture cellulaire 2D, l'alternative serait donc de travailler avec des cultures cellulaires 3D. L'intégration du microenvironnement s'avère aussi important pour modéliser le plus fidèlement possible les conditions des cellules cancéreuses des patients. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que la culture de cellules pulmonaires cancéreuses A549, dans un modèle de co-culture 3D avec des fibroblastes, induit un changement de la sensibilité pharmacologique et des caractéristiques phénotypiques différentes, en comparaison à la culture classique de cellules A549 2D. Ces nouvelles caractéristiques se rapprocheraient plus du phénotype retrouvé dans la tumeur *in vivo*.

2. Objectifs

Afin de prouver cette hypothèse, l'objectif a donc été de pouvoir établir un modèle de co-culture 3D avec des cellules cancéreuses A549 et des fibroblastes humains du poumon HFL1, LL24 ou MRC-5. Ce modèle se doit d'être viable et de pouvoir durer dans le cadre d'un test de sensibilité à différents composés pharmaceutiques, lors d'un criblage à haut débit. Les différents facteurs nécessaires pour établir ce modèle, tel que le ratio optimal de chaque type de cellules, seront donc abordés dans les parties ci-dessous.

Nous déterminerons dans un premier temps le ratio optimal pour la co-culture des cellules A549 avec les fibroblastes HFL1, LL24 et MRC5 ainsi que la lignée de fibroblastes choisie pour la caractérisation du modèle.

Par la suite, nous étudierons le modèle de co-culture sur le long terme avec un rajout de fibroblastes tout au long de la culture. Nous identifierons les changements dans le comportement des cellules à travers des expériences de migration et d'analyse des changements protéiques par western blot.

Nous observerons aussi s'il y a un changement dans les niveaux de sécrétion des cytokines et chimiokines ainsi que les potentiels changements métaboliques que la co-culture peut induire dans notre modèle.

Finalement, nous caractériserons la réponse thérapeutique du modèle de monoculture et de co-culture long terme afin de déterminer si les fibroblastes induisent une résistance ou une sensibilité à certains composés thérapeutiques.

Chapitre 3 – Matériel et méthode

Culture Cellulaire 2D

Les cellules d'adénocarcinome de cancer du poumon A549 (ATCC CCL-185™) ont été cultivées en monocouche dans des flasques adhérentes Corning (#83.3911.002) à une densité cellulaire de 40 cellules par mm². Elles ont été cultivées dans du milieu F12K (Wisent) supplémentées de 10% de sérum fœtal bovin (Wisent) pendant 3 à 4 jours, sans passage cellulaire, jusqu'à atteindre 80% de confluence.

Les fibroblastes ont été mis en culture dans des flasques adhérentes à une densité cellulaire de 48 cellules par mm². Les HFL1 (ATCC CCL-153™), LL24 (ATCC CCL-151™) et MRC-5 (ATCC CCL-171™) ont respectivement été cultivées dans du milieu F12K, McCoy's et EMEM (Wisent) supplémentés avec 10% de FBS. Ces fibroblastes sont tous issus du poumon, au stade fœtal (HFL1 et MRC5), ou au stade de développement d'un enfant de 5 ans (LL24). Les fibroblastes ont été cultivés pendant 2 à 3 jours jusqu'à atteindre 75% de confluence.

Les passages cellulaires ont été effectués avec de la trypsine-EDTA à 0.25%, incubée 5 min à 37°C, après rinçage au PBS (Phosphate-buffered Saline). Ensuite, les cellules ont été ré-ensemencées à leur densité cellulaire optimale. Les cellules sont comptées à chaque passage à l'hémacytomètre avec du bleu de trypan.

Les cellules sont maintenues en culture dans un environnement humide à 37°C, 5% CO₂.

Culture cellulaire 3D

Les cellules A549 ont été ensemencées dans des plaques à faible Adhésion ULA® (S Bio® MS-9096UZ) depuis leur passage cellulaire en 2D. 20 000 cellules sont placées par puits puis une centrifugation de 5 min à 1000 RPM a été effectuée. Les sphéroïdes ont par la suite été passés aux jours 3, 10, 17 et 24. Pour cela, les sphéroïdes sont récoltés, rincés au PBS puis trypsinisés (1 ml de trypsine par plaque; 5 min à 37°C). Après un compte à l'hémacytomètre, les cellules sont de nouveau ensemencées à 20 000 cellules par puit.

Co-culture cellulaire 3D

Pour la co-culture en 3D, les fibroblastes ont été ajoutés au jour 3 à différents ratios, pour un nombre de cellules total par puits de 20 000 cellules. Les cellules A549 ont été placées et centrifugées dans les puits, puis les fibroblastes ont été ajoutés par la suite 4 heures après l'ensemencement des A549. Ceci permet aux cellules A549 de commencer à adhérer entre elles et permettre un meilleur ensemencement des fibroblastes du sphéroïde.

Pour la co-culture à long terme, les fibroblastes ont été ajoutés 3 jours après chaque passage des sphéroïdes aux jours 3, 10 et 17 afin de maintenir le nombre de fibroblastes à 2000 cellules par sphéroïde.

Marquage au CFSE et suivi des populations fluorescentes

Les fibroblastes ont été récoltés, rincés au PBS puis marqués 20 minutes avec la solution de CFSE (Invitrogen CellTrace™ CFSE #C34554), à une concentration cellulaire de 1 million de cellule par ml. Après neutralisation de la solution de marquage avec 5 volumes de milieu complété de 10% FBS, les cellules marquées sont centrifugées puis resuspendues à 100 000 cellules par ml.

Le suivi de la population fluorescente a été effectué au cytomètre en flux GUAVA easyCyte 6HT-2L System (Millipore) avec l'option Incyte du logiciel GUAVASOFT. Des cellules non marquées ont été utilisées comme contrôle négatif.

Temps de doublement, viabilité et taille des cellules

Le temps de doublement des cellules a été estimé à chaque passage cellulaire grâce à l'équation suivante : $Dt = t_1 - t_0 \times \ln(2) \div \ln(N_{t_1}/N_{t_0})$

où t_0 est le temps de début de culture (h) ; t_1 est le temps de fin de culture (h) ; N_{t_0} est le nombre de cellules à t_0 et N_{t_1} est le nombre de cellules à t_1 .

La taille des cellules a été déterminée grâce au Compteur cellulaire automatisé Orflo MOXY Z Mini (MXZ001) avec des cassettes Moxi Z (Orflo™ #MXC001).

Les viabilités cellulaires ont été déterminées grâce au Kit ViaCount (Luminex™ #4000-0040). Après récupération du milieu de culture, les cellules ont été trypsinisées puis remises dans leur milieu de culture contenant les cellules mortes. Pour déterminer la viabilité, 20 µl de solution Viacount ont été ajoutés par puit et les lectures de fluorescence ont été faites avec le logiciel guavaSOFT 3.2 sur le cytomètre en flux GUAVA 6HT-2L easyCyte™ de Milipore. Afin de placer correctement les fenêtres d'acquisitions, un échantillon de cellules mortes, après incubation 5 min à 90°C a été utilisé.

Imagerie en continu et suivi de taille

Les sphéroïdes ont été imagés en continu par le microscope S3 Live-Cell Analysis Incucyte (SARTORIUS Incucyte™ 4647) à l'objectif 4x, intégré dans un Incubateur humide à 5% de CO₂. Le calcul du diamètre des sphéroïdes a été effectué après l'acquisition des images par le logiciel Incucyte. La fluorescence a aussi été imagée dans le détecteur Vert de l'Incucyte.

Cycle Cellulaire

Environ 1 million de cellules ont été collectées, rincées au PBS puis fixées dans de l'éthanol 100%, une nuit à -20°C. Après fixation et rinçage au PBS, les cellules ont été incubées 20 min avec de la RNase A (20 µg/ml Invitrogen PureLink™ #12091-021), puis l'ADN a été marqué à l'iodure de Propidium (SIGMA™ #P4170) à une concentration finale de 1 µg/ml. La lecture de fluorescence a été effectuée au GUAVA Incyte dans le filtre RED- B. Les phases du cycle cellulaire ont été déterminées selon l'intensité de fluorescence caractéristiques des phases (Apoptotique > G₀ > S > G₂/M)

Coupe des sphéroïdes

Les sphéroïdes ont été récoltés puis fixés 1h à température pièce, au paraformaldéhyde 4% (PFA), après une brève incubation dans de l'éosine. Les sphéroïdes ont ensuite été placés dans de l'OCT (SAKURA™ #4583) et stocké à – 80°C. Par la suite les sphéroïdes ont été découpés au Cryotome (LEICA CM 1950) par coupes de 20 µm d'épaisseur sur des lamelles de microscopie chargées (Ultident™170-8105-W+). Ces coupes ont été conservées au –80°C jusqu'à leur marquage pour l'immunofluorescence.

Immunofluorescence

Les lames avec les coupes sont mises à température ambiante pendant 45 min, avant d'être fixées 10 min à la PFA. Par la suite, 3 rinçages de 5 min au PBS ont été effectués puis les lamelles ont été incubées toute la nuit à 4°C avec du PBS 1% FBS, des lamelles sont placés pour éviter l'évaporation.

Après blocage, les coupes ont été rincées 3 fois au PBS pendant 5 min puis les anticorps primaires ont été ajoutés à leur ratio optimal dans du PBS 1% FBS (voir tableau 1). Les lames ont été incubées toute la nuit à 4°C dans l'anticorps primaires avec des lamelles pour éviter l'évaporation.

Le lendemain, les lames sont rincées au PBS 3 fois pendant 5 min, puis incubées 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière avec des anticorps secondaires couplés à des fluorophores au ratio 1:1000 dans du PBS 1% FBS (voir tableau 1).

Les lames ont ensuite été rincées 2 fois au PBS puis incubées pendant 10 min avec du PBS-DAPI (2 gouttes par ml de PBS, Invitrogen NucBlue™ #R37606).

Les lames ont ensuite été séchées puis montées avec 50 µl de liquide de montage Prolong Gold (Prolong™ Diamond Gold #P36962). Une lamelle CoverGlass (Ultident 1oz #170-C2460) est ensuite apposée et les lames sont laissées à température ambiante pour curer pendant 24h.

Les coupes ont été observées avec un microscope à fluorescence inversée à la plateforme de microscopie du CHU Sainte-Justine PIM, objectif 10x. Le logiciel LAS X est utilisé pour l'acquisition et le traitement des images.

Western blot

Les cellules ont été récoltées puis culotées après un rinçage au PBS. Les protéines ont par la suite été extraites avec le tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-Cl pH 7,4 ; 5 mM EDTA ; 250 mM NaCl ; 50 mM NaF ; 0,1% Triton X100 ; 0,1 mM) complémenté d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), de 1 mM PMSF, d'inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich) et d'inhibiteurs de phosphatase (PhosphoSTOP - Roche) pendant 20 min sous agitation, à 4°C. Ensuite, le lysat a été centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 min à 4°C et le surnageant, contenant les protéines, a été conservé à -20°C.

Un dosage des protéines au spectrophotomètre a été effectué avec une gamme d'étalonnage à la BSA et une solution de Bradford à 20% (BioRad).

Les concentrations protéiques ont ensuite été équilibrées puis diluées dans du Laemmli 5x (10% SDS, 50% Glycérol, 300mM Tris pH 6.8, 0,05% Bleu de Bromophénol et 100mM DTT).

Les étapes de western blot ont été effectuées comme recommandées par Biorad. Brièvement, les échantillons ont été dénaturés pendant 10 minutes puis migrés dans des gels SDS-PAGE à 150V. Les protéines ont été ensuite transférées toute la nuit sur une membrane de PVDF, préalablement activée au méthanol, à 4°C et 30V.

Le lendemain, les membranes ont été bloquées pendant 1 heure dans du lait 5% avec du TBS-Tween (Tris 200 mM, NaCl 1500 mM et Tween-20 à 0,2%). L'anticorps primaire est ensuite ajouté dans du lait 5% avec TBS-T à un ratio optimal (voir tableau 1). Après une incubation de toute une nuit, les membranes ont été rincées 3 fois au TBS-T et incubées pendant 1 heure dans une solution d'anticorps secondaire couplé au HRP au ratio 1: 10 000. (voir tableau 1) Les membranes ont ensuite été révélées au LAS 4000-Image Quant après ajout de la solution de révélation ECL (BioRad Clarity™ # 170-5061).

Les bandes ont ensuite été quantifiées avec le logiciel Image J (Rasband, 1997-2015) puis normalisé sur la valeur de la bande d'actine.

Tableau 1. – Anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot et immunofluorescence (IF)

<u>Anticorps</u>	<u>Référence</u>	<u>Ratio utilisé</u>	<u>Host</u>
Actine- β	Sigma Aldrich A2228	1 : 5000	Mouse
Actine α -SMA	Abcam ab 124964	1 : 1000 1 : 500 (IF)	Rabbit
EZH2	ActiveMotif 39934	1 : 500	Rabbit
ITGB5	Invitrogen PA5-17260	1 : 1000	Rabbit
Fibronectine	Abcam ab 32419	1 : 1000 1 : 500 (IF)	Rabbit
HDAC 1	Cell Signaling 5356	1 : 1000	Mouse
Twist	Abcam ab175430	1 : 500	Mouse
Vimentine	Sigma Aldrich V6630	1 : 1000	Mouse
Anti-Rabbit HRP	BioRad #170-6515	1 : 1000	Goat
Anti-Mouse HRP	BioRad #170-6516	1 : 1000	Goat
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488nm	Invitrogen A11008	1 :1000	Goat
Anti-Rabbit Alexa Fluor 555nm	Invitrogen A21428	1 :1000	Goat
Anti-Mouse Alexa Fluor 488nm	Invitrogen A11001	1 :1000	Goat
Anti-Mouse Alexa Fluor 555nm	Invitrogen A21422	1 :1000	Goat

Migration cellulaire

La migration cellulaire a été mesurée dans des chambres de Boyden (Costar® Transwell Permeable support #3422). 50 000 cellules trypsinisés ont été placés dans les chambres supérieures avec du milieu sans FBS. La chambre inférieure contenait du milieu avec 20% de FBS

pour récapituler la chimioattraction. La migration a été effectuée pendant 12 h et les filtres de Boyden ont par la suite été fixés à la PFA 4% pendant 20 min à température pièce, rincés puis marqués au Crystal Violet 1% (Fisher Chemical™ #C581-100). Les cellules qui ont traversées le filtre ont par la suite été comptées au microscope optique (Axiovert 35M) à l'objectif 5x et 10x. Les champs ont été imagés avec la caméra Olympus QColor 3 et enregistrées avec le logiciel Image Pro Plus 7.0. Les cellules ont été comptées à l'aide du logiciel CELLCOUNTER. La moyenne du nombre de cellules dans chaque champ a été prise en compte.

Milieu conditionné

Le milieu issu de la culture des fibroblastes et des A549 a été récolté lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence après quelques jours de culture. Le milieu a ensuite été filtré à l'aide d'un filtre de 0,22 µm pour enlever les cellules mortes.

Les fibroblastes ont été ensemencés dans des flasques T25 adhérentes avec 2,5 ml du milieu de culture des fibroblastes et 2,5 ml du milieu de culture issue des A549. Les cellules ont par la suite été passées aux jours 3, 7 et 10. Chaque passage avait pour objectif de remettre les cellules à une densité optimale de 50 cellules par millimètre² et de renouveler le milieu conditionné issu des cellules A549.

LC-MS et analyse métabolique

Les surnageant de culture cellulaire ont été extraits avec du méthanol froid à 80% contenant des étalons internes marqués isotopiquement. Les métabolites ont été séparés à l'aide d'un système UPLC Agilent 1290 équipé d'une colonne Waters XBridge Amide 1 x 50 mm HILIC (Waters Part 186004871) ou d'une colonne Waters Cortecs T3 2.1x50 mm, à granulométrie pour la taille des particules de 2.7 µm, phase inverse (Waters part# 186008482). Les métabolites ont été détectés à l'aide d'un spectromètre de masse Sciex Qtrap 5500 fonctionnant en mode de surveillance de réactions multiples (MRM) ciblant 286 transitions de mode positif et 299 transitions de mode négatif. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Analyst v1.6.2 et des aires des pics intégrées à l'aide de Skyline v20.2. Les métabolites ont été identifiés grâce à des standards. Les

données brutes ont été normalisées sur la moyenne des échantillons de contrôle, contenant tous les échantillons (pool). L'intensité relative des métabolites a été analysée et visualisée avec le logiciel MetaboAnalyst 5.0 pour générer des heatmaps et des volcano-plots. Ces intensités sont présentées en détails dans le tableau 3 de la partie annexe.

Analyse su sécrétome par ELISA Luminex

Pour l'analyse des composés sécrétés dans le milieu de culture, nous avons utilisé la technologie Luminex xMAP. Cette technologie utilise des billes avec des anticorps spécifiques aux analytes, ces billes sont aussi uniques car elles possèdent chacune des fluorophores d'identifications spécifique. Cette technique permet donc de mesurer le niveau de plusieurs analytes de manière spécifique et simultanée : cela s'appelle une analyse multiplexe.

La quantification multiplexée de 71 cytokines humaines, chimiokines et facteurs de croissance.

L'analyse par multiplexage a été effectuée à l'aide du système LuminexMC 200 (Luminex, Austin, TX, É.-U.) par Eve Technologies Corp. (Calgary, Alberta). Soixante et onze marqueurs ont été mesurés simultanément dans les échantillons à l'aide du test de découverte de cytokine humaine 71-Plex d'Eve TechnologiesMD, qui consiste en deux trousse distinctes : un 48-plex et un 23-plex (MilliporeSigma, Burlington, Massachusetts, États-Unis). L'essai a été effectué selon le protocole du fabricant. Le 48-plex était composé de sCD40L, EGF, Eotaxine, FGF-2, FLT-3 Ligand, Fractalkine, G-CSF, GM-CSF, GRO α , IFN- α 2, IFN- γ , IL1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IL-27, IP-10, MCP-1, MCP-3, M-CSF, MDC, MIG/CXCL9, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, TGF- α , TNF- α , TNF- β , VEGF-A. Le 23-plex était composé de 6CKine, BCA-1, CTACK, ENA-78, Eotaxin-2, Eotaxin-3, I-309, IL-16, IL-20, IL-21, IL-23, IL-28A, IL-33, LIF, MCP-2, MCP-4, MIP- δ C, SCF, SDF-1 α +1 β , TARC, TPO, TRAIL et TSLP. La sensibilité de ces marqueurs varie de 0,14 à 55,8 pg/mL pour le 71-plex. Les valeurs individuelles de sensibilité des analytes sont disponibles dans le protocole MILLIPLEX® MAP

L'analyse des 3 isoformes du TGF- β au aussi été effectuée. Le 3-plex est constitué de TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. La sensibilité de ces marqueurs varie de 2,2 à 6,6 pg/mL pour le 3-plex. Les valeurs

individuelles de sensibilité des analytes sont disponibles dans le protocole MilliporeSigma MILLIPLEX® MAP.

Une autre analyse Luminex a été effectuée pour les composés ne pouvant être analysés avec les multiplex précédents. Le 4-plex était constitué de la cathepsine D, de la ferritine, de la protéine alpha d'activation des fibroblastes et de la myéloperoxydase. La sensibilité de ces marqueurs varie de 0,03 à 0,4 pg/mL pour le 4-plex. Les valeurs individuelles de sensibilité des analytes sont disponibles dans le protocole MilliporeSigma MILLIPLEX® MAP.

Criblage de composés thérapeutiques à haut débit

Les composés thérapeutiques utilisés sont issus de la banque de molécules épigénétiques SelleckChem : Epigenetics Compound Library (96-well)-Z203065-100 uL-L1900. La liste des composés est indiquée dans le tableau 4 de l'annexe. Les composés sont dilués à une concentration de 1 mM dans du DMSO ou de l'eau et stockés à -80°C. Pour le traitement, les cellules A549 ont étéensemencées à 10 000 cellules par puit dans des plaques de 96 puits à fond plat SARSTEDT. Le lendemain, 2 µl des 181 composés épigénétiques ont été ajoutés dans les puits pour une concentration finale de 10 µM.

Après 48 heures de traitement, les cellules ont été trypsinisées puis les viabilités ont été mesurées avec le ViaCount comme précédemment décrit. Des cellules traitées 48 h avec de la puromycine (20 ng/ml), de l'eau ou du DMSO ont été utilisées comme contrôle.

L'ajout des composés dans les sphéroïdes a été effectué au jour 22 puis la viabilité a été mesurée au jour 24 après la trypsinisation individuelle des sphéroïdes. La manipulation des plaques de sphéroïdes a été effectué avec la pipette automatisée INTEGRA VIAFLO96™.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad. Une analyse de Variance One-Way, Two-way ANOVA et des comparaisons multiples ont été effectuées pour vérifier la

significativité des résultats observés. Une analyse de composante principale (PCA) a été effectuée afin de déterminer le niveau de variabilité observé entre les différents réplicas. Cette analyse statistique multivariée place chaque réplica sur un diagramme à nuage de point. Les niveaux d'expression des différents métabolites d'un réplica sont regroupés dans une matrice et la variance générale des différents métabolites est ensuite calculée grâce à une transformation mathématique de la matrice. Chaque axe représente la variance générale (aussi appelée covariance) observée dans les niveaux de sécrétion des multiples métabolites analysés. Ceci permet de comparer le niveau de similarité des différents échantillons, deux points étant proche démontrant un haut niveau de similarité entre les échantillons. L'analyse PCA a été réalisée avec le logiciel MétaboAnalyst, qui permet de traiter les niveaux d'expression des métabolites afin de déterminer la similarité, les différences et la significativité des résultats métaboliques selon les différentes conditions de culture observées.

Chapitre 4 – Résultats

Les sphéroïdes ont été générés grâce à l'utilisation d'une plaque à faible adhérence, ce qui a permis l'amas et la compaction des cellules entre elles pour former le sphéroïde. Les cellules tumorales A549 ont d'abord été cultivées 3 jours en monoculture 3D. Ensuite, une étape de trypsine a été effectuée pour enlever les débris et les cellules mortes (Figure 1A).

Par la suite, nous avons ajouté des fibroblastes de poumon à différents ratios, dans l'objectif d'imiter la composante stromale du cancer du poumon chez le patient. Pour mieux comprendre l'impact des fibroblastes sur les sphéroïdes de cancer du poumon, nous avons utilisé différentes lignées de fibroblastes. Ces fibroblastes sont tous issus du poumon, au stade fœtal (HFL1 et MRC5), ou au stade de développement d'un enfant de 5 ans (LL24). Pour déterminer quelle lignée cellulaire sera utilisée pour la suite de nos expériences, nous avons mesuré la compaction du sphéroïde et le nombre de cellules totale après 7 jours de co-culture, dépendamment du type de fibroblaste, mais aussi du ratio utilisé des fibroblastes avec les cellules tumorales.

1) Choix de la lignée cellulaire de fibroblastes

En Figure 1B, nous pouvons remarquer la différence de taille entre le sphéroïde de monoculture A549 et le sphéroïde de monoculture de fibroblastes. En effet, en seulement 12h de culture en 3D, la monoculture de fibroblastes présente une taille 4 fois plus petite que le contrôle de monoculture A549. Le sphéroïde de fibroblastes restera à la même taille de 0.5 mm^2 jusqu'à la fin de la culture 3D de 7 jours. Cette observation s'applique pour les monocultures de fibroblastes des 3 différentes lignées utilisées (Figure 1C, D-E).

Le ratio de 50% de fibroblastes présente, après 12h de culture, une taille inférieure au contrôle de monoculture A549 comme montré par l'image en Figure 1.B et les courbes de l'aire du sphéroïde (Figure 1C, D-E). Les sphéroïdes de ratio 50% présente une taille 2 fois plus petite que le contrôle A549 pour les fibroblastes HFL1 (Figure 1C, Panel du milieu) tandis que les fibroblastes LL24 et MRC-5 ont un sphéroïde de ratio 50% 4 fois plus petit que le contrôle de monoculture A549 (Figure 1D-E, Panel du milieu).

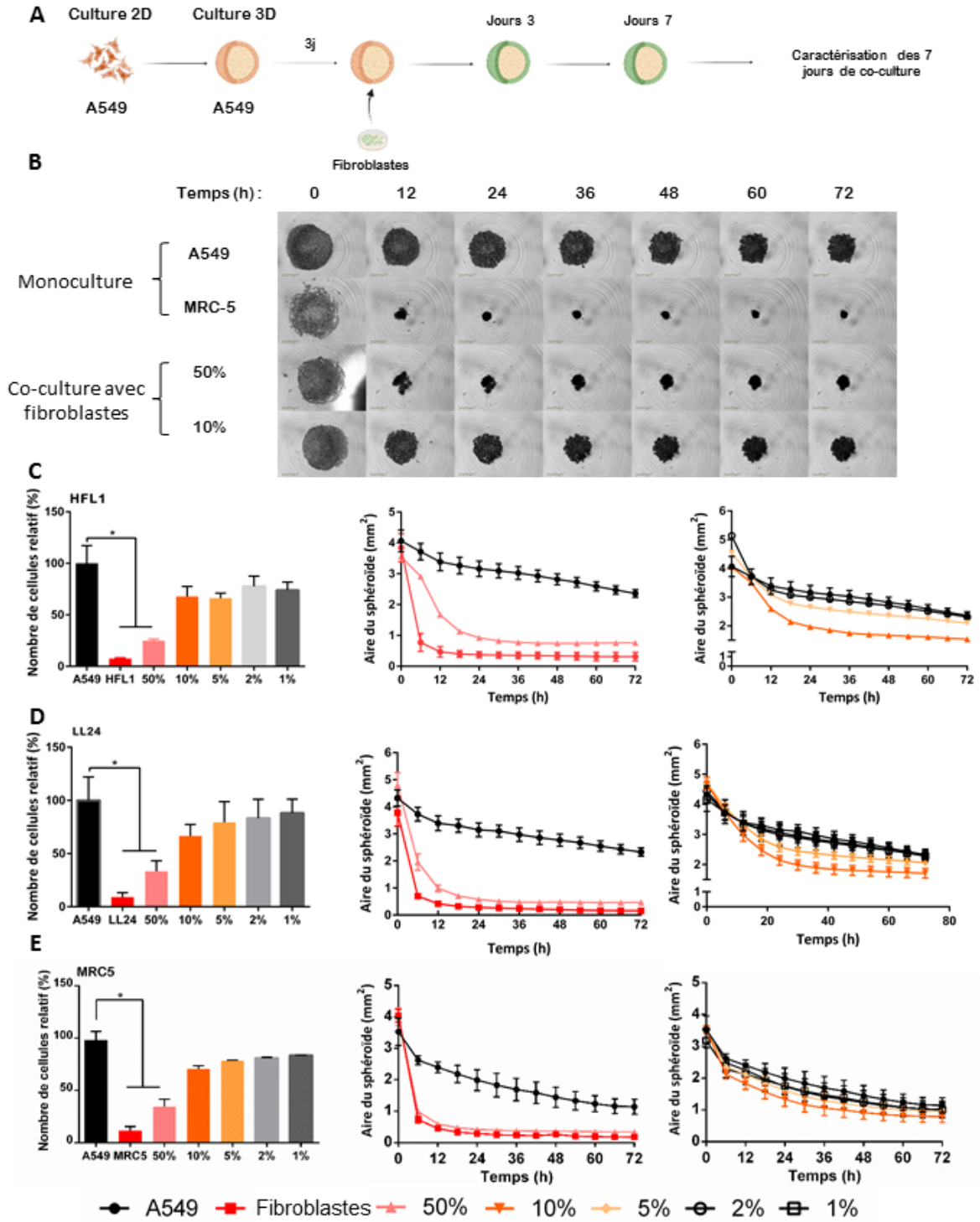


Figure 1. – Caractérisation du modèle de co-culture 3D selon la lignée de fibroblastes

A. Schéma explicatif du modèle de co-culture 3D **B.** Acquisition d'images sur 72h des sphéroïdes de monoculture A549, MRC-5 et les ratios de co-culture 50% et 10%, prises d'images à l'Incucyte, Objectif 4x **C.D.E** Nombre relatifs de cellules par sphéroïde, normalisé sur la monoculture A549 à 7 jours et compaction des sphéroïdes sur 72h mesurée à l'Incucyte avec les fibroblastes HFL1 (**C**), LL24 (**D**) et MRC-5 (**E**).

Pour les conditions avec moins de 50 % de fibroblastes dans le sphéroïde (10%, 5%, 2% et 1%), la taille suit la tendance du contrôle de monoculture A549 (Figure 1**C, D-E**, Panel de droite). Il semble aussi il y avoir un impact du nombre de fibroblastes sur la taille du sphéroïde. En effet, plus les ratios de fibroblastes sont importants, plus la taille du sphéroïde est petite (Figure 1**C, D-E** Panel de droite). Ceci est d'autant plus vrai pour le ratio de 50% de fibroblaste et la condition de monoculture de fibroblastes (Figure 1**C, D-E**, Panel du milieu).

Le nombre de cellules est significativement inférieur au contrôle de monoculture pour les ratios de 50% et la monoculture de fibroblastes (Figure 1**C, D-E**, Panel de gauche). On observe cette diminution dans les 3 lignées de fibroblastes utilisés. Cette différence dans le nombre de cellules du sphéroïde corrèle avec la différence de taille discutée précédemment. On peut donc penser que la diminution drastique de la taille pour ces conditions est causée par une perte et une mort des fibroblastes au sein du sphéroïde. Pour les conditions avec des ratios en dessous de 50%, on ne retrouve pas de différences significatives dans le nombre de cellules après 7 jours de co-culture (Figure 1**C, D-E**, Panel de gauche). On retrouve néanmoins la tendance observée dans les tailles des sphéroïdes : plus il y a de fibroblastes, plus le sphéroïde tends à avoir moins de cellules en comparaison au contrôle après 7 jours de co-culture.

La co-culture avec les cellules MRC-5 présente peu de variabilité dans le nombre de cellules après 7 jours en comparaison aux autres lignées de fibroblastes ou les écarts-types sont plus importants. La courbe de taille du sphéroïde est aussi plus similaire au contrôle en comparaison aux autres lignées de fibroblastes. Afin d'avoir un modèle le plus viable et le plus reproductif possible, nous avons choisi de continuer la caractérisation de notre modèle de co-culture avec les fibroblastes MRC-5.

2) Établissement de la proportion cellulaire de fibroblastes en co-culture monocouche et sphéroïde

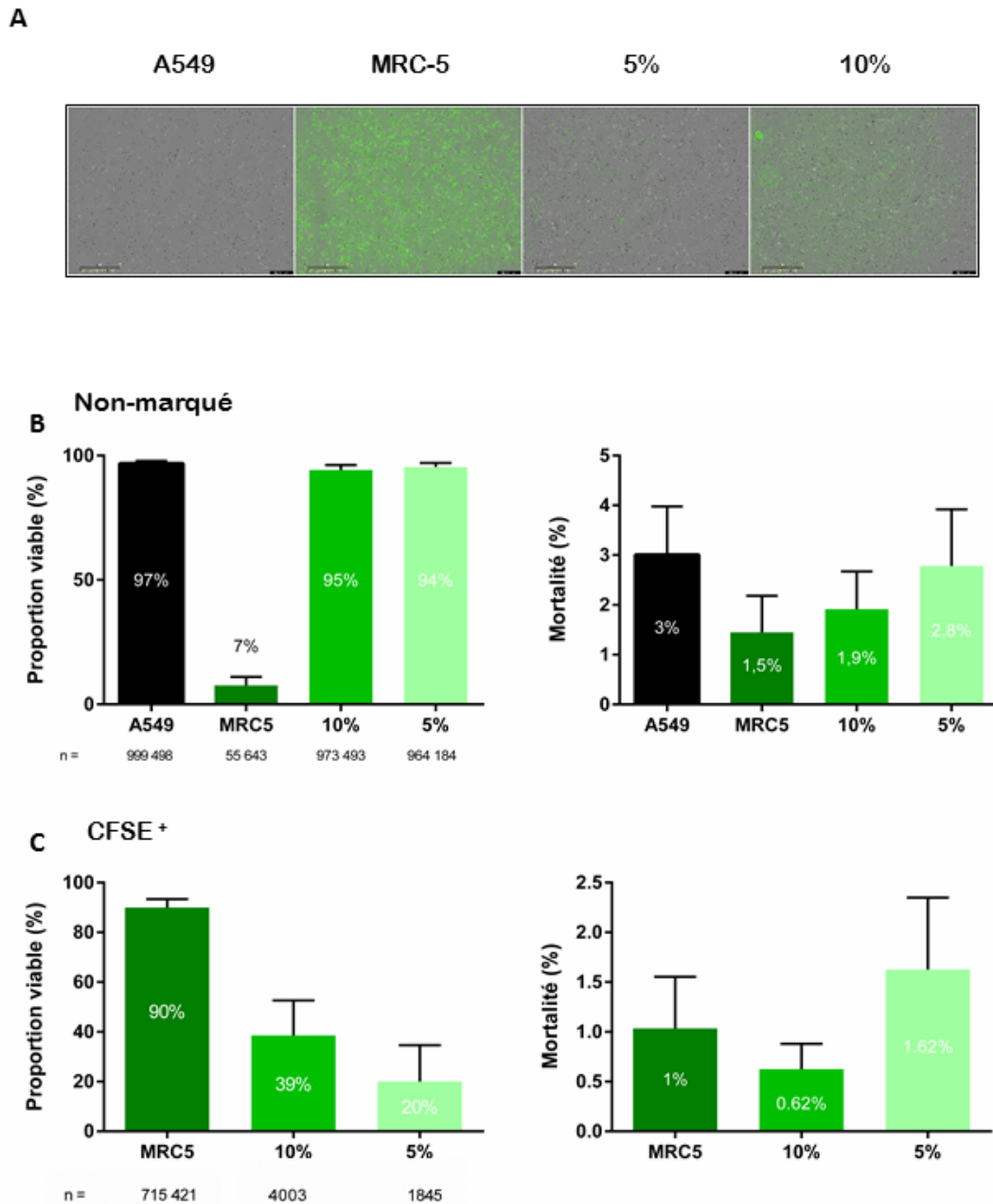


Figure 2. – Modèle de co-culture en 2D avec cellules tumorales A549 et fibroblastes MRC-5 marquées au CFSE

A. Images de co-culture 2D des cellules A549 et MRC-5 marquées au CFSE (CFSE⁺) à 24h, Acquisition à l'Incucyte, Objectif 4x, l'échelle mesure 1 millimètre (**B.C**) Mesure de viabilité (Panel de gauche) et mortalité (panel de droite) au PI (Iodure de Propidium) des cellules non-marquées (**B**) et des cellules MRC-5 CFSE+ (**C**) acquis au FACS GUAVA 6HT-2L. Le nombre de cellules total est indiqué en dessous de l'axe des abscisses (n). Les expériences ont été effectuées 3 fois (n=3)

Les MRC-5 ont été choisis comme lignée de fibroblastes pour notre modèle de co-culture. Nous avons dans un premier temps déterminé les proportions cellulaires de chaque type de cellules dans un modèle de co-culture 2D. Pour ce faire, nous avons marqué les fibroblastes au CFSE afin de pouvoir discerner les deux types de populations cellulaires. En Figure **2A**, nous pouvons observer la co-culture en 2D des A549 et des MRC-5 marquées au CFSE. La monoculture de cellules A549 ne présente pas de cellules qui fluorescent dans le vert. À l'inverse, la monoculture de MRC-5 CFSE possède une forte fluorescence, qui s'observe aussi dans le surnageant des cellules. Ces observations suggèrent que le fluorophore CFSE peut sortir et se retrouver sous sa forme libre dans le surnageant. On peut en déduire que certaines cellules marquées au CFSE peuvent perdre leur marquage avec le temps de culture. Cette perte de marquage du CFSE peut être causée par la division cellulaire des fibroblastes où le fluorophore peut être clivé, en plus d'être réparti dans les 2 cellules filles et ainsi diviser sa concentration et son signal fluorescent de moitié. Le signal fluorescent du CFSE peut aussi diminuer dans les cellules avec l'apparition de cellules apoptotiques avec une intégrité membranaire affectée, ce qui peut causer la fuite du fluorophore à l'extérieur de la cellule.

Nous avons par la suite mesuré la proportion de cellules marquées ou non-marquées après 5 jours de co-culture en 2D. Nous avons aussi déterminé la viabilité des différentes lignées cellulaires avec l'iodure de propidium, qui est un marqueur fluorescent rouge marquant les cellules mortes et apoptotiques. On peut observer que pour la monoculture A549, nous observons une bonne viabilité avec 97% de cellules viables (Figure **2B**). Pour la condition de monoculture MRC-5 CFSE, on retrouve 7% des cellules qui sont viables mais qui ne présentent plus de marquage CFSE. Enfin, en co-culture, pour la condition avec 5 ou 10 % de cellules MRC-5 CFSE⁺, on retrouve une viabilité des cellules non marquées de respectivement 94 et 95%. On retrouve néanmoins 20 000 cellules

A549 en moins dans les conditions de co-culture en comparaison au contrôle A549. La mortalité, quant à elle, diffère avec 1.9% de cellules non marqués mortes pour la condition 10% contre 2.8% de cellules mortes pour la condition à 5% de MRC-5 CFSE⁺ (Figure **2B**). La mortalité du contrôle de monoculture A549 s'élève à 3%. On observe aussi 1.5% des cellules MRC-5 qui n'ont plus de marquage CFSE mais présente un marquage au PI (Figure **2B**).

Pour les cellules marquées au CFSE, on retrouve 90% des cellules MRC-CFSE qui sont viables avec 1% de mortalité (Figure **2C**). Pour la condition avec 10% de cellules marquées, on retrouve après 5 jours seulement 40% de la population de MRC-5 CFSE d'origine viable. Ceci correspond à 4 003 cellules MRC-5 viables sur les 10 000 cellules qui avaient initialement été mis dans les puits. (Figure **2C**) Pour la condition avec 5% de MRC-5 CFSE, on retrouve seulement 20% des cellules initialement mises en culture après 5 jours de co-culture. Ceci correspond à 1 845 cellules sur les 5 000 cellules initialement mises en culture. Ceci peut être expliqué par la capacité proliférative accrue des cellules tumorales en comparaison aux fibroblastes. Enfin on observe une mortalité de 0.62% des cellules marquées CFSE pour la condition 10% contre 1.62% pour la condition de 5%.

Ces résultats nous montrent que 7% des cellules marquées en 2D perdent leur marquage après 5 jours de culture (Figure **2B**). Les conditions de co-culture démontrent aussi une diminution du nombre de fibroblastes dans les puits en comparaison au nombre de fibroblastes initialement mis en culture (Figure **2C**). On peut aussi affirmer que la présence de fibroblastes dans la culture n'impact pas de manière significative la viabilité des cellules A549. Il semble même il y avoir une tendance à la baisse du taux de mortalité des A549 en présence de fibroblastes (Figure **2B**). Il n'y a pas non plus de différences entre les conditions 5% et 10% quand on regarde la viabilité du compartiment tumoral. Le ratio de 10% démontre une mortalité légèrement plus faible dans les deux compartiments. On peut donc penser qu'il y a un intérêt à continuer l'établissement du modèle de co-culture avec la condition de 10% de fibroblastes afin d'optimiser les conditions de culture et de viabilité du modèle. Ces résultats concordent avec la proportion de fibroblastes retrouvée chez les patients atteints de cancer du poumon. (Figure Annexe 1)

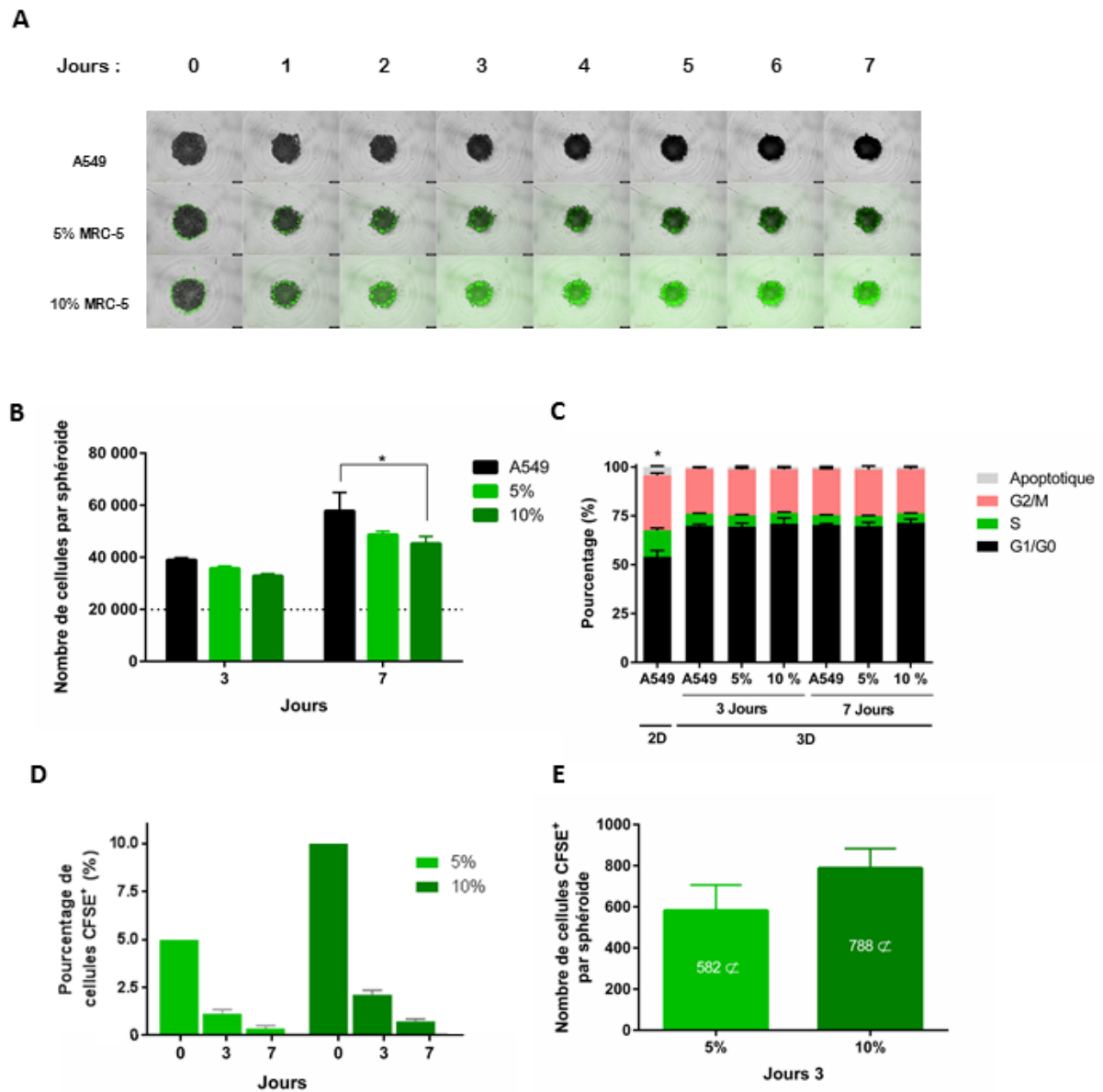


Figure 3. – Étude de la proportion de fibroblastes MRC-5 CFSE⁺, dans le modèle de co-culture sphéroïde sur 7 jours

A. Panel de photos acquis à chaque 24h à l'Incucyte, objectif 4x. Les fibroblastes MRC-5 sont marqués au CFSE (CFSE⁺) **B.** Nombre de cellules total par sphéroïde après 3 et 7 jours de co-culture. **C.** Proportion des phases du cycle cellulaire selon les ratios et les temps de co-culture. **D.** Proportion et nombre (**E**) de cellules marquées au CFSE après 3 jours et 7 jours de co-

culture. Test t de comparaison multiple avec analyse ANOVA One-WayTest (**B**) et ANOVA Two-Way (**C**), les phases S et G2/M du 2D sont statistiquement différentes des autres conditions
*p-value < 0.05, n =3.

Le modèle de co-culture 3D a par la suite été testé au vu des observations de la co-culture en 2D. Pour cela, nous avons utilisé des fibroblastes MRC-5 à un ratio de 5% et 10% que nous avons marqué au CFSE. Nous les avons par la suite ajoutés à des sphéroïdes de cellules A549 de 3 jours, l'ajout a été effectué 6h après le passage au jour 3 des sphéroïdes de monoculture A549.

Le marquage des fibroblastes au CFSE nous a permis de déterminer la disposition des fibroblastes au sein du sphéroïde ainsi que la proportion de cellules CFSE restante après 3 et 7 jours de co-culture. Les fibroblastes restent en périphérie du sphéroïde lorsque mis en co-culture. (Figure **3A**) Les fibroblastes s'agrègent aussi les uns aux autres, formant alors des groupes de fibroblastes tout autour du sphéroïde.

Le nombre de cellules a été mesuré au jour 3 et au jour 7, on retrouve notamment les sphéroïdes de monoculture à 40 000 cellules et 58 000 cellules respectivement au jour 3 et au jour 7. Les ratios de co-culture ne montrent pas de différences significatives au jour 3 avec 38 000 et 37 000 cellules respectivement pour les sphéroïdes de 5% et de 10% (Figure **3B**). Néanmoins, au jour 7, on remarque une différence significative entre le contrôle de monoculture à 58 000 cellules par sphéroïde et la condition de 10% de MRC-5 qui ne contient que 45 000 cellules. On peut donc penser que le taux de prolifération est diminué dans les conditions de co-culture, ce qui pourrait expliquer la tendance à la baisse pour les sphéroïdes de co-culture en comparaison au contrôle de monoculture.

Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la proportion des phases du cycle cellulaire pour les différentes conditions. Le contrôle utilisé est la culture de cellules A549 2D (Figure **3C**). On peut remarquer que les cellules en 2D ont 15% de cellules en phase S contre seulement 5% en moyenne pour les cellules issues de sphéroïdes. De la même manière, la culture en 3D présente plus de cellules en phase G0/G1 (65%) en comparaison à la culture 2D (50%). La phase G2/M est aussi plus importante pour les cellules en 2D (35%) par rapport aux cellules de sphéroïde (30%). On observe très peu de cellules apoptotiques dans les conditions en 3D et légèrement

plus de cellules apoptotiques dans les cellules 2D (2%). Ces résultats suggèrent que la prolifération est plus faible dans les cellules cultivées sous forme de sphéroïde en comparaison aux cellules issues de la culture en 2D. Les plus grandes proportions de la phase G1/G0 pour les sphéroïdes nous indique que les cellules se répliquent moins que les cellules en 2D. Les sphéroïdes ne montrent pas de différences dans les phases du cycle cellulaire si l'on compare les sphéroïdes de monoculture avec les sphéroïdes de co-culture. Les fibroblastes n'impactent donc pas la répartition des phases du cycle cellulaire dans notre modèle de co-culture en 3D.

Le nombre de fibroblastes a été suivi grâce au marquage CFSE au jour 3 et au jour 7 de la co-culture. (Figure 3D) On peut remarquer que le nombre de fibroblastes chute drastiquement en 3 jours. (Figure 3E) En effet, pour les sphéroïdes avec des fibroblastes, on retrouve au 3^{ème} jour respectivement 1,5% et 2,5% de fibroblastes pour les ratios de 5% et de 10% de fibroblastes. Ceci correspond à 582 fibroblastes restant dans le ratio de 5%, qui est inférieur aux 1000 fibroblastes mis en culture au temps 0. Pour le ratio de 10%, on retrouve au 3^{ème} jour 788 fibroblastes, ce qui est moins que les 2000 fibroblastes originalementensemencés. Au 7^{ème} jour, les fibroblastes ont presque totalement disparu, car on retrouve seulement 0.15% et 1% de fibroblastes pour les conditions de 5% et 10%.

Ces résultats nous indiquent que les sphéroïdes de co-culture ont une tendance à avoir nombre de cellules plus bas que la monoculture d'A549. Cette différence n'est pas explicable par un changement dans les phases du cycle cellulaire. Ceci peut être causé en partie par les fibroblastes qui ne perdurent pas au sein du sphéroïde. Le temps de demi-vie de ces derniers se trouve aux alentours de 3 jours. Il convient donc de trouver une solution pour maximiser l'imprégnation des cellules tumorales par les fibroblastes.

3) Caractérisation de la co-culture sphéroïde par rajout de fibroblastes

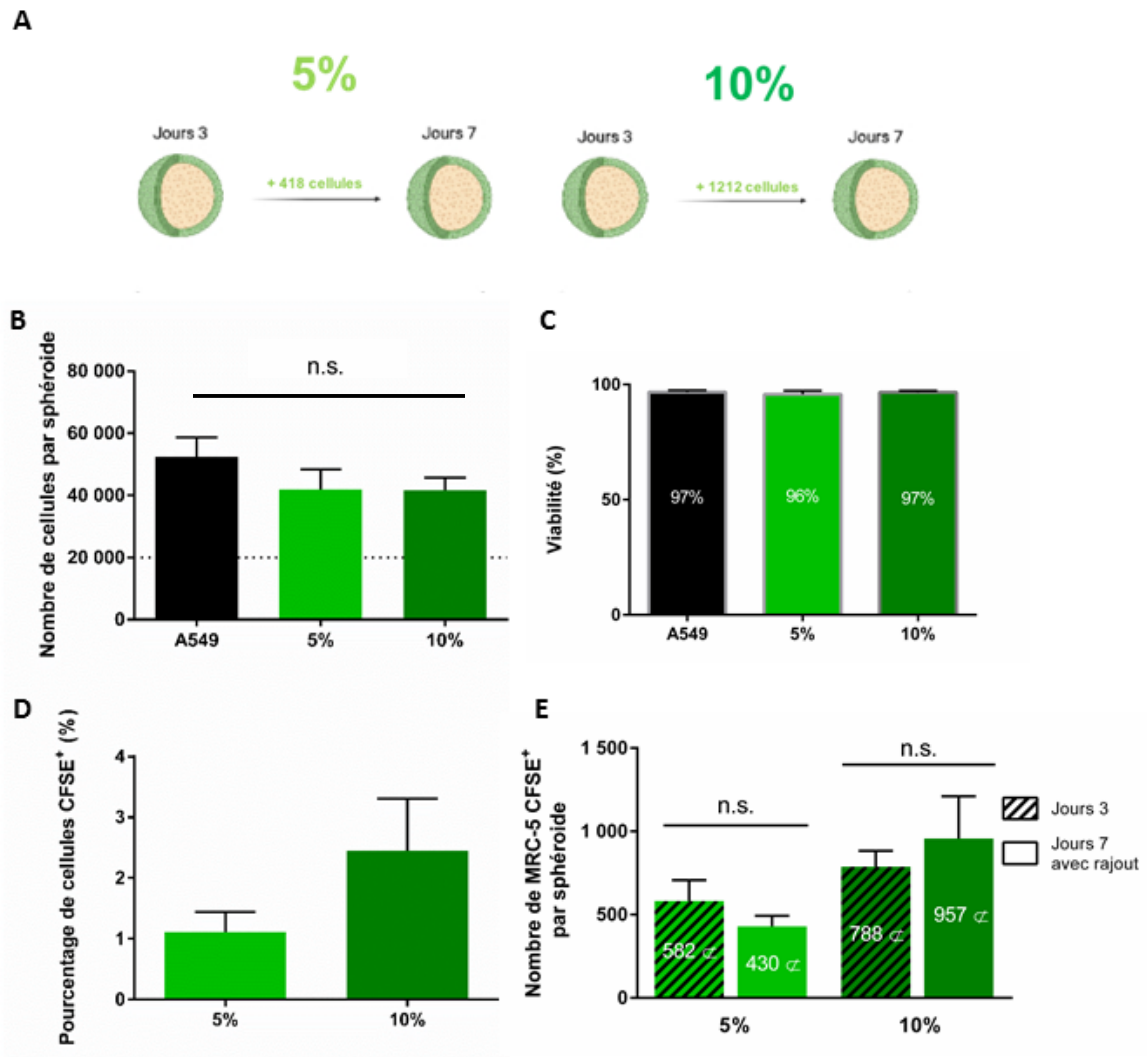


Figure 4. – Maintien du ratio de co-culture dans les sphéroïdes, par rajout de MRC-5 CFSE⁺ au 3^{ème} jour

A. Schéma explicatif du rajout de fibroblastes **B.** Nombre de cellules total après 7j de co-culture avec rajout de fibroblastes au 3^{ème} jour **C.** Mesure de viabilité au PI des cellules non-marquées A549 après 7j de culture en sphéroïde, acquis au FACS GUAVA 6HT-2L. **D.** Proportion après 7 jours et nombre (**E.**) des cellules MRC-5 CFSE⁺, acquis au FACS GUAVA 6HT-2L. Test ANOVA One-Way avec test t de comparaison multiple, "n.s." = non-significatif

La majorité des fibroblastes du sphéroïde de co-culture meurent en dessous de de 3 jours. Afin de maximiser la communication des fibroblastes avec les cellules cancéreuses, un rajout des fibroblastes est nécessaire. Ceci permettra d'optimiser le temps où les cellules A549 et les fibroblastes MRC-5 sont en contact au sein du sphéroïde. Avec les proportions de fibroblastes déterminés dans la **Figure 3**, nous pouvons estimer le nombre de MRC-5 à rajouter pour maintenir le nombre de fibroblastes à respectivement 1000 et 2000 cellules dans les sphéroïdes de 5% et 10% de co-culture. Dans ce nouveau modèle de co-culture avec rajout de fibroblastes au sphéroïde, nous rajoutons 418 cellules MRC-5 pour le ratio de 5% et 1212 cellules MRC-5 pour le ratio de 10% au 3^{ème} jour de co-culture (**Figure 4A**). Le marquage des fibroblastes au CFSE nous permet de suivre et de quantifier la proportion de cellules MRC-5 restantes au 7^{ème} jour de co-culture. Au 7^{ème} jour, le nombre de cellules total suit la même tendance que précédemment. On observe que les sphéroïdes de co-culture ont un nombre de cellules moins élevé que le contrôle de monoculture. (**Figure 4B**). Néanmoins, nous n'observons pas de différences dans la viabilité générale du sphéroïde (**Figure 4C**). Les sphéroïdes possèdent une viabilité de 97% pour la monoculture et le ratio de 10% de co-culture et le ratio de 5% a une viabilité à 96%. Ceci démontre que la population de cellules, et par extension le modèle de co-culture par rajout est viable et peut être utilisé pour optimiser le temps de co-culture entre les cellules tumorales A549 et les fibroblastes MRC-5. Après trypsinisation et passage au cytomètre en flux, nous avons déterminé la proportion de fibroblastes restant au 7^{ème} jour de co-culture (**Figure 4D**). Cette proportion s'élève à 1,5% pour la condition de 5% de co-culture et 2,5% pour la condition de 10% de fibroblastes. Lorsque nous appliquons ce pourcentage au nombre de cellules total déterminé, nous pouvons estimer le nombre de fibroblastes au 7^{ème} jour à 430 cellules et 957 cellules pour les conditions de 5% et 10% de cellules. Ceci corrèle avec le nombre de cellules observé au 3^{ème} jour de co-culture (**Figure 3E**). Ainsi, avec le modèle de rajout de fibroblastes, nous pouvons maintenir un nombre de fibroblaste constant au sein du sphéroïde.

Le rajout de fibroblastes tous les 3 jours dans les sphéroïdes nous permet de maintenir un nombre de fibroblastes stable dans le modèle de co-culture. Ce rajout de fibroblastes n'induit pas de changement de viabilité et du nombre de cellules total du sphéroïde après 7 jours de co-culture.

Cette technique de rajout cellulaire pourra par la suite utilisée pour générer des sphéroïdes de co-culture sur le long terme.

4) Mesure de l'expression des protéines et de la capacité migratoire du modèle de co-culture en sphéroïde

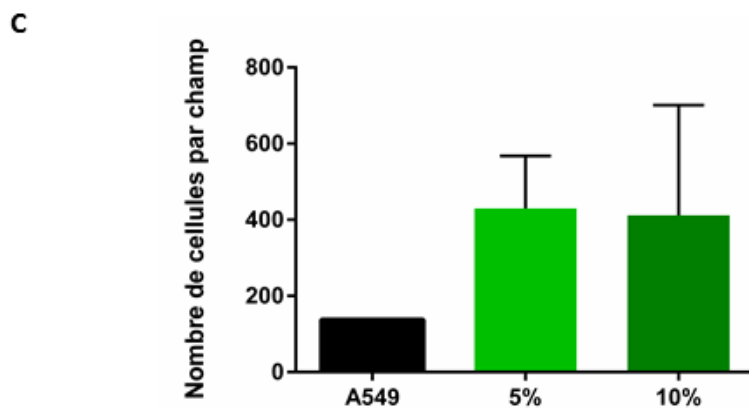
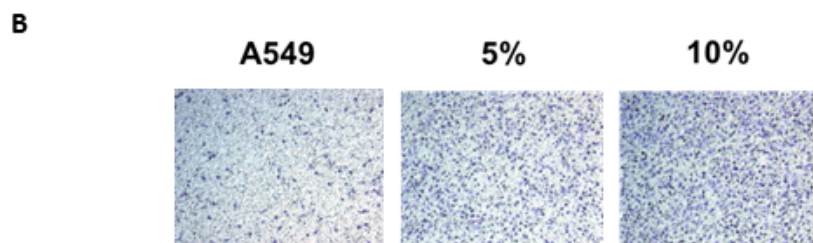
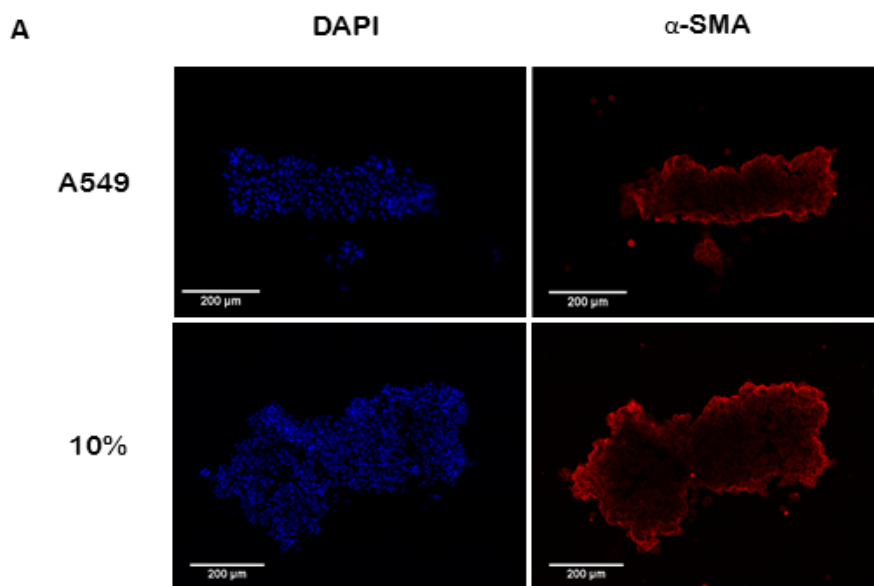


Figure 5. – Effet de la co-culture sur l'expression de la α -SMA et la capacité migratoire des cellules

A. Expression de la protéine α -SMA selon la condition de monoculture ou de co-culture avec 10% de fibroblastes au jour 7, microscope à fluorescence DMI-8, objectif 40x, Image reconstituée avec le logiciel LAS X ; échelle : 200 μ M. **B.** Images du filtre inférieur de la chambre de boyden, microscope optique, objectif 10x, après marquage des cellules au crystal violet **C.** Histogramme du nombre de cellules ayant traversé la chambre de boyden selon les conditions de co-culture au jour 10 (n=2)

Afin de mesurer si la co-culture de fibroblastes induit un phénotype distinct des cellules A549, des expériences d'immunofluorescence et de migration dans des chambres de Boyden ont été effectuées. La protéine α -SMA est une isoforme de l'actine qui est impliquée dans le remaniement du cytosquelette lors de la transition épithélio-mésenchymateuses (EMT). (216) De plus, cette protéine est aussi surexprimée dans les CAF en comparaison aux fibroblastes sains. (120) L'expression de cette protéine a donc été observée dans les sphéroïdes monoculture et de co-culture au Jour 10. (Figure 5.A) On peut remarquer que l'expression de la α -SMA est majoritairement située dans le pourtour du sphéroïde, quel que soit le type de culture 3D. Il n'y pas non plus de différence notable dans l'intensité de fluorescence de la protéine dans la co-culture en comparaison à la monoculture. La présence de fibroblastes n'induit donc pas une augmentation de la α -SMA après 10 jours de co-culture.

Pour caractériser la capacité migratoire des cellules issues de sphéroïde, nous avons par la suite effectué des essais de migration dans des chambres de Boyden au jour 10 de culture 3D. Les cellules ont été placées dans la chambre supérieure et la partie inférieure a été remplie avec du milieu contenant 20% de FBS afin de mesurer la réponse chimiotactique des cellules au gradient de FBS. Après 24h de migration, les filtres ont été récupérés et marqués au Crystal Violet afin d'observer et de compter les cellules ayant traversé le filtre. (Figure 5.B) Pour les sphéroïdes de monoculture, on retrouve en moyenne 200 cellules qui traversent le filtre par champ tandis que les conditions de co-culture présentent 400 cellules ayant traversé le filtre par champ, soit le double en comparaison au control de monoculture. (Figure 5.C) Il n'y a pas de différence entre la condition avec 5% de fibroblastes ou avec 10%. Néanmoins, ces résultats prouvent que les cellules

A549 ayant été cultivées avec des fibroblastes dans des sphéroïdes possèdent une meilleure capacité à migrer et à suivre des gradients chimiotactiques.

Il y a donc un changement dans le phénotype migratoire lorsque les cellules sont issues de la co-culture en comparaison au contrôle. Ce changement n'est pas observé dans le niveau global de α -SMA, néanmoins, un co-marquage avec un marqueur spécifique des fibroblastes serait pertinent afin de déterminer si l'expression de cette protéine est retrouvée autour des cellules de fibroblastes des cellules mais peut être causé par l'augmentation de certains facteurs de transcription ou des chimiokines qui altèrent le comportement des cellules migratoires vers un phénotype plus invasif.

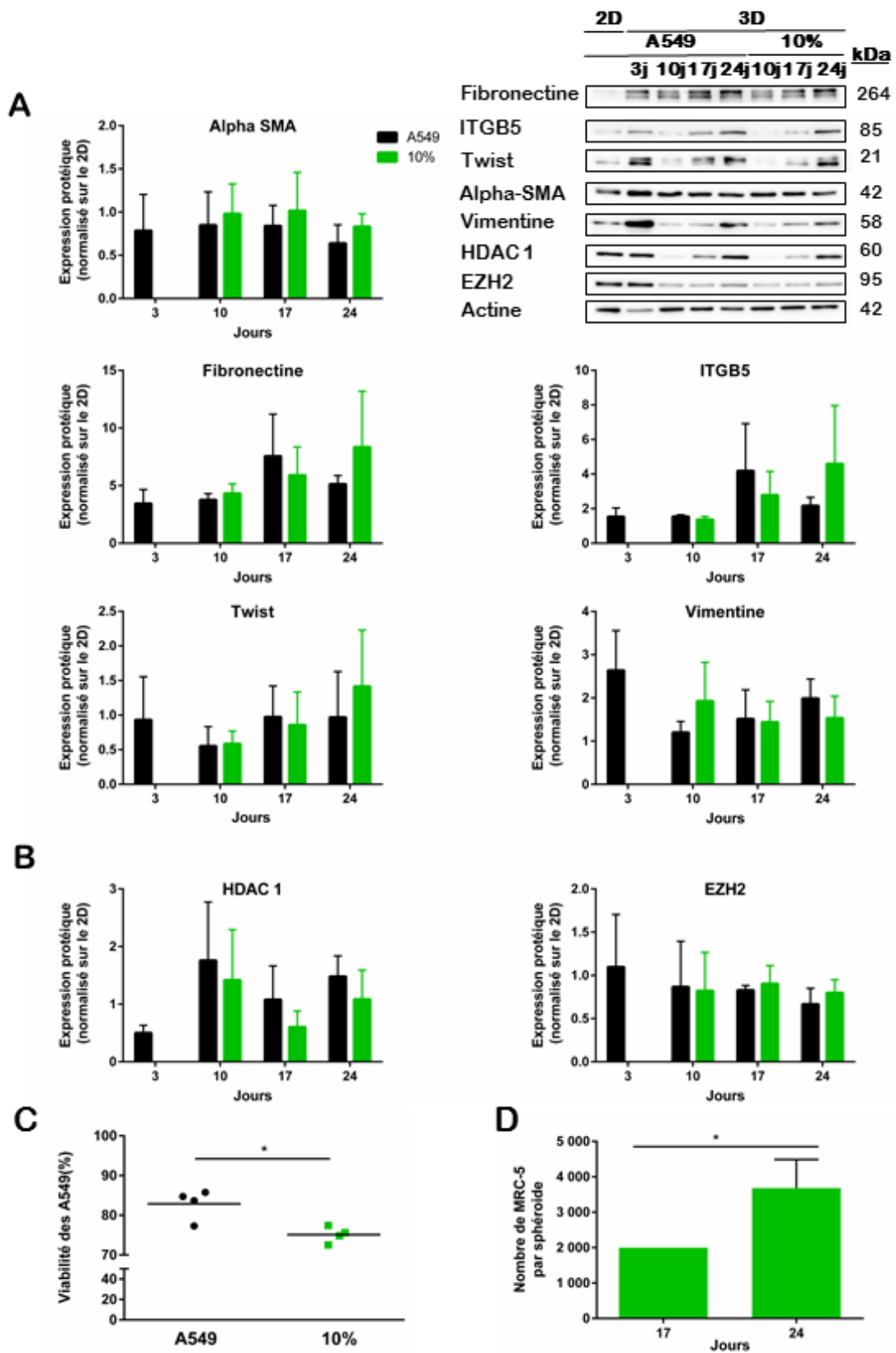


Figure 6. – Analyse des niveaux d'expression protéiques liés à la régulation épigénétique et à la matrice extracellulaire, induit par la co-culture à long terme de sphéroïdes

A. Expression des protéines liées à la matrice extracellulaire , par expérience de Western blot, niveaux des protéines normalisé sur l'actine et le 2D **B.** Expression des protéines liées à la régulation épigénétique , par expérience de Western blot, niveaux des protéines normalisé sur l'actine et le 2D **C.** Viabilité des cellules A549 au 24^{ème} jour mesuré au PI avec le GUAVA 6HT-2L **D.** Nombre de cellules MRC5-CFSE⁺ par sphéroïde au 24^{ème} jour de co-culture long terme avec rajout. **(A-B)** Pas de significativité des résultats avec les tests de comparaison multiple et ANNOVA Two-way **(C)** Test-t; *p-value = 0.0304 **(D)** Test-t; *p-value = 0.0413 ≤ 0.05

Les cellules A549 issues de la co-culture possèdent donc un phénotype migratoire plus élevé en 10 jours de co-culture. Des expériences de séquençage de l'ARN de notre laboratoire ont récemment démontré que la culture 3D des A549 impactait de nombreux gènes impliqués dans la migration, l'organisation de la matrice extracellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce séquençage soulignait aussi la pertinence de prolonger la culture 3D des sphéroïdes jusqu'à une période de 24 jours afin d'accentuer cette maturation du sphéroïde. Au vu de ces résultats, nous avons donc décidé de faire perdurer notre modèle de co-culture sur 24 jours afin d'observer si, dans un contexte de culture avec des fibroblastes, nous observons ce même changement de l'expression des gènes. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de co-culture avec rajout de fibroblastes tous les 3 jours durant une période de 24 jours. Des expériences de Western Blot ont par la suite été effectuées sur les cellules en 2D ainsi qu'à 3, 10, 17 et 24 jours de culture en sphéroïde en monoculture et en co-culture. (Figure 6.) Les valeurs d'expression des conditions ont ensuite été normalisées sur le contrôle d'actine puis sur la condition en 2D afin d'observer si des changements notables ont été induit par la culture sous forme de sphéroïde.

Nous avons dans un premier temps quantifié l'expression de la α -SMA, cette protéine ne présente pas de différence en comparaison au 2D et possède des valeurs d'expression aux alentours de 0.8 lorsque normalisé sur le 2D. Ceci valide les expériences d'immunofluorescence qui n'ont pas démontré de différences dans les intensités de fluorescence des coupes au Jour 10. (Figure 6A)

Une autre protéine du cytosquelette a aussi été caractérisée, la vimentine, cette protéine est retrouvée surexprimée dans les cellules invasives des patients atteints de CPNPC et corrèle avec un mauvais pronostic. (217)

C'est une protéine de la famille des filaments intermédiaires de type III et l'inactivation de cette dernière dans des cellules de cancer du poumon induit une capacité migratoire diminuée des cellules. (218)

Cette protéine est augmentée de l'ordre de 2,5 fois sa valeur en 2D après 3 jours de culture 3D. Au jour 10, la co-culture présente une augmentation de 2 fois la valeur du 2D tandis que la monoculture ne présente pas de différences avec le 2D. Pour le jour 17, la valeur d'expression de vimentine est autour de 1,2 fois la valeur du 2D et le jour 24 de monoculture présente une augmentation de 2 fois la valeur du 2D contre une augmentation de 1,5 pour la co-culture. Cette protéine semble donc jouer un rôle le comportement des cellules dans le début de la culture 3D aux alentours du jour 10. (Figure 6A)

Par la suite, l'expression de la fibronectine, une protéine impliquée dans l'interaction avec la matrice extracellulaire, et son récepteur cellulaire, l'intégrine Beta 5 (ITGB5) ont été mesurées. Ces protéines sont impliquées dans le caractère invasif des cellules cancéreuses *in vitro* et chez certains patients atteints de CPNPC.(219-221)

En seulement 3 jours de culture 2D, nous pouvons observer une augmentation de l'expression de la fibronectine de l'ordre de 4 en comparaison au 2D. Le fibronectine reste au même niveau au jour 10 puis augmente aux alentours de 8 fois la valeur du 2D au jour 17. Au jour 24, la fibronectine est exprimée environ 8 fois plus que le 2D pour la condition de co-culture tandis que la monoculture démontre un ratio qui redescend aux alentours de 5 fois la valeur du 2D. (Figure 6A)

Le récepteur de cette molécule, l'ITGB5 et impliqué dans la cascade signalétique menant à un caractère plus invasif des cellules. ITGB5 ne démontrent pas de différence avec le 2D au jour 3 et 10. Par la suite, on observe une augmentation d'ITGB5 au jour 17 de 4 fois le niveau du 2D pour la monoculture et de 3 fois le niveau du 2D pour la co-culture. Au jour 24, les niveaux d'ITGB5 sont de 2 fois plus élevés que le 2D pour la monoculture et 5 fois les niveaux du 2D pour la condition de co-culture. Ces augmentations du récepteur peuvent être expliquées par l'augmentation du ligand associé qui est la fibronectine. La culture 3D induit donc une

augmentation de fibronectine et de son ligand ITGB5, cette augmentation semble se produire avec le temps de culture passé en 3D. L'augmentation d'expression de ces protéines semble aussi être accentuée par la présence de fibroblastes dans le sphéroïde au jour 24. (Figure **6A**)

Le facteur de transcription TWIST est un facteur largement étudié car il est impliqué dans l'EMT des cellules cancéreuses, mais aussi dans le mécanisme de dédifférenciation des cellules cancéreuses souches.(216, 222)

L'expression de TWIST est similaire au 2D pour le jour 3, puis le ratio d'expression diminue à 0,5 fois le niveau du 2D au jour 3, avant de remonter à des niveaux similaires au 2D pour le jour 17. Enfin au jour 24, l'expression de TWIST est augmentée de 1,3 fois le niveau du 2D pour la co-culture tandis que les niveaux de TWIST pour la monoculture restent similaires au 2D. Ces résultats suggèrent que les fibroblastes peuvent induire une faible augmentation des niveaux de TWIST pour la co-culture long terme de 24 jours mais que cette expression ne s'observe pas dans les jours précédents. (Figure **6A**)

Certains facteurs épigénétiques sont aussi importants pour la progression du cancer chez le patient comme les HDAC et la méthyltransférase EZH2.(58, 60, 61)

Les niveaux d'expression des enzymes de modifications épigénétiques HDAC1 et EZH2 ont donc été caractérisés dans notre modèle de co-culture long terme. L'Histone désacétylase HDAC1 a une expression diminuée de moitié au jour 3 de culture en comparaison au 2D. Les niveaux d'expression de HDAC1 augmentent par la suite à des niveaux 1,5 fois plus importants que le 2D au jour 10. Ces niveaux redescendent à des niveaux similaires au 2D au jour 17 avant d'augmenter encore de 1,5 au jour 24 de monoculture tandis que la co-culture ne présente pas de différence avec le 2D. (Figure **6.B**)

Les niveaux d'expression d'EZH2 au jour 3 sont similaires au 2D et par la suite, les temps de culture en 3D démontrent une faible diminution des niveaux d'expression d'EZH2 par rapport au 2D. (Figure **6.B**)

Ces informations nous indiquent qu'EZH2 ne varie pas lors de la culture des cellules en 3D mais que HDAC1 semble être impliqué dans la maturation du sphéroïde indépendamment de la présence ou non de fibroblastes.

Finalement nous avons caractérisé la proportion de fibroblastes restant au jour 24 ainsi que la viabilité des sphéroïdes de monoculture et de co-culture. (Figure 6.C) Nous pouvons observer une diminution significative de la viabilité de 7% dans les sphéroïdes de co-culture. Néanmoins, entre le jour 17 et le jour 24, le nombre de fibroblastes dans le sphéroïde est passé de 2 000 cellules à 3 682 cellules. Cette augmentation significative du nombre de fibroblastes entre le jour 17 et le jour 24 souligne l'intérêt d'effectuer une co-culture avec rajout de fibroblastes sur 24 jours, afin d'augmenter la viabilité et la survie des fibroblastes.

5) Analyse des métabolites sécrétés selon les conditions de culture

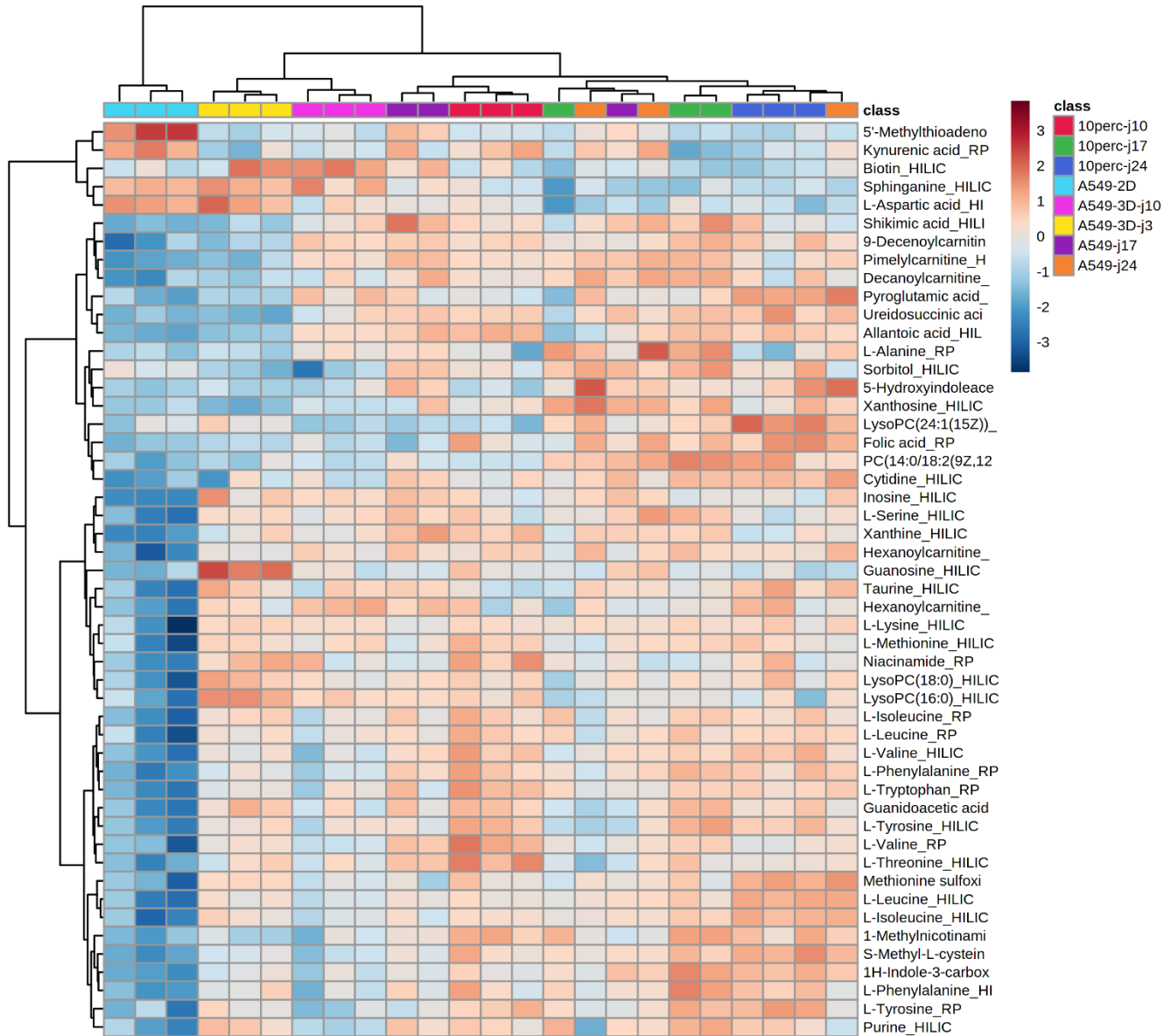


Figure 7. – HeatMap des métabolites produits par la monoculture 2D de cellules A549 ainsi que la monoculture et co-culture de sphéroïdes à différents temps de culture

Heatmap des 50 métabolites les plus différenciellement produits par la monoculture 2D de cellules A549 et les conditions de monoculture et de co-culture selon les temps de culture en 3D. Chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) et à phase inversée (RP) couplé à la spectrométrie de masse (LC-MS) du milieu issu de sphéroïde de monoculture et de co-culture au cours du temps. Les conditions sont regroupées selon l'analyse ANOVA (n=3). « A549 » est la

condition de monoculture, « 10perc » la condition de co-culture avec 10% de fibroblastes MRC-5 et les abréviations « j3 ; j10 ; j17 ; j24 » désigne les temps de culture sous forme de sphéroïdes au jour 3, 10, 17 et 24.

Pour mieux caractériser le modèle de co-culture long terme, nous avons aussi effectué une analyse des métabolites présents dans le milieu de ces cellules. Cette analyse a été effectuée avec une filtration du milieu sur une colonne hydrophile pour récupérer la majorité des métabolites et une filtration sur colonne à phase inversée a été effectuée pour récupérer les métabolites plus hydrophobes. Ces échantillons ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse et les différents pics ont été reliés aux métabolites correspondants.

Dans la **Figure 7**, nous pouvons observer les changements métaboliques de manière globale des 50 métabolites les plus différentiellement exprimés à travers les différentes conditions de culture. On peut remarquer dans un premier temps les faibles niveaux de la majorité des métabolites différentiellement exprimés dans la condition de culture 2D. Ceci signifie que ces métabolites sont plus consommés par les cellules en 2D et ainsi que les voies métaboliques associées sont plus actives en 2D. Le regroupement hiérarchique des conditions de culture par “cluster” nous renseigne aussi sur les différences métaboliques des différents jours et conditions de culture. On peut observer l’arbre de clustering dans la partie supérieure du Heatmap, les conditions de culture 2D sont dans un groupe à part des conditions de 3D. Par la suite, le second cluster est sous-divisé en 2 groupes : les sphéroïdes au jour 3 et 10 et les autres conditions de culture 3D. On peut donc distinguer les différents temps de culture selon leur signature métabolique. Au jour 24 pour la monoculture et la co-culture, on observe une diminution de la 5'-méthylthioadénosine (MTA), de la sphiganine et de l’acide aspartique.

- L’acide aspartique (aspartate) est un composé important pour de multiples voies métaboliques comme la synthèse protéique, le métabolisme des nucléotides, la glycolyse et le cycle de Krebs.(223) On remarque une plus grande consommation de l’acide aspartique en 3D. On peut donc inférer que les voies associées à l’aspartate sont aussi plus activées en 3D qu’en 2D.

- La sphiganine est un composé impliqué dans la voie de synthèse des céramides et ces derniers peuvent inhiber la prolifération cellulaire et induire l'apoptose des cellules cancéreuses. (224) On retrouve plus de sphiganine dans le milieu des cellules en 2D en comparaison au 3D. Ceci signifie que les cellules en 3D consomment plus de sphiganine. Cette dernière peut être convertie dans la cellule en un céramide qui impactera la survie cellulaire ou en sphingophospholipide 1 qui va améliorer la survie cellulaire.(225)
- MTA possède des propriétés anti-tumorales et l'accumulation de ce métabolite dans la cellule induit une inhibition des Enzymes méthyltransférase et plus précisément de la PRMT5 (« Protein Arginine méthyltransférase 5 »).(226)

MTA est normalement impliqué dans la production de méthionine et de purine à travers la catalyse de MTA par l'enzyme méthylthioadénosine phosphorylase (MTAP). La méthionine peut à son tour produire du MTA à travers le cycle de la méthionine et la conversion de l'intermédiaire S-adenosyl-méthionine (SAM).(227, 228)

Néanmoins, les cellules A549 sont déficientes en *MTAP* et ne peuvent pas catalyser la conversion de MTA en en adénosine et 5-méthylthioribose-1-phosphate, qui mènera en bout de ligne à la production de méthionine.(229)

Dans le contexte des cellules déficientes en *MTAP*, on peut observer une sensibilisation des cellules aux analogues toxiques des purines ainsi qu'à la déplétion de la méthionine.(228, 229) Ceci s'explique par leur capacité réduite à produire la méthionine et l'adénine. L'accumulation de MTA dans le milieu des cellules en 2D peut donc corrélérer avec des niveaux intracellulaires augmentés de MTA. Les niveaux de méthionine du milieu des 2D est aussi faible et ceci nous indique que l'activité du cycle de la méthionine est augmentée en 2D, en comparaison au 3D, où l'on retrouve des plus hauts niveaux de méthionine dans le milieu. Les sphéroïdes présentent moins de MTA et ceci peut être expliqué par une diminution de l'activité du cycle de la méthionine Ces informations nous indiquent que les cellules en 2D sont plus sensibles et dépendantes aux niveaux de méthionine et que ceci entraîne l'accumulation du MTA, menant à une plus grande sensibilité d'inhibition des enzymes méthyltransférase et PRMT5.

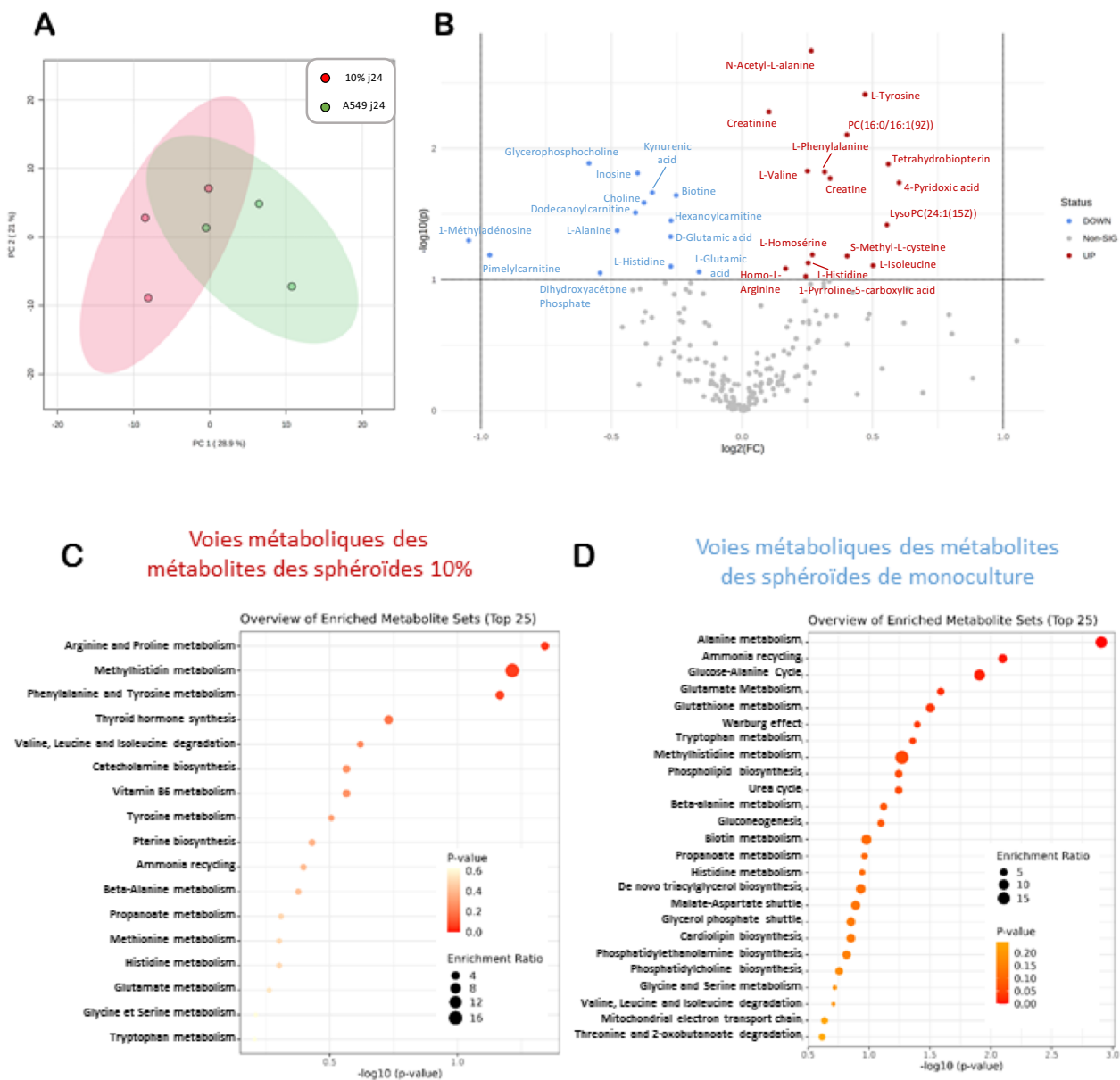


Figure 8. – Analyse différentielle des métabolites sécrétés par les sphéroïdes de monoculture et de co-culture et analyse d’enrichissement des voies métaboliques associées

A. Analyse de composante principale (PCA) des métabolites selon la condition de monoculture ou de co-culture 10% au 24^{ème} jour de culture 3D. **B.** Diagramme à Volcan des métabolites différemment produits par la monoculture et la co-culture **C.D** Classification selon la voie catabolique des métabolites différemment sécrétés par la monoculture (**C**) et la co-culture (**D**) au 24^{ème} jour de culture 3D (n=3).

L'analyse de composante principale (PCA) a été effectuée sur les sphéroïdes de monoculture et de co-culture au jour 24 afin de mettre en évidence la signature métabolique distincte des 2 conditions. (Figure **8A**) On peut en effet observer que les échantillons se regroupent en 2 différents clusters, sauf pour un réplicat de la monoculture et de la co-culture qui se chevauchent. Ces réplicats démontrent donc une similarité dans les voies métaboliques observées. Néanmoins, les groupes et les autres réplicats sont distincts selon la monoculture ou co-culture et prouvent la différence métabolique des conditions de culture.

Par la suite, une analyse de diagramme à volcan a été effectuée afin de distinguer quels sont les métabolites significativement présents dans le milieu des sphéroïdes de monoculture ou de co-culture. (Figure **8B**) Le seuil pour le changement d'ordre de grandeur (FC) est de 1 et signifie que les métabolites mis en évidence ont un changement de l'ordre de 1 ou plus dans la comparaison entre les conditions de culture. La valeur de p utilisée est 0,1 afin de pouvoir inclure certaines différences dans les métabolites qui auraient pu ne pas être pris en compte à cause de la variabilité d'un de réplicat dans les 2 groupes observés. Cette analyse de diagramme à volcan a mis en évidence 14 métabolites plus présents dans le milieu de la monoculture et 16 métabolites retrouvés à des plus hauts niveaux dans le milieu de la co-culture.

Ces métabolites ont ensuite été classés et analysés par une analyse d'enrichissement des voies métaboliques afin de déterminer quelles sont les voies métaboliques impactées par la présence ou l'absence de ces métabolites dans le milieu des sphéroïdes. (Liste, valeurs de FC et p en Annexe Tableau 4)

Dans les métabolites plus retrouvés dans le milieu de monoculture (Figure **8D**), on retrouve des métabolites associés significativement aux voies de l'effet Warburg, aux voies métaboliques de l'alanine, du glutamate, du glutathion et du tryptophan. Ceci nous indique que l'activité métabolique de ces voies est diminuée en monoculture en comparaison à la co-culture.

Dans les métabolites plus retrouvés dans le milieu de co-culture (Figure **8C**), on retrouve des métabolites associés significativement aux voies métaboliques de l'arginine et de la proline ainsi qu'au métabolisme de la proline et de la phénylalanine. La phénylalanine est un acide aminé essentiel qui ne peut être produit par la cellule, l'augmentation de ce dernier dans le milieu indique que les sphéroïdes de co-culture ont un besoin plus faible en phénylalanine par rapport

à la monoculture. Une récente étude a notamment associé l'augmentation des niveaux de phénylalanine sérique chez le patient comme étant un marqueur robuste du CPNPC. (230)

L'augmentation des métabolites associés aux voies métabolique de l'arginine et de la proline nous informe que le flux métabolique de ces voies est diminué et que l'activité et métabolites présents dans cette voie s'en retrouve diminué dans la co-culture avec des fibroblastes.

Le niacinamide, plus connu sous le nom de nicotinamide (NAM), est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires. Il est retrouvé augmenté environ 2,8 fois plus dans le milieu des cellules issues de co-culture. Sa valeur n'a pas été prise en compte de par le fait qu'un des répliquas de co-culture ne contient pas ou peu de ce métabolite. Mais cette molécule reste quand même une molécule d'intérêt de par ses propriétés. Cette molécule est une forme active de la vitamine B3 et sa structure chimique est dérivée de la pyridine. Dans un contexte d'une cellule saine, le nicotinamide sert de co-facteur et est un précurseur du NAD⁺, une molécule impliquée dans les voies énergétiques des cellules. NAD⁺ est aussi un substrat pour les enzymes Poly-ADP Ribose polymérase 1 (PARP1) et les Sirtuines, qui sont des histones désacétylases dépendantes du NAD⁺ tandis que les autres HDAC sont dépendantes du Zinc. (231, 232)

Les sirtuines composent la famille des HDACIII dans la classification des histones désacétylases.(233) De par sa similarité de structure avec le NAD⁺, le NAM est un inhibiteur des enzymes PARP1, Sirt1 et Sirt2.(232) Dans un contexte physiopathologique, le NAM augmente le flot sanguin et diminue les niveaux d'hypoxie de la tumeur, il agit donc comme un agent chimio- et radio-sensibilisateur. Cet effet peut notamment être expliqué par sa capacité à d'inhiber les polymérases poly(ADP-Ribose), enzymes qui sont impliquées dans la réparation des cassures d'ADN causée par la chimio- et la radio-thérapie.

Dans des études *in vivo* sur des souris atteintes de cancer de la vessie, le NAM a induit une inhibition de la croissance tumorale à travers une réexpression du gène suppresseur de tumeur RUNX3.(234)

De plus, des inhibiteurs de sirtuines dérivés du nicotinamide ont récemment été développés et ont démontré avoir un effet d'inhibition sur la prolifération de cellules cancéreuses du poumon comme les A549 dans un contexte *in vitro* tout comme dans des xénogreffes.(235) Ces études ont aussi mis en lumière une sensibilisation des cellules par le NAM lors des traitements au cisplatine.

De par ses propriétés chimiopréventive et de sensibilisation, le NAM est actuellement utilisé dans des phases d'études cliniques en combinaison avec des inhibiteurs d'EGFR (gefitinib et erlotinib).(236)

6) Mesure des cytokines et chimiokines sécrétées selon les conditions de culture

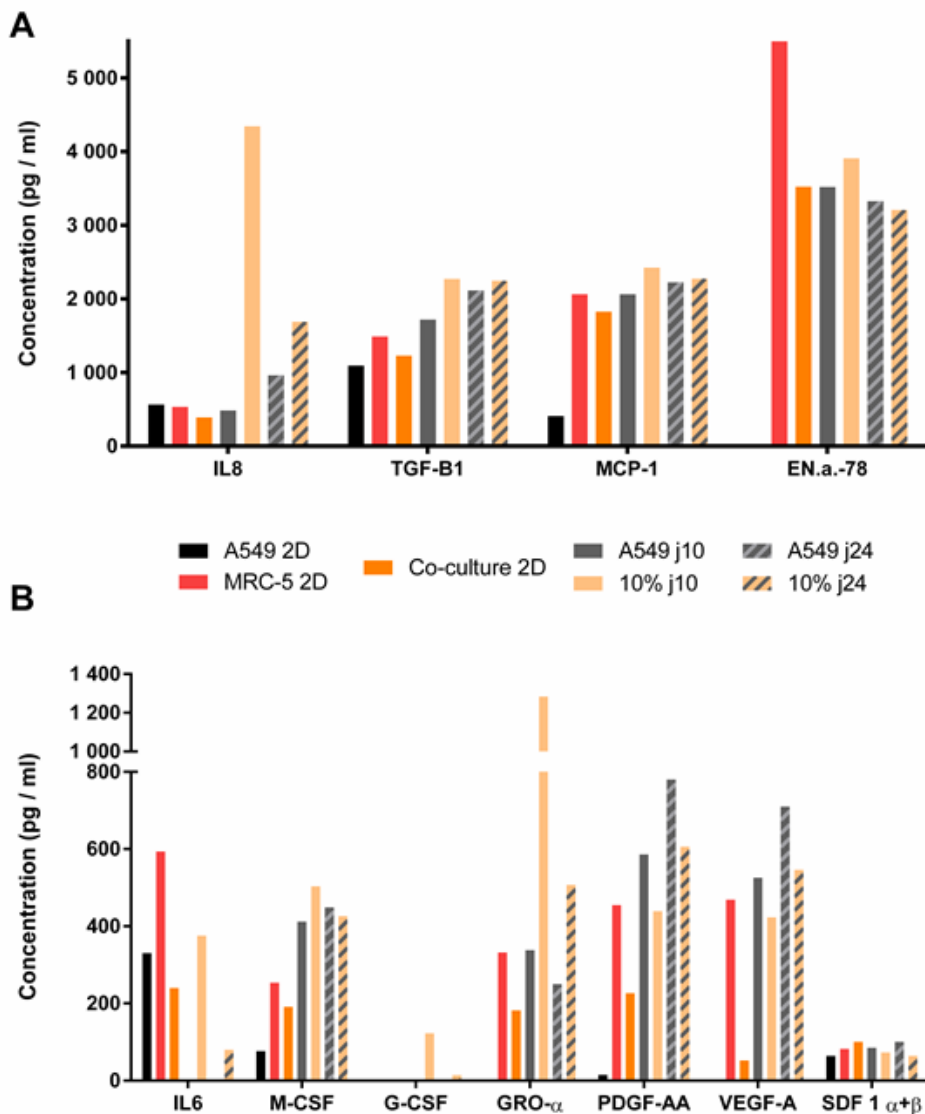


Figure 9. – Cytokines et chimiokines sécrétées par la co-culture et la monoculture en 2D et 3D

(A et B) Niveaux de sécrétion des cytokines avec des concentrations supérieures **(A)** et inférieures **(B)** à 1 000 pg/ml dans les différentes conditions de monoculture et de co-culture en 2D (A549, MRC-5 et 10%) et en 3D (j10 et j24) ; Mesure des cytokines par ELISA Luminex multiplexée ; (n=1). Nous avons ensuite effectué un essai ELISA sur le surnageant des sphéroïdes de monoculture et de co-culture afin de cribler les différentes cytokines et chimiokines présentes dans le milieu. Cette information nous permettra de caractériser la communication paracrine du modèle de 3D monoculture et de co-culture en comparaison au modèle 2D. Les cytokines avec une concentration de l'ordre du ng/ml ont d'abord été analysées. (Figure 9A) On peut remarquer une augmentation de l'Interleukine-8 (IL-8 ; CXCL8) à 4 ng/ml au jour 10 pour la co-culture tandis que la monoculture possède des niveaux d'IL-8 similaire au 2D autour de 500 pg/ml. Cette différence entre la monoculture et la co-culture est aussi présente au jour 24 où l'IL-8 est présente à une concentration de 1,8 ng/ml en co-culture mais est seulement à 1 ng/ml en monoculture. Ce qui reste 2 fois supérieur aux niveaux observés en 2D. L'IL-8 possède des propriétés angiogéniques et pro-inflammatoires et est retrouvée surexprimée chez certains patients atteints de CPNPC.(237)

Le TGF- β est aussi plus sécrété en 3D avec des niveaux aux alentours de 2 ng/ml en comparaison au 2D qui présente des concentrations aux alentours de 1 ng/ml. Cette molécule est impliquée dans de nombreux mécanismes de progression tumorale comme la prolifération, la survie des cellules tumorales mais aussi l'évasion immunitaire et la transition épithélio-mésenchymateuse. De la même manière, le MCP-1 (CCL2), est retrouvé à 300 pg/ml en monoculture 2D des cellules A549 tandis que les autres conditions présentent des niveaux de MCP-1 autour de 2 ng/ml. Notamment, la monoculture 2D de MRC-5 et la co-culture en 2D présentent les mêmes niveaux que les sphéroïdes de monoculture et de co-culture. Il est intéressant de noter que, dans le contexte 2D, la présence de seulement 10% de fibroblastes dans la culture permet d'induire des niveaux similaires à la monoculture de fibroblastes et aux conditions de culture 3D. Le MCP-1 a démontré induire l'agressivité des cellules de CPNPC dans des modèles *in vitro* en induisant l'expression de MMP-9. (238)

La molécule EN.a.78 (CXCL5) est une molécule chimiotactique qui permet le recrutement des neutrophiles au site de lésion dans un contexte physiologique. (239) Cette dernière est majoritairement produite par les fibroblastes comme nous pouvons le voir avec la monoculture de MRC-5 qui exprime plus de 5,5 ng/ml de cette molécule. La monoculture 2D de cellules A549 ne produit pas cette molécule tandis que les sphéroïdes possèdent des concentrations avoisinant les 3,5 ng/ml quel que soit la condition ou le temps de culture.

Le changement d'expression de ces molécules entre la culture 2D et la culture 3D soulignent bien le changement de sécrétome des cellules lorsque cultivées sous forme de sphéroïde. Ces changements d'expression de cytokine comme l'interleukine 8, le TGF β et le MCP-1 coïncident avec les augmentations retrouvées chez les patients.(240, 241) La culture 3D semble donc posséder un sécrétome plus similaire au sécrétome retrouvé chez les patients.

Nous avons aussi retrouvé certaines cytokines exprimées différemment entre le 2D et le 3D à des concentrations plus faibles, en dessous de l'ordre du ng/ml. (Figure **9B**) Par exemple, l'interleukine-6 (IL-6 ; INFB2) est exprimée en 2D à 300 pg/ml pour les A549 2D et 600 pg/ml pour les fibroblastes. Tandis que cette expression est abrogée pour les sphéroïdes de monoculture, elle est retrouvée à 400 pg/ml au jour 10 et faiblement au jour 24. Cette Interleukine présente un effet contexte-dépendant et peut favoriser ou perturber la progression tumorale.(242) Ceci démontre encore une fois le contexte de culture spécifique à la co-culture.

Le facteur de croissance M-CSF est plus exprimé en 3D en comparaison au 2D et peut participer à la maturation du modèle de culture sphéroïde. Le facteur de croissance granulocytaire (G-CSF) est aussi seulement retrouvé en co-culture 3D au jour 10.

Le facteur de croissance GRO- α ("Growth-Regulated Oncogene- α " ; CXCL1) est impliqué dans la croissance tumorale. On ne retrouve pas ce facteur dans la culture 2D d'A549 et il est exprimé par les MRC-5 en 2D à des concentrations de 400 pg/ml. En culture sphéroïde, on retrouve le GRO- α à respectivement 380 pg/ml et 200 pg/ml dans les sphéroïdes de monoculture de 10 j et 24j. De manière intéressante la co-culture en sphéroïde augmente la sécrétion de GRO- α à 1,2 ng/ml et 500 pg/ml pour les temps de culture respectifs de 10j et 24j. Cette molécule est donc pertinente dans la caractérisation de notre modèle car la présence de fibroblaste augmente la sécrétion de cette molécule pro-tumorale.

Le PDGF-AA est faiblement exprimé en 2D par les A549 et grandement exprimé par les MRC-5 en 2D. Néanmoins, dans la culture 3D, la monoculture sécrète plus de PDGF-AA que la co-culture avec 850 pg/ml de PDGF-AA présent dans la monoculture au jour 24 contre seulement 600 pg/ml pour la co-culture au jour 24.

Cette observation s'applique aussi pour le VEGF-A avec des sphéroïdes au jour 24 qui sécrètent 700 pg/ml en monoculture contre seulement 600 pg/ml pour la co-culture.

Le facteur chimiotactique SDF- α + β (CXCL12) ne présente pas de différences dans les différentes conditions avec des niveaux de sécrétion qui restent aux alentours de 50 pg/ml en 2D et 3D.

Ces résultats démontrent un changement dans les cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules tumorales lorsque cultivées sous forme 3D. On retrouve en effet une augmentation de certaines cytokines comme l'IL-8, TGF- β , MCP-1, M-CSF, GRO- α , PDGF-AA et VEGF-A dans les conditions de culture 3D. Ces molécules sont aussi sur-exprimées chez les patients atteints de CPNPC et sont utilisées comme marqueur d'agressivité et de faible pronostic de survie.(237, 243-246) Ces observations confirment donc la pertinence de la culture 3D dans l'objectif de mieux représenter la maladie *in vitro*. En effet, la culture 3D récapitule du moins en partie le sécrétome des cellules tumorales retrouvé chez le patient.

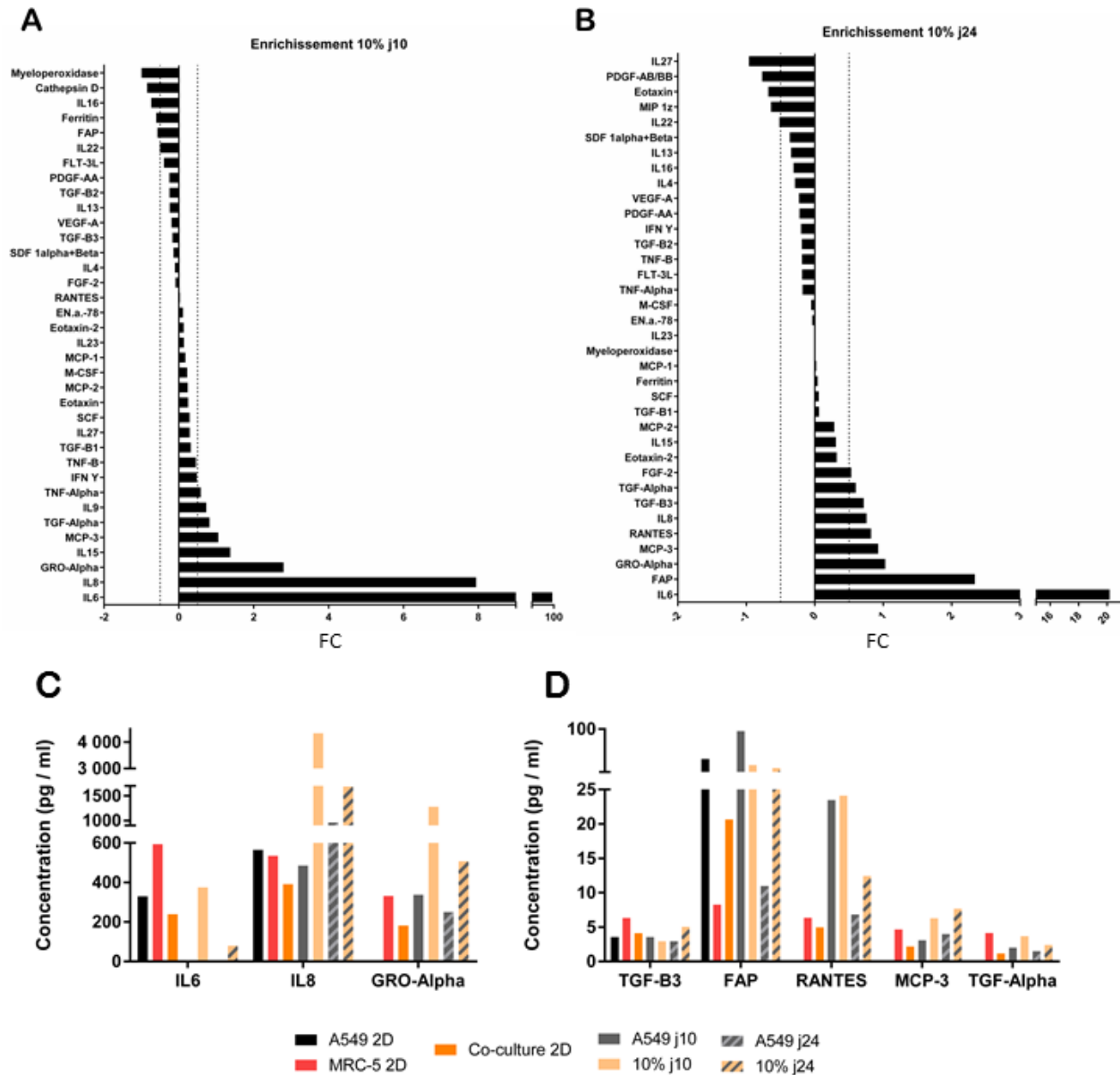


Figure 10. – Niveaux d’enrichissement des cytokines et chimiokines sécrétées différemment par les sphéroïdes de co-culture au jour 10 et au jour 24

(A et B) Analyse d'enrichissement (Fold change) des niveaux de cytokines sécrétées au jour 10 **(A)** et au jour 24 **(B)** pour les sphéroïdes de monoculture et de co-culture avec 10% de MRC-5. Les valeurs négatives indiquent un enrichissement dans la monoculture et des valeurs positives un enrichissement dans la co-culture **C.** Concentrations des cytokines avec le plus de différences entre les conditions pour les concentrations supérieures à 200 pg/ml **D.** Concentrations des

cytokines avec le plus de différences entre les conditions pour les concentrations inférieures à 200 pg/ml ; Mesure des cytokines par ELISA Luminex multiplexée ; (n=1)

Par la suite, nous avons voulu caractériser les différences dans le sécrétome des cellules induites par la présence de fibroblastes (Figure 10). Pour ce faire, nous avons effectué une analyse comparative des cytokines entre la monoculture et la co-culture au jour 10 (Figure 10A) et au jour 24 (Figure 10B). On peut remarquer que l'IL-6, l'IL-8, le GRO- α sont fortement sur-exprimés dans les sphéroïdes de co-culture au jour 10 et au jour 24.

Par la suite, nous avons observé les concentrations des cytokines et chimiokines cités précédemment (Figure 10C). Nous pouvons observer une sécrétion de l'IL-6 en 2D à 300 pg/ml pour les A549 et 600 pg/ml pour les MRC-5. La co-culture 2D présente des niveaux d'IL-6 autour de 200 pg/ml. Dans les sphéroïdes de monoculture, nous n'observons pas d'IL-6 quel que soit le temps de culture. Par contre, la présence de seulement 10% de fibroblastes induit une sécrétion de l'IL-6 à 400 pg/ml au jour 10 et 80 pg/ml au jour 24. L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire bivalente qui peut posséder un effet pro-tumoral et anti-tumoral dépendamment du stade de développement du cancer.(242) En effet, une récente étude sur des xénogreffes de cellules du CPNPC avec une mutation de *K-RAS* dans des souris a démontré que, dans les stades d'apparition du cancer, l'IL-6 peut empêcher la progression tumorale à travers la stimulation de l'homéostasie des cellules saines pulmonaires, la régulation des macrophages et l'activation des cellules T cytotoxiques. Néanmoins, dans les stades plus avancés, le microenvironnement tumoral est déjà reprogrammé et l'IL-6 va induire l'activation de la prolifération tumorale à travers les voies IL-6/STAT3 qui va activer la cycline D1. L'IL-6 est aussi associée à un mauvais pronostic de survie chez le patient.(247)

L'IL-8 est aussi exprimée à des plus hauts niveaux dans les sphéroïdes de co-culture en comparaison à la monoculture. Dans un premier temps, on retrouve l'IL-8 sécrétée à des concentrations autour de 600 pg/ml pour les monocultures 2D et 400 pg/ml pour la co-culture 2D. Ensuite, les sphéroïdes de monoculture des jours 10 et des jours 24 sécrètent respectivement 450 pg/ml et 1000 pg/ml d'IL-8. Néanmoins, on retrouve des niveaux d'IL-8 plus élevés en co-culture avec des sphéroïdes au jour 10 qui possèdent une concentration supra-physiologique de

4 ng/ml et de 1,5 ng/ml au jour 24. Cette observation est spécifique à ce modèle de co-culture car l'on peut remarquer que les niveaux d'IL-8 entre les cellules MRC-5 et A549 en 2D sont similaires, alors que la co-culture au jour 10 présente 4 fois plus d'IL-8 que la monoculture du jour 10.

Le GRO- α est aussi surexprimé dans les sphéroïdes de co-culture en comparaison à la monoculture. Ce facteur de croissance est impliqué dans la croissance tumorale, l'angiogenèse, l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux et l'augmentation de la motilité à travers la liaison du récepteur CXCR1. Il est exprimé à 1 ng/ml pour les sphéroïdes de co-culture contre seulement 300 pg/ml pour la monoculture au jour 10. On peut aussi observer cette différence au jour 24 avec 500 pg/ml dans la condition de co-culture pour seulement 200 pg/ml pour la monoculture d'A549.

D'autres cytokines et chimiokines présentent des différences mais à des concentrations plus basses de l'ordre de 100 pg/ml. (Figure **10D**). Le TGF-B3, MCP-3 (CCL7) et TGF- α présentent de très faibles variations en dessous de 5 pg/ml. La protéine d'activation des fibroblastes (FAP) est exprimée dans la culture 2D des A549 (89 pg/ml) et faiblement exprimée par les MRC-5 en 2D (8 pg/ml). On peut observer que la culture 3D n'induit pas d'augmentation différentielle au jour 10 de FAP mais que le jour 24 présente une augmentation de FAP en co-culture (85 pg/ml) en comparaison à la monoculture au jour 24 (10 pg/ml). Cette protéine est une sérine protéase membranaire qui est impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire et l'évasion immunitaire des cellules cancéreuses.(248) Elle est aussi associée à un mauvais pronostic de survie pour le patient.(249)

7) Réponse thérapeutique du modèle de co-culture au criblage de composés épigénétiques

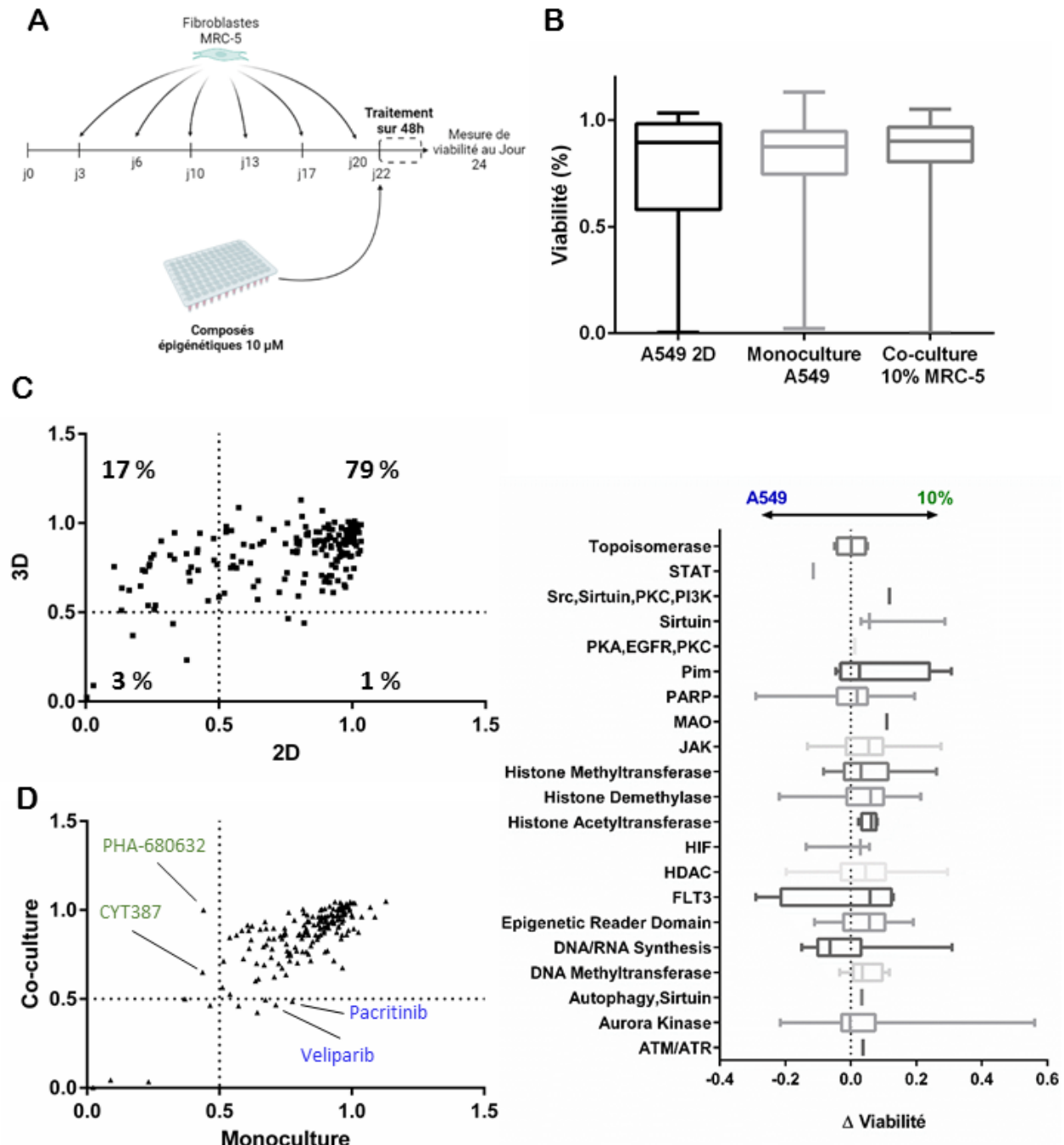


Figure 11. – Réponse thérapeutique du modèle de co-culture long terme aux composés épigénétiques

A Schéma explicatif du criblage de composés thérapeutiques à haut débit avec une banque de drogues épigénétiques (liste en supplémentaire T.5) **B.** Mesure de viabilité moyenne au 24^{ème} jour de culture 3D, acquise au FACS GUAVA 6HT-2L avec le kit Viacount. **C.** Analyse comparative de l'effet des composés selon le modèle de culture 3D en comparaison au modèle 2D. L'unité des axes représente la viabilité des différentes conditions. **D.** Analyse comparative de l'effet des composés selon le modèle de co-culture 3D en comparaison au modèle de monoculture 3D. L'unité des axes représente la viabilité des différentes conditions. **E.** Analyse de l'effet de classe des composés sur le modèle de culture en sphéroïde (n=2)

Afin de mesurer la réponse thérapeutique de notre modèle de co-culture long terme, nous avons effectué un criblage à haut débit de molécules thérapeutique. Nous avons utilisé une banque de 181 composés thérapeutique épigénétique à une concentration finale de 10uM. Le traitement a été effectué au jour 22 pour une durée de 48h jusqu'au 24^{ème} jour où la viabilité des sphéroïdes traités a été mesurée (Figure **11A**).

De manière générale, la viabilité des cellules en 2D est plus faible que celle des conditions en sphéroïdes, cette différence n'est néanmoins pas statistiquement significative (Figure **11B**). Nous pouvons aussi observer que l'effet des composés (soit la réponse des cellules en 2D aux composés thérapeutiques) sur les cellules en 2D est plus divers, ce qui se traduit par une plus grande distribution de la viabilité des cellules en 2D. Ceci suggère que les sphéroïdes sont plus résistants aux composés thérapeutiques que la culture classique à 2 dimensions.

Nous avons par la suite observé l'effet des composés épigénétiques en 2D avec leur effet sur des sphéroïdes en monoculture (Figure **11C**). Ceci nous permet de déterminer quels sont les molécules qui possèdent un effet en culture 2D mais qui démontrent une résistance dans le modèle de sphéroïde de monoculture. Ces 31 composés se retrouvent dans le cadran supérieur gauche de la Figure **11C**.

L'effet des molécules épigénétiques sur les sphéroïdes de co-culture a été comparé à l'effet des composés sur un sphéroïde de monoculture (Figure **11.D**). Cette comparaison a été effectuée afin de déterminer si les fibroblastes induisent une résistance ou une sensibilisation dans la réponse

thérapeutique du modèle de cancer du poumon en sphéroïde. On peut remarquer dans un premier temps que la majorité des composés possèdent le même effet en monoculture qu'en co-culture. Ceci s'exprime par la majorité des points qui vont se retrouver dans le cadran supérieur droit de la figure **11.D**. Il y a donc une grande similarité des modèles de sphéroïdes monoculture et de co-culture dans la réponse thérapeutique aux médicaments épigénétiques. Néanmoins, cette analyse comparative nous a permis de mettre en évidence 2 molécules épigénétiques qui possèdent un effet plus grand en co-culture en comparaison à la monoculture. Ces molécules sont le pacritinib et le veliparib. Ces composés ciblent respectivement les voies du FLT3, des PARP.

Les composés thérapeutiques ont par la suite été regroupés en fonction de la voie biologique inhibée, la viabilité moyenne de ces classes a été déterminé afin d'observer si une classe possédait plus d'effet dépendamment du modèle de culture utilisé (Figure **11.E**). Il n'y pas de différences significatives dans l'effet de classe des composés en fonction du modèle de culture. Dans la culture à 2 dimensions les cellules A549 démontrent une sensibilité aux composés inhibiteurs de la classe HDAC et FLT3. Cet effet de classe est abrogé dans les modèles sphéroïdes pour la classe HDAC tandis que la classe des FLT3 démontre un faible effet de classe, avec la viabilité moyenne qui est plus basse que les autres classes de composés épigénétiques.

La librairie des composés épigénétiques contient de nombreux inhibiteurs de JAK et du récepteur FLT3. L'activation de JAK induit la phosphorylation et la dimérisation des STAT, la translocation des STAT au noyau va de réguler l'expression de nombreux gènes et zones de transcriptions. Dans le même ordre d'idée, l'activation du récepteur FLT3 induit l'activation de nombreuses voies signalétiques comme ERK/MAPK, AKT et STAT, qui résultera en bout de ligne à une activation ou une répression épigénétiques de la transcription des gènes. Les STAT peuvent modifier l'état de compaction de la chromatine par un recrutement des complexes de remodelage de la chromatine, ils peuvent aussi recruter des co-répresseurs ou des co-activateurs de l'expression des gènes. Ces inhibiteurs de tyrosine kinase possèdent donc un effet épigénétique par l'inhibition du recrutement des protéines en aval de la voie signalétique affiliée au récepteur. Ces protéines effectrices de la voie signalétique seront donc moins activées ce qui se traduira par une modulation de la régulation épigénétiques des gènes au niveau du noyau.

Chapitre 5 - Discussion

Le modèle de co-culture long terme avec des fibroblastes nous a permis d'établir un modèle de culture *in vitro* du cancer du poumon, plus représentatif de la maladie, avec notamment l'aspect du micro-environnement tumoral qui joue un rôle prépondérant dans la progression de la maladie des patients atteints de CPNPC.(82-84, 250)

Nous avons dans un premier temps pu observer la mort des sphéroïdes de monoculture de fibroblastes ainsi que des sphéroïdes avec des ratios de 50% de fibroblastes. Ensuite, à travers les différentes lignées cellulaires de fibroblastes utilisées, nous avons pu observer un effet de compaction fibroblaste-dépendant des sphéroïdes de co-culture en comparaison à la monoculture. Cette observation est en accord avec la littérature, en effet, une étude de *Ning Lu et al* a démontré un effet de compaction des sphéroïdes de co-culture de cellules A549 avec des fibroblastes embryonnaires murins.(251) Ils ont aussi prouvé que cette compaction était induite par l'interaction entre les lignées cellulaires par le biais des intégrines et de la communication paracrine. Une augmentation de l'intégrine ITGB5 a notamment été observée dans les expériences de Western Blot.

La lignée de fibroblastes MRC-5 a par la suite été choisie avec un ratio de 10% pour continuer les expériences, de par sa reproductibilité et ses faibles écart-type. Ce choix des fibroblastes concorde avec une récente étude de co-culture 3D utilisant les MRC-5 et A549 comme lignées cellulaires, qui a démontré une résistance dans la réponse thérapeutique des A549 à travers l'augmentation de sécrétion du TGF- β et de la voie PI3K/Akt/mTOR associée. Ces expériences de co-culture ont aussi démontré une augmentation de l'expression de la fibronectine dans les cellules A549 lorsque cultivées avec les fibroblastes MRC-5.(209) D'autres études utilisant les mêmes lignées cellulaires ont démontré une coopération métabolique des cellules cultivées en co-culture.(252)

Afin de mieux caractériser l'impact de la co-culture de fibroblastes avec les cellules A549, nous avons effectué une co-culture en 2D sur 5 jours de cellules MRC-5 marquées au CFSE. Cette expérience nous a permis d'observer que les fibroblastes cultivés avec les cellules tumorales présentaient une viabilité diminuée ainsi qu'une mort cellulaire plus importante en comparaison

au contrôle de monoculture de MRC-5. Or, la présence de fibroblastes dans la culture des cellules A549 n'impactait pas la viabilité de ces dernières.

Nous avons par la suite établi notre modèle de co-culture en 3D avec 10% de cellules MRC-5. Nous avons pu observer la disposition en périphérie des fibroblastes marqués au CFSE et avons par la suite mesuré les proportions des cellules CFSE aux jours 3 et 7 de co-culture. Environ 70% des fibroblastes meurent en 3 jours de co-culture 3D, ce qui est également observé dans les conditions de co-culture 2D. Cette mort prématurée des fibroblastes peut être causée par le manque de matrice extracellulaire du sphéroïde.(253) Néanmoins la mort des fibroblastes n'impacte pas le nombre de cellules total retrouvées après 7 jours. Les mesures des phases du cycle cellulaire ont démontré que la culture 2D présente plus de cellules en phase S que les conditions de culture 3D. Ceci est associé à une croissance plus rapide des cellules. Néanmoins, la tumeur issue du patient atteint de CPNPC présente un temps de doublement de 152 jours, ce qui se caractérise par une prolifération relativement plus longue que les cultures actuelles *in vitro*.(254) Le ralentissement de la prolifération dans les modèles 3D peut donc signifier que les cellules entrent dans des phases de mitose à une fréquence plus semblable à celle retrouvée chez les patients.

Au vu de ces observations, nous avons effectué un rajout des fibroblastes au jour 3 afin de maintenir le nombre de fibroblastes au sein du sphéroïde. Ce rajout des fibroblastes au jour 3 n'impacte pas la viabilité et le nombre de cellules total du modèle et nous permet de pouvoir faire perdurer la communication entre les fibroblastes et les cellules tumorales. Ce modèle pourra être utilisé afin d'effectuer une co-culture des sphéroïdes sur une plus longue période.

Des essais de migration ont démontré que les cellules issues des sphéroïdes de co-culture présentent une capacité migratoire plus élevée en comparaison à la monoculture de cellules tumorales. Ceci est consistant avec la littérature qui démontre que la co-culture avec des fibroblastes induit un caractère plus agressif des cellules tumorales. De plus, de récentes études ont mis en évidence que les CAF pouvaient augmenter le potentiel métastatique des cellules cancéreuses à travers la sécrétion d'interleukine 6 et l'activation de la voie de signalisation STAT3.(255) Ceci corrèle avec nos résultats qui démontrent une migration augmentée des cellules tumorales en présence de fibroblastes ainsi qu'une sécrétion spécifique de l'IL-6 dans les

sphéroïdes de co-culture. Les cellules issues de co-culture présentent aussi une augmentation non-significative de la fibronectine et de son récepteur ITGB5 dans les expériences de Western Blot. Plus de répétitions seraient pertinentes afin d'atteindre la significativité des résultats, mais la différence entre la co-culture au jour 24 et la culture 2D est significative et est de l'ordre de 8 fois et 4 fois plus d'expression pour la fibronectine et ITGB5. Ceci nous renseigne sur la pertinence de la co-culture long terme dans l'aspect métastatique du CPNPC. En effet, la voie impliquant la fibronectine et son récepteur ITGB5 est impliquée dans l'augmentation de la migration et de l'invasion des cellules CPNPC.(256) La fibronectine est aussi impliquée dans l'augmentation des niveaux de MMP9 via la liaison de ITGB5 et l'activation de la voie PI3K et ERK. MMP9 permet de dégrader la matrice extracellulaire et favorise l'invasion et la métastase.(257) L'augmentation des capacités migratoires des cellules concorde aussi avec l'augmentation du facteur de transcription TWIST en comparaison au 2D. En effet, TWIST est impliqué dans l'EMT et dans l'invasion et la métastase des cellules CPNPC chez le patient.(258, 259) TWIST est aussi une cible transcriptionnelle de la voie KRAS, qui peut elle-même être suractivé par les IL-6 et IL-8.

L'IL 8 est une cytokine chimiotactique et angiogénique qui est associée à un mauvais pronostic de survie chez les patients atteints de CPNPC.(237) L'IL-8 lie le récepteur CXCR1 et induit une activation des voies PI3K/AKT et Ras/MAPK.(260) Ce qui se traduit par une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'angiogénèse, participant donc à la progression tumorale et la métastase du cancer CPNPC. (261, 262) L'IL-8 est aussi impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse et l'apparition de cellules cancéreuses souches durant la progression tumorale du CPNPC. (263) L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux est aussi rendue possible par l'IL8 et le GRO- α . En effet, ces 2 molécules lient le récepteur CXCR1 et induisent une activation des voies PI3K/Akt et Ras/MPK. La protéine KRAS peut alors à son tour activer de manière transcriptionnelle la production d'IL-8 et ainsi induire une boucle de rétroaction positive avec un effet autocrine de la voie de l'Interleukine 8. (264, 265) Ceci peut expliquer les hauts niveaux d'IL8 retrouvé, la co-culture de fibroblastes semble favoriser cette voie de signalisation. La production d'IL-8 par les fibroblastes peut induire et augmenter la boucle de rétroaction positive de la sécrétion d'IL8 des cellules tumorales.(266)

La culture 3D démontre aussi un métabolisme différent de la culture 2D. En effet, on peut remarquer que les cellules 2D possèdent un cycle de la méthionine plus actif, ce qui se traduit aussi par l'accumulation de MTA qui inhibe et induit une sensibilité pharmacologique d'enzymes méthyltransférase comme PRMT5 et EZH2.(229)

On peut observer un grand écart type dans la viabilité des cellules 2D criblées par les composés inhibiteurs des histones méthyltransférases causé par le BIX 01294 et UNC0631, qui inhibent G9a, ainsi que UNC0379 qui inhibe KMT5.

De manière globale, la culture 2D présente plus de sensibilité que la culture 3D en réponse aux criblages de composés épigénétiques. Ce qui est consistant avec les résultats observés dans la littérature.(267, 268) On retrouve néanmoins 2 composés qui ont plus d'effet en 3D en comparaison au 2D qui sont la gemcitabine et PHA-680632. La gemcitabine est un analogue de la cytidine et PHA-680632 inhibe les kinases Aurora.

Dans le contexte de la co-culture 3D, la majorité des composés présentent un effet plus faible en comparaison à la monoculture. Ce qui est aussi communément retrouvé dans la littérature scientifique. (269, 270)

L'inhibiteur Quercetin de voies des Sitouines et PI3K a moins d'effet en co-culture en comparaison à la monoculture. Cette résistance peut être expliquée par la présence d'une grande quantité d'IL-8 en co-culture qui sur-active la voie des PI3K et permet de surmonter l'effet d'inhibition de la quercetin. Les sphéroïdes de monoculture possèdent moins d'IL-8 ce qui se traduit par une sensibilité plus grande à l'inhibition de la voie PI3K. D'autres composés comme le CYT387 et le PHA-680632 présentent un effet plus important sur la viabilité des sphéroïdes de monoculture. Le CYT387 est un inhibiteur de la voie des Janus Tyrosine kinases JAK1 et JAK2, ces protéines sont impliquées dans le recrutement des Statines et l'induction de la prolifération cellulaire.

PHA-680632 est un inhibiteur des Aurora Kinases. On peut donc supposer que la voie de signalisation reliée à l'activation de l'Aurora kinase est plus importante dans le contexte de monoculture en sphéroïde.

On peut néanmoins observer que l'inhibiteur de STAT APSTAT3-9R possède un effet plus prononcé en co-culture, ce qui est expliqué par la voie IL6/STAT3 qui est activée avec la présence de fibroblastes. Cette voie semble donc être importante dans le maintien de la viabilité des

sphéroïdes de co-culture. Certains inhibiteurs de FLT3 (Pacratinib), PARP (Veliparib) ont démontré avoir un plus grand effet (20% de différence avec la monoculture) dans la co-culture. Les PARP sont des polymérases qui permettent la réparation des dégâts à l'ADN, ces enzymes sont NAD⁺ dépendantes. (271) Les hauts niveaux de Niacinamide (NAM), précurseur du NAD⁺, présent dans la co-culture peuvent inhiber l'activité PARP et augmenter l'effet thérapeutique du veliparib.

Le pacratinib est un inhibiteur de FLT3 et JAK2, les effecteurs en aval de cette voie sont les STAT3/5, PI3K et les voies RAS/MAPK. Comme expliqué précédemment, ces voies sont sur-activées en co-culture et l'effet accentué du pacratinib en co-culture corrobore avec l'effet accentué induit par APSTAT3-9R sur la voie IL6/STAT3 en co-culture.

Ces différences dans l'effet des composés selon leur classe nous renseignent donc sur l'importance de la voie de l'IL-6/STAT3 dans la survie des sphéroïdes de co-culture. D'autre part, la résistance des sphéroïdes de co-culture à l'inhibition de la voie des Sirtuines et PI3K démontre bien la sur-activation de cette voie causée par l'induction stromale de sécrétion d'IL8. Ce qui permet aux sphéroïdes de co-culture de surmonter l'inhibition de la voie PI3K en comparaison à la monoculture.

La sécrétion augmentée d'IL-8 et d'IL-6 dans les sphéroïdes induit aussi un phénotype plus inflammatoire et angiogénique des cellules cancéreuses. Ces interleukines permettent le recrutement des cellules immunitaires et l'immuno-évasion ainsi que la prolifération des cellules endothéliales associées à la néovascularisation. Il serait intéressant d'injecter les sphéroïdes dans un modèle murin *in vivo* afin de mesurer la progression tumorale, dépendamment de la présence ou non de ces fibroblastes. Ceci nous permettrait de valider les capacités angiogéniques, pro-inflammatoires et métastatiques de notre modèle de co-culture.

Afin de confirmer l'impact de ces cytokines spécifiques, il serait aussi pertinent d'utiliser des anticorps neutralisant l'IL-8, l'IL-6 ainsi que le récepteur associé CXCR1. Ces expériences pourraient être incorporées à notre modèle *in vitro* dans le but de démontrer l'importance de ces cytokines et des voies signalétiques associées dans le maintien de la viabilité et du phénotype migratoire du sphéroïde.

La migration des cellules de sphéroïde dans les chambres de Boyden nécessite une solution unicellulaire pour être effectuée. Ceci implique que le sphéroïde doit être dissocié avec la

trypsine, ce qui détruit les protéines d'adhésion membranaire des cellules. Il convient d'utiliser une technique qui ne nécessite pas la dissociation du sphéroïde, afin de mesurer au mieux ses capacités migratoires. Nous pourrions donc utiliser un hydrogel à base de collagène couplé à des fluorophores avec des agents d'extinction de fluorescence (quencher). Une fois le sphéroïde placé au centre de ce gel, nous pourrions observer la formation de protrusions cellulaires et nous pourrions mesurer la dégradation du gel induit par le sphéroïde, à travers la mesure de la fluorescence du collagène dégradé. (272)

Il serait judicieux de mesurer les niveaux sécrétés des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 dans les sphéroïdes de co-culture afin de mieux caractériser les capacités d'invasion et de dégradation de la matrice extracellulaire du modèle.

Il serait aussi pertinent de mesurer les niveaux d'ARN des voies suractivées dans la co-culture afin de mettre en évidence les changements transcriptomiques que la co-culture induit sur les cellules de cancer du poumon. Pour ce faire, il convient de pouvoir identifier les fibroblastes avec un gène rapporteur comme la GFP afin de pouvoir les trier et observer les changements transcriptomiques spécifique à chacune des populations lors de la co-culture.

Finalement, afin de se rapprocher au maximum du micro-environnement tumoral retrouvé chez le patient, il serait intéressant de rajouter des cellules endothéliales à la co-culture. Ceci permettrait de récapituler de manière plus fidèle les composantes de la matrice extracellulaire tumorale et de reproduire les réponses angiogéniques des cellules endothéliales induites par les cytokines et chimiokines présentes dans la co-culture.

Conclusion

Pour résumer, nous avons établi un modèle sphéroïde de co-culture de cellules pulmonaires tumorales avec des fibroblastes, sur une durée de 24 jours. Les fibroblastes ont été maintenus à un ratio de 10% tout au long de la période de culture. Nous avons démontré que la présence de fibroblastes dans le sphéroïde induit une augmentation de la migration des cellules en comparaison à la monoculture après 10j de culture 3D. Nous avons aussi mis en évidence une sécrétion spécifique d'IL-6 et une sécrétion augmentée d'IL-8 et de GRO- α dans les sphéroïdes de co-culture. L'IL-8 et le GRO- α lient tous deux le récepteur cellulaire CXCR1, qui semble donc être une cible pertinente dans la caractérisation de l'effet des fibroblastes sur les A549.

De plus, nous avons observé une tendance à la hausse de protéine de la fibronectine et ITGB5 dans la co-culture après 24 jours, ce qui reflète une interaction plus importante des cellules avec la matrice extracellulaire en comparaison à la monoculture. Les interleukines 6, 8 et GRO- α possèdent aussi des propriétés inflammatoires et angiogéniques qui peuvent participer à la progression tumorale *in vivo*. Il serait intéressant de caractériser ces effets angiogéniques et inflammatoires dans un modèle *in vitro* de tri-culture utilisant des cellules endothéliales ainsi qu'un modèle *in vivo* de xénogreffe murin.

Des changements métaboliques ont aussi été observés dans la co-culture de fibroblastes. Il serait pertinent de caractériser le flot métabolique de voies impactées par la co-culture d'A549 avec des fibroblastes sur le long terme. La présence de fibroblastes dans le modèle de culture sphéroïde a aussi modulé la sensibilité pharmacologique des cellules. Une validation des composés ayant un effet plus important dans la co-culture 3D, avec une courbe dose-réponse des composés APSTAT3-9R, Pacratinib et Veliparib, serait pertinent afin de valider l'effet sur les voies de signalisation suractivées dans notre modèle.

Références bibliographiques

1. (WHO) WHO. Cancer Statistics
. Cancer J Clinicians. 2021;Volume: 71(Issue: 3):Pages: 209-49.
2. Ganti AK, Klein AB, Cotarla I, Seal B, Chou E. Update of Incidence, Prevalence, Survival, and Initial Treatment in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer in the US. *JAMA Oncol.* 2021;7(12):1824-32.
3. 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. *Journal of Thoracic Oncology.* 2016;11(1):39-51.
4. Kanodra NM, Silvestri GA, Tanner NT. Screening and early detection efforts in lung cancer. *Cancer.* 2015;121(9):1347-56.
5. Birring SS, Peake MD. Symptoms and the early diagnosis of lung cancer. *Thorax.* 2005;60(4):268-9.
6. Woodard GA, Jones KD, Jablons DM. Lung Cancer Staging and Prognosis. In: Reckamp KL, editor. *Lung Cancer: Treatment and Research.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 47-75.
7. Committee CCSA. Canadian Cancer Statistics 2022. 2022;Canadian Cancer Society.
8. Sepich-Poore GD, Fraraccio S, Wandro S, Knight R, Miller-Montgomery S, Adams E. Abstract 1184: Early-stage lung cancer detection via circulating microbial DNA biomarkers and machine learning classification. *Cancer research.* 2022;82(12_Supplement):1184-.
9. Xu Z, Ren H, Zhou W, Liu Z. ISANET: Non-small cell lung cancer classification and detection based on CNN and attention mechanism. *Biomedical Signal Processing and Control.* 2022;77:103773.
10. Raso MG, Bota-Rabassedas N, Wistuba II. Pathology and Classification of SCLC. *Cancers.* 2021;13(4).
11. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang Y-W, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1856(2):189-210.
12. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria J-C. The Evolving Role of Histology in the Management of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(36):5311-20.
13. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(10):1563-79.
14. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2008;359(13):1367-80.
15. Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT. Lung cancer. *Radiol Clin North Am.* 2007;45(1):21-43.
16. Myers DJ WJ. Lung Adenocarcinoma. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; . 2022 Jan-.
17. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2004;101(27):10143-8.

18. Yoon JY, Lee J-D, Joo SW, Kang DR. Indoor radon exposure and lung cancer: a review of ecological studies. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*. 2016;28(1):15.
19. Gazdar AF, Brambilla E. Preneoplasia of lung cancer. *Cancer Biomarkers*. 2011;9:385-96.
20. Valcke M, Ponce G, Bourgault M-H, Institut national de santé publique du Québec. Direction de la santé environnementale et de la t. Évaluation du risque cancérigène attribuable aux concentrations d'arsenic et de cadmium dans l'air de la ville de Rouyn-Noranda: avis scientifique. Montréal: Institut national de santé publique du Québec; 2022. iii, 37 p. p.
21. Dyer O. Quebec doctors' letter forces government rethink on polluted cancer black spot. *BMJ*. 2022;378:o1818.
22. Ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec. Registre québécois du cancer, 1986-1990 à 2013-2017. In: Québec. TddepIldspd, editor. 2022.
23. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma–carcinoma sequence. *Cancer*. 1992;70(S4):1727-31.
24. Mirsadraee S, Oswal D, Alizadeh Y, Caulo A, van Beek E, Jr. The 7th lung cancer TNM classification and staging system: Review of the changes and implications. *World J Radiol*. 2012;4(4):128-34.
25. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC, et al. p53 Mutations and Survival in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer: Results of a Prospective Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(13):961-70.
26. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
27. Bronte G, Rizzo S, La Paglia L, Adamo V, Siragusa S, Ficorella C, et al. Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. *Cancer Treatment Reviews*. 2010;36:S21-S9.
28. Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol*. 2021;12(4):217-37.
29. Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, et al. Lung Cancer in Never Smokers: Molecular Profiles and Therapeutic Implications. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(18):5646-61.
30. Dogan S, Shen R, Ang DC, Johnson ML, D'Angelo SP, Paik PK, et al. Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related KRAS-Mutant Cancers. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(22):6169-77.
31. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-39.
32. Friedlaender A, Drilon A, Weiss GJ, Banna GL, Addeo A. KRAS as a druggable target in NSCLC: Rising like a phoenix after decades of development failures. *Cancer Treatment Reviews*. 2020;85:101978.
33. Gimble RC, Wang X. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Frontiers in Oncology*. 2019;9.
34. Lee T, Lee B, Choi YL, Han J, Ahn MJ, Um SW. Non-small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, and ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases. *J Pathol Transl Med*. 2016;50(3):197-203.

35. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(10):947-57.
36. Dumitrescu RG. Epigenetic Markers of Early Tumor Development. In: Dumitrescu RG, Verma M, editors. *Cancer Epigenetics: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 3-14.
37. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2009;31(1):27-36.
38. Holliday R. The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science*. 1987;238(4824):163-70.
39. Felsenfeld G. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
40. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*. 2003;33(3):245-54.
41. Sharma D, Koshy G, Gupta S, Sharma B, Grover S. Deciphering the Role of the Barr Body in Malignancy: An insight into head and neck cancer. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2017;17(4):e389-e97.
42. Mazzi EA, Soliman KF. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*. 2012;7(2):119-30.
43. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. 2001;278(1):25-31.
44. Tittle RK, Sze R, Ng A, Nuckels RJ, Swartz ME, Anderson RM, et al. Uhrf1 and Dnmt1 are required for development and maintenance of the zebrafish lens. *Developmental Biology*. 2011;350(1):50-63.
45. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-60.
46. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
47. Morales Y, Caceres T, May K, Hevel JM. Biochemistry and regulation of the protein arginine methyltransferases (PRMTs). *Arch Biochem Biophys*. 2016;590:138-52.
48. Sun L, Wang M, Lv Z, Yang N, Liu Y, Bao S, et al. Structural insights into protein arginine symmetric dimethylation by PRMT5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(51):20538-43.
49. Jing P, Xie N, Zhu X, Dang H, Gu Z. The methylation induced by protein arginine methyltransferase 5 promotes tumorigenesis and progression of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2018;10(12):7014-9.
50. Takashina T, Kinoshita I, Kikuchi J, Shimizu Y, Sakakibara-Konishi J, Oizumi S, et al. Combined inhibition of EZH2 and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Science*. 2016;107(7):955-62.
51. Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2002;12(2):198-209.
52. Kress C, Thomassin H, Grange T. Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Letters*. 2001;494(3):135-40.
53. Karpinets TV, Foy BD. Tumorigenesis: the adaptation of mammalian cells to sustained stress environment by epigenetic alterations and succeeding matched mutations. *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1323-34.
54. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009;1(2):239-59.
55. Brzezińska E, Dutkowska A, Antczak A. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Molecular Biology Reports*. 2013;40(1):309-25.

56. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. *Transl Res.* 2015;165(1):74-90.
57. Cao LL, Song X, Pei L, Liu L, Wang H, Jia M. Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(31):e7663.
58. Feng Y, Wang J, Wu Y, Feng X, Yu Y. [Protein expressions of HDAC1 and DNMT1 in non-small-cell lung cancer and its clinical significance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014;94(8):596-8.
59. Miyanaga A, Gemma A, Noro R, Kataoka K, Matsuda K, Nara M, et al. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: development of a molecular predictive model. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2008;7(7):1923-30.
60. Behrens C, Solis LM, Lin H, Yuan P, Tang X, Kadara H, et al. EZH2 Protein Expression Associates with the Early Pathogenesis, Tumor Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2013;19(23):6556-65.
61. Huqun, Ishikawa R, Zhang J, Miyazawa H, Goto Y, Shimizu Y, et al. Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2012;118(6):1599-606.
62. Kipp DR, Quinn CM, Fortin PD. Enzyme-dependent lysine deprotonation in EZH2 catalysis. *Biochemistry.* 2013;52(39):6866-78.
63. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res.* 2008;647(1-2):21-9.
64. Mohammad Helai P, Smitheman Kimberly N, Kamat Chandrashekhar D, Soong D, Federowicz Kelly E, Van Aller Glenn S, et al. A DNA Hypomethylation Signature Predicts Antitumor Activity of LSD1 Inhibitors in SCLC. *Cancer Cell.* 2015;28(1):57-69.
65. Damiani LA, Yingling CM, Leng S, Romo PE, Nakamura J, Belinsky SA. Carcinogen-Induced Gene Promoter Hypermethylation Is Mediated by DNMT1 and Causal for Transformation of Immortalized Bronchial Epithelial Cells. *Cancer research.* 2008;68(21):9005-14.
66. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, et al. DNA Methylation Markers and Early Recurrence in Stage I Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2008;358(11):1118-28.
67. Kim H, Kwon YM, Kim JS, Han J, Shim YM, Park J, et al. Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2006;107(5):1042-9.
68. Lin R-K, Hsu H-S, Chang J-W, Chen C-Y, Chen J-T, Wang Y-C. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2007;55(2):205-13.
69. Ansari J, Shackelford RE, El-Osta H. Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(2):155-71.
70. Hoy SM. Tazemetostat: First Approval. *Drugs.* 2020;80(5):513-21.
71. Dockerill M, Gregson C, DH OD. Targeting PRC2 for the treatment of cancer: an updated patent review (2016 - 2020). *Expert Opin Ther Pat.* 2021;31(2):119-35.
72. Julia E, Salles G. EZH2 inhibition by tazemetostat: mechanisms of action, safety and efficacy in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Future Oncol.* 2021;17(17):2127-40.
73. Pikor L, Thu K, Vucic E, Lam W. The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2013;32(3):341-52.

74. Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IPM. Genomic instability — the engine of tumorigenesis? *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(9):701-8.
75. Nowell PC. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
76. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016;11(7):964-75.
77. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(3):504-14.
78. Prabavathy D, Swarnalatha Y, Ramadoss N. Lung cancer stem cells-origin, characteristics and therapy. *Stem Cell Investig*. 2018;5:6-.
79. Rivera C, Rivera S, Lorient Y, Vozenin M-C, Deutsch E. Lung Cancer Stem Cell: New Insights on Experimental Models and Preclinical Data. *Journal of Oncology*. 2011;2011:549181.
80. MacDonagh L, Gray SG, Breen E, Cuffe S, Finn SP, O'Byrne KJ, et al. Lung cancer stem cells: The root of resistance. *Cancer Letters*. 2016;372(2):147-56.
81. Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, Gorelik E, Lokshin AE. Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells: Cytokine Network, Tumorigenic and Metastatic Properties. *PLOS ONE*. 2008;3(8):e3077.
82. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*. 2020;30(16):R921-r5.
83. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(4):239-52.
84. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
85. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund L-T. Prognostic Effect of Epithelial and Stromal Lymphocyte Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(16):5220-7.
86. Katakai A, Scheid P, Piet M, Marie B, Martinet N, Martinet Y, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2002;140(5):320-8.
87. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4410-7.
88. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, Waller DA, Bradding P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *European Respiratory Journal*. 2009;33(1):118-26.
89. Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology*. 2009;55(3):301-12.
90. Welsh T, Green R, Richardson D, Waller D, Byrne K, Bradding P. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:8959-67.
91. Kilic A, Landreneau RJ, Luketich JD, Pennathur A, Schuchert MJ. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. *J Surg Res*. 2011;167(2):207-10.

92. Horne ZD, Jack R, Gray ZT, Siegfried JM, Wilson DO, Yousem SA, et al. Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer. *J Surg Res.* 2011;171(1):1-5.
93. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J, et al. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2010;69(3):348-54.
94. Stankovic B, Bjørhovde HAK, Skarshaug R, Aamodt H, Frafjord A, Müller E, et al. Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2019;9:3101-.
95. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-54.
96. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol.* 2010;28(19):3167-75.
97. Santarpia M, Giovannetti E, Rolfo C, Karachaliou N, González-Cao M, Altavilla G, et al. Recent developments in the use of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Review of Respiratory Medicine.* 2016;10(7):781-98.
98. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455-65.
99. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971;27(5):549-50.
100. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2002;3(5):349-63.
101. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Advances in Wound Care.* 2016;5(3):119-36.
102. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng.* 2006;12(3):519-26.
103. Chang HY, Chi J-T, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002;99(20):12877-82.
104. Angeli F, Koumakis G, Chen MC, Kumar S, Delinassios JG. Role of Stromal Fibroblasts in Cancer: Promoting or Impeding? *Tumor Biology.* 2009;30(3):109-20.
105. Tarin D, Croft CB. Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *J Anat.* 1969;105(Pt 1):189-90.
106. Mauch C, Kreig T. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16(1):93-107.
107. Tettamanti Gea. The Multifunctional Role of Fibroblasts during Wound Healing in *Hirudo Medicinalis* (Annelida, Hirudinea). *Biology of the Cell* 2004;96.6 443–55.
108. Delinassios JG. Fibroblasts against cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 1987;7(5b):1005-10.
109. Delinassios JG. Cytocidal effects of human fibroblasts on HeLa cells in vitro. *Biology of the Cell.* 1987;59(1):69-77.

110. Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J, Kerbel RS. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6028-32.
111. Delinassios JG, Kottaridis SD. Interactions between human fibroblasts and HeLa cells in vitro. *Biol Cell*. 1984;50(1):9-16.
112. DeCosse JJ, Gossens C, Kuzma JF, Unsworth BR. Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *J Natl Cancer Inst*. 1975;54(4):913-22.
113. DeCosse JJ, Gossens CL, Kuzma JF, Unsworth BR. Breast cancer: induction of differentiation by embryonic tissue. *Science*. 1973;181(4104):1057-8.
114. Djurec M, Graña O, Lee A, Troulé K, Espinet E, Cabras L, et al. Saa3 is a key mediator of the protumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in pancreatic tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(6):E1147-E56.
115. Rubin H. Cell–cell contact interactions conditionally determine suppression and selection of the neoplastic phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(17):6215-21.
116. Barker SE, Grosse SM, Siapati EK, Kritz A, Kinnon C, Thrasher AJ, et al. Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12. *Br J Cancer*. 2007;97(2):210-7.
117. Sage EK, Thakrar RM, Janes SM. Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. *Cytotherapy*. 2016;18(11):1435-45.
118. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
119. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1650-9.
120. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(5):392-401.
121. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
122. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):482-97.
123. Knowles LM, Stabile LP, Egloff AM, Rothstein ME, Thomas SM, Gubish CT, et al. HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(11):3740-50.
124. Zhang J, Qi J, Wei H, Lei Y, Yu H, Liu N, et al. TGFβ1 in Cancer-Associated Fibroblasts Is Associated With Progression and Radiosensitivity in Small-Cell Lung Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:667645.
125. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(1):86.
126. Raposo TP, Beirão BC, Pang LY, Queiroga FL, Argyle DJ. Inflammation and cancer: till death tears them apart. *Vet J*. 2015;205(2):161-74.
127. El Rayes T, Catena R, Lee S, Stawowczyk M, Joshi N, Fischbach C, et al. Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(52):16000-5.

128. Linares J, Marín-Jiménez JA, Badia-Ramentol J, Calon A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:621070.
129. Mishra R, Haldar S, Suchanti S, Bhowmick NA. Epigenetic changes in fibroblasts drive cancer metabolism and differentiation. *Endocrine-Related Cancer.* 2019;26(12):R673-R88.
130. Han J, Li Q, Chen Y, Yang Y. Recent Metabolomics Analysis in Tumor Metabolism Reprogramming. *Front Mol Biosci.* 2021;8:763902.
131. Yue B. Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma.* 2014;23(8 Suppl 1):S20-3.
132. Mecham RP. Overview of Extracellular Matrix. *Current Protocols in Cell Biology.* 2012;57(1):10.1.1-.1.6.
133. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3(6):422-33.
134. Pang B, Wu N, Guan R, Pang L, Li X, Li S, et al. Overexpression of RCC2 Enhances Cell Motility and Promotes Tumor Metastasis in Lung Adenocarcinoma by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5598-610.
135. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, Gillery P, Tournier J-M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: Quantificative and morphological analyses. *International Journal of Cancer.* 1997;72(4):556-64.
136. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, et al. MT1-MMP Initiates Activation of pro-MMP-2 and Integrin $\alpha\beta 3$ Promotes Maturation of MMP-2 in Breast Carcinoma Cells. *Experimental Cell Research.* 2001;263(2):209-23.
137. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res.* 2005;31(6):599-621.
138. Ogata Y, Enghild J, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *Journal of Biological Chemistry.* 1992;267(6):3581-4.
139. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 2011;41(2):271-90.
140. Ylisirniö S, Höyhtyä M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res.* 2000;20(2b):1311-6.
141. Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 9):2373-9.
142. Pesta M, Kulda V, Kucera R, Pesek M, Vrzalova J, Liska V, et al. Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2011;31(11):4031-8.
143. Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2005;49(1):25-33.
144. Riaz SP, Linklater KM, Page R, Peake MD, Møller H, Lüchtenborg M. Recent trends in resection rates among non-small cell lung cancer patients in England. *Thorax.* 2012;67(9):811.
145. Lackey A, Donington JS. Surgical management of lung cancer. *Semin Intervent Radiol.* 2013;30(2):133-40.
146. Wright G, Manser RL, Byrnes G, Hart D, Campbell DA. Surgery for non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Thorax.* 2006;61(7):597-603.

147. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. *The Lancet*. 1998;352(9124):257-63.
148. Wright CD, Moncure AC, Shepard J-AO, Wilkins EW, Mathisen DJ, Grillo HC. Superior sulcus lung tumors: Results of combined treatment (irradiation and radical resection). *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1987;94(1):69-74.
149. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. 2014;740:364-78.
150. Roila F, Molassiotis A, Herrstedt J, Aapro M, Gralla RJ, Bruera E, et al. 2016 MASCC and ESMO guideline update for the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting and of nausea and vomiting in advanced cancer patients. *Annals of Oncology*. 2016;27:v119-v33.
151. Maroun JA, Anthony LB, Blais N, Burkes R, Dowden SD, Dranitsaris G, et al. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Diarrhea in Patients with Colorectal Cancer: A Consensus Statement by the Canadian Working Group on Chemotherapy-Induced Diarrhea. *Current Oncology*. 2007;14(1):13-20.
152. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist*. 2003;8(4):303-6.
153. Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1):386.
154. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI, et al. KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med*. 2020;383(13):1207-17.
155. Palma G, Khurshid F, Lu K, Woodward B, Husain H. Selective KRAS G12C inhibitors in non-small cell lung cancer: chemistry, concurrent pathway alterations, and clinical outcomes. *npj Precision Oncology*. 2021;5(1):98.
156. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-6.
157. Chuang JC, Neal JW. Crizotinib as first line therapy for advanced ALK-positive non-small cell lung cancers. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(5):639-41.
158. Awad MM, Shaw AT. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: crizotinib and beyond. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(7):429-39.
159. Schrank Z, Chhabra G, Lin L, Iderzorig T, Osude C, Khan N, et al. Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. *Cancers*. 2018;10(7):224.
160. Castellanos EH, Horn L. Generations of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Perils and Progress. *Current Treatment Options in Oncology*. 2015;16(10):51.
161. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(6):467-77.
162. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(15):5094-100.
163. Topalian Suzanne L, Drake Charles G, Pardoll Drew M. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450-61.

164. Kaur J, Elms J, Munn AL, Good D, Wei MQ. Immunotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC), as a stand-alone and in combination therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2021;164:103417.
165. Reck M, Rodríguez–Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(7):537-46.
166. Peters S, Reck M, Smit EF, Mok T, Hellmann MD. How to make the best use of immunotherapy as first-line treatment of advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 2019;30(6):884-96.
167. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, 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(17):2046-54.
168. Rowbotham SP, Li F, Dost AFM, Louie SM, Marsh BP, Pessina P, et al. H3K9 methyltransferases and demethylases control lung tumor-propagating cells and lung cancer progression. *Nature Communications*. 2018;9(1):4559.
169. Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, et al. Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes by a Novel Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Methyltransferases. *Cancer research*. 2005;65(14):6305-11.
170. Friedman JM, Liang G, Liu C-C, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, et al. The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2. *Cancer research*. 2009;69(6):2623-9.
171. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20(1):85-93.
172. Wrangle J, Wang W, Koch A, Easwaran H, Mohammad HP, Vendetti F, et al. Alterations of immune response of Non-Small Cell Lung Cancer with Azacytidine. *Oncotarget*. 2013;4(11):2067-79.
173. Nakagawa M, Kitabayashi I. Oncogenic roles of enhancer of zeste homolog 1/2 in hematological malignancies. *Cancer Science*. 2018;109(8):2342-8.
174. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006;5(9):769-84.
175. Brazelle W, Krehling JM, Gemmer J, Ma Y, Cress WD, Haura E, et al. Histone Deacetylase Inhibitors Downregulate Checkpoint Kinase 1 Expression to Induce Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLOS ONE*. 2010;5(12):e14335.
176. Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: A chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2010;1799(10):717-25.
177. Serresi M, Siteur B, Hulsman D, Company C, Schmitt MJ, Liefink C, et al. Ezh2 inhibition in Kras-driven lung cancer amplifies inflammation and associated vulnerabilities. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(12):3115-35.
178. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2017;3(4):651-7.

179. Wong CH, Siah KW, Lo AW. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics*. 2019;20(2):273-86.
180. Rubin EH, Gilliland DG. Drug development and clinical trials--the path to an approved cancer drug. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(4):215-22.
181. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed Res Int*. 2015;2015:621324.
182. Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(4):253-4.
183. Szymański P, Markowicz M, Mikiciuk-Olasik E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int J Mol Sci*. 2012;13(1):427-52.
184. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138(4):645-59.
185. Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol*. 2007;152(1):53-61.
186. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2011;162(6):1239-49.
187. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-77.
188. Weigelt B, Ghajar CM, Bissell MJ. 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.
189. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018;14(4):910-9.
190. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-9.
191. Souza AG, Silva IBB, Campos-Fernandez E, Barcelos LS, Souza JB, Marangoni K, et al. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Curr Pharm Des*. 2018;24(15):1689-94.
192. Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res*. 2013;319(1):75-87.
193. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, et al. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One*. 2013;8(3):e59689.
194. Abbott A. Biology's new dimension. *Nature*. 2003;424(6951):870-2.
195. Melissaridou S, Wiechec E, Magan M, Jain MV, Chung MK, Farnebo L, et al. 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;19:16.
196. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen*. 2006;11(8):922-32.
197. Schmidt M, Scholz CJ, Polednik C, Roller J. Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. *Oncol Rep*. 2016;35(4):2431-40.

198. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci.* 2017;130(1):203-18.
199. Arya N, Sardana V, Saxena M, Rangarajan A, Katti DS. Recapitulating tumour microenvironment in chitosan–gelatin three-dimensional scaffolds: an improved in vitro tumour model. *Journal of The Royal Society Interface.* 2012;9(77):3288-302.
200. Hebner C, Weaver VM, Debnath J. Modeling Morphogenesis and Oncogenesis in Three-Dimensional Breast Epithelial Cultures. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2008;3(1):313-39.
201. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews Cancer.* 2005;5(9):675-88.
202. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2020;7.
203. Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells.* 2019;8(12):1620.
204. Sherman H, Gitschier HJ, Rossi AE. A Novel Three-Dimensional Immune Oncology Model for High-Throughput Testing of Tumoricidal Activity. *Front Immunol.* 2018;9.
205. Chaicharoendomrung N KP, Noisa P. . Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. . *World J Stem Cells.* 2019;11(12):1065-83.
206. Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *Journal of Cell Science.* 2003;116(12):2377-88.
207. Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov.* 2017;22(5):456-72.
208. Li F, Zhao S, Guo T, Li J, Gu C. The Nutritional Cytokine Leptin Promotes NSCLC by Activating the PI3K/AKT and MAPK/ERK Pathways in NSCLC Cells in a Paracrine Manner. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2585743.
209. Movia D, Bazou D, Prina-Mello A. ALI multilayered co-cultures mimic biochemical mechanisms of the cancer cell-fibroblast cross-talk involved in NSCLC MultiDrug Resistance. *BMC Cancer.* 2019;19(1):854.
210. Wu M, Swartz MA. Modeling tumor microenvironments in vitro. *J Biomech Eng.* 2014;136(2):021011.
211. Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(8):573-87.
212. Fontana F, Marzagalli M, Sommariva M, Gagliano N, Limonta P. In Vitro 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. *Cancers.* 2021;13(12):2970.
213. Abulaiti A, Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, et al. Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF-beta signaling by IL-6. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2013;82(2):204-13.
214. Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, Kawamura T, Funaki S, Minami M, et al. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *J Thorac Oncol.* 2016;11(9):1482-92.
215. Rahmanian M, Seyfoori A, Ghasemi M, Shamsi M, Kolahchi AR, Modarres HP, et al. In-vitro tumor microenvironment models containing physical and biological barriers for modelling

multidrug resistance mechanisms and multidrug delivery strategies. *Journal of Controlled Release*. 2021;334:164-77.

216. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(2):131-42.

217. Ye Z, Zhang X, Luo Y, Li S, Huang L, Li Z, et al. Prognostic Values of Vimentin Expression and Its Clinicopathological Significance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies with 4118 Cases. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163162.

218. Tadokoro A, Kanaji N, Liu D, Yokomise H, Haba R, Ishii T, et al. Vimentin Regulates Invasiveness and Is a Poor Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(4):1545-51.

219. Li L, Mei DT, Zeng Y. HDAC2 promotes the migration and invasion of non-small cell lung cancer cells via upregulation of fibronectin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:284-90.

220. Spada S, Tocci A, Di Modugno F, Nisticò P. Fibronectin as a multiregulatory molecule crucial in tumor matrixome: from structural and functional features to clinical practice in oncology. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2021;40(1):102.

221. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.

222. Wang G, Dong W, Shen H, Mu X, Li Z, Lin X, et al. A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2011;39(6):1028-32.

223. Lei S, Rossi S, Huang B. Metabolic and Physiological Regulation of Aspartic Acid-Mediated Enhancement of Heat Stress Tolerance in Perennial Ryegrass. *Plants (Basel)*. 2022;11(2).

224. Ahn EH, Schroeder JJ. Induction of apoptosis by sphingosine, sphinganine, and C(2)-ceramide in human colon cancer cells, but not by C(2)-dihydroceramide. *Anticancer Res*. 2010;30(7):2881-4.

225. Mohammed S, Harikumar KB. Sphingosine 1-Phosphate: A Novel Target for Lung Disorders. *Front Immunol*. 2017;8:296.

226. Ferreira de Freitas R, Ivanochko D, Schapira M. Methyltransferase Inhibitors: Competing with, or Exploiting the Bound Cofactor. *Molecules*. 2019;24(24).

227. Ouyang Y, Wu Q, Li J, Sun S, Sun S. S-adenosylmethionine: A metabolite critical to the regulation of autophagy. *Cell Proliferation*. 2020;53(11):e12891.

228. Hori H, Tran P, Carrera CJ, Hori Y, Rosenbach MD, Carson DA, et al. Methylthioadenosine phosphorylase cDNA transfection alters sensitivity to depletion of purine and methionine in A549 lung cancer cells. *Cancer research*. 1996;56(24):5653-8.

229. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, Lubin M. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity. *Cancer Biology & Therapy*. 2011;11(7):627-32.

230. Klupczynska A, Dereziński P, Dyszkiewicz W, Pawlak K, Kasprzyk M, Kokot ZJ. Evaluation of serum amino acid profiles' utility in non-small cell lung cancer detection in Polish population. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2016;100:71-6.

231. Domínguez-Gómez G, Díaz-Chávez J, Chávez-Blanco A, Gonzalez-Fierro A, Jiménez-Salazar JE, Damián-Matsumura P, et al. Nicotinamide sensitizes human breast cancer cells to the cytotoxic effects of radiation and cisplatin. *Oncology reports*. 2015;33(2):721-8.

232. Nikas IP, Paschou SA, Ryu HS. The Role of Nicotinamide in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Biomolecules*. 2020;10(3).
233. Fiorino E, Giudici M, Ferrari A, Mitro N, Caruso D, De Fabiani E, et al. The sirtuin class of histone deacetylases: Regulation and roles in lipid metabolism. *IUBMB Life*. 2014;66(2):89-99.
234. Kim WJ, Lee JW, Quan C, Youn HJ, Kim HM, 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(6):2366-75.
235. Hong JY, Lin H. Sirtuin Modulators in Cellular and Animal Models of Human Diseases. *Front Pharmacol*. 2021;12:735044.
236. Park IY. Anticancer Activity of Nicotinamide on Lung Cancer. In: *ClinicalTrials.gov*, editor. 2015.
237. Cury SS, de Moraes D, Freire PP, de Oliveira G, Marques DVP, Fernandez GJ, et al. Tumor Transcriptome Reveals High Expression of IL-8 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Low Pectoralis Muscle Area and Reduced Survival. *Cancers (Basel)*. 2019;11(9).
238. Wang L, Lan J, Tang J, Luo N. MCP-1 targeting: Shutting off an engine for tumor development. *Oncol Lett*. 2022;23(1):26.
239. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD, et al. Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest*. 1994;94(3):1012-8.
240. Ramachandran S, Verma AK, Dev K, Goyal Y, Bhatt D, Alsahli MA, et al. Role of Cytokines and Chemokines in NSCLC Immune Navigation and Proliferation. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:5563746.
241. Cai Z, Chen Q, Chen J, Lu Y, Xiao G, Wu Z, et al. Monocyte chemotactic protein 1 promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in vivo. *Neoplasia*. 2009;11(3):228-36.
242. Qu Z, Sun F, Zhou J, Li L, Shapiro SD, Xiao G. Interleukin-6 Prevents the Initiation but Enhances the Progression of Lung Cancer. *Cancer research*. 2015;75(16):3209-15.
243. Li J, Shen C, Wang X, Lai Y, Zhou K, Li P, et al. Prognostic value of TGF-beta in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):691.
244. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Andersen S, Busund LT, Bremnes RM. Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. *J Thorac Oncol*. 2008;3(9):963-70.
245. Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol*. 2009;4(9):1094-103.
246. Yu S, Yi M, Xu L, Qin S, Li A, Wu K. CXCL1 as an Unfavorable Prognosis Factor Negatively Regulated by DACH1 in Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:1515.
247. Silva EM, Mariano VS, Pastrez PRA, Pinto MC, Castro AG, Syrjanen KJ, et al. High systemic IL-6 is associated with worse prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181125.
248. Shi J, Hou Z, Yan J, Qiu W, Liang L, Meng M, et al. The prognostic significance of fibroblast activation protein-alpha in human lung adenocarcinoma. *Ann Transl Med*. 2020;8(5):224.
249. Liao Y, Ni Y, He R, Liu W, Du J. Clinical implications of fibroblast activation protein-alpha in non-small cell lung cancer after curative resection: a new predictor for prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(9):1523-8.

250. Cremer I, Fridman WH, Sautès-Fridman C. Tumor microenvironment in NSCLC suppresses NK cells function. *Oncolmmunology*. 2012;1(2):244-6.
251. Lu N, Karlsen TV, Reed RK, Kusche-Gullberg M, Gullberg D. Fibroblast alpha11beta1 integrin regulates tensional homeostasis in fibroblast/A549 carcinoma heterospheroids. *PLoS One*. 2014;9(7):e103173.
252. Koukourakis MI, Kalamida D, Mitrakas AG, Liouisia M, Pouliliou S, Sivridis E, et al. Metabolic cooperation between co-cultured lung cancer cells and lung fibroblasts. *Lab Invest*. 2017;97(11):1321-31.
253. Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. 1993;4(9):953-61.
254. Lin RS, Plevritis SK. Comparing the benefits of screening for breast cancer and lung cancer using a novel natural history model. *Cancer Causes Control*. 2012;23(1):175-85.
255. Wang L, Cao L, Wang H, Liu B, Zhang Q, Meng Z, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(44):76116-28.
256. Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J, et al. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*. 2009;101(2):327-34.
257. Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, Roman J. Fibronectin Increases Matrix Metalloproteinase 9 Expression through Activation of c-Fos via Extracellular-regulated Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways in Human Lung Carcinoma Cells *. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(40):29614-24.
258. Hui L, Zhang S, Dong X, Tian D, Cui Z, Qiu X. Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. *PLoS One*. 2013;8(4):e62171.
259. Khan MA, Chen H-c, Zhang D, Fu J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumor Biology*. 2013;34(5):2497-506.
260. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000;68(1):1-8.
261. Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2007;56(1):25-33.
262. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Mussi A, Basolo F, et al. Interleukin-8 in non-small cell lung carcinoma: relation with angiogenic pattern and p53 alterations. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2005;50(3):309-17.
263. Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol*. 2012;8(6):713-22.
264. Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br J Cancer*. 2004;91(11):1970-6.
265. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004;6(5):447-58.
266. Anderson IC, Mari SE, Broderick RJ, Mari BP, Shipp MA. The Angiogenic Factor Interleukin 8 Is Induced in Non-Small Cell Lung Cancer/Pulmonary Fibroblast Cocultures1. *Cancer research*. 2000;60(2):269-72.

267. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. *Biology*. 2014;3(2):345-67.
268. Amann A, Gamerith G, Huber JM, Zwierzina M, Hilbe W, Zwierzina H. Predicting drug sensitivity by 3D cell culture models. *memo - Magazine of European Medical Oncology*. 2015;8(1):77-80.
269. Jeong SY, Lee JH, Shin Y, Chung S, Kuh HJ. Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159013.
270. Abreu S, Espírito Santo V, Oleksijew A, Oswald E, Estrada MF, Rebelo SP, et al. The impact of co-culture of NSCLC tumor cells and fibroblasts on drug response. *Annals of Oncology*. 2017;28:v21.
271. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(10):405-11.
272. Sameni M, Cavallo-Medved D, Dosescu J, Jedeszko C, Moin K, Mullins SR, et al. Imaging and quantifying the dynamics of tumor-associated proteolysis. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(4):299-309.

Annexes

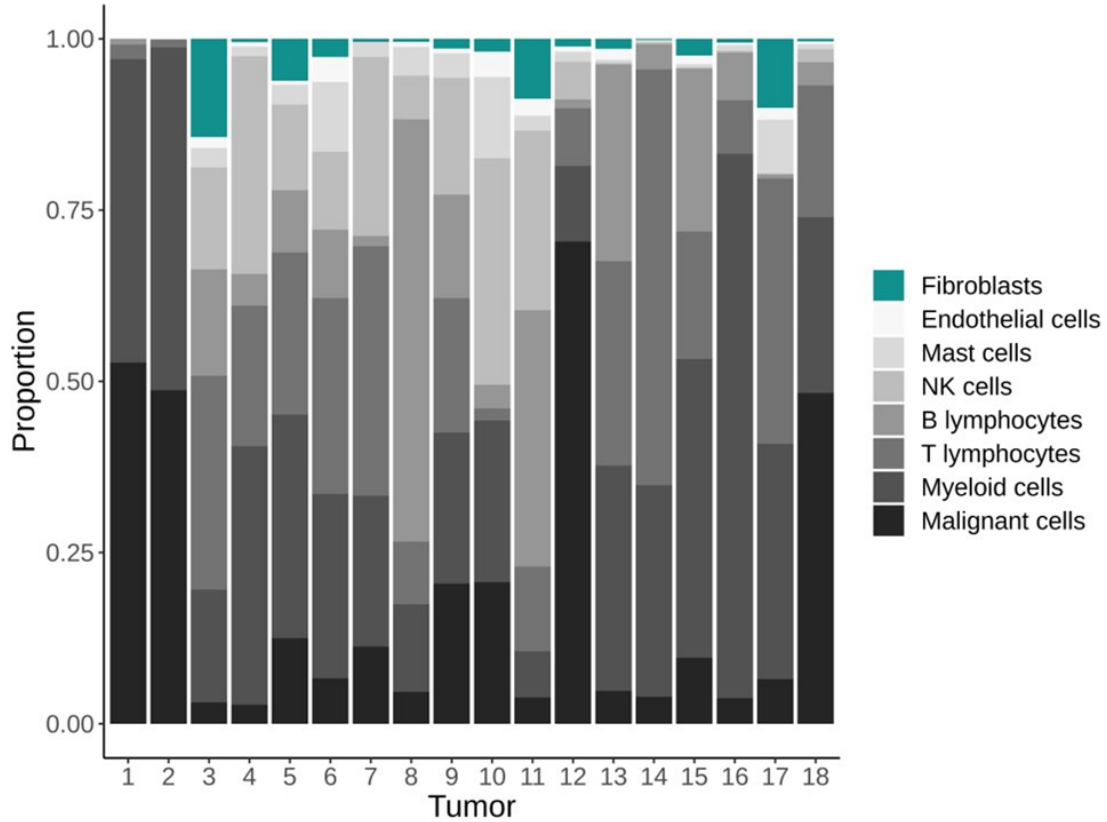


Figure 1. – Proportion des types cellulaires retrouvés chez les patients atteints de CPNPC

Figure produite par *Marielle Huot*, données issues de GEO (Gene Expression Omnibus), Datasets *GSE117570, GSE131907, GSE127465, GSE123904*.

Tableau 2. – Concentrations des cytokines selon les conditions et les temps de culture

Les concentrations indiquées sont en picogramme par millilitre (pg/ml). L'appellation « N.a. » signifie que la cytokine n'a pas pu être détectée dans l'échantillon, de par son absence ou sa trop faible concentration en dessous du seuil de détection de l'expérience Luminex.

	A549 2D	MRC-5 2D	Co-culture 2D	A549 j10	10% j10	A549 j24	10% j24
IL4	N.a.	1,31	0,13	1,33	1,19	1,76	1,25
IL6	330,29	593,98	239,97	3,82	375,49	3,78	80,05
IL8	565,2	535,22	391,67	485,97	4343,55	961,99	1689,93
IL9	N.a.	1,85	N.a.	1,27	2,2	N.a.	N.a.
IL10	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.	2,13	N.a.	1,08
IL13	N.a.	16,2	N.a.	14,64	11,07	15,89	10,4
IL15	2,61	3,87	3,52	1,63	3,87	2,26	2,96
IL16	9,69	9,69	12,35	12,35	3,25	6,49	4,48
IL20	OOOR	48,83	48,83	17,83	OOOR	17,83	OOOR
IL22	N.a.	22,99	N.a.	20,35	10,15	25,37	12,27
IL23	26,88	15,88	19,55	26,88	30,55	4,87	4,87
IL27	N.a.	15,3	N.a.	18,64	24,09	19,84	0,75
TGF-β1	1094,51	1490,97	1228,96	1718,82	2271,13	2115,24	2247,68
TGF-β2	162,19	974,16	949,7	504,97	379,08	372,77	302,78
TGF-β3	3,55	6,31	4,13	3,55	2,95	2,95	5,06
FGF-2	12,35	15,31	23,24	18,75	17,09	5,73	8,79
M-CSF	76,43	253,63	191,61	411,93	503,3	449,2	425,96
G-CSF	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.	122,61	N.a.	14,45
GM-CSF	13,4	50,11	12,52	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.
GRO-Alpha	0,35	332,32	182	338,02	1283,07	250,02	507,31
IFN Y	N.a.	2	N.a.	1,69	2,5	2,29	1,83
PDGF-AA	14,78	455,02	226,67	586,07	438,84	780,07	606,1
PDGF-AB/BB	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.	59,97	13,9
RANTES	N.a.	6,34	4,98	23,46	24,12	6,82	12,44
TGF-α	N.a.	4,16	1,17	2,01	3,66	1,5	2,4
TNF-α	2,13	4,61	1,71	2,27	3,6	2,59	2,13
TNF-β	0,4	11,07	0,48	7,54	10,98	11,87	9,65
VEGF-A	N.a.	468,65	52,43	525,8	423,24	709,91	546,38
SCF	2,91	2	0,97	5,97	7,69	7,69	8,14
SDF 1 α +β	64	82,34	100,72	85,4	73,16	100,72	64
MIP 1z	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.	N.a.	49,83	18,01
MCP-1	407,47	2061,89	1828,19	2062,25	2423,99	2226,04	2273,05
MCP-2	2,48	3,74	5,49	2,74	3,39	2,48	3,19
MCP-3	N.a.	4,67	2,19	3,07	6,3	3,98	7,67
Eotaxin-2	0,41	18,19	12,6	53,6	60,55	51,62	68,19
Eotaxin	0,61	1,9	1,49	1,37	1,71	1,9	0,61
FLT-3L	0,11	0,87	0,51	1,21	0,73	1,19	0,97
EN.a.-78	N.a.	5498,92	3523,83	3519,06	3910,35	3328,77	3208,92
Ferritin	1,97	2,54	1,57	7,78	3,09	5,29	5,52
FAP	51,44	8,25	20,64	96,61	41,39	10,96	36,62
Cathepsin D	6883,54	140712,68	21828,48	484241,01	73944,72	198507,1	734736,08
Myeloperoxidase	4,64	3,89	4,64	421,99	2,01	3,89	3,89

Tableau 3. – Intensité normalisée des métabolites dans les différentes conditions et temps de culture

Les appellations « RP » et « HILIC » définissent le type de chromatographie utilisé pour récupérer le métabolite lors de la filtration de l'échantillon. « HILIC » correspond à la chromatographie liquide d'interaction hydrophile. « RP » correspond à la chromatographie liquide à phase inversé (RP = Reverse Phase) pour isoler les composés moins hydrophiles.

Métabolites	F12K	A549 2D	A549 j3	A549 j10	10% j10	A549 j17	10% j17	A549 j24	10% j24	EMEM	MRC5	MRC5 cd j10
1-Methyladenosine_RP	0,6686	1,2192	0,8705	0,7015	1,3847	1,5560	1,4204	1,9823	0,9595	0,3969	0,6551	1,4618
1-Methylhistidine_HILIC	0,9966	1,1985	1,1180	0,9429	1,0057	1,2892	1,0833	1,0034	1,0229	1,0112	1,1046	0,8622
1-Methylnicotinamide_HILIC	0,2092	0,4499	0,7089	0,7840	1,7805	1,0048	2,0161	1,1444	1,6039	0,2143	0,3364	0,4626
1-Pyrroline-5-carboxylic acid_HILIC	1,1004	0,7377	0,8728	0,6022	0,7083	1,0020	0,6722	0,6652	0,7878	0,3242	0,8854	0,8081
1H-Indole-3-carboxaldehyde_HILIC	0,9164	0,4861	0,9519	0,8223	1,0601	1,1096	1,5505	1,1708	1,4549	2,0845	1,0362	0,7137
2-Aminobenzoic acid_RP	0,3780	1,4552	1,0742	0,9465	1,6397	0,9127	1,4106	1,1265	1,0540	0,4562	0,4976	1,8101
2-Hydroxyglutarate_HILIC	0,9682	1,2004	0,9997	0,8721	0,8736	1,0746	0,9759	1,0708	1,0915	0,3444	1,1422	1,0667
2-Keto-L-gluconate_HILIC	0,8087	0,9858	0,8760	0,8558	0,8638	1,0063	0,9850	1,0809	0,9800	0,6267	0,9220	0,9743
2-Pyrocatechuic acid_HILIC	1,1419	0,9077	0,9200	0,8769	0,8257	0,8773	0,8823	0,9049	0,9628	0,1284	1,3480	0,9557
3-Hydroxyanthranilic acid_HILIC	1,1629	0,9310	1,1475	1,0195	0,9081	0,9020	0,9191	0,8797	0,9227	1,1398	1,0214	0,9657
3-Hydroxyhexadecanoylcarnitine_RP	0,9699	1,0749	1,0352	1,0953	0,7562	0,8722	0,9974	1,0773	1,0308	0,7943	1,0047	1,0372
3-Methylhistidine_HILIC	0,7369	1,2550	1,0122	0,9383	0,9831	1,2108	0,9471	0,9927	0,9908	1,2639	1,1719	1,0180
3-Methylhistidine_RP	1,0902	0,8399	1,1561	1,1188	1,0175	1,1068	0,8652	1,0708	1,0938	1,4347	1,1598	0,9918
4-Hydroxybenzoic acid_HILIC	0,9766	1,0896	1,0486	0,8764	1,0889	1,1450	1,0626	1,0795	1,2019	0,7384	0,9989	0,9863
4-Hydroxyphenylpyruvic acid_HILIC	2,5061	1,0943	1,4345	1,0365	1,0574	0,8673	0,6522	0,7336	0,7032	1,2030	1,0082	0,6588
4-Hydroxyproline_HILIC	0,9602	1,1121	1,1054	1,1253	1,0671	0,9144	0,9466	0,9451	0,8753	0,9328	0,9343	0,9356
4-Hydroxyproline_RP	0,6610	0,8201	0,7633	0,7400	0,9632	0,9786	1,2322	1,1642	0,9726	0,8707	0,8521	0,8303
4-Pyridoxic acid_HILIC	1,1328	0,8082	0,8767	0,7224	0,5723	0,6102	0,5774	0,8181	1,2414	1,5187	0,8137	0,9002
5'-Methylthioadenosine_HILIC	0,0016	2,3289	0,8722	0,9602	0,9616	1,3674	0,8694	1,0253	0,8680	0,0010	0,0042	0,2059
5-Hydroxyindoleacetic acid_HILIC	0,8661	1,0570	0,9251	0,7227	0,6888	0,7783	0,7116	1,0859	1,0655	1,8604	1,3221	1,4190
5-Hydroxyindoleacetic acid_RP	1,0899	0,8335	0,9280	1,0223	0,9388	1,5931	1,3057	2,2041	1,6048	0,0489	0,7664	0,8795
5-Methoxytryptophan_HILIC	0,7749	0,8844	0,8312	0,8789	1,1265	0,9967	1,2266	1,1166	1,3356	0,7278	0,7234	1,0115
7-Dehydrocholesterol_HILIC	0,6261	0,6014	0,7797	0,7319	0,6608	0,7402	0,7566	0,6752	1,0380	0,8734	0,7369	0,7749
7-Methylguanine_HILIC	0,4326	0,7734	0,9876	1,1125	1,0922	1,3861	1,0895	1,2077	1,0076	0,3550	0,6629	0,7271
7-Methylguanosine_HILIC	0,4767	0,9751	1,2694	1,3455	1,2459	1,4222	1,0236	1,2085	1,0514	0,3525	0,5747	0,8248
9-Decenoylcarnitine_HILIC	0,1457	0,4334	0,6397	1,4505	1,3730	1,3890	1,5728	1,2167	1,4893	0,0942	0,1162	0,2422
9-Hexadecenoylcarnitine_HILIC	1,0056	0,7317	0,9302	0,9395	0,9402	1,0149	0,9585	0,9594	0,9133	0,5850	0,8960	0,8924
Acetylcholine chloride_HILIC	1,0526	1,1871	1,2012	1,0876	0,8991	1,0651	1,0993	1,1744	1,1963	0,5641	1,0341	1,0126
Adenine_HILIC	0,1485	1,8307	0,9547	0,8016	0,9523	1,2761	1,0297	0,9658	0,9742	0,0929	0,0611	0,2064
Allantoic acid_HILIC	0,4814	0,6601	0,7396	1,0697	1,2386	1,1285	1,0371	1,0175	1,1464	0,9658	0,8501	0,8893
Allantoin_HILIC	1,2021	1,0572	1,1157	0,9277	0,9909	0,9992	0,9615	0,9960	1,0282	1,0022	0,9358	0,8414
Ascorbic acid_HILIC	1,9026	1,1200	1,1082	0,8694	0,8783	0,9158	1,2597	1,0311	0,9541	0,3041	0,9958	1,0153
Asymmetric dimethylarginine_HILIC	0,9163	1,1342	1,2285	0,9496	1,0419	1,2571	0,8564	1,1170	1,0896	0,6325	0,8281	1,0191
Asymmetric dimethylarginine_RP	0,9015	0,9103	0,9801	1,1875	1,1359	1,2612	1,0082	1,0701	1,0487	0,7055	0,7681	0,7771
Betaine_HILIC	1,0068	0,9606	0,9897	0,9982	0,9786	1,0489	1,0708	1,0722	1,0507	0,9624	0,9768	1,0000
Biotin_HILIC	1,1401	0,9463	1,3403	1,4772	0,9621	1,1256	0,7932	1,0113	0,8491	0,2119	1,0103	0,9925
Butyrylcarnitine_HILIC	0,8001	1,2206	1,2327	0,9399	1,1991	0,9787	1,0876	0,8008	0,8057	0,8784	0,9182	1,0905
Butyrylcarnitine_RP	0,9786	1,2041	1,0558	0,9521	1,1169	1,0007	0,8389	0,7956	0,8372	0,7501	0,9068	1,0984
Carnosine_HILIC	1,0845	0,7541	1,0787	0,9600	0,8529	0,8988	0,9941	0,9003	1,0988	1,3016	1,0757	1,4096
Ceramide (d18:1/16:0)_HILIC	0,3158	0,4076	0,9419	0,6052	1,0396	0,7585	0,9050	0,8482	0,7804	0,9644	0,7255	0,8755
Ceramide (d18:1/22:0)_HILIC	0,5625	0,6964	1,1683	1,0181	0,7386	0,6308	0,5190	1,0989	1,1564	1,3333	0,6626	0,9843
Cholesterol sulfate_HILIC	1,2880	1,0459	0,9772	1,0326	1,0020	1,1068	1,0784	0,9797	1,2266	0,8020	1,1074	0,9908
Choline_HILIC	1,2511	1,0909	1,1086	1,1769	0,9195	0,9393	0,9601	1,0476	0,9127	0,3470	1,1104	1,0443
Choline_RP	1,2246	0,8458	1,0532	1,1029	1,0122	1,0499	0,8709	1,1331	0,8736	0,4192	1,1870	1,0753
Citrulline_HILIC	1,5687	1,2123	1,3477	1,1461	1,1420	1,1181	0,9120	1,1475	1,1227	0,8688	1,2435	1,0956
Creatine_HILIC	1,0436	1,0453	1,0757	1,0457	0,8337	0,9811	0,8805	0,7845	0,9912	0,7346	0,8289	0,8261
Creatinine_HILIC	0,7586	0,8587	1,0887	0,9117	1,0296	1,0096	0,7622	0,9127	0,9804	0,7006	0,8891	0,9368
Cytidine_HILIC	4,7250	0,2038	0,3735	0,4091	0,5109	0,7246	0,6732	0,7042	0,7599	2,3393	2,2119	1,0235
D-Erythrose 4-phosphate_HILIC	1,2265	0,9702	0,9381	0,5795	1,1010	1,3968	0,6640	0,8840	0,9854	0,6739	1,4406	0,7570
D-Fructose_HILIC	1,1933	0,8638	1,4111	1,1646	0,5338	0,9856	0,4055	0,6463	0,5010	0,3242	0,8146	1,0718
D-Glutamic acid_RP	0,7460	1,0872	0,8783	1,0169	1,0238	1,1292	0,9491	1,0694	0,8849	0,5123	1,0114	1,0584
Decanoylcarnitine_HILIC	0,2152	0,5513	0,7331	1,0011	1,1029	1,3619	1,4653	1,4361	1,1569	0,6154	0,5061	0,5245
Deoxyguanosine_HILIC	0,7432	0,7676	1,3603	1,6169	0,8765	0,7331	0,7346	0,7500	0,7798	0,4240	2,1471	1,7927
Desaminotyrosine_HILIC	0,9821	0,5284	0,9471	0,7095	1,0635	1,0854	1,2834	1,0642	1,3224	2,1971	1,1073	0,7120
Desaminotyrosine_RP	0,8348	1,1678	1,0940	0,9796	0,9891	1,0765	1,1221	1,4193	1,2054	1,0977	1,3278	1,1237
Dihydroxyacetone phosphate_HILIC	0,8434	0,8485	0,9384	0,9142	0,9269	1,1286	0,8754	1,2146	0,8334	1,1394	1,0665	0,8381
Dimethylglycine_HILIC	0,7647	0,8728	1,3901	1,2056	1,0877	1,3869	0,9423	1,1107	0,8537	0,1604	0,7968	0,8787
DL-2-Aminoocetanoic acid_HILIC	0,8162	1,1060	0,8439	0,9010	0,6729	0,8271	0,7554	1,4004	1,3621	0,8429	1,6053	1,1016
Dodecanoylcarnitine_HILIC	0,3835	0,6549	1,0114	2,0667	1,2303	1,2671	0,8267	1,0747	0,8100	0,3669	0,3100	0,4311
Folic acid_RP	0,8131	0,6930	0,8098	0,8752	1,1303	0,8747	1,1242	1,3658	1,3962	0,7324	0,9945	0,9896
Formic acid_RP	0,7865	0,8936	0,9624	0,8199	1,1030	0,7992	0,8071	1,0670	1,0330	0,3480	1,0316	1,1661
Glucosylceramide (d18:1/22:0)_HILIC	1,0569	1,1021	0,9960	0,7776	1,1122	0,8122	1,1910	1,2862	1,2207	1,1860	1,2777	0,9105
Glucosylceramide (d18:1/24:0)_HILIC	0,6753	0,7878	0,9863	1,0724	0,9622	0,9017	0,9397	0,8178	1,0813	1,5722	0,8847	0,8905

Glutarylcarntine_HILIC	0,9096	0,7919	0,9829	0,9393	0,9705	1,0563	0,7636	1,0243	0,8828	0,8324	0,9192	1,0247
Glycerophosphocholine_RP	0,8476	0,9045	0,8080	0,8285	1,0942	1,2321	1,1134	1,1746	0,7825	1,2461	1,1901	1,0482
Glycine_HILIC	1,2743	1,1898	1,1897	1,1197	0,9561	1,0999	1,0141	1,0696	1,0708	0,3473	1,1250	1,2727
Glycine_RP	0,8813	0,9647	1,0821	1,1949	1,1623	1,0926	1,1828	1,4542	1,2690	0,5263	1,1556	0,9823
Glycocholic acid_HILIC	1,0467	1,0685	0,9298	1,1304	1,2876	1,5067	1,5882	0,8364	1,4488	0,9000	0,9408	1,1806
Guanidoacetic acid_HILIC	1,1308	0,6048	1,0609	0,8952	1,0791	0,9484	1,0341	0,8853	1,0062	1,8480	0,8874	0,6546
Guanidoacetic acid_RP	1,0856	0,6420	1,1910	1,1323	1,4800	1,2516	1,2033	1,1361	1,0950	1,3157	0,9903	0,7825
Guanosine_HILIC	0,9061	0,5992	2,1972	0,9567	1,1020	1,0233	0,9208	0,9797	0,8276	0,3813	0,8084	0,7813
Hexanoylcarnitine_HILIC	1,2016	0,4505	0,8734	1,1174	0,8372	0,9297	0,7411	0,8445	1,0083	1,0267	1,1968	0,8281
Hexanoylcarnitine_RP	0,8669	0,4335	0,8995	1,0056	1,0674	1,0172	1,0385	1,1942	0,9891	0,9146	0,9518	0,7284
Hippuric acid_HILIC	1,1227	0,9939	1,1715	1,0208	1,0735	1,0614	0,8808	0,9848	1,0109	1,0607	0,9700	0,8923
Histamine_RP	2,0906	1,4331	1,1923	1,1753	1,0136	0,9592	1,0759	1,1329	1,2588	1,4392	1,4488	1,5626
Homo-L-arginine_HILIC	1,0118	0,9694	1,1908	1,1860	1,1901	1,2285	0,9401	1,1706	1,3147	0,8182	1,0634	0,9059
Homo-L-arginine_RP	1,1340	1,0502	1,1877	1,3447	1,5702	1,5940	1,5012	1,5149	1,2994	1,2958	1,3495	1,2821
Homogentisic acid_HILIC	1,1528	1,3634	1,2339	1,1087	1,0097	1,2605	1,1942	1,3086	1,0671	1,0641	1,0335	1,2221
Hydroxysocaproic acid_HILIC	0,1875	0,8195	0,8362	1,0215	1,2815	1,3474	1,3374	1,1133	1,1295	0,2066	0,2360	0,6413
Hypotaurine_HILIC	0,8277	1,1582	1,0753	1,2909	1,0316	1,1016	1,0007	0,8685	0,9001	1,2626	0,9535	1,2625
Hypoxanthine_HILIC	2,0290	0,2916	1,4943	1,1172	0,9769	1,0048	0,8169	0,9807	1,0003	0,4609	1,4299	0,8459
Indoleacetic acid_HILIC	1,4919	1,0614	1,2299	0,9476	0,8508	0,9895	0,8985	1,1150	1,1704	0,7770	1,2166	0,9750
Indoleacetic acid_RP	0,8193	1,0857	0,8593	0,8991	0,9563	1,1742	1,2329	1,1711	0,8765	0,4627	0,7121	0,9845
Indolelactic acid_HILIC	0,7286	0,8524	0,7449	0,9453	0,9394	1,4738	1,0537	0,8273	0,9333	0,4431	0,7381	1,0461
Indolelactic acid_RP	1,5945	1,1286	1,0842	1,9219	1,5462	1,7169	1,4658	1,3944	1,0608	0,8063	1,1908	1,0587
Indoxyl sulfate_HILIC	1,0127	0,8030	1,1297	0,8910	1,1542	1,2030	1,0297	1,0143	1,2039	0,5936	1,0007	0,9302
Inosine_HILIC	0,3682	0,3373	1,1508	0,9819	0,8267	1,1339	0,8112	1,0313	0,7816	0,3127	1,9553	1,4658
Isovalerylcarnitine_RP	1,2155	0,9226	0,9110	0,8480	0,9652	1,1010	0,9016	1,3089	1,2130	1,1778	0,9374	0,9218
Kynurenic acid_RP	1,7660	1,4635	0,9989	1,0720	1,3199	1,2208	0,9219	1,3062	1,0295	1,2460	0,9863	1,1228
L-3-Hydroxykynurenine_HILIC	0,3809	0,4243	0,4102	0,7922	0,6228	0,8881	0,6074	0,4854	0,7039	0,3811	0,5449	0,5678
L-Acetylcarnitine_HILIC	1,4197	1,1403	1,1710	0,9226	1,0010	1,0602	0,7936	0,8477	0,9974	1,4998	1,2112	1,2058
L-Alanine_HILIC	0,6038	0,7842	0,8687	0,9506	0,9700	1,2135	1,0398	1,1212	1,0899	0,2846	0,9411	0,8369
L-Alanine_RP	0,8855	0,9017	0,9362	1,0869	0,9614	1,1189	1,3467	1,3296	0,9547	0,4408	0,8587	0,9060
L-Arginine_HILIC	1,4623	1,2863	1,2710	0,9217	1,3242	1,3786	1,5375	1,2721	1,3708	0,7780	1,8178	1,8839
L-Aspartic acid_HILIC	2,2217	1,5589	1,6363	1,0112	0,9776	0,9109	0,7548	0,6889	0,7587	0,1092	1,1613	1,0310
L-Carnitine_RP	1,0834	0,7968	1,0418	0,8791	1,0940	0,8853	0,9552	1,0343	0,9973	1,8856	1,2690	0,8901
L-Cysteine_RP	1,2964	1,3123	0,9071	1,0258	0,9850	1,0857	1,2240	1,4482	1,3485	0,4383	1,1003	0,8405
L-Glutamic acid_HILIC	0,5620	1,1743	0,8437	0,9129	0,8977	1,0251	0,9713	1,0294	0,9184	0,2620	1,0943	1,1786
L-Glutamic acid_RP	0,6256	1,0204	0,8217	1,0121	0,9972	1,0786	0,9122	1,0974	0,8373	0,4649	1,1603	1,1949
L-Glutamine_HILIC	1,9105	0,4292	1,1447	1,0835	1,1460	0,9661	1,0187	0,9859	1,0172	2,2599	1,1138	0,7027
L-Glutamine_RP	1,7632	0,6500	1,1423	0,9654	1,0436	1,0063	0,9496	0,9619	0,9224	1,9136	1,1712	0,7230
L-Histidine_HILIC	0,8351	1,0268	1,0923	0,9429	0,9056	1,0137	0,7851	0,9991	1,1909	1,0280	1,2620	1,0739
L-Histidine_RP	0,7936	0,8502	0,8568	0,8708	0,8986	0,8932	1,0505	1,0256	0,8490	1,0738	1,0205	0,8488
L-Homoserine_HILIC	0,7511	0,7648	0,7393	0,6272	0,7054	0,8138	0,7774	0,7327	0,8832	0,8789	0,8030	0,8063
L-Isoleucine_HILIC	1,0808	0,4454	1,0838	0,8363	1,0942	1,0032	1,1427	1,1788	1,4350	2,3003	1,0002	0,6546
L-Isoleucine_RP	1,2734	0,3420	1,2482	0,8951	1,4365	1,1751	1,4281	0,9155	1,2964	2,5877	0,7521	0,4580
L-Lactic acid_HILIC	0,2492	1,0755	0,7474	0,9002	0,9937	1,1406	1,0656	1,1202	1,0348	0,2476	0,8339	1,1775
L-Leucine_HILIC	1,0501	0,4710	0,9625	0,8004	0,9745	0,9718	1,0049	1,1280	1,3228	1,4231	0,9249	0,6496
L-Leucine_RP	1,1135	0,4556	1,0030	0,8954	1,2600	0,9961	1,1520	0,9800	1,1308	1,7055	0,8012	0,5994
L-Lysine_HILIC	1,6198	0,4219	1,2299	1,1263	1,1475	0,9917	1,1245	1,1708	1,1425	1,6835	1,0902	0,7842
L-Lysine_RP	1,5359	0,6877	1,2068	1,0950	1,0280	1,0699	1,1871	1,1926	1,4165	1,1079	0,7283	0,7283
L-Malic acid_HILIC	1,0808	0,9489	0,9962	0,9815	1,1507	1,3191	1,4438	1,2976	1,2981	0,6770	1,2160	1,2489
L-Methionine_HILIC	1,0571	0,3913	0,9494	0,8976	1,0648	0,8120	0,8959	0,7926	0,9469	1,9998	1,0342	0,6720
L-Methionine_RP	1,3957	0,4772	1,1049	1,1246	1,3521	1,0043	1,1321	0,9493	1,0138	1,2424	1,0533	0,5553
L-Phenylalanine_HILIC	0,7853	0,5935	0,9989	0,8028	1,1084	1,0231	1,3497	0,9567	1,1915	1,8722	0,9633	0,7690
L-Phenylalanine_RP	0,9221	0,5071	0,9869	0,8391	1,3558	1,1673	1,2943	1,1133	1,2604	2,5695	1,0435	0,7902
L-Proline_HILIC	1,0132	0,9924	0,9968	1,0539	1,0490	1,0181	0,9756	0,9892	0,9791	0,1853	0,9477	1,0153
L-Proline_RP	1,2213	0,9633	1,0065	1,0400	1,0389	1,0817	1,0215	1,1293	1,0190	0,1242	1,0514	1,0845
L-Serine_HILIC	1,0769	0,5522	1,2037	1,1470	1,1395	1,3109	1,3012	1,2969	1,0033	0,2134	1,0384	0,7204
L-Serine_RP	1,0833	0,6332	1,1180	1,1388	1,0832	1,0078	0,8947	0,9741	0,9327	0,3749	1,1657	0,8801
L-Threonine_HILIC	0,5200	0,6985	1,0489	0,9918	1,3536	1,0935	1,0491	0,9710	1,0224	2,0682	0,8449	0,9122
L-Tryptophan_HILIC	1,0047	0,6015	1,1136	1,1264	1,1370	1,1801	1,3605	1,2342	1,4737	1,8929	1,0101	0,7924
L-Tryptophan_RP	0,9673	0,5261	1,0036	0,9530	1,4326	1,1003	1,1995	1,0754	1,1692	1,8473	1,2115	0,8184
L-Tyrosine_HILIC	0,8113	0,5368	0,9439	0,8640	1,1712	0,8410	1,0692	0,8665	1,0923	2,5707	0,9023	0,6942
L-Tyrosine_RP	0,8707	0,5500	0,8711	0,6612	1,0320	0,7874	1,0559	0,8394	1,1635	2,0273	0,9251	0,9772
L-Valine_HILIC	0,9948	0,5754	0,9829	0,8247	1,2416	1,0779	1,0267	1,0272	1,2222	2,2256	1,0066	0,7538
L-Valine_RP	1,2188	0,6317	1,1263	0,9283	1,5780	1,2456	1,2047	1,0809	1,0587	2,6644	0,8722	0,8209
LysoPC(16:0)_HILIC	2,4299	0,1859	1,6163	0,8090	0,8089	0,6527	0,4379	0,5079	0,4371	2,6796	2,0022	1,0059
LysoPC(18:0)_HILIC	1,7143	0,2473	1,3424	0,7878	0,9733	0,9160	0,6944	0,8023	0,9713	1,7448	1,2988	0,6614
LysoPC(22:0)_HILIC	1,1648	0,7890	1,4460	0,8296	0,7155	0,8059	0,9341	1,1568	1,2719	1,2017	0,9457	0,8019
LysoPC(24:1(15Z))_HILIC	0,8000	0,6684	0,8710	0,5419	0,5716	0,6349	0,9892	1,0770	1,5819	1,3020	0,9152	0,8512
Malonylcarnitine_HILIC	1,2073	0,9995	0,8702	0,6593	0,9389	0,8599	0,9094	1,0456	1,1672	1,3598	1,1487	1,2555
Metanephrine_HILIC	1,2107	0,9111	0,9743	0,9492	1,0083	1,0484	0,8142	0,8482	0,8832	0,8170	0,9961	0,9466
Methionine sulfoxide_RP	1,2049	0,4648	0,9432	0,7418	0,9064	0,7529	0,8382	1,0174	1,1748	1,5484	1,3492	0,8695
Murocholic acid_RP	0,7676	0,7726	0,6052	0,8311	1,3133	1,2951	1,3208	1,1108	0,9418	1,4383	0,8904	1,0324
myo-Inositol_HILIC	1,2294	0,9699	1,0685	0,9046	0,8163	0,8679	0,7855	0,9426	0,8949	0,5117	1,0191	0,9192
N-Acetyl-D-glucosamine_HILIC	0,8327	1,1774	0,8662	1,0757	1,0755	0,9731	1,1330	1,6436	1,4591	1,2039	1,2499	1,2439
N-Acetyl-L-alanine_HILIC	1,2507	1,0518	1,1385	1,0625	1,1181	1,1586	0,9326	0,8833	1,0615	1,0941	0,9516	1,0367
N-Acetylaspartylglutamic acid_HILIC	0,6301	0,6416	0,4971	0,6637	0,7280	0,6941	0,6946	0,7752	0,7798	0,7846	1,2376	1,0139
N-Acetylglutamic acid_HILIC	0,6599	0,9940	0,9459	0,9840	1,1002	1,1230	1,1836	1,2044	1,1038	1,3505	1,0442	1,2963
N-Acetylglutamine_HILIC	1,0264	1,0669	1,1097	0,9785	0,9563	1,0858	0,8440	0,7674	0,8336	0,5857	0,8699	1,0000
N-Acetylglutamine_RP	0,9263	1,0782	0,9691	0,9874	1,3117	1,4741	0,9774	0,9870	0,9383	0,9367	0,6944	0,7871
N-Acetylmannosamine_HILIC	0,7962	0,9329	0,9552	1,1896	1,2255	1,0076	1,0506	1,1881	1,0041	1,2501	1,3781	1,1324
N-Acetyls erine_HILIC	0,4913	1,1798	1,0356	1,0073	1,1747	1,1152	1,1015	1,0410	0,9706	0,3665	0,8366	1,2638
N-Alpha-acetyls erine_RP	1,2761	1,1292	1,1822	1,2176	1,2804	1,0629	0,9801	1,1051	1,1353	1,4595	1,0378	0,9693
N6-Acetyl-L-lysine_RP	1,2559	0,8786	1,2056	1,0156	1,1759	1,2001	1,2245					

Pantothenic acid_HILIC	1,0662	1,1229	0,9716	0,8911	0,8671	0,8701	0,9063	0,9639	1,0137	1,4587	0,9420	0,9236
PC(14:0/16:0)_HILIC	1,1010	0,9451	1,0826	1,1273	0,9839	1,1753	1,2064	1,2717	1,2699	1,4162	1,2284	1,1072
PC(14:0/18:2(9Z,12Z))_HILIC	1,2471	0,7198	0,9617	0,9850	1,0284	1,4169	2,1076	1,6993	1,8726	1,1115	1,0988	1,0955
PC(16:0/16:0)_HILIC	0,7894	0,7800	1,0705	1,0138	0,7959	0,7565	0,9529	1,0633	1,1656	1,0020	0,8722	0,7417
PC(16:0/16:1(9Z))_HILIC	1,0492	1,0656	1,1043	1,1534	0,7815	0,6643	0,5589	0,5655	0,7473	0,8102	0,7897	0,8623
PC(16:0/18:1(9Z))_HILIC	1,3540	1,2204	1,1577	1,1246	0,9940	1,1905	1,3441	1,3998	1,4218	1,0109	1,1606	0,9610
PC(16:0/18:2(9Z,12Z))_HILIC	1,5525	1,0400	1,1348	0,8319	0,9320	0,8398	1,0857	1,0376	1,2448	0,9218	0,9167	0,7793
PC(16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))_HILIC	1,6978	1,1978	0,9982	0,7856	0,7940	0,9228	1,0877	1,2433	1,1907	1,0982	0,9333	0,9655
PC(16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z))_HILIC	1,5775	1,5393	1,3363	1,5060	1,1294	1,0755	1,1826	1,3336	1,5370	1,2954	1,5399	1,3966
PC(16:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))_HILIC	2,1348	1,7377	1,3227	1,2945	1,2339	1,3308	1,2941	1,1843	1,0509	0,9508	1,2072	1,3945
PC(18:0/18:0)_HILIC	1,2068	1,2261	1,1502	1,2693	1,0763	1,2405	1,3177	1,2352	1,2446	1,0737	1,0535	1,0135
PC(18:0/18:1(11Z))_HILIC	0,8625	0,8707	0,8786	0,9526	0,8882	0,9931	1,1648	1,3492	1,3961	1,2809	1,0707	0,9144
PC(18:0/18:2(9Z,12Z))_HILIC	1,2546	1,0272	1,0737	0,9850	0,9015	1,0727	1,1922	1,2769	1,3742	1,2232	1,0285	1,0519
PC(18:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))_HILIC	1,5135	1,8850	1,3226	1,6673	1,2522	1,1955	1,5612	1,6175	1,4082	1,0365	1,2043	1,3873
PC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/P-18:0)_HILIC	0,8333	1,0278	0,9956	1,0943	0,9363	1,1752	0,9684	0,9312	0,9222	1,6733	0,9769	1,0645
PC(P-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))_HILIC	1,8183	1,4736	1,3183	1,2273	1,2534	1,2173	1,7447	1,8174	1,9810	1,0173	1,2609	0,8695
PC(P-16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))_HILIC	1,3574	0,9643	1,0000	1,2357	0,9265	0,7032	0,8535	0,9104	1,4139	1,0574	0,9260	0,9785
PE(18:0/18:1(9Z))_HILIC	1,2761	1,1402	1,2051	1,1794	1,0843	1,0516	1,2494	1,1926	1,1838	1,3020	0,9358	1,1354
Phenylpropionic acid_HILIC	3,0477	0,5003	1,6161	1,0865	0,9826	0,9431	0,7802	0,7606	0,7578	1,9145	0,7915	0,5204
phosphatidylcholine_HILIC	1,0475	0,8567	1,0091	0,9460	1,1203	1,0862	1,4004	1,3183	1,6178	1,1310	1,4102	0,8916
Pimelylcarnitine_HILIC	0,1266	0,2477	0,4470	1,5927	1,5679	2,4501	2,2745	2,4028	1,2300	0,1349	0,1145	0,2499
Pipecolic acid_RP	0,8539	0,9752	1,0055	1,1190	1,1518	1,1092	1,0463	1,0171	0,9235	0,8641	0,9269	0,9945
Propionylcarnitine_HILIC	2,0646	1,0525	1,1686	0,6701	0,9262	0,9242	0,8187	0,9540	1,1302	1,1861	1,5814	1,0069
PS(16:0/18:1(9Z))_HILIC	0,3034	0,9539	4,1063	1,0414	0,8463	0,6651	0,9375	0,9264	1,0989	0,5357	1,1792	1,7488
PS(18:0/18:1(9Z))_HILIC	0,2107	0,6206	2,8196	1,1242	0,9360	1,1261	1,5760	1,2785	1,4835	0,6051	0,8188	1,0015
Pseudouridine_HILIC	0,7105	1,3546	1,0457	1,0833	0,8309	0,7297	0,8328	0,6466	0,5190	0,9591	0,5506	1,0646
Purine_HILIC	0,9895	0,5813	1,0916	0,7363	1,0348	1,0530	1,2495	0,7984	1,0712	1,7409	0,7513	0,6432
Pyridoxal_RP	0,8820	1,0422	0,7482	0,8859	1,0923	1,2182	1,2765	1,1446	1,0551	0,1775	0,9788	1,0616
Pyridoxine_RP	1,4169	0,8114	0,9909	0,6966	1,0889	0,8086	0,8771	0,7097	0,9901	4,5045	0,8749	0,7714
Pyroglutamic acid_HILIC	0,7643	0,8910	0,9407	1,1137	1,0168	1,0510	1,0041	1,1503	1,1939	0,9517	1,2076	1,0301
Pyruvic acid_HILIC	1,8923	1,2461	0,8826	0,5722	0,5968	0,5144	0,6042	0,7029	0,6231	0,2643	1,5782	1,3179
Retinal_HILIC	1,1079	0,9085	0,9189	1,0181	0,8893	1,2435	0,9481	0,8403	1,0780	1,1613	0,7737	1,0156
S-Methyl-L-cysteine_RP	0,9308	0,5150	0,9103	0,7601	1,2347	1,0365	1,2600	1,1718	1,5491	2,5189	1,0055	0,7577
Saccharopine_HILIC	0,0980	0,4272	0,6907	0,9179	1,1684	1,4656	1,7149	1,5808	1,4284	0,2500	0,9774	1,1131
Shikimic acid_HILIC	0,6262	0,5827	0,7033	1,1537	1,2135	1,7416	1,3952	1,2413	1,1718	0,3092	0,5693	0,6472
SM(d18:1/16:0)_HILIC	0,7902	0,8217	0,9957	1,0910	1,0227	1,1242	1,1730	1,3869	1,4443	0,8149	1,0213	1,0657
SM(d18:1/23:0)_HILIC	0,8302	0,6537	1,2372	0,9536	0,9857	1,2980	1,1926	0,7761	1,4319	0,2250	1,7709	1,1852
SM(d18:1/24:0)_HILIC	0,8713	0,5240	0,6823	0,7260	0,9411	0,8683	0,8413	0,6386	1,0322	0,1197	1,4215	0,8279
SM(d18:1/26:0)_HILIC	0,5875	0,5438	0,7914	0,7094	1,2506	1,2823	0,8581	0,6836	0,9281	0,1290	1,1755	0,8395
Sorbitol_HILIC	0,9414	1,0195	0,7119	0,6722	1,0681	1,4260	1,5390	1,2558	1,3037	0,8284	1,0382	1,0578
Sphinganine_HILIC	1,9000	1,5183	1,6113	1,5859	0,9351	0,9449	0,6941	0,7704	0,8320	0,0539	1,2129	0,8117
Succinic acid_HILIC	1,1443	1,0958	0,9867	0,9655	0,9927	0,9655	1,0486	1,0640	1,1383	1,3838	1,1227	1,2577
Sucrose_HILIC	0,1871	0,4796	1,1332	0,8419	0,7998	1,4709	1,5310	1,3142	1,2350	0,2045	1,0893	1,3259
Symmetric dimethylarginine_HILIC	0,8925	1,0793	1,1848	0,9545	1,0276	1,1987	0,8447	1,1488	1,0883	0,5942	0,8180	0,9836
Taurine_HILIC	1,5212	0,4372	1,1505	0,9611	0,7744	1,0507	0,8415	1,1051	1,1870	1,3525	1,3850	0,8616
Tetrahydrobiopterin_HILIC	0,2783	0,9889	1,2226	1,3246	0,8936	1,0670	0,9547	0,9740	1,4360	0,3333	1,2441	1,0003
Thiamine_RP	0,7880	0,7969	0,7593	0,6551	1,0509	0,8111	1,0539	1,2471	1,2149	0,7028	1,2658	1,1161
Urea_HILIC	0,8524	1,0209	0,8164	1,0048	1,1294	1,2262	0,9415	0,8706	0,8892	0,5187	0,7322	0,8963
Ureidosuccinic acid_HILIC	0,4220	0,6599	0,6325	0,9746	1,1169	1,1664	1,0577	1,1018	1,2316	0,7151	0,7900	0,9057
Uric acid_HILIC	1,0862	1,0832	1,0538	1,0740	0,9154	1,1074	0,7814	1,0271	1,0016	0,0045	1,1448	1,1827
Uridine_HILIC	0,8851	1,1243	0,9643	1,0885	1,0680	1,0804	1,2237	1,2597	1,0531	1,0761	0,8873	1,2250
Xanthine_HILIC	0,8606	0,6440	1,0732	1,0763	1,2631	1,3154	1,1392	1,1678	1,0165	0,5626	0,6851	0,6670
Xanthosine_HILIC	0,5332	0,8451	0,7284	0,9676	1,1517	1,3097	1,4991	1,5869	1,2493	0,7674	0,7580	1,0492

Tableau 4. – . Métabolites différentiellement exprimés dans la monoculture ou co-culture au jour 24

	FC	log2(FC)	raw,pval	-LOG10(p)
1-Methyladenosine	0,48402	-1,0468	0,050313	1,2983
Pimelylcarnitine	0,5119	-0,96607	0,064987	1,1872
Glycerophosphocholine	0,66617	-0,58603	0,01297	1,8871
Dihydroxyacetone phosphate	0,68615	-0,54341	0,088982	1,0507
L-Alanine	0,71807	-0,47781	0,042348	1,3732
Dodecanoylcarnitine	0,75371	-0,40792	0,030838	1,5109
Inosine	0,75791	-0,3999	0,015428	1,8117
Choline	0,77096	-0,37527	0,025902	1,5867
Kynurenic acid	0,78817	-0,34342	0,021698	1,6636
D-Glutamic acid	0,82745	-0,27326	0,047023	1,3277
L-Histidine	0,8278	-0,27265	0,079282	1,1008
Hexanoylcarnitine	0,82828	-0,27181	0,035493	1,4499
Biotin	0,83963	-0,25217	0,022782	1,6424
L-Glutamic acid	0,89224	-0,1645	0,087396	1,0585
Creatinine	1,0741	0,10319	0,0052626	2,2788
Homo-L-arginine	1,1231	0,16745	0,082237	1,0849
1-Pyrroline-5-carboxylic acid	1,1843	0,24398	0,094537	1,0244
L-Valine	1,1899	0,25079	0,014879	1,8274
L-Histidine	1,1919	0,25332	0,07461	1,1272
N-Acetyl-L-alanine	1,2017	0,26513	0,0018028	2,7441
L-Homoserine	1,2055	0,26964	0,064665	1,1893
L-Phenylalanine	1,2454	0,31666	0,015122	1,8204
Creatine	1,2635	0,33737	0,016898	1,7722
PC(16:0/16:1(9Z))	1,3213	0,40199	0,0078658	2,1043
S-Methyl-L-cysteine	1,322	0,40272	0,066114	1,1797
L-Tyrosine	1,3861	0,47101	0,0038672	2,4126
L-Isoleucine	1,4161	0,50196	0,078108	1,1073
LysoPC(24:1(15Z))	1,4688	0,55466	0,038303	1,4168
Tetrahydrobiopterin	1,4744	0,56011	0,01317	1,8804
4-Pyridoxic acid	1,5174	0,60156	0,018242	1,7389

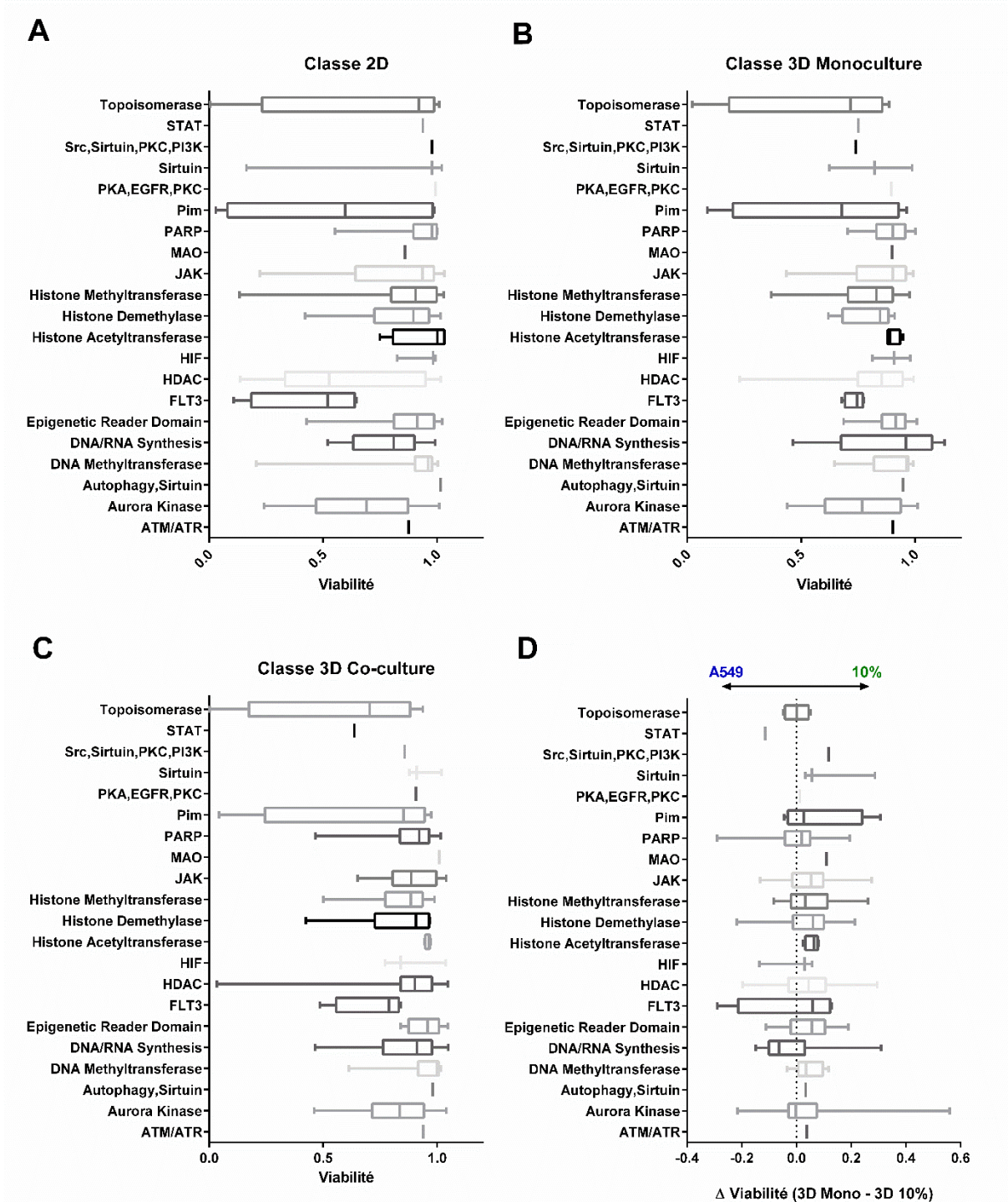


Figure 2. – Analyse des effets de classe des composés épigénétiques en 2D, 3D et 3D co-culture

Boite à moustache de la viabilité moyenne induite par les composés épigénétique selon leur cible d'inhibition (classe) en 2D (A), 3D Monoculture (B) et Co-culture (C) ainsi que la différence entre ces deux dernières conditions (D).

Tableau 5. – Caractéristiques des molécules épigénétiques du criblage à haut débit

Catalog Number	Product Name	M.w.	CAS Number	Target
S7110	(+)-JQ1	456,99	1268524-70-4	Epigenetic Reader Domain
S1233	2-Methoxyestradiol (2-MeOE2)	302,41	362-07-2	HIF
S7120	3-deazaneplanocin A (DZNeP) HCl	262,26	120964-45-6	Histone Methyltransferase
S7555	4SC-202	447.51	910462-43-0	HDAC
S7572	A-366	329.44	1527503-11-2	Histone Methyltransferase
S1090	Abexinostat (PCI-24781)	397,42	783355-60-2	HDAC
S2178	AG-14361	320,39	328543-09-5	PARP
S1143	AG-490 (Tyrphostin B42)	294,3	133550-30-8	EGFR,JAK
S1133	Alisertib (MLN8237)	518,92	1028486-01-2	Aurora Kinase
S2719	AMG-900	503,58	945595-80-2	Aurora Kinase
S7582	Anacardic Acid	348.52	16611-84-0	Histone Acetyltransferase
S8197	APTSTAT3-9R	4947.51	NA	STAT
S2244	AR-42	312.36	935881-37-1	HDAC
S1134	AT9283	381,43	896466-04-9	Aurora Kinase,Bcr-Abl,JAK
S1451	Aurora A Inhibitor I	588,07	1158838-45-9	Aurora Kinase
S2214	AZ 960	354,36	905586-69-8	JAK
S7767	AZ6102	428.53	1645286-75-4	PPAR
S1782	Azacitidine	244,2	320-67-2	DNA Methyltransferase
S7104	AZD1208	379,48	1204144-28-4	Pim
S2162	AZD1480	348,77	935666-88-9, 1260222-79-4 (TFA)	JAK
S7029	AZD2461	395,43	1174043-16-3	PARP
S1147	Barasertib (AZD1152-HQPA)	507,56	722544-51-6	Aurora Kinase
S2851	Baricitinib (LY3009104, INCB028050)	371,42	1187594-09-7	JAK
S1085	Belinostat (PXD101)	318,35	414864-00-9	HDAC
S8179	BI-7273	353.41	1883429-21-7	Epigenetic Reader Domain
S8006	BIX 01294	600,02	1392399-03-9	Histone Methyltransferase
S7419	Blasticidin S HCl	458.9	3513-03-9	DNA/RNA Synthesis
S7591	BRD4770	413.47	1374601-40-7	Histone Methyltransferase
S7233	Bromosporine	404,44	1619994-69-2	Epigenetic Reader Domain
S7152	C646	445,42	328968-36-1	Histone Acetyltransferase
S1215	Carboplatin	371.25	41575-94-4	DNA/RNA Synthesis
S2806	CEP-33779	462,57	1257704-57-6	JAK
S3001	Clevudine	260.22	163252-36-6	DNA/RNA Synthesis
S7616	CPI-169	528.66	1450655-76-1	Histone Methyltransferase
S7304	CPI-203	399,9	1446144-04-2	Epigenetic Reader Domain
S7656	CPI-360	437.53	1802175-06-9	Histone Methyltransferase
S1194	CUDC-101	434,49	1012054-59-9	EGFR,HDAC,HER2
S2759	CUDC-907	508,55	1339928-25-4	HDAC,PI3K

S7041	CX-6258 HCl	498,4	1353859-00-3	Pim
S1171	CYC116	368,46	693228-63-6	Aurora Kinase,VEGFR
S1648	Cytarabine	243.22	147-94-4	DNA/RNA Synthesis
S1095	Dacinostat (LAQ824)	379,459	404951-53-7	HDAC
S1107	Danuserib (PHA-739358)	474,55	827318-97-8	Aurora Kinase,Bcr-Abl,c-RET,FGFR
S2554	Daphnetin	178.14	486-35-1	PKA,EGFR,PKC
S1373	Daptomycin	1620.67	103060-53-3	DNA/RNA Synthesis
S7541	Decernotinib (VX-509)	392.38	944842-54-0	JAK
S1200	Decitabine	228,21	2353-33-5	DNA Methyltransferase
S1422	Droxinostat	243,69	99873-43-5	HDAC
S7611	EI1	390.48	1418308-27-6	Histone Methyltransferase
S1327	Ellagic acid	302.19	476-66-4	Topoisomerase
S1181	ENMD-2076	375,47	934353-76-1	Aurora Kinase,FLT3,VEGFR
S2018	ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid	525.56	1291074-87-7	Aurora Kinase,FLT3,VEGFR
S3147	Entacapone	305,29	130929-57-6	Histone Methyltransferase
S1053	Entinostat (MS-275)	376,41	209783-80-2	HDAC
S7353	EPZ004777	539,67	1338466-77-5	Histone Methyltransferase
S7805	EPZ011989	642.27	1598383-40-4(free base)	Histone Methyltransferase
S7748	EPZ015666(GSK3235025)	383.44	1616391-65-1	Histone Methyltransferase
S2736	Fedratinib (SAR302503, TG101348)	524,68	936091-26-8	JAK
S7605	Filgotinib (GLPG0634)	425,5	1206161-97-8	JAK
S2179	Gandotinib (LY2784544)	469,94	1229236-86-5	JAK
S1149	Gemcitabine HCl	299.66	122111-03-9	Autophagy,DNA/RNA Synthesis
S2170	Givinostat (ITF2357)	475,97	732302-99-7	HDAC
S7581	GSK J1	389.45	1373422-53-7	Histone Demethylase
S7070	GSK J4 HCl	453,96	1373423-53-0(free base)	Histone Demethylase
S2740	GSK1070916	507.63	942918-07-2	Aurora Kinase
S7620	GSK1324726A (I-BET726)	434.91	1300031-52-0	Epigenetic Reader Domain
S7231	GSK2801	371.45	1619994-68-1	Epigenetic Reader Domain
S7796	GSK2879552 2HCl	437.4	1401966-69-5 (free base)	Histone Demethylase
S7804	GSK503	526.67	1346572-63-1	Histone Methyltransferase
S8111	GSK591	380.48	1616391-87-7	Histone Methyltransferase
S7574	GSK-LSD1 2HCl	289.24	1431368-48-7	Histone Demethylase
S1529	Hesperadin	516,65	422513-13-1	Aurora Kinase
S8209	HLCL-61 HCl	380.91	1158279-20-9	Histone Methyltransferase
S7189	I-BET-762	423,9	1260907-17-2	Epigenetic Reader Domain
S7835	I-BRD9	497.55	1714146-59-4	Epigenetic Reader Domain
S1087	Iniparib (BSI-201)	292,03	160003-66-7	PARP
S1132	INO-1001 (3-Aminobenzamide)	136,15	3544-24-9	PARP
S7234	IOX1	189,17	5852-78-8	Histone Demethylase
S2919	IOX2	352,34	931398-72-0	HIF

S8323	ITSA-1 (ITSA1)	292.12	200626-61-5	HDAC
S7281	JIB-04	308.76	199596-05-9	Histone Demethylase
S1249	JNJ-7706621	394,36	443797-96-4	Aurora Kinase,CDK
S2158	KW-2449	332,4	1000669-72-6	Aurora Kinase,Bcr-Abl,FLT3
S8056	Lomeguatrib	326,17	192441-08-0	DNA Methyltransferase
S2779	M344	307,39	251456-60-7	HDAC
S1484	MC1568	314,31	852475-26-4	HDAC
S7438	ME0328	321,37	1445251-22-8	PARP
S7476	MG149	340.46	1243583-85-8	Histone Acetyltransferase
S7618	MI-2 (Menin-MLL Inhibitor)	375.55	1271738-62-5	Histone Methyltransferase
S7619	MI-3 (Menin-MLL Inhibitor)	375.55	1271738-59-0	Histone Methyltransferase
S8096	Mirin	220.25	1198097-97-0	ATM/ATR
S8146	Mitomycin C	334.37	50-07-7	DNA/RNA Synthesis
S1384	Mizoribine	259.22	50924-49-7	DNA/RNA Synthesis
S2770	MK-5108 (VX-689)	461,94	1010085-13-8	Aurora Kinase
S7296	ML324	349.43	1222800-79-4	Histone Demethylase
S1100	MLN8054	476,86	869363-13-3	Aurora Kinase
S7265	MM-102	669,8	1417329-24-8	Histone Methyltransferase
S1122	Mocetinostat (MGCD0103)	396,44	726169-73-9	HDAC
S2219	Momelotinib (CYT387)	414,46	1056634-68-4	JAK
S8112	MS023	287.40	1831110-54-3	Histone Methyltransferase
S7305	MS436	383.42	1395084-25-9	Epigenetic Reader Domain
S1826	Nedaplatin	303.17	95734-82-0	DNA/RNA Synthesis
S7473	Nexturastat A	341,4	1403783-31-2	HDAC
S7625	Niraparib (MK-4827) tosylate	492.59	1038915-73-9	PARP
S1509	Norfloxacin	319.33	70458-96-7	Topoisomerase
S2686	NVP-BSK805 2HCl	563,47	1092499-93-8 (free base)	JAK
S7238	NVP-TNKS656	494.58	1419949-20-4	PARP
S8195	Oclacitinib	453.51	1640292-55-2	JAK
S7681	OF-1	440.31	919973-83-4	Epigenetic Reader Domain
S1463	Ofloxacin	361.37	82419-36-1	Topoisomerase
S7237	OG-L002	225,29	1357302-64-7	Histone Demethylase
S1060	Olaparib (AZD2281, Ku-0059436)	434,46	763113-22-0	PARP
S7795	ORY-1001 (RG-6016) 2HCl	303.27	1431326-61-2	Histone Demethylase
S7360	OTX015	491,99	202590-98-5	Epigenetic Reader Domain
S8057	Pacritinib (SB1518)	472,58	937272-79-2	FLT3,JAK
S1030	Panobinostat (LBH589)	349,43	404950-80-7	HDAC
S2012	PCI-34051	296,32	950762-95-5	HDAC
S8180	PF-CBP1 HCl	525.08	NA	Epigenetic Reader Domain
S1216	PFI-1 (PF-6405761)	347,39	1403764-72-6	Epigenetic Reader Domain
S7294	PFI-2 HCl	499.52	1627676-59-8	Histone Methyltransferase

S7315	PFI-3	321.37	1819363-80-8	Epigenetic Reader Domain
S1454	PHA-680632	501,62	398493-79-3	Aurora Kinase
S7062	Pinometostat (EPZ5676)	562,71	1380288-87-8	Histone Methyltransferase
S1393	Pirarubicin	627.64	72496-41-4	Topoisomerase
S2886	PJ34	295.34	344458-19-1	PARP
S7300	PJ34 HCl	331,8	344458-15-7	PARP
S1515	Pracinostat (SB939)	358,48	929016-96-6	HDAC
S4294	Procainamide HCl	271,79	614-39-1	DNA Methyltransferase, Sodium Channel
S1995	Procarbazine HCl	257.76	366-70-1	DNA/RNA Synthesis
S2391	Quercetin	302,24	117-39-5	Src, Sirtuin, PKC, PI3K
S1096	Quisinostat (JNJ-26481585) 2HCl	394,476	875320-31-3	HDAC
S7641	Remodelin	363.28	1622921-15-6	Histone Acetyltransferase
S2693	Resminostat	349,4	864814-88-0	HDAC
S1396	Resveratrol	228,24	501-36-0	Autophagy, Sirtuin
S2821	RG108	334,33	48208-26-0	DNA Methyltransferase, Transferase
S7292	RG2833 (RGFP109)	339,43	1215493-56-3	HDAC
S7229	RGFP966	362,4	1396841-57-8	HDAC
S8001	Ricolinostat (ACY-1215)	433,5	1316214-52-4	HDAC
S1007	Roxadustat (FG-4592)	352,34	808118-40-3	HIF
S1098	Rucaparib (AG-014699, PF-01367338) phosphate	421,36	459868-92-9	PARP
S1378	Ruxolitinib (INCB018424)	306,37	941678-49-5	JAK
S7295	RVX-208	370,4	1044870-39-4	Epigenetic Reader Domain
S8043	Scriptaid	326,35	287383-59-9	HDAC
S1541	Selisistat (EX 527)	248,71	49843-98-3	Sirtuin
S7079	SGC 0946	618,57	1561178-17-3	Histone Methyltransferase
S7832	SGC707	298.34	1687736-54-4	Histone Methyltransferase
S7256	SGC-CBP30	509,04	1613695-14-9	Epigenetic Reader Domain
S7276	SGI-1027	461,52	1020149-73-8	DNA Methyltransferase
S2198	SGI-1776 free base	405,42	1025065-69-3	Pim
S2804	Sirtinol	394,47	410536-97-9	Sirtuin
S8005	SMI-4a	273,23	438190-29-5	Pim
S1154	SNS-314 Mesylate	527,04	1146618-41-8	Aurora Kinase
S4125	Sodium Phenylbutyrate	186,18	1716-12-7	HDAC
S7680	SP2509	437.90	1423715-09-6	Histone Demethylase
S1129	SRT1720 HCl	506,02	1001645-58-4	Sirtuin
S2902	S-Ruxolitinib (INCB018424)	306,37	941685-37-6	JAK
S2818	Tacedinaline (CI994)	269,3	112522-64-2	HDAC
S2718	TAK-901	504,64	934541-31-8	Aurora Kinase
S2692	TG101209	509,67	936091-14-4	c-RET, FLT3, JAK
S7324	TMP269	514,52	1314890-29-3	HDAC
S5001	Tofacitinib (CP-690550) Citrate	504,49	540737-29-9	JAK

S2789	Tofacitinib (CP-690550,Tasocitinib)	312,37	477600-75-2	JAK
S1048	Tozasertib (VX-680, MK-0457)	464,59	639089-54-6	Aurora Kinase
S4246	Tranylcypromine (2-PCPA) HCl	169,65	4548-34-9	MAO
S1045	Trichostatin A (TSA)	302,4	58880-19-6	HDAC
S8049	Tubastatin A	335,4	1252003-15-8	HDAC
S2627	Tubastatin A HCl	371,86	1310693-92-5	HDAC
S7570	UNC0379	413,56	1620401-82-2	Histone Methyltransferase
S7610	UNC0631	635,93	1320288-19-4	Histone Methyltransferase
S7088	UNC1215	529,72	1415800-43-9	Epigenetic Reader Domain
S7373	UNC669	338,24	1314241-44-5	Epigenetic Reader Domain
S8038	UPF 1069	279,29	1048371-03-4	PARP
S1168	Valproic acid sodium salt (Sodium valproate)	166,19	1069-66-5	GABA Receptor,HDAC,Autophagy
S1004	Veliparib (ABT-888)	244,29	912444-00-9	PARP
S1047	Vorinostat (SAHA, MK0683)	264,3	149647-78-9	Autophagy,HDAC
S2867	WHI-P154	376,2	211555-04-3	EGFR,JAK
S2796	WP1066	356,22	857064-38-1	JAK
S7036	XL019	444,53	945755-56-6	JAK
S7113	Zebularine	228,2	3690-10-6	DNA Methyltransferase
S8004	ZM 39923 HCl	367,91	1021868-92-7	JAK
S1103	ZM 447439	513,59	331771-20-1	Aurora Kinase