

2020-2021

Thèse

pour le

Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

**Optimisation d'un modèle *in vitro* de
testing pharmacologique prenant en
compte le micro-environnement
endothélial - études à partir de cellules
de cancer bronchique non à petites
cellules**

Projet BRONCHO-PHARM

BOURREAU Clara

Née le 11 mai 1996 à Angers (49)

Sous la direction de Mr. Nicolas CLERE

Membres du jury

Frédéric LAGARCE	Président
Nicolas CLERE	Directeur
Flavien BESSAGUET	Membre
Alain MOREL	Membre

Soutenue publiquement le :
1^{er} décembre 2021



**FACULTÉ
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Clara Banneau,
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour
écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

Cet engagement de non plagiat doit être inséré
en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.





FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

"La Faculté de Santé déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation."

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BELLANGER William	Médecine Générale	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	Gynécologie-obstétrique	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COPIN Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine Générale	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
D'ESCATHA Alexis	Médecine et santé au travail	Médecine
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUBEE Vincent	Maladies Infectieuses et Tropicales	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILET David	Chimie analytique	Pharmacie
GUITTON Christophe	Médecine intensive-réanimation	Médecine
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HENNI Samir	Médecine Vasculaire	Médecine
HUNAUT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine

LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGENDRE Guillaume	Gynécologie-obstétrique	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et Santé au Travail	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et Biologie Moléculaire	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Médecine d'urgence	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique et Biostatistiques	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENARA Aurélien	Chirurgie viscérale et digestive	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
BAGLIN Isabelle	Chimie thérapeutique	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et Biostatistiques	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BEGUE Cyril	Médecine générale	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	Physiologie Pharmacologie	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
BRIET Claire	Endocrinologie, Diabète et maladies métaboliques	Médecine
BRIS Céline	Biochimie et biologie moléculaire	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie / physiologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
GUELFF Jessica	Médecine Générale	Médecine
HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	Biotechnologie	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	Médecine générale	Médecine
KHIATI Salim	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie	Médecine
LACOEUILLE Franck	Radiopharmacie	Pharmacie
LANDREAU Anne	Botanique/ Mycologie	Pharmacie
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LEGEAY Samuel	Pharmacocinétique	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	Neurochirurgie	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Pharmacognosie	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
LUQUE PAZ Damien	Hématologie biologique	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MIOT Charline	Immunologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	Bactériologie-virologie	Médecine
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine

PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
POIROUX Laurent	Sciences infirmières	Médecine
PY Thibaut	Médecine Générale	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	Médecine Générale	Médecine
RINEAU Emmanuel	Anesthésiologie réanimation	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistiques	Pharmacie
RIQUIN Elise	Pédopsychiatrie ; addictologie	Médecine
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SAVARY Camille	Pharmacologie-Toxicologie	Pharmacie
SCHMITT Françoise	Chirurgie infantile	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique	Pharmacie
TESSIER-CAZENEUVE Christine	Médecine Générale	Médecine
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	Médecine Générale	Médecine
VIAULT Guillaume	Chimie organique	Pharmacie

AUTRES ENSEIGNANTS

PRCE

AUTRET Erwan	Anglais	Médecine
BARBEROUSSE Michel	Informatique	Médecine
BRUNOIS-DEBU Isabelle	Anglais	Pharmacie
FISBACH Martine	Anglais	Médecine
O'SULLIVAN Kayleigh	Anglais	Médecine

PAST

CAVAILLON Pascal	Pharmacie Industrielle	Pharmacie
DILÉ Nathalie	Officine	Pharmacie
MOAL Frédéric	Pharmacie clinique	Pharmacie
PAPIN-PUREN Claire	Officine	Pharmacie
SAVARY Dominique	Médecine d'urgence	Médecine

ATER

Arrivée prévue nov 2021	Immunologie	Pharmacie
-------------------------	-------------	-----------

PLP

CHIKH Yamina	Economie-gestion	Médecine
--------------	------------------	----------

AHU

CORVAISIER Mathieu	Pharmacie Clinique	Pharmacie
IFRAH Amélie	Droit de la Santé	Pharmacie
LEBRETON Vincent	Pharmacotechnie	Pharmacie

Remerciements

A mon président du jury Monsieur Frédéric LAGARCE,

Directeur du département de Pharmacie à l'Université d'Angers,

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse d'exercice, ainsi que de l'intérêt que vous avez porté à ce travail, veuillez trouver ma sincère reconnaissance.

A mon directeur de thèse, Monsieur Nicolas CLERE,

Maitre de Conférence à la Faculté de Pharmacie d'Angers,

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur et encadrant en or qui m'a apporté son soutien de façon inconditionnelle depuis le début de mes études de pharmacie, m'a soutenu moralement, tant pendant ces mois à Paris que lors de ces mois en stage à Angers. Sa patience, ces encouragements et sa confiance, m'ont permis de mener avec lui ce projet ambitieux. Je ne finirai jamais de le remercier pour toute sa foi placée en moi, son optimisme infatigable malgré les bas (et ils sont nombreux !) qui ont rythmé mes humeurs, ainsi que le temps qu'il m'a consacré. Un immense merci et le début d'une longue collaboration je l'espère, à commencer par ces trois ans de doctorat !

Aux membres du jury :

A **Monsieur Alain MOREL**, Professeur de Biologie Moléculaire à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest à Angers, et **Monsieur Flavien BESSAGUET**, Maitre de Conférence à la Faculté de Pharmacie d'Angers,

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour le temps que vous m'avez accordé, je vous prie de trouver mes remerciements.

Au laboratoire d'accueil

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire MINT pour m'avoir permis de réaliser mon stage dans les meilleures conditions possibles, malgré la crise sanitaire qui n'a pas toujours été simple.

En tout premier lieu je remercie Patrick SAULNIER pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 au sein du laboratoire MINT UMR 1066.

Merci à l'équipe du service Pharmacologie du CHU d'Angers, Marie BRIET chef de projet, Sarah, Chadi et Hichem, pour leur collaboration dans ce projet, pour toute la partie pharmacologie, pharmacocinétique et testing qui n'a pas toujours été un chemin tranquille !

Merci à Valentin pour son aide, tant sur le terrain que sur ses conseils toujours bienveillants, merci de m'avoir relayé quand le timing était séré et quand mon optimisme fléchissait.

Merci à l'équipe nantaise, Lucas TREPS et Delphine FRADIN pour tous leurs conseils, bienveillance et soutien tout au long de ce stage.

Merci à toute l'équipe PACeM, Catherine, Lydie, et Jérôme (tout d'abord) pour leur bonne humeur, et conseils précieux pour la cytométrie et RT-qPCR sur les derniers jours (quelque peu intenses au laboratoire !).

Je remercie Adélie, mon amie, qui m'a toujours soutenu, écouté et épaulé dans les moments compliqués au laboratoire et en dehors. Merci à Audrey, Marion et Isabelle pour tous leurs conseils et coups de main que je ne compte plus.

Merci à Flavien pour sa bonne humeur communicative lors des longues séances de culture cellulaire passées côte à côte sur les PSM.

Merci à l'ensemble des stagiaires de Master 2, Jaspe, Rana, Anastasia sans qui ce stage n'aurait pas été le même, à nos galères communes qui nous ont fait sourire bien des fois.

A mes amis

Merci à l'ensemble des étudiants devenus mes amis découverts lors de ce Master à Paris qui ont été un soutien et une bouffée d'air frais tout au long de cette année. Merci particulièrement à Jeanne, mon homologue pharmacienne du Master pour tous ces messages, encouragements et partages de galères (ainsi que son aide précieuse lors des impressions de dossiers à la dernière minute !).

Merci à toi Clémence, amie fidèle de ces années d'études de pharmacie, sans toi ce parcours n'aurait pas été le même. Ces années ont marqué le début d'une grande amitié.

Merci à mes amies d'enfance et d'adolescence malgré la distance qui ont toujours gardé un œil sur moi et ont su me remonter le moral.

A ma famille

Enfin, à ma maman et mes grands-parents qui ont toujours été présents dans les bons comme les mauvais moments. Merci pour leur soutien inconditionnel durant toutes ces longues années. Et pour finir, merci à mon chat Happy pour son aide perpétuelle lors des journées de rédaction devant mon ordinateur, il a été mon premier jury et *reviewer* !

En un mot : **MERCI**.

« Il ne faut avoir aucun regret pour le passé, aucun remords pour le présent, et une confiance inébranlable pour l'avenir. »

Jean Jaurès (1859-1914)

Sommaire

Liste des abréviations

État de l'art du sujet de recherche

1. Données épidémiologiques
2. Dépistage
3. Diagnostic
4. Caractéristiques tumorales et champ de cancérisation
5. Hétérogénéité du cancer pulmonaire bronchique non à petites cellules
 - 5.1. Hétérogénéité génomique
 - 5.1.1. Voie de l'EGFR
 - 5.1.2. Voie PI3K/AKT/mTOR
 - 5.1.3. Voie RAS-MAPK
 - 5.1.4. Les réarrangements ALK et ROS1
 - 5.1.5. Autres mutations
 - 5.2. Les signatures mutationnelles
 - 5.3. Hétérogénéité micro-environnementale
 - 5.3.1. La matrice extracellulaire
 - 5.3.2. Les cellules immunitaires
 - 5.3.3. La vascularisation tumorale
 - 5.3.4. Les fibroblastes associés au cancer
6. Stratégies thérapeutiques
 - 6.1. La chimiothérapie néo-adjuvante
 - 6.2. La chimiothérapie adjuvante
 - 6.3. Chimiothérapie pour stade avancé (stade IV)
 - 6.4. Nouvelles stratégies : les thérapies ciblées
 - 6.4.1. Thérapeutiques ciblant les mutations de l'EGFR
 - 6.4.2. Thérapeutiques ciblant les mutations des réarrangements ALK et ROS1
 - 6.4.3. Thérapeutiques ciblant la voie RAS-MAPK
 - 6.4.4. Thérapeutiques ciblant la voie PI3K/AKT/mTOR
 - 6.4.5. Thérapeutiques ciblant d'autres mutations

7. Thérapeutiques ciblant le micro-environnement tumoral

- 7.1. Ciblage du compartiment vasculaire
- 7.2. L'immunothérapie
 - 7.2.1. Immunothérapie pour les CBNPC stade III non résecables
 - 7.2.2. L'immunothérapie en thérapie combinée

8. Place des résistances des cellules tumorales aux nouvelles thérapeutiques

- 8.1. Les résistances aux thérapies ciblées

9. Les outils de biomarqueur

- 9.1. Les miARN
- 9.2. Les cellules tumorales circulantes (CTC)
- 9.3. L'ADN tumoral circulant
- 9.4. La charge mutationnelle tumorale (*Tumor Mutation Burden*)

10. La place du micro-environnement dans les résistances aux thérapeutiques

11. Médecine de précision

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

- 1.1. Culture des lignées tumorales
- 1.2. Culture des cellules endothéliales
- 1.3. Traitement des cellules endothéliales HUVEC

2. Tests de chimiosensibilité

- 2.1. Préparation des plaques « mère » et « filles chimio »
- 2.2. Transfert des plaques « filles chimio » vers les plaques « filles cellules »
- 2.3. Révélation
- 2.4. Analyse

3. Test de cytotoxicité (test de survie)

4. Test de prolifération

5. Test *in vitro* angiogénique: tubulogénèse

6. Western Blotting

- 6.1. Extraction et dosage protéique
- 6.2. Migration et transfert
- 6.3. Révélation

7. RT-qPCR
8. Cytométrie en flux
9. Analyses statistiques

Résultats

1. Étude des profils de réponses des lignées tumorales aux chimiothérapies
2. Études fonctionnelles de la réponse des cellules endothéliales aux différentes conditions de traitement
3. Caractérisation d'une transition EndoMT
 - 3.1. Expression protéique des différents marqueurs endothéliaux et mésenchymateux
 - 3.2. Etude de l'expression géniques modifiée au cours de la transition EndoMT
 - 3.3. Etude des marqueurs de surface cellulaire impliqués au cours de la transition EndoMT

Discussion

Bibliographie

Table des matières

Table des illustrations

Table des tableaux

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique Circulant
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNnc :	Acide Ribonucléique Non Codant
AKT :	Protéine Kinase B
ALK :	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
APC :	<i>Allophycocyanin</i>
ATU :	Autorisation Temporaire d'Utilisation
AXLR :	Du nom d'un oncogène viral
BRAF :	B-Raf Proto-Oncogène
CAF :	<i>Cancer-Associated-Fibroblasts</i>
CBNPC :	Cancer-Bronchique non à petites cellules
CEA :	Antigène carcinoembryonnaire
cfADN :	Acide Désoxyribonucléique Acellulaire
ctADN :	Acide Désoxyribonucléique tumoral circulant
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTC :	Cellules Tumorales Circulantes
CTLA-4 :	Protéine T-Lymphocyte-Associée Cytotoxique 4
CYFRA21-1 :	Cytokeratin-21-Fragment 1
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EGFR :	<i>Epithelial Growth Factor Receptor</i>
EGM2 :	<i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i>
ELISA :	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT :	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
EML4 :	Echinoderm Microtubule-Associated Protein Like 4
EndoMT :	Transition Endothélio-Mésenchymateuse
eNOS :	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
FDA :	<i>Food And Drug Administration</i>
FGFR :	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC :	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSP1 :	<i>Fibroblast-Specific Protein-1</i>
GAS6 :	<i>Growth Arrest-Specific gene 6</i>
HAS :	Haute Autorité de Santé
HBSS :	<i>Hepes Buffered Saline Solution</i>
HER-2 :	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
HGF :	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>

HIF :	<i>Hypoxia-Inductible Factor</i>
HLA :	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HUVEC :	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
IARC :	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IL :	<i>Interleukine</i>
IL-1β :	<i>Interleukin 1β</i>
ITK :	<i>Inhibiteur de Tyrosine Kinase</i>
KFL4 :	<i>Kruppel-Like Factor 4</i>
KRAS :	<i>V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
LMA :	<i>Leucémie Myéloïde Aiguë</i>
LKB1 :	<i>Liver Kinase B1</i>
MAC :	<i>Macrophages Associés au Cancer</i>
MAPK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MEC :	<i>Matrice Extra-Cellulaire</i>
MEK :	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
MET :	<i>Microenvironnement Tumoral</i>
MET :	<i>Receptor Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
miARN :	<i>Micro Acide ribonucléique</i>
MMP14 :	<i>Matrix Metallopeptidase 14</i>
mTOR :	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NCBI :	<i>National Cancer for Biology Information</i>
NK :	<i>Natural Killers</i>
NGS :	<i>Next Generation Sequencing</i>
NTRK :	<i>Neutrophic Tyrosine Receptor Kinase</i>
OMS :	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
PECAM-1 :	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PDGF(R) :	<i>Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)</i>
PD-L1/PD-1	<i>Programmed cell Death ligand protein 1/Programmed cell Death protein 1</i>
PFA :	<i>Paraformaldehyde</i>
PI3K :	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIK3CA :	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinases Catalytique subunit Alpha</i>
PS :	<i>Performance Status</i>
PVDF :	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
RAS :	<i>Provient du « Rat Sarcoma virus »</i>
RIPA :	<i>Radio-Immuno Precipitation Assay Buffer</i>
ROS1 :	<i>c-ros oncogene 1</i>
RPMI :	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT-qPCR :	<i>Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SCCA :	<i>Squamous cell carcinoma antigen</i>
SDS-PAGE :	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
α-SMA :	<i>α-Smooth Muscle Actine</i>

STK11 :	Sérine-Thréonine Kinase 11
TECs :	<i>Tumor Endothelial Cells</i>
TGF-β :	<i>Beta Transforming Growth Factor</i>
TILs :	<i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
TMB :	<i>Tumor Mutational Burden</i>
TNF- α :	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNM :	<i>Tumor-Nodes-Metastasis</i>
TP53 :	<i>Tumor Protein 53</i>
TRK (A,B,C)	<i>Tropomyosin Receptor Kinase</i>
Tris :	Trishydroxymethylaminométhane
UCSC :	<i>University of California Santa Cruz Genomics Institut</i>
VEGF :	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEs :	Vésicules Extra-cellulaires
vWF :	<i>Von Willebrand Factor</i>
WES :	<i>Whole Exome Sequencing</i>
WGS :	<i>Whole Genome Sequencing</i>

État de l'art du sujet de recherche

1. Données épidémiologiques

Selon les données de l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*), on estime en 2020 l'incidence des cancers à l'échelle mondiale entre 18 et 19 millions de nouveaux cas diagnostiqués, et la prévalence mondiale à 5 ans est d'environ 44 millions. Les cancers sont la seconde cause de mortalité derrière les maladies cérébro-vasculaires. Le cancer broncho-pulmonaire représente plus de 11% des cas nouvellement diagnostiqués en 2020 soit plus de 2,2 millions de nouveaux cas, avec un nombre de décès d'environ 1,8 million de personnes dans le monde tous sexes confondus.

En France, le cancer du poumon est le 3^{ème} cancer le plus fréquent, avec une forte progression chez les femmes ces dernières années. L'âge médian au diagnostic est de 67 ans chez les hommes et de 65 ans chez les femmes. Par ailleurs, entre 1990 et 2018, il a été observé une évolution des taux d'incidence avec une baisse de 0,3% en moyenne par an chez les hommes, contre une augmentation de 5% en moyenne par an chez les femmes. Tous sexes confondus, environ 33 117 décès par cancer du poumon ont été recensés en France, en 2018 (1).

Des facteurs liés au mode de vie, ainsi qu'environnementaux ont pu être associés au développement du CBNPC. Le principal agent cancérigène qui y est associé est la fumée de tabac, qui produit des dommages durables et progressifs au niveau des voies respiratoires. On estime qu'il représente 85 à 90% des cancers du poumon.

L'incidence et la mortalité liées au CBNPC sont plus élevées dans les pays développés. Ainsi, les pays en voie de développement d'Amérique centrale ou d'Afrique présentent des taux estimés plus faibles. Cependant l'impact réel, même dans les pays développés est sous-estimé par un manque de système de notifications centralisé masquant ainsi l'incidence réelle. Une estimation de l'OMS indique que la mortalité par CBNPC dans le monde continuera à augmenter, notamment en raison d'une augmentation de consommation mondiale en tabac et plus particulièrement en Asie.

En 2018, GLOBOCAN a prédit plus de 2 millions de nouveaux cas, et 1,76 millions de décès dans le monde, avec une incidence presque égale à la mortalité. Malgré l'amélioration de la prise en charge, la survie à 5 ans augmente mais reste mauvaise, passant de 15,6% en 2011 à 19,4% en 2019. Cette légère amélioration peut être attribuée à l'augmentation de la détection des phases précoces, ainsi qu'aux progrès en termes de traitements tels que la chirurgie thoracoscopique, la radiothérapie, l'immunothérapie et les thérapies dites ciblées (2).

Le cancer du poumon est classé selon l'OMS (OMS – 2015) suivant l'origine du tissu affecté en tumeur épithéliale, lymphohistocytaires, mésenchymateuse, ectopique ou métastatique, pour les formes évoluées (3).

Il constitue un groupe hétérogène de cancers et est divisé en deux grandes catégories histologiques suivant le type cellulaire à partir duquel il se développe : non à petites cellules et à petites cellules. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) est le cancer du poumon le plus fréquent, et représente entre 85 et 90% de l'ensemble des cancers du poumon (4)(5).

Ce type de cancer peut être lui-même subdivisé en 3 catégories : carcinome à cellules squameuses, adénocarcinome et carcinome à grandes cellules. Le CBNPC se développe habituellement aux dépens des cellules

glandulaires situées dans la partie externe du poumon et porte le nom d'adénocarcinome. L'adénocarcinome est le sous-type histologique du CBNPC le plus courant, représentant environ 40% des tumeurs pulmonaires. Il résulte de mutations *de novo* dans les cellules alvéolaires des voies aériennes périphériques (6). Le CBNPC peut aussi prendre naissance au niveau des cellules minces et plates appelées cellules squameuses. Celles-ci tapissent les bronches et sont impliquées dans le développement de carcinomes épidermoïdes du poumon. Le carcinome épidermoïde représente quant à lui 25 à 30% des cas et se développe selon un processus multi-étapes permis par des facteurs de stress locaux (7). Enfin, le carcinome à grandes cellules, autre type de cancer du poumon non à petites cellules, représente 5 à 10% des cas de CBNPC et est considéré comme une tumeur peu différenciée qui ne peut être attribuée aux marqueurs moléculaires et catégories histologiques courantes du CBNPC (3)(8).

Malgré les avancées thérapeutiques récentes, le pronostic reste médiocre en raison notamment de la présence de tumeurs localement avancées ou métastatiques chez la majorité des patients au moment du diagnostic, ainsi que par les multiples résistances (8).

2. Dépistage

Le résultat clinique du CBNPC est à la fois lié au stade et au moment du diagnostic. Souvent, le CBNPC n'est diagnostiqué qu'à un stade avancé de la maladie. Le plus couramment, le CBNPC est évoqué devant la présence ou la persistance de symptômes respiratoires (toux chez 50 à 75% des patients, dyspnée, hémoptysie). La plupart du temps, le diagnostic est réalisé à l'aide de radiographies thoraciques ou d'analyses cytologiques de crachats. Une étude réalisée par le *National Lung Screening Trial* a testé la tomodensitométrie en comparaison à la radiographie chez plus de 50 000 patients à haut risque et a montré un bénéfice de 20% en matière de mortalité toutes causes confondues. Cependant, malgré ces résultats les pratiques de dépistage dans le CBNPC restent malheureusement peu développées et il semble essentiel de réfléchir à de nouvelles stratégies pour permettre une meilleure détection (9).

3. Diagnostic

Le diagnostic du CBNPC repose sur l'examen anatomopathologique. Les prélèvements sont réalisés à partir de la tumeur et/ou des adénopathies associées. Cet examen permet de définir le type et sous-type histologique de la tumeur. Une analyse des mutations spécifiques reconnues dans le CBNPC peut également être demandée et recommandée. Aujourd'hui, le nombre de biopsies bronchiques doit être supérieure à 5 et depuis 2016, l'*European Expert Group* recommande au moins 5 biopsies pour le diagnostic et 5 biopsies supplémentaires pour le phénotypage et le génotypage.

De plus, le diagnostic nécessite la détermination de l'étendue de la tumeur, définissant le stade dit TNM (*Tumor Nodes Metastasis*). Le TNM doit ainsi préciser la taille et l'extension locorégionale de la tumeur (T), la présence de métastases ganglionnaires (N) ou de métastases thoraciques ou extra-thoraciques (M).

Le CBNPC est généralement classé sur la base de la 8^{ème} édition de la classification TNM selon le schéma suivant : maladie précoce non métastatique (tumeurs stades IA-IIIA), maladie localement avancée et limitée à la cavité

thoracique (stade IIIB), ou maladie métastatique à distance localisée en dehors de la cavité thoracique (stade IV) (3). Les taux de survie à 5 ans pour les stades I, II, III et IV sont respectivement de 47%, 30%, 10% et 1% (10,11).

En parallèle de la détermination du TNM, selon la nouvelle classification multidisciplinaire du cancer du poumon de l'association internationale pour l'étude du cancer du poumon, de la Société thoracique américaine, et de la société européenne de pneumologie, il est nécessaire d'obtenir suffisamment de tissu afin d'améliorer le diagnostic. En effet, le potentiel d'identification des mutations et de traitement sur mesure, a des implications lors de l'évaluation initiale de tous types de cancers du poumon. Ainsi pour illustrer, en cas de CBNPC non épidermoïde localement avancé ou métastatique, cet examen permet de rechercher une mutation du gène de l'EGFR ou d'effectuer des analyses complémentaires à la recherche de biomarqueurs qui permettront un affinement du diagnostic, et par la suite de la prise en charge (9).

Enfin, un bilan de l'état général du patient est réalisé afin de déterminer son indice de performance (PS), nécessaire pour la détermination de la prise en charge. En oncologie, l'indice de performance est attribué par système de points selon des critères relatifs à l'autonomie et l'état physique du patient, définis par l'OMS.

4. Caractéristiques tumorales et champ de cancérisation

En 1960, le professeur P.Nowell, chercheur sur la notion de cancer participe à la découverte du chromosome Philadelphia et met en place la notion que le cancer est une maladie cellulaire introduit par des altérations génétiques. Plus tard dans les années 1980, cette théorie est renforcée par M.Bishop et H.Varmus au travers de la découverte des oncogènes qui permettent la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Aujourd'hui la définition du cancer est élargie à une maladie dans laquelle des cellules anormales se divisent sans contrôle et peuvent envahir les tissus voisins. Dans les années 2000, D.Hanahan et R.Weinberg proposent un modèle décrivant les caractéristiques du cancer intitulé « *The Hallmarks of Cancer* » (12-14).

Ainsi, les caractéristiques du cancer comprennent selon leur modèle six capacités biologiques acquises lors du développement tumoral. Elles constituent un principe d'organisation pour rationaliser les complexités de la maladie dite néoplasique. Ces caractéristiques comprennent le maintien de la signalisation proliférative, l'évitement des suppresseurs de croissance cellulaire, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité répliquative, l'induction du phénomène d'angiogenèse, et enfin, l'activation et l'invasion métastatique. Au fondement de toutes ces caractéristiques, se trouve l'instabilité du génome des cellules, créant de la diversité génétique permettant la mise en place de ces caractéristiques, favorisé par le phénomène d'inflammation. Les chercheurs ont par la suite complété ce modèle en intégrant notamment les notions de : reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire, et l'évitement du système immunitaire (**Figure 1**) (14).

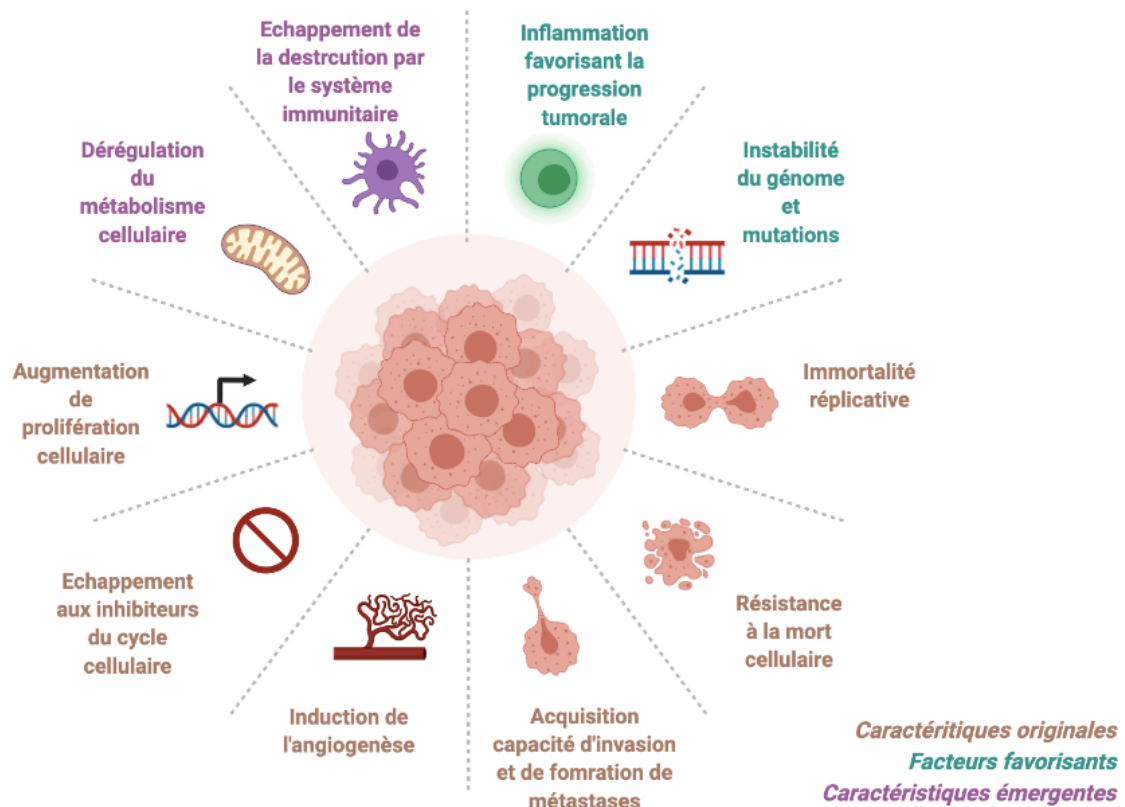


Figure 1 : Les caractéristiques cancéreuses ("The Hallmarks of Cancer"). Cette illustration représente les caractéristiques originales du cancer établies par D.Hanahan et R.Weinberg, ainsi que d'autres provenant des recherches survenues par la suite venant compléter ce schéma. Certaines d'entre-elles sont caractérisées comme émergentes car elles ne sont pas encore complètement généralisées. Par ailleurs, deux caractéristiques consécutives de la néoplasie facilitent l'acquisition des caractéristiques fondamentales et émergentes (facteurs dits « favorisants »). L'instabilité génomique et l'acquisition de mutation confèrent aux cellules cancéreuses des altérations génétiques qui entraînent la progression tumorale. L'inflammation par des cellules immunitaires innées conçues pour combattre les infections, peut à la place entraîner le soutien des cellules tumorales, entraînant des conséquences sur la promotion des tumeurs. Adapté de la publication de Hanahan D et Weinberg RA., *Cell*. 2011

Dans le CBNPC, l'exposition répétée à des agents dits cancérogènes tels que le tabac, induit des altérations au niveau des voies respiratoires en provoquant une inflammation. Au fil du temps, cette inflammation chronique peut être le siège de mutations, notamment d'oncogènes tumoraux ou de gènes suppresseurs de tumeurs (15-18). Ces altérations dites pré-néoplasiques progressives expliquent le processus de cancérisation de champ des voies respiratoires initialement mis en évidence par Slaughter et coll. (19,20).

Lorsque débute la tumorigenèse, les cellules normales accumulent des mutations pro-néoplasiques qui au fil de temps peuvent évoluer vers des clones pré-néoplasiques mutants. L'accumulation de ces clones mutants favorise le développement et la progression cancéreux (21). Au sein du tissu adjacent para-néoplasique, ces altérations moléculaires et génétiques ne sont pas des événements singuliers. Le champ cancéreux peut présenter certaines modifications pré-cancéreuses telles que l'hyperplasie, dysplasie, sans toutefois présenter de modification histologiquement identifiable (20,22).

La prise de conscience de cette notion de champ de cancérisation permet d'intégrer de nouvelles notions. En premier lieu, après l'ablation du site tumoral si cela est possible, alors le champ cancéreux reste en place avec le potentiel de donner naissance à des tumeurs secondaires. De plus, l'intégration de cette notion reconnaît un

processus prolongé en plusieurs étapes avec une acquisition progressive de nouvelles mutations génétiques qui peuvent fournir une opportunité dans l'identification des phénotypes pré-cancéreux, offrant une fenêtre d'action avant la progression vers le stade de cancer (20,23).

Par ailleurs, l'identification d'altérations génétiques au niveau des tissus para-néoplasiques adjacents, soulève le besoin d'une meilleure sélection des contrôles normaux pour la recherche, les essais cliniques, ainsi que les études de validation de biomarqueurs à cause des altérations co-existantes à haut risque dans les tumeurs, et contrôles adjacents normaux qui pourraient cacher des altérations moléculaires essentielles. Ces dernières pourraient par la même occasion faire l'objet d'une étude pour être exploitées par la suite comme biomarqueurs critiques ou nouvelles cibles thérapeutiques (20,24-26).

Cette notion de champ de cancérisation doit être distinguée du microenvironnement tumoral (MET). Ce dernier correspond à un environnement cellulaire hétérogène entourant et infiltrant la tumeur. Il est composé de diverses populations cellulaires telles que les cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, *Natural Killers* (NK), macrophages associés au cancer (*Tumor-Associated Macrophage*, MAC), les cellules du compartiment vasculaire (cellules endothéliales, fibroblastes associés au cancer), de cellules soutenant le *stroma* (cellules mésenchymateuses) ou encore de médiateurs (cytokines, chimiokines, exosomes...) qui améliorent la communication entre les cellules. Il est également constitué d'un compartiment non cellulaire qui comprend diverses molécules circulantes entre le MET et les cellules tumorales (27,28). Au cours des phases précoces de la progression tumorale, la niche cancéreuse génère un « sanctuaire » tumoral par l'attraction de diverses populations cellulaires au travers de la circulation sanguine vers son MET (**Figure 2**) (29).

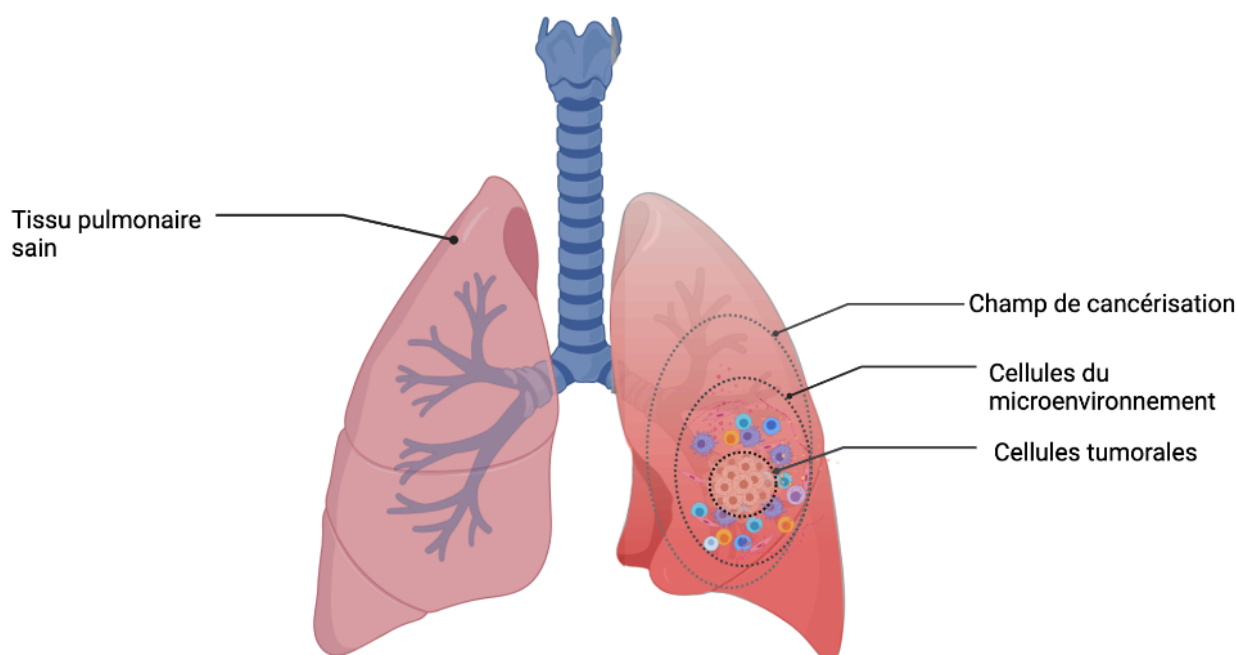


Figure 2: Notion de champ de cancérisation. Propagation locale du MET entourant les cellules tumorales constitué de diverses populations cellulaires (cellules endothéliales, immunitaire, MEC...). Adjacent au MET, le champ de cancérisation qui s'étend de façon diffuse sur les voies respiratoires. Ce champ de cancérisation peut présenter des changements histologiques tels que l'hyperplasie, ou encore la dysplasie mais peut également ne pas présenter de modification histologique ne portant que quelques altérations génétiques locales. Adapté de la publication de Pirlog R et coll., *Int J Mol Sci*. 2021

5. Hétérogénéité du cancer pulmonaire bronchique non à petites cellules

5.1. Hétérogénéité génomique

Il est aujourd'hui reconnu que le cancer est une maladie associée à de nombreuses altérations génomiques. L'analyse mutationnelle et le profilage génomique ont fait progresser de manière significative la compréhension et la prise en charge thérapeutiques des patients, en particulier lorsque les altérations se situent au niveau d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, au cours de la tumorigenèse.

Au cours du CBNPC, une forte hétérogénéité morphologique et mutationnelle a été mise en évidence. Ainsi, différents profils de mutations ont été identifiés et notamment des mutations activatrices dans les gènes du récepteur de croissance épidermique EGFR, du gène BRAF, de la voie des MAP kinases (MAPK), de l'échinoderme microtubule-like 4 (EML-4), d'ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) ou encore du récepteur tyrosine kinase ROS1 (30). Le séquençage du génome entier a permis d'identifier différents taux de mutations géniques, des altérations du nombre de copies génétiques et différents niveaux d'expression des protéines et de leur phosphorylation, confirmant l'association entre l'hétérogénéité morphologique et moléculaire des tumeurs (**Figure 3**).

5.1.1. Voie de l'EGFR

L'EGFR est un membre de la famille des récepteurs membranaires dits tyrosine kinase, de type I, et son gène se situe sur le bras court du chromosome 7. Cette protéine se distribue sur la membrane de diverses cellules épithéliales où elle se lie au facteur de croissance épidermique ou à l'EGF afin de réguler la croissance cellulaire (**Figure 4**) (31).

Les récepteurs à tyrosine-kinase sont des protéines situées au niveau de la membrane cellulaire possédant 3 domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Le domaine extracellulaire est celui où se fixe le ligand. La fixation d'un ligand sur un récepteur entraîne le rapprochement de 2 récepteurs, leur dimérisation, et l'activation par transphosphorylation de leur partie intracellulaire, par le biais de modifications conformationnelles, correspondant à l'activation du domaine tyrosine-kinase. Cette activation du domaine kinase va permettre ainsi l'activation des voies de signalisation intra-cellulaires.

Le récepteur EGFR est impliqué dans la survie, migration, prolifération, et différenciation cellulaires mais aussi au cours de l'angiogenèse. Ces différentes implications sont permises par l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT /mTOR et RAS-MAPK après activation du récepteur. Cependant, une dérégulation des signaux transmis par ce récepteur peut avoir lieu, notamment lors de mutations, amplifications ou surexpressions affectant ce récepteur. Les mutations de l'EGFR surviennent principalement au niveau de son domaine kinase et vont permettre une activation indépendante de la fixation de ligand entraînant une activation constitutive et permanente des différentes voies de signalisation (10).

Chez les patients atteints de CBNPC, environ 17% présentent une mutation de l'EGFR (32).

5.1.2. Voie PI3K/AKT/mTOR

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est également considérée comme une cible potentielle dans le traitement du CBNPC. Cette voie intra-cellulaire régule plusieurs processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'angiogenèse mais aussi la transcription de gènes et la synthèse de protéines. Son activation peut se faire au niveau extra-cellulaire au travers de récepteurs à tyrosine kinase tels EGFR ou PDGFR, ou au niveau intracellulaire par mutations ou surexpression des protéines impliquées dans cette voie comme la protéine mTOR, petite protéine sérine-thréonine kinase (**Figure 4**) (33).

Environ 4% des tumeurs CBNPC présentent des mutations dans cette voie (32).

5.1.3. Voie RAS-MAPK

La famille des gènes RAS (comprenant KRAS) code pour des petites protéines G de la membrane plasmique qui sont des GTPase. Elles régulent la prolifération cellulaire au travers de l'activation de différentes MAPK. Cette voie de signalisation est activée par des récepteurs membranaires tels que EGFR et FGFR au cours de la différenciation cellulaire mais aussi de la survie cellulaire (**Figure 4**). Dans cette famille, le gène le plus souvent muté dans le CBNPC est KRAS. Les mutations se produisent dans environ 20 à 40% des adénocarcinomes pulmonaires et ont pour conséquences une dérégulation de cette voie impliquant une augmentation de la prolifération des cellules tumorales. De multiples récepteurs en aval des voies RAS, ainsi que les protéines RAF, MEK peuvent être des cibles potentielles dans le CBNPC (33).

Une autre mutation de cette voie provient de la mutation du gène BRAF, protéine proto-oncogène altérée dans environ 2 à 5% des patients atteints de CBNPC. La mutation la plus courante du gène BRAF est la substitution p.V600E. Cette protéine sérine-thréonine kinase est normalement activée par la protéine RAS, mais des mutations activatrices de ce gène permettent une sur-activation de la voie de signalisation engendrant une augmentation de la prolifération des cellules tumorales (34).

5.1.4. Les réarrangements ALK et ROS1

La protéine ALK est issue de la fusion des gènes EML4 et ALK. Elle est présente chez environ 7% des patients atteints de CBNPC, et survient la plupart du temps indépendamment des mutations de l'EGFR et KRAS. Ces réarrangements de gènes à l'origine de cette protéine oncogénique sont responsables d'une activité kinase permanente indépendamment de toute fixation à un ligand. Cette activation est responsable d'une potentialisation de la prolifération des cellules tumorales, de leur migration et survie par l'activation notamment des voies RAS-MAPK, PI3K/AKT/mTOR mais également de leur résistance à l'apoptose (35).

ROS1 est un récepteur tyrosine kinase dont les réarrangements ont pu être identifiés comme activateurs oncogéniques et présents dans environ 2% des tumeurs bronchiques. Le gène ROS1 a une homologie avec celui codant pour ALK et cette similitude structurelle a constitué la base de l'utilisation des inhibiteurs d'ALK (tels que les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) : crizotinib, lorlatinib) pour les patients atteints de CBNPC mutés ALK. L'activation de ce récepteur entraîne une prolifération, une survie et une migration cellulaires accrues *via* la stimulation des voies de signalisation PI3K/AKT ou encore RAS-MAPK (**Figure 4**) (36).

5.1.5. Autres mutations

Une autre mutation également retrouvée dans de rares cas de CBNPC (environ 1%) est la fusion du gène NTRK. Cette mutation va permettre la production de protéines (TRKA, TRKB, TRKC) structurées en différents domaines dont un domaine de liaison extra-cellulaire, un domaine transm-membranaire et un domaine intra-cellulaire. La liaison de leur ligand permet l'activation du récepteur et une phosphorylation consécutive, activant les voies de signalisation intra-cellulaires. Ces protéines ont un rôle dans la différenciation cellulaire, la survie et la prolifération cellulaire par une sur-activation de leur expression et l'activation de voies de signalisation telles que RAS-MAPK et PI3K/AKT. Cette mutation peut être la cible d'inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement du CBNPC (37).

Une mutation au niveau le récepteur *MET* peut-être surexprimé dans certains cas de CBNPC (environ 3%). Ce récepteur membranaire possède une activité tyrosine kinase, dont le ligand est le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et est impliqué dans les propriétés mitogènes, motogènes et pro-angiogéniques des cellules. Son implication dans le CBNPC est connue pour permettre une augmentation de l'invasion tissulaire et la formation de métastases. L'amplification du gène codant pour ce récepteur est un mécanisme de résistance secondaire retrouvé chez 20% des patients mutés EGFR et traités par des ITK à l'EGFR (38,39).

Enfin, la mutation PIK3CA a été retrouvé dans une grande variété de tumeurs humaines dont 1% chez les patients atteints de CBNPC. PIK3CA est un gène codant pour la protéine PI3K impliquée comme expliqué précédemment dans la voie PI3K/AKT/mTOR, voie cruciale dans la survie, la croissance et la progression du cycle cellulaire. Cependant le rôle clinique de la mutation de PI3KCA chez les patients est encore débattu même si le gène de PI3KCA a été reconnu comme gène pilote et pouvant contribuer à la croissance des cellules tumorales et au développement du CBNPC (40).

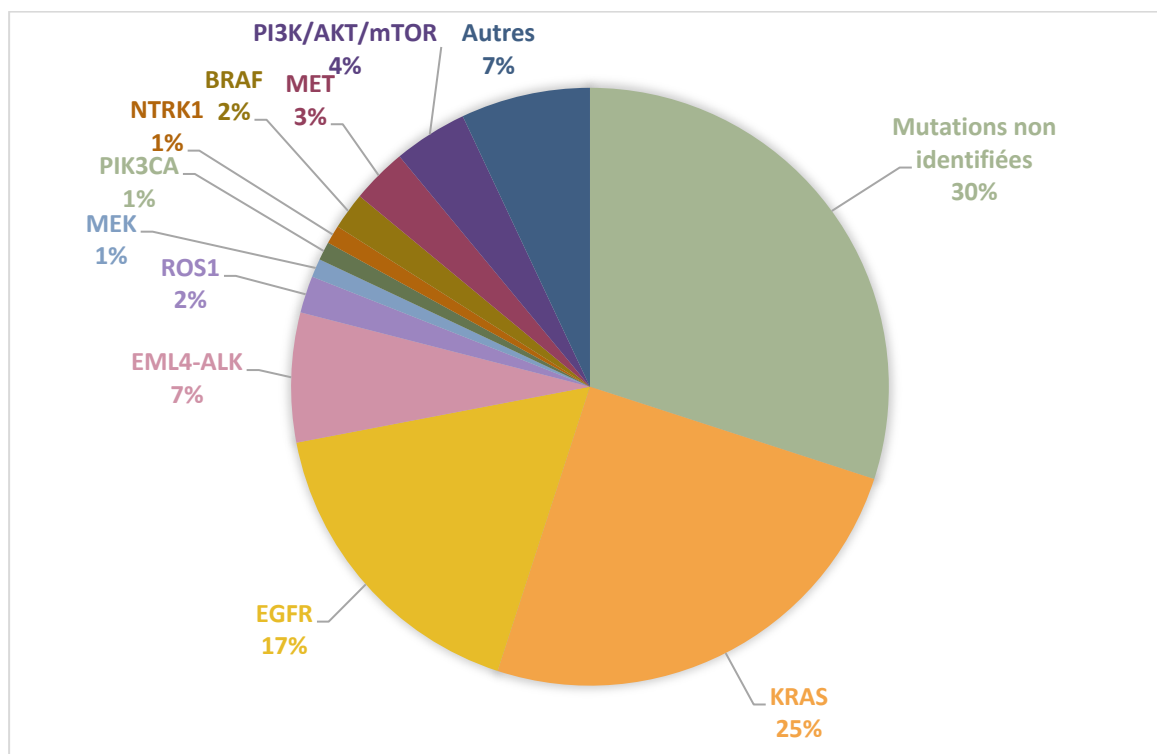


Figure 3 : Classification moléculaire des cancers bronchiques non à petites cellules - Principales mutations identifiées. Adapté de la publication de Hirsch FR *et coll.*, *Lancet*. 2017

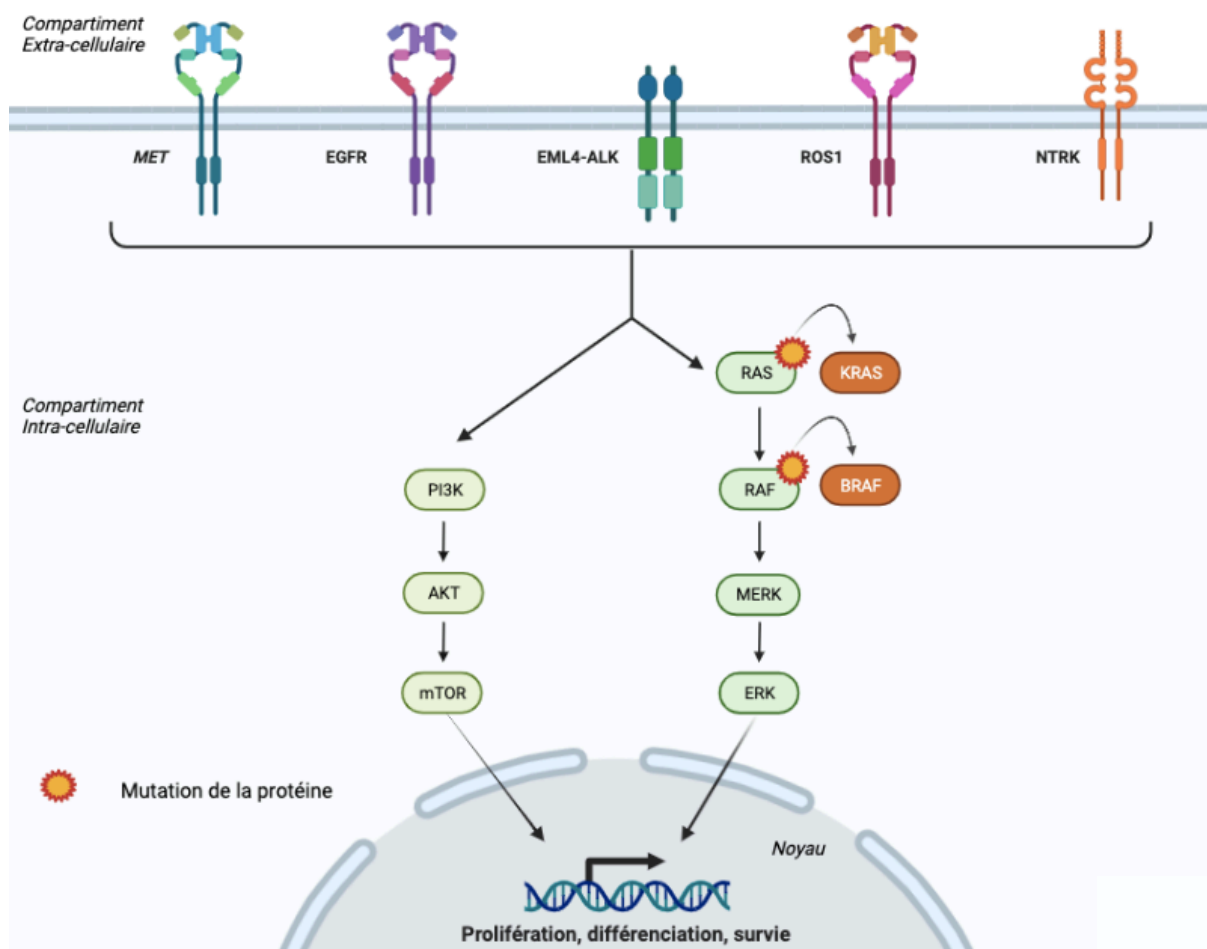


Figure 4 : Protéines et voies de signalisation impliquées dans le CBNPC. Les récepteurs tyrosine kinases *MET*, *EGFR*, *ROS1*, *NTRK*, ainsi que la protéine de fusion *EML4-ALK* sont représentés au niveau de la membrane cellulaire. Lors de l'interaction avec leur ligand, ces différentes protéines vont activer des voies de signalisation telles que *PI3K/AKT/mTOR* et *RAS-MAPK* impliquées dans la prolifération, la différenciation ou encore la survie cellulaire. Une dérégulation activatrice des différentes protéines par l'apparition de mutations, amplifications comme dans le cas de CBNPC par exemple, va permettre une potentialisation de l'activation des voies de signalisation entraînant une augmentation de la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. Adapté de la publication de Dholaria B et coll., *Journal of Hematology & Oncology*. 2016

5.2. Les signatures mutationnelles

L'identification des mutations motrices telles que les mutations touchant l'*EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *ROS1* ou encore *MET*, participe à l'amélioration de la compréhension du CBNPC et sa prise en charge. Cette compréhension du paysage mutationnel du CBNPC est facilitée par la diminution des coûts des tests génomiques au cours de cette dernière décennie, permettant le développement de bases de données regroupant les différentes mutations. Parmi ces bases de données nous retrouvons : Ensembl (*European Bioinformatics Institute / Wellcome Trust Sanger Institute*), NCBI (*National Cancer for Biology Information*) ou encore UCSC (*University of California Santa Cruz*) (41).

Une grande quantité de données génétiques ont été générées à grande échelle du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), avec plus de 1000 génomes de patients atteints de CBNPC séquencés. Malgré tout, il reste encore difficile de distinguer les mutations dites conductrices, des mutations dites passagers, notamment par exemple chez les patients non-fumeurs. Une des explications peut venir du fait que les patients fumeurs vont présenter plus de mutations en raison de l'exposition directe à la fumée de tabac, promotrice de mutations (42,43).

Le profilage génomique des carcinomes pulmonaire a ainsi montré que ces mutations sont principalement des mutations nucléotidiques C :G > A :T survenant par l'effet mutagène tabagique.

Pour exemple, l'étude française BioCast a évalué le statut mutationnel du récepteur à l'EGF, KRAS, ALK, BRAF, ou encore de PIK3CA. Cette étude représente la plus grande étude sur le carcinome pulmonaire chez des personnes n'ayant jamais fumé dans la population européenne. Dans cette étude, une altération moléculaire exploitable a été retrouvée dans plus de 70% des cas dont l'EGFR (51%), KRAS (6%), BRAF (3%) et PIK3CA (1%) (44).

Une étude prospective belge réalisée en 2020 sur une petite cohorte de 46 patients a pu comparer à l'aide d'une étude WES intégrative (*Whole Exome Sequencing*) et d'une étude WGS à faible couverture (*Whole Genome Sequencing*) des différences en termes de signature mutationnelle entre patients fumeurs et non-fumeurs (45). Ainsi, la classification des mutations somatiques selon les six modèles de type de substitutions possibles a indiqué que chez les fumeurs le type de substitution principal était G :C > A :T, contrastant avec les patients non-fumeurs où le type dominant est G :C > T :A. Il a également été identifié des signatures mutationnelles somatiques collectives, basées sur le contexte de séquence pour chaque substitution. La signature collective retrouvée chez les non-fumeurs est composée de six signatures mutationnelles, chacune sous-tendant un processus mutagène. Ainsi par exemple, il a pu être mis en évidence que 14% de la signature collective était liée à une perturbation du mécanisme de réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Cette découverte est soutenue par la détection de mutations somatiques dans les gènes régulant la recombinaison homologue. Il est intéressant de relever que le regroupement non supervisé d'une cohorte de patients CBNPC basée sur les signatures mutationnelles somatiques fait la distinction entre les fumeurs et non-fumeur, mettant en évidence une étiologie différente dans ces groupes. D'autre part, la fréquence des mutations des gènes conducteurs à l'EGFR, ainsi que des amplifications dans le gène *MET* se sont révélées plus élevées chez les patients non-fumeurs que fumeurs, ainsi qu'un taux de mutation de TP53 (facteur pronostic négatif) plus faible. Ces observations suggèrent un pronostic plus favorable chez les patients non-fumeurs, ainsi qu'une mise en place de thérapeutiques ciblées fonctionnelles.

De nombreuses études permettant de caractériser de façon plus claire le paysage mutationnel, notamment par l'identification de signatures et profils spécifiques des mutations impliquées dans le CBNPC de chaque patient, permettra une meilleure prise en charge thérapeutique personnalisée.

5.3. Hétérogénéité micro-environnementale

Au cours de cette dernière décennie, le micro-environnement tumoral (MET) des CBNPC s'impose de plus en plus comme un facteur non seulement de progression du carcinome pulmonaire primitif *de novo* mais également dans le développement de son agressivité et comme source de résistances. En dépit de ces limites, le MET reste un compartiment riche en potentielles cibles thérapeutiques.

Les caractéristiques cellulaires mais aussi anatomiques du poumon sain servent de barrière défensive dans la lutte contre les agents pathogènes et particules diverses. Comme expliqué précédemment, le CBNPC englobe une hétérogénéité cellulaire, mais également mutationnelle, suivant les différents sous types tumoraux. De mieux en mieux décrite, cette hétérogénéité est également étendue à l'environnement tumoral qui comprend le système vasculaire, les fibroblastes associés au cancer (*Cancer Associated Fibroblasts*, CAFs), la matrice extracellulaire (MEC), ainsi que les cellules immunitaires infiltrantes dont les lymphocytes infiltrants la tumeur (TILs). Il a pu être montré dans le CBNPC, que l'infiltration immunitaire dépend du stade, et suggère que le MET contribue à la carcinogenèse pulmonaire et pourrait avoir une utilité pronostique. En effet, des analyses quantitatives et qualitatives de différentes cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages...) ont été réalisées au cours de différents stades et types histologiques de CBNPC. Les résultats, variables selon ces deux critères met en évidence que cette infiltration pourrait jouer un rôle prédictif qu'en à l'efficacité de l'immunothérapie permettant la réactivation du système immunitaire (46).

De plus, au sein du MET pulmonaire, il a été rapporté un rôle des cellules cancéreuses dans la reprogrammation des cellules stromales infiltrant la tumeur favorisant ainsi la carcinogenèse (**Figure 5**) (47).

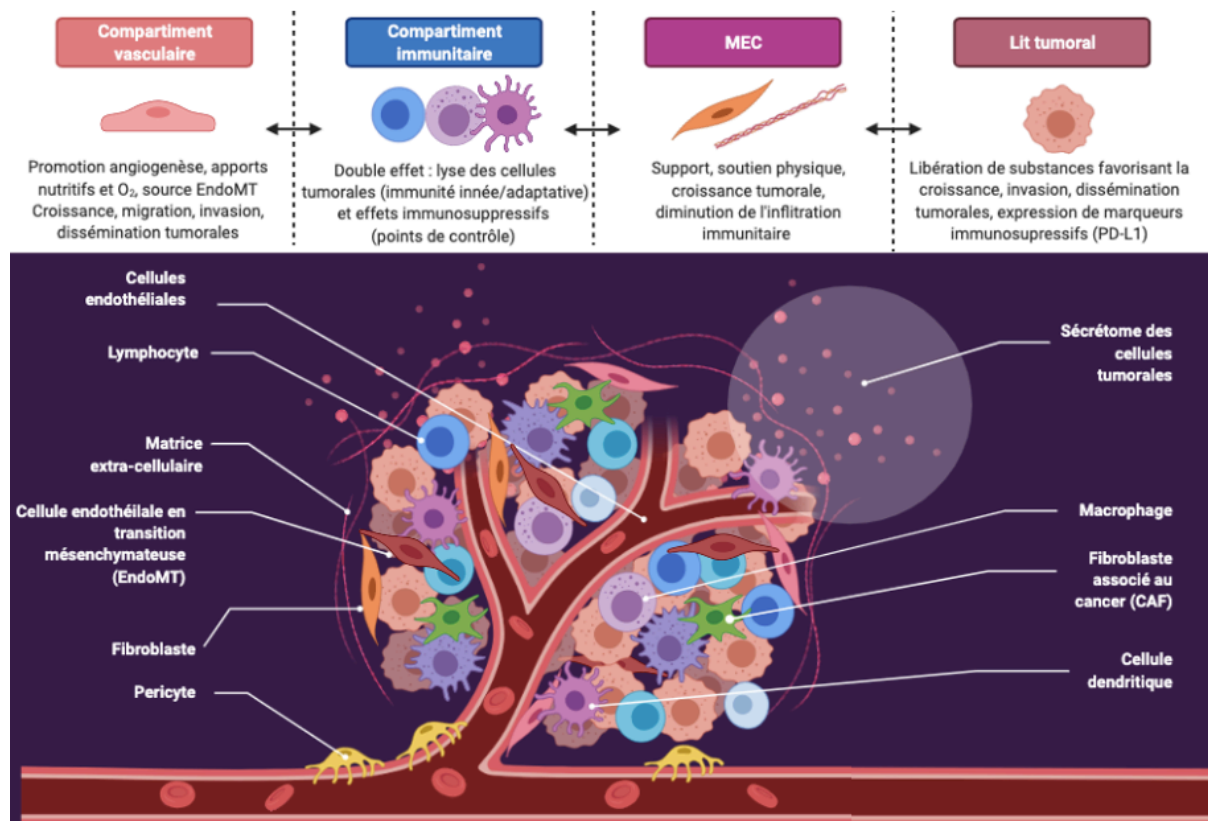


Figure 5 : Représentation schématique des principaux acteurs du micro-environnement tumoral. Le micro-environnement tumoral est composé de différents compartiments dont les cellules immunitaires et celles de la matrice extracellulaire, mais également d'un compartiment vasculaire complexe impliquant majoritairement des cellules endothéliales. Le lit tumoral regroupant les cellules cancéreuses, interagit très étroitement avec l'ensemble des éléments de ce micro-environnement, et conduit à la libération de substances regroupées sous le terme de sécrétome telles que le TGF- β ou encore différentes interleukines. Ce sécrétome induit de nombreuses actions non seulement sur les cellules tumorales mais aussi sur les cellules du micro-environnement, à l'origine de modifications telle que la transition endothélio-mésenchymateuse ou à l'induction d'un environnement

immunosuppresseur. L'ensemble de ce micro-environnement participe activement à la prolifération, la croissance et la dissémination des cellules tumorales, mais également à des résistances thérapeutiques. Adapté de la publication de Altorki NK *et coll.*, *Nat Rev Cancer*. 2019

5.3.1. La matrice extracellulaire

Le micro-environnement tumoral est composé notamment de la matrice extracellulaire, elle-même constituée de collagène, d'élastine, de fibronectine, de laminine, d'intégrines ou encore de facteurs de croissance. Elle sert de support et fournit un soutien physique à la croissance tumorale et à la propagation des cellules tumorales. Ce composant majeur du MET permet la médiation des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales contribuant à la carcinogenèse. Une étude a ainsi mis en évidence dans un modèle de CBNPC muté KRAS chez la souris, que l'expression de la MMP14 (*matrix metalloprotease 14*) à la membrane des cellules cancéreuses conduit à l'activation de la voie de l'EGF par l'intermédiaire du facteur HB-EGF, induisant à une augmentation de la croissance tumorale (48). Par ailleurs, il a également été démontré que la densité de la MEC conditionne l'infiltration immunitaire de cellules lymphocytaires T au sein des lits tumoraux de CBNPC humains. Ainsi, le ciblage de la MEC pourrait constituer une stratégie intéressante afin de faciliter l'infiltration des lymphocytes T et renforcer l'efficacité anti tumorale (49).

5.3.2. Les cellules immunitaires

Le compartiment immunitaire a un rôle prépondérant dans le MET pulmonaire. Les cellules immunitaires innées mais aussi adaptatives ont des rôles bivalents à la fois de promotion et de suppression de tumeurs. Les TILs, et en particulier les lymphocytes T CD4+ et CD8+ ainsi que leurs cytokines immunorégulatrices, sont à l'origine d'une immunité adaptative avec des fonctions cytotoxiques indispensables au sein du MET, dans la réponse anti-tumorale des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires. En effet, les cellules tumorales peuvent échapper au système immunitaire en exprimant à leur surface la protéine nommée PD-L1. Cette dernière inactive les lymphocytes T en se liant aux récepteur PD1 et B7.1 à leur surface. Cette liaison PD1/PD-L1 constitue une cible thérapeutique dans la réactivation du système immunitaire en cancérologie, notamment par le développement de l'immunothérapie.

Dans un modèle murin de CBNPC muté KRAS, l'inhibition de PD1 par un anti-PD1, a permis la réactivation de tous les types cellulaires T, et la production de cytokines effectrices à l'origine d'un ralentissement de la croissance tumorale (27,50).

L'amélioration de l'efficacité de l'immunothérapie nécessite une meilleure compréhension des rôles immunomodulateurs des cellules immunitaires au sein du MET pulmonaire. De récentes études ont montré que les mutations oncogènes KRAS, p53 ou EGFR sont associées à des phénotypes immunitaires distincts dans des modèles murins de CBNPC et adénocarcinomes pulmonaires humains (51). Ainsi, nous pouvons comprendre que l'hétérogénéité tumorale des types de CBNPC va conditionner et moduler les réponses aux thérapies immunitaires anti-tumorales suivant le type mutationnel tumoral de chaque patient et qu'il est important de considérer cette hétérogénéité dans la prise en charge thérapeutique.

5.3.3. La vascularisation tumorale

Comme dans la majorité des cancers, le CBNPC possède un micro-environnement vasculaire très développé. Ce réseau vasculaire se développe par le processus d'angiogenèse indispensable à la croissance tumorale. Il participe à l'initiation de la tumeur par un apport en O₂ et de nutriments, mais aussi à la propagation de la tumeur et à la dissémination des cellules tumorales métastatiques en permettant la migration des cellules cancéreuses de la tumeur primitive jusqu'aux sites secondaires.

Cette angiogenèse tumorale est induite par des molécules pro-angiogéniques sécrétée par les cellules tumorales, comme notamment le facteur de croissance transformant β (*Transforming Growth Factor*, TGF- β). En situation d'hypoxie, une augmentation de l'expression du facteur HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) dépendant du promoteur de TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), induit une expression de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), facteur clé pour la croissance des cellules endothéliales. Par ailleurs, outre son rôle dans la néo-angiogenèse, le micro-environnement vasculaire peut modifier la perfusion de molécules thérapeutiques (52). La plasticité de ce micro-environnement apparaît comme un enjeu majeur au sein du MET.

Les cellules endothéliales sont un des acteurs principaux dans le phénomène d'angiogenèse, qui par définition est la formation de nouveaux vaisseaux à partir de réseaux préexistants, indispensable pour la croissance, migration, invasion des cellules tumorales et le développement métastatique. En effet, au-delà d'une certaine taille, la tumeur ne peut plus croître en l'absence d'une vascularisation accrue. Des cellules endothéliales tumorales (*Tumor-Endothelial Cell*, TECs) sont alors recrutées localement par la tumeur. Ces cellules possèdent une capacité de migration mais aussi de prolifération plus élevée que les cellules endothéliales saines et ont une plus forte sensibilité aux facteurs angiogéniques tel que le VEGF, favorisant plus encore l'angiogenèse. Par ailleurs, il est décrit que cette néovascularisation anarchique permet à la fois la croissance tumorale et une augmentation de l'extravasation des cellules tumorales par une perméabilité accrue (53).

En plus de leur rôle prépondérant dans le processus de néo-angiogenèse, les cellules endothéliales sont impliquées, également, dans un processus de modification de leur phénotype, passant d'un phénotype endothélial à un phénotype mésenchymateux *via* la transition dite endothélio-mésenchymateuse (EndoMT). Cette plasticité initialement décrite comme un processus important du développement de la valve cardiaque durant l'embryogenèse en 1975, est retrouvée dans différentes pathologies comme l'hypertension pulmonaire, la fibrose cardiaque, ou encore l'athérosclérose. Cette différenciation phénotypique trouve également sa place dans la biologie des cancers (54).

Au cours de la transition endothélio-mésenchymateuse, les cellules endothéliales perdent leur organisation en monocouche jointive, se détachent de la lame basale et acquièrent un phénotype mésenchymateux. Ce phénotype est caractérisé par la perte des jonctions intercellulaires, la perte des marqueurs endothéliaux tels que la molécule d'adhésion des cellules endothéliales plaquettaire (PECAM-1, CD31), VE-cadherine, vWF (*von Willebrand Factor*), et par le gain de marqueurs mésenchymateux tels que α -SMA (*α -Muscle Factor*), vimentine, N-cadherine ou encore la protéine spécifique des fibroblastes (FSP1). On observe ainsi le gain de propriétés invasives et migratoires des cellules en transition. En effet, l'EndoMT est reconnue comme un

potentiel facteur de dissémination métastatique par la modulation de la fonction endothéliale : perte de l'expression de protéines fonctionnelles, augmentation de la perméabilité et augmentation de la contractilité cellulaires. L'EndoMT apparaît ainsi facilité l'extravasation de cellules tumorales vers des sites secondaires. De plus, il a été montré qu'au cours de la transition, les cellules acquéraient un phénotype sécrétoire de type pro-inflammatoire, caractérisé par une augmentation d'IL-4,6,8,13 et TNF- α (54).

L'EndoMT est induite mais également contrôlée par divers *stimuli* et voies de signalisation tels que Wnt/catenin et Notch, l'hypoxie et le stress oxydatif (*Reactive Oxygen Species*, ROS), mais le facteur décrit comme l'inducteur principal de l'EndoMT est le TGF- β .

La famille des protéines TGF- β comporte différents facteurs de croissance pléiotropes jouant un rôle dans plusieurs processus physiologiques comme l'embryogenèse, le développement du système immunitaire ou encore les fonctions de la réponse inflammatoire. Il est aujourd'hui admis que les facteurs de la famille TGF- β sont de puissants inducteurs de la conversion des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Il en existe 3 isoformes, et l'EndoMT semble être stimulée préférentiellement par l'isoforme TGF- β 2. Une récente étude, travaillant sur l'EndoMT à partir de cellules de cancer de colon invasif, a confirmé que le TGF- β 2 augmente l'expression des marqueurs mésenchymateux (α -SMA, N-cadherine), et est l'isoforme inductrice la plus puissante pour induire l'EndoMT dans ce modèle (55). L'induction de cette transition par le TGF- β 2 semble impliquer deux voies de signalisation distinctes : l'une conduisant à une augmentation de Snail-1, l'un des principaux facteurs de transcription régulant l'EndoMT avec Slug et Twist, et une autre recrutant la voie de signalisation des Smad. D'après une autre étude, l'induction de l'EndoMT et la stabilité du maintien du phénotype mésenchymateux dépend de la durée de la stimulation des cellules endothéliales par différents *stimuli* comme le TGF- β et l'IL-1 β (**Figure 6**) (56).

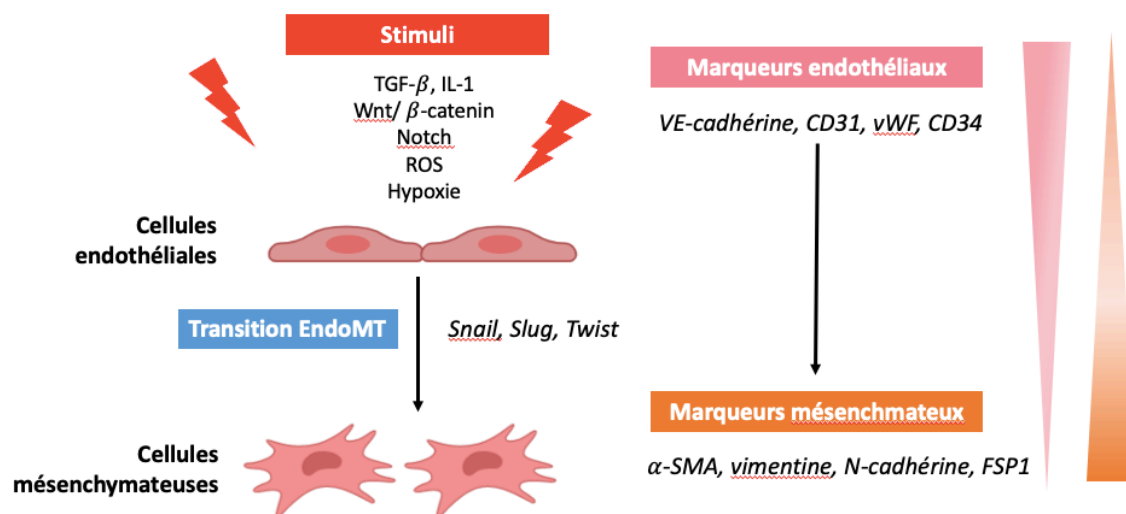


Figure 6 : Modifications phénotypiques des cellules endothéliales durant la transition endothélio-mésenchymateuse. *Stimuli* conduisant à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes mésenchymateux au cours de la transition EndoMT. Perte progressive des marqueurs endothéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux au cours du changement phénotypique des cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux. Adapté d'après Platel V et coll., *J Oncol.* 2019

5.3.4. Les fibroblastes associés au cancer

De nombreuses études antérieures ont montré l'implication des CAFs au sein des tumeurs solides comme facteur pouvant participer à la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et le processus métastatique, mais aussi dans la résistance aux thérapeutiques. Une étude *in vivo* conduite en 2017 à partir de tissus pulmonaires cancéreux humains a mis en évidence une coopération cellulaire à l'origine d'une potentialisation de la progression métastatique. En effet, les auteurs ont rapporté une augmentation de la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6) par les CAF, à l'origine d'une stimulation de la voie JAK2-STAT3 des cellules tumorales (57).

La transition endothélio-mésenchymateuse est en grande partie à l'origine de la formation de CAFs. Au cours de l'étude de Zeisberg *et coll.*, une quantification de l'origine des fibroblastes sur un modèle murin de mélanome a été réalisée *via* l'utilisation d'une enzyme recombinase Cre-Lox. Il a ainsi été observé que 40% des CAFs présentaient une origine endothéliale. Différentes origines ont pu être démontrées en dehors de l'EndoMT telles qu'une origine épithéliale *via* la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), à partir de fibroblastes tissulaires activés par les cellules tumorales, ou encore à partir de cellules hématopoïétiques (58).

Les CAFs du micro-environnement tumoral permettent également la création de niches pré-métastatiques facilitant le phénomène de « *homing* » des cellules tumorales. Ces cellules tumorales ont besoin d'un environnement favorable pour survivre et se développer sur les sites secondaires. Par leur forte mobilité, les CAFs migrent dans d'autres tissus et à l'aide de leur sécrétome, reconstituent le micro-environnement tumoral. La fibronectine ou des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF sont produits en partie par les CAFs et permettent l'adhésion des cellules cancéreuses sur les tissus cibles, ainsi que le phénomène d'angiogenèse décrit précédemment (59).

6. Stratégies thérapeutiques

Environ 85% des cancers pulmonaires sont des CBNPC et sont généralement moins sensibles à la chimiothérapie que les carcinomes pulmonaires à petites cellules. Seuls 20 à 25% des patients atteints de CBNPC sont diagnostiqués à un stade précoce et subissent une résection à visée curative. Pour la plus grande majorité, ils présentent un stade avancé et les thérapeutiques telles que les chimiothérapies, les thérapies ciblées et l'immunothérapie sont les principales stratégies de traitement (60).

Les traitements du CBNPC sont spécifiques du stade de la maladie. Ainsi, les patients présentant des stades I ou II doivent être traités par résection chirurgicale complète s'il n'y a pas de contre-indication. Ceux qui ne peuvent en bénéficier doivent envisager une radiothérapie conventionnelle ou stéréotaxique (61). En complément, lors des stades non avancés (I et II), des chimiothérapies standards sont prescrites à base de sel de platine (agent alkylant) en association avec l'étoposide (inhibiteur de topoisomérase II) ou la vinorelbine (poison du fuseau mitotique). Lors du stade III, les sels de platine sont conservés avec en complément un traitement de 3ème génération tel que le docétaxel, paclitaxel (poisons du fuseau mitotique), la gemcitabine (anti-métabolite), ou le pemetrexed (anti-folate) (62,63).

6.1. La chimiothérapie néo-adjuvante

Les avantages de la chimiothérapie néo-adjuvante comprennent un traitement précoce des micrométastases, une réduction de la tumeur pouvant dans certains cas permettre une résection complète, ainsi qu'une meilleure tolérance par comparaison avec une chimiothérapie adjuvante. Cependant, le rôle du traitement par chimiothérapie néo-adjuvante dans le CBNPC reste encore flou et aucune étude n'a rapporté de bénéfice de survie (64,65).

6.2. La chimiothérapie adjuvante

La chimiothérapie adjuvante consiste en des schémas thérapeutiques combinés à base de sels de platine et est indiquée pour des patients atteints de CBNPC de stade II et IIIA après résection chirurgicale. Sa justification pour les stades précoces est basée sur les observations selon lesquelles les métastases à distance sont des sites d'échec courants suite à une chirurgie curative. Ses dernières années, l'incorporation de thérapies ciblées ou d'immunothérapie dans les prises en charge de stades précoces avec a fait l'objet d'une attention particulière (gefitinib, erlotinib ou encore l'atézolizumab dans un essai IMpower010 de phase III). Cependant, cette approche reste encore limitée aux essais cliniques. Ainsi, plusieurs études incluant des inhibiteurs d'EGFR et d'ALK n'ont pas rapporté d'amélioration significative de la survie sans progression ni de la survie globale après résection chirurgicale, a contrario de l'étude de l'immunothérapie qui a rapporté un bénéfice en termes de survie sans maladie chez les patients traités avec cet anticorps comme thérapeutique adjuvante après résection (66–68).

6.3. Chimiothérapie pour stade avancé (stade IV)

Les patients qui présentent un stade avancé ou métastatique nécessitent un traitement par voie systémique. Avant l'ère de l'immunothérapie, le traitement par plusieurs chimiothérapies telles que les dérivés du platine avec de la gemcitabine, de la vinorelbine ou encore un taxane (paclitaxel ou docétaxel) était le traitement de référence. Plus tard, le pemetrexed (anti-folate) a fait son arrivée et a été étudié en association avec le cisplatine (sel de platine) comparé à la combinaison standard cisplatine/gemcitabine chez des patients atteints de CBNPC. Dans cette dernière étude, il a été montré une différence significative en termes de survie en faveur du traitement par cisplatine/pemetrexed. Cette association s'est également avérée mieux tolérée et a finalement été recommandée pour patients atteints de CBNPC au stade avancé (69).

6.4. Nouvelles stratégies : les thérapies ciblées

Les chimiothérapies conventionnelles ont montré leurs limites dans la prise en charge des formes évoluées de CBNPC justifiant le développement de thérapies ciblées. Ces dernières associent de nombreux inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase (ITK), des anticorps monoclonaux (anti-angiogéniques ou capables d'inhiber des points de contrôle immunitaires) et ont considérablement amélioré la survie des patients souffrant de ces cancers. L'inhibition des voies de signalisation associées à la tumorigenèse peut se faire au travers d'une action extra-cellulaire par les anticorps monoclonaux empêchant l'interaction ligand-récepteur, mais également en extra-cellulaire et/ou intra-cellulaire par l'intermédiaire des ITK (27).

La plupart des tyrosine-kinases sont des protéines intracellulaires (comme EML-ALK, PI3K, AKT, mTOR) mais également des récepteurs membranaires (EGFR, ROS1, ou encore *MET*) avec des domaines de liaison extra et intra-cellulaires. Ces protéines possèdent des sites de liaison à l'ATP (Adenosine TriPhosphate) où les ITK vont pouvoir se fixer de façon compétitive, bloquer la phosphorylation de la protéine, et par conséquent la transduction du signal des voies de signalisation qui lui sont associées.

Ainsi, pour les tumeurs de stades avancés de stade IV au cours desquels les chimiothérapies conventionnelles présentent une limite thérapeutique, diverses thérapies ciblées peuvent être proposées parmi lesquelles différents ITK tels que l'erlotinib, l'afatinib, gefitinib ou encore l'osimertinib en cas de mutations du gène EGFR, l'alectinib, le crizotinib, le céritinib ou le brigatinib en cas de réarrangement ALK ou le crizotinib ou encore l'entrectinib en cas de réarrangement du récepteur ROS1 (**Figure 7**) (70,71).

L'ensemble des molécules citées ci-dessous (sauf exception précisée) ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) ou une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans le CBNPC (selon la Société Française de Pharmacie Oncologique, Le Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament, la base de données THERIAQUE (72), le site de l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ANSM) (73) et le site de La Haute Autorité de Santé (HAS) (74)).

6.4.1. Thérapeutiques ciblant les mutations de l'EGFR

Parmi ces inhibiteurs se distinguent différents ITK. Ainsi nous retrouvons les ITK de première génération : le gefitinib (AMM) et l'erlotinib (AMM), les ITK de seconde génération : afatinib (AMM) et dacomitinib (AMM) et un ITK de troisième génération : osimertinib (AMM). Il est à noter que la mise sur le marché de l'osimertinib a considérablement amélioré la survie sans progression en cas d'utilisation en première ligne de traitement du CBNPC par comparaison avec le gefitinib ou erlotinib (18,9 mois contre 10,2 mois) (75). Par ailleurs, le dacomitinib a été approuvé aux Etats-Unis pour le traitement de première ligne du CBNPC avancé muté EGFR. Cet ITK a montré une amélioration de la survie globale (34 mois contre 27 mois) et de la survie sans progression (14,7 mois contre 9,2 mois) en comparaison au gefitinib. En dépit de ces données encourageantes, des précautions restent à prendre, puisque des toxicités digestives et cutanées de haut grade ont été relevées en présence de ces ITK, pouvant freiner leur utilisation (76,77).

En France, les recommandations pour le CBNPC de stades avancés présentant une mutation activatrice à l'EGFR selon les référentiels Auvergne Rhône-Alpes en Oncologie Thoracique de 2021, sont en 1^{ère} ligne la molécule de 3^{ème} génération, l'osimertinib.

Concernant les anticorps monoclonaux anti-EGFR tels que le cetuximab (Hors AMM pour le CBNPC) ou le nécitumumab (non approuvé par l'ANSM), deux essais cliniques de phase III réalisés sur des patients atteints de CBNPC de stade IV, ont rapportés une amélioration modeste de la survie globale pour ces anticorps lors de leur combinaison avec un traitement cytotoxique systémique (médiane de survie globale de 11,3 mois contre 10,1 mois en présence du cetuximab et de 11,5 mois à 9,9 mois en présence du nécitumumab en comparaison aux groupes n'ayant pas reçu ces anticorps) (78,79).

6.4.2. Thérapeutiques ciblant les mutations des réarrangements ALK et ROS1

1. Mutations ALK

Les inhibiteurs ITK anti-ALK ont été approuvés par la FDA et l'ANSM, et sont indiqués pour le traitement des patients atteints de CBNPC positifs au réarrangement ALK.

Le crizotinib (AMM) représente la première génération d'ITK anti-ALK, tandis que le céritinib (AMM), l'alectinib (AMM) et le brigatinib (AMM) font partie de la seconde génération d'ITK et le lorlatinib (AMM) appartient à la troisième génération. Ces deux dernières générations ont été mises sur le marché en raison, notamment de l'apparition de résistances apparues avec les molécules de première génération (80).

L'efficacité du crizotinib a été initialement identifiée dans l'étude multicentrique PROFILE 1001 de phase I (total n= 147 patients). L'essai de phase III PROFILE 1007 (total n= 347 patients) a confirmé une meilleure survie et un meilleur taux de réponse des patients atteints de CBNPC mutés ALK sous crizotinib par rapport à ceux traités par docétaxel ou pemetrexed. L'essai ASCEND-4 (total n=376 patients) a évalué l'efficacité du céritinib et a montré une amélioration de la survie sans progression en comparaison à la chimiothérapie combinée (sels de platine avec pemetrexed) de première lignée (81,82).

L'alectinib, autre ITK anti-ALK de seconde génération est aujourd'hui approuvé par la FDA dans le traitement de première intention pour les patients atteints de CBNPC muté ALK et ceux qui ont progressé sous crizotinib. En cas de résistance à l'alectinib, le lorlatinib, ITK anti-ALK de troisième génération a reçu l'approbation de la FDA pour le CBNPC muté ALK avec progression sous crizotinib et progression sous au moins un autre inhibiteur ALK en traitement de première ligne (83).

En France, selon les mêmes référentiels que pour les ITK à l'EGFR, le traitement de première ligne pour les patients mutés ALK repose sur l'alectinib ou le brigatinib. Le traitement de seconde ligne reposera sur une adaptation suivant le profil moléculaire lié à la progression tumorale.

2. Mutations ROS1

Des thérapeutiques ciblant ce récepteur ont vu le jour, notamment le crizotinib qui reste l'option de première intention pour les patients mutés ROS1. Cet ITK a plusieurs rôles car il peut cibler le récepteur ROS1 mais aussi la protéine ALK et le récepteur *MET*. Le crizotinib a obtenu son approbation par la FDA sur la base de l'essai clinique PROFILE 1001 (total n= 143 patients) qui a montré une survie sans progression de 19,2 mois et est ainsi devenu le traitement de première intention pour les patients muté ROS1 dans le CBNPC. Cependant, une augmentation de l'incidence des métastases cérébrales chez ces patients est observée sous traitement, avec en parallèle des résistances au crizotinib notamment par la mise en place de voies alternatives (84).

Par la suite, un autre ITK, l'entrectinib (ATU nominative) a reçu l'approbation de la FDA en 2019 pour les patients CBNPC mutés ROS1, et possède une bonne pénétration de la barrière-hématoencéphalique permettant le traitement des métastases cérébrales. Le lorlatinib, inhibiteur d'ALK et ROS1 de troisième génération, possède une activité contre plusieurs mutants de ROS1 qui confèrent une résistance au crizotinib, céritinib.

Un nouvel ITK, le repotrectinib (non approuvée par l'ANSM) est un ITK puissant de faible poids moléculaire avec une efficacité démontrée contre les récepteurs TRK, ALK et la plupart des mutants ROS1. Son efficacité est 90

fois supérieure à celle du crizotinib. En 2017 il reçoit la désignation de médicament orphelin par la FDA pour le traitement du CBNPC porteur des mutations oncogènes spécifiquement ciblées par cette molécule (36).

En France, le traitement de 1^{ère} ligne des patients mutés ROS1 repose sur le crizotinib selon les référentiels Auvergne Rhône-Alpes en Oncologie Thoracique de 2021.

6.4.3. Thérapeutiques ciblant la voie RAS-MAPK

Le sorafénib (Hors AMM pour le CBNPC), inhibiteur multikinase, cible la protéine RAS ainsi que d'autres récepteurs comme les isoformes 2 et 3 du récepteur au VEGF et l'isoforme β du récepteur au PDGF (85). Cependant, malgré des résultats prometteurs, cette molécule n'a montré aucune efficacité clinique dans le CBNPC (86,87).

Des inhibiteurs de la protéine MEK ont également été étudiés dans le traitement du CBNPC. Toutefois, les résultats obtenus n'ont pas été concluants. Ainsi pour illustrer, aucun avantage en termes de survie n'a été observé avec le sélumétinib (Hors AMM pour le CBNPC) par rapport à un traitement par chimiothérapie standard avec pemetrexed. De même, l'étude évaluant le tramétinib (AMM) n'a pas montré de bénéfice par rapport à une chimiothérapie par docétaxel (88). Parmi les hypothèses à l'origine de ces résultats décevants, une faible affinité des molécules pour les sites de liaison semble être mise en évidence.

Chez les patients présentant la mutation BRAF V600E qui ont progressé sous chimiothérapie, l'association d'ITK dabrafénib et tramétinib est désormais approuvée par la FDA sur des résultats d'essai clinique de phase II. Le vemurafenib (Hors AMM pour le CBNPC) est également un ITK indiqué pour les patients présentant cette mutation (89).

6.4.4. Thérapeutiques ciblant la voie PI3K/AKT/mTOR

Des inhibiteurs de cette voie sont en cours de développement. Ainsi, le LY294002, inhibiteur de PI3K, améliorerait la sensibilité du CBNPC à la radio-chimiothérapie (90). Par ailleurs, cet inhibiteur a pu montrer une augmentation de la sensibilité aux ITK de l'EGFR dont l'erlotinib (91).

Des inhibiteurs de sérine-thréonine kinase tel que le temsirolimus (Hors AMM pour le CBNPC), inhibiteur de mTOR, cible les molécules en aval des voies PI3K et a montré une activité antitumorale prometteuse au cours d'essais de phase I dans le CBNPC (92). D'autres inhibiteurs de cette voie, comme l'éverolimus (Hors AMM pour le CBNPC), sont également en essais précliniques pour le traitement du CBNPC (93,94).

6.4.5. Thérapeutiques ciblant d'autres mutations

Un inhibiteur oral, le larotrectinib (AMM) est approuvé par la FDA et l'ANSM pour les cas de CBNPC muté NTRK (fusion du gène du récepteur neutrophique de tyrosine kinase présenté chez 1% des patients) après progression d'une chimiothérapie ou d'une immunothérapie ultérieure (95).

Concernant le ciblage du récepteur *MET*, différentes stratégies sont envisagées. Par exemple par l'inhibition de son ligand HGF par un anticorps anti-HGF (le rilotumumab), ou une inhibition du récepteur à l'aide d'un

anticorps monoclonal l'onartuzumab, sont des stratégies encore en cours d'étude. Actuellement, des essais cliniques aux Etats-Unis sur le cabozantinib et le crizotinib comme ITK de *MET* sont aussi à l'étude. Il convient également de mentionner d'autres médicaments, également en cours d'étude comme le tepotinib, ITK de *MET* très sélectif, ou encore le savolitinib (96).

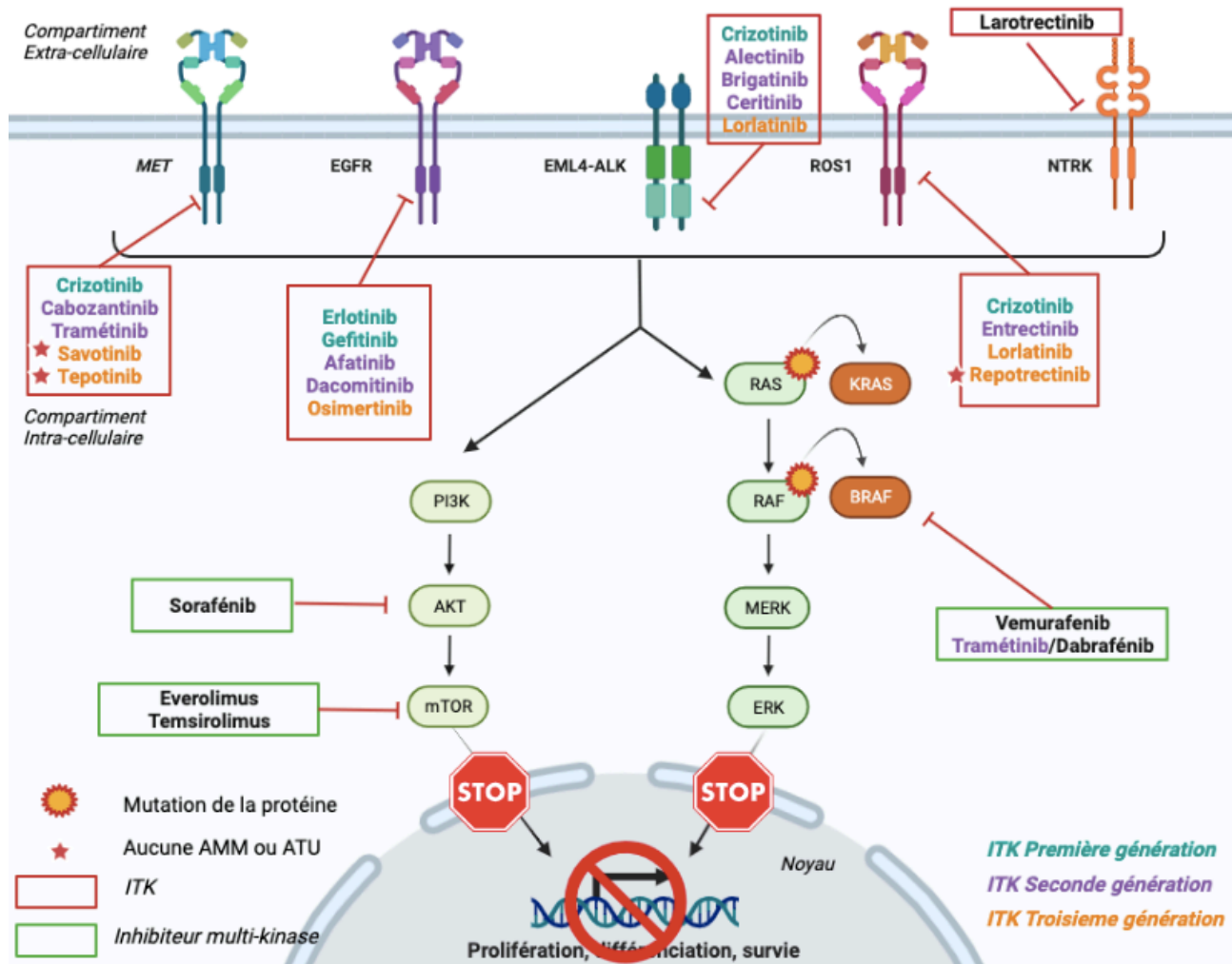


Figure 7 : Représentation non exhaustive des thérapies ciblées inhibiteurs de protéines kinase dans le CBNPC. Lors de l'identification de mutations au sein de cellules tumorales, à l'origine d'un dérèglement de voies de signalisation intra-cellulaires (PI3K/AKT/mTOR ou encore RAS-MAPK), des thérapies dites ciblées sont proposées. Parmi ces thérapies sont cités les inhibiteurs de protéines kinases dont font partie les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), mais il existe également d'autres inhibiteurs qui peuvent cibler différentes kinases telles que les sérines-thréonines kinases et seront nommées inhibiteurs multi-kinase. L'inhibition des différentes protéines kinase à l'origine d'un dérèglement de voies de signalisation (PI3K/AKT/mTOR ou encore RAS-MAPK), permet de limiter la prolifération, la différenciation et la survie des cellules tumorales. Adapté de la publication de Dholaria B et coll., *Journal of Hematology & Oncology*. 2016

7. Thérapeutiques ciblant le micro-environnement tumoral

7.1. Ciblage du compartiment vasculaire

Une thérapie ciblée associée à des stratégies ciblant le MET peut constituer une bonne combinaison lors de la mise en place de stratégies thérapeutiques. Dans un essai de phase II sur des patients atteints de CBNPC à des stades avancés non préalablement traités et mutés EGFR (total n= 154 patients), l'erlotinib a été testé en combinaison avec un anti-angiogénique, le bévacizumab (anti-VEGF) en tant que traitement de première intention. L'étude a révélé une survie sans progression plus élevée lors de du traitement combiné qu'en présence de l'erlotinib seul (97).

Une autre étude de phase III (total n= 228 patients), comparant l'association erlotinib-bévacizumab à l'erlotinib en monothérapie sur des patients atteints de CBNPC de stades avancés mutés EGFR, a confirmé ces résultats et a établi une toxicité gérable de cette association. Ainsi, la combinaison erlotinib-bévacizumab est devenue un nouveau traitement standard dans la prise en charge des patients atteints de CBNPC muté EGFR et reçoit en 2016 l'AMM pour les patients atteints de CBNPC non épidermoïdes (98).

D'autres molécules ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire sont indiquées dans le traitement du CBNPC tel que le ramucirumab (anti-VEGFR2, AMM). Ainsi, le cet anticorps combiné au docétaxel a montré une légère amélioration de la survie sans progression et de la survie globale par rapport au docétaxel seul (61,99).

Dernièrement, une étude a mis en évidence que le blocage du récepteur VEGFR2 avec un anticorps anti-VEGFR2 (ramucirumab) a des effets anti-angiogéniques, et permettrait une augmentation des effets anti-tumoraux d'ITK à l'EGFR, ALK ou ROS1 (100). Ainsi, une thérapie combinée de traitements ciblant le compartiment vasculaire en combinaison avec des ITK, pourrait compléter les stratégies de prise en charge.

Le compartiment vasculaire participe au phénomène de cancérogenèse également par le phénomène d'EndoMT. Des études pharmacologiques sont en cours afin d'identifier des molécules capables d'inhiber ce processus de différenciation cellulaire. Récemment, une équipe s'est intéressée au traitement de l'EndoMT induite au cours de l'athérosclérose. Cette équipe a la salidroside, un glycoside du tyrosol isolé de *Rhodiola rosea*, comme un agent inhibiteur de l'EndoMT au travers de la voie de signalisation KLF4/eNOS par une activation de la voie du monoxyde d'azote eNOS/NO et une diminution de l'expression de KLF4.

7.2. L'immunothérapie

Parmi l'éventail de traitements proposé dans le CBNPC, se distingue l'immunothérapie. Les thérapies ciblant les points de contrôle du système immunitaire telles que les anti-PD1 et anti-CTLA-4, ont été approuvées dans le traitement des tumeurs pulmonaires (61).

Les anticorps anti-PD1 comme le nivolumab, ont été utilisés pour traiter le CBNPC métastatique à partir de 2015, sur la base de l'essai clinique CheckMate 017 (total n=272 patients) (101). Par la suite, le pembrolizumab

(anti-PD-1) et l'atezolizumab (anti-PD-L1) ont également reçu l'approbation dans le traitement du CBNPC métastatique précédemment traités. Cette approbation s'est appuyée sur les études KEYNOTE-024 et OAK.

L'étude KEYNOTE 24 (total n=305 patients) a comparé une population de patients atteints de CBNPC traités par pembrolizumab à une autre traitée par chimiothérapie à base de sels de platine. Cette étude a montré une meilleure efficacité en termes de réponse et de survie globale pour les patients traités par pembrolizumab. Aujourd'hui le pembrolizumab a reçu l'AMM en monothérapie dans le traitement de 1ère ligne des patients atteints de CBNPC métastatique dont les tumeurs expriment PD-L1 au seuil $\geq 50\%$, sans mutation tumorale d'EGFR ou d'ALK. Il peut également être utilisé pour cette même indication en association quel que soit le niveau d'expression de PD-L1 avec des chimiothérapies à base de sels de platine (102).

L'étude OAK (total n=850 patients) a évalué l'efficacité de l'atezolizumab et a confirmé une survie significativement augmentée (avec une survie globale de 13,8 mois en présence de l'atezolizumab contre 9,6 mois avec le docétaxel) pour les patients porteurs de CBNPC et traités par atezolizumab par rapport à ceux pris en charge par docétaxel (103).

L'atezolizumab possède à l'heure actuelle une AMM dans le CBNPC localement avancé ou métastatique après une chimiothérapie antérieure des patients.

Cependant, l'immunothérapie n'est efficace que pour un petit pourcentage de patients, et la complexité du MET immunitaire, le faible niveau d'expression des cibles pharmacologiques à la surface des cellules, peuvent expliquer cette faible réponse. C'est pourquoi, d'autres points de contrôle immunitaire alternatifs à ceux déjà identifiés doivent être recherchés afin de faire profiter au plus grand nombre de patients de nouveaux traitements d'immunothérapie. A ce titre, plusieurs essais cliniques impliquant d'autres inhibiteurs de point de contrôle du système immunitaire sont en cours. Différents essais cliniques s'intéressent notamment au gène d'activation lymphocytaire-3 (LAG-3), à l'immunoglobuline des lymphocytes T, à la protéine 3 contenant de la mucine (TIM-3), ou encore à l'immunoglobuline du domaine V suppresseur de l'activation des cellules T (VISTA) (33).

7.2.1. Immunothérapie pour les CBNPC stade III non résecables

Le stade III du CBNPC nécessite une prise en charge complexe. Au cours de la dernière décennie, la radiochimiothérapie concomitante a été le traitement de base pour les formes non résecables afin de traiter les micrométastases locorégionales et à distance. Ainsi, l'étude clinique PACIFIC (total n=713 patients) étudiant le rôle du durvalumab (anti-PD-L1), a montré chez les patients atteints de ces formes complexes de CBNPC, une amélioration de la survie sans progression (16,8 mois contre 5,6 mois dans le bras placebo), et de la survie globale (104). Toutefois, en dépit de ces résultats encourageants, le pronostic des patients reste mauvais avec un taux de 15% de survie à 5 ans. (105) Cet anticorps possède aujourd'hui une AMM pour les patients atteints de CBNPC localement avancé et non opérable, n'ayant pas progressé à la fin de la chimioradiothérapie concomitante et dont les tumeurs expriment PD-L1 $>$ ou $= 1\%$.

7.2.2. L'immunothérapie en thérapie combinée

Le bénéfice clinique de l'immunothérapie s'avère être limité en monothérapie avec un taux de réponse globale d'environ 10 à 20%. C'est pourquoi, les stratégies de prise en charge du CBNPC tendent à combiner les thérapeutiques pour surmonter cette limite (33).

Pour les patients ne présentant pas de mutations motrices ni d'expression élevée de la protéine PD-L1, la chimiothérapie à base de sels de platine reste la norme. Les thérapies inhibitrices des points de contrôle immunitaire ont montré par diverses études des résultats prometteurs lorsqu'elles sont combinées avec la chimiothérapie. En effet, l'essai clinique de phase III KEYNOTE-189 (total n=616 patients) réalisé sur des patients atteints de CBNPC métastatique sans mutations motrices EGFR/ALK a montré une amélioration significative de la survie sans progression (médiane de 8,8 mois contre 4,9 mois) et du taux de survie (69,2% contre 49,4% à 12 mois) lors de la combinaison du pembrolizumab à des sels de platine-pemetrexed (106).

Une autre stratégie, pouvant être envisagée, est la combinaison des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire avec les ITK. Il a par exemple été rapporté sur des modèle murins que l'activation de la voie de l'EGFR augmenterait la sensibilité du blocage de PD1 dans le cancer pulmonaire. On peut donc imaginer que l'association d'ITK anti-EGFR et d'anticorps anti-PD1 pourrait être une stratégie prometteuse. L'étude CheckMate 012 de phase I sur des patients à des stades avancés de CBNPC (total n=21 patients), a étudié l'impact de l'association du nivolumab et de l'erlotinib en termes de toxicité et tolérance (107). Cette association a présenté des toxicités cutanées et digestives de grade 3 chez 19% des patients. Leur étude a conclu à une association tolérable de cette bi-thérapie, avec des réponses durables chez les patients traités au préalable par ITK à l'EGFR. Une autre étude de phase I (TATTON, total n=23 patients) réalisées sur des patients atteints de CBNPC prétraités ou naïfs de chimiothérapie a testé le bénéfice de l'association d'osimertinib et de durvalumab. Cette étude a ainsi confirmé que cette association présentait un intérêt clinique (43% de patients répondeurs) mais a également montré l'apparition de graves effets secondaires chez 67% des patients traités qui nécessitera des études approfondies (108).

Enfin, une ultime stratégie étudiée ces dernières années consiste en l'association de plusieurs immunothérapies. Ainsi, des combinaisons d'anti-PD1 avec un anti-CTLA-4 sont explorées dans le CBNPC en traitement de première ou de seconde intention. Cette stratégie a été évaluée au cours de l'étude CheckMate 012 multi-cohortes qui a testé l'innocuité et l'efficacité de la bi-thérapies nivolumab-ipilimumab. Il a, ainsi, été rapporté une augmentation de l'efficacité et l'innocuité de la combothérapie par rapport à la monothérapie, en première intention chez des patients atteints de CBNPC à des stades avancés. Par ailleurs, après deux ans de suivi, l'étude a mis en évidence un bénéfice clinique continu chez tous les patients traités par cette association, quel que soit leurs statuts mutationnels pour EGFR, tabagique ou encore histologique (109). L'HAS a rendu son avis en 2021 concernant cette association et a indiqué que cette association à des cycles de chimiothérapie à base de sels de platine, constitue une alternative en tant que traitement de première ligne des patients adultes atteints d'un CBNPC métastatique dont les tumeurs n'ont pas la mutation sensibilisante de l'EGFR, ni la translocation ALK.

8. Place des résistances des cellules tumorales aux nouvelles thérapeutiques

L'hétérogénéité du CBNPC soulève de nombreuses questions pronostiques. En effet, la récurrence suite à des résistances aux thérapeutiques, est l'une des causes les plus importantes de décès, et la réponse aux nouvelles thérapeutiques, décrites ci-dessus, n'est observée que chez 15 à 20% des patients (27).

8.1. Les résistances aux thérapies ciblées

Malgré les avancées dans la prise en charge du CBNPC, ce cancer reste associé à de multiples résistances aux thérapeutiques qui représentent l'une des causes les plus importantes de décès. Parmi les mécanismes à l'origine de ces résistances, les modifications de la transduction du signal, l'acquisition de nouvelles mutations, le contournement de l'inhibition du récepteur à l'EGF, l'acquisition du phénotype EMT peuvent être rapportés. Par ailleurs, l'émergence de nouveaux sous-clones tumoraux comportant des mutations secondaires résistantes aux traitements par une pression de sélection et une hétérogénéité cellulaire et moléculaire peut également expliquer ces résistances (30).

Plusieurs études ont démontré que la première et seconde génération d'ITK anti-EGFR avaient des avantages substantiels en termes de survie sans progression par rapport à la chimiothérapie conventionnelle en traitement de première intention. Cependant, ces ITK anti-EGFR ont été principalement étudiés dans des protocoles en seconde ligne ce qui justifie le peu d'effet observé sur la survie globale (100,111).

La progression du paysage mutationnel au cours de la tumorigenèse des cellules tumorales est à l'origine de résistances aux traitements sur le marché et représente aujourd'hui l'origine de la majorité des résistances aux thérapeutiques.

Ainsi, d'autres mutations comme des amplifications du gène *PIK3CA* ou pour le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (*HER-2*) font partis des voies de dérivation qui sont impliquées dans les mécanismes de résistance aux ITK de l'EGFR (61).

La survie globale chez les patients à stade avancé dans le CBNPC ne semble pas affectée par les traitements par ITK après chimiothérapie. Cette constatation repose sur un résumé de 13 essais cliniques de phase III comparant ITK anti-EGFR et traitements aux sels de platine (110,111). En effet, des résistances aux ITK anti-EGFR peuvent apparaître environ 10 à 14 mois après leur mise en place. Les mutations aux ITK anti-EGFR de première et seconde générations sont le plus souvent des mutations dans le domaine tyrosine kinase dont la plus fréquente est la mutation T790M (retrouvée chez 40 à 60% des patients traités), ou encore des amplifications *MET* (5 à 20% des patients traités), ou des mutations de la protéine RAS (39,61).

L'identification de la mutation T790M est apparue comme une nouvelle cible potentielle pour lutter contre ces résistances. C'est ainsi, qu'une troisième génération d'ITK anti-EGFR a vu le jour, avec en tête l'osimertinib. Cet ITK peut activer et cibler non seulement les mutations sensibles et résistantes (T790M) de l'EGFR.

Dans l'étude clinique FLAURA (total n= 556 patients), la médiane de survie dans progression de patients traités par osimertinib (18,9 mois), était plus élevée que les patients traités par gefitinib et erlotinib (10,2 mois) (112,113).

Une autre étude clinique (AURA3, total n=419 patients) a également montré que la survie sans progression associée au traitement par osimertinib était de 10,1 mois contre 4,4 mois lors du traitement des patients par chimiothérapies combinées pemetrexed-sels de platine (114).

Au travers de ces études nous pouvons voir que l'osimertinib suivi d'un ITK anti-EGFR de première/seconde génération ou suivi d'une chimiothérapie chez les patients atteints de CBNPC pourrait être un choix rationnel pour les patients positif à la mutation de l'EGFR.

En France selon les référentiels Auvergne Rhône-Alpes en Oncologie Thoracique de 2021, il est aujourd'hui recommandé de rechercher la mutation T790M en cas de progression sous ITK anti-EGFR de 1^{ère} ou 2^{ème} génération et de traiter sous osimertinib. En cas d'absence de cette mutation, il est recommandé de biopsier à nouveau et de rechercher d'autres mécanismes de résistances. Cependant, il a pu être mis en évidence ces dernières années des mutations à la troisième génération d'ITK anti-EGFR. Ainsi, la mutation EGFR C797S, et des mutations d'amplification de PI3CA, KRAS, BRAF et *MET* ont pu être mises en évidence dans les résistances à l'osimertinib (115,116). Pour illustrer, environ 5 à 20% des patients résistants aux ITK anti-EGFR développent des amplifications *MET*. Une étude a ainsi pu montrer que le développement d'inhibiteurs de *MET* tel que le crizotinib pouvait augmenter la sensibilité au gefitinib chez les patients atteints de CBNPC (117).

Ces dernières données suggèrent qu'une caractérisation moléculaire plus globale du paysage tumoral semble avoir un réel potentiel dans l'identification de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles pour lutter contre ces résistances. Cette caractérisation est facilitée par le développement de technologies de séquençage de nouvelles générations qui contribuent à une prise en charge thérapeutique de plus en plus personnalisée. Toutefois, la caractérisation moléculaire permet de mettre en place une thérapie ciblée chez une fraction de ces patients seulement, et même chez ces patients, la réponse au traitement n'est pas systématique. Il n'existe pas aujourd'hui de test permettant d'estimer réellement la réponse au traitement.

9. Les outils de biomarqueur

Les biomarqueurs tumoraux sériques existants dans le diagnostic du CBNPC sont aujourd'hui l'antigène carcinoembryonnaire (CEA), l'antigène du carcinome épidermoïde (SCCA, *Squamous cell carcinoma antigen*) et le fragment de cytokératine 19 (CYFRA21-1). Malgré ces marqueurs, le diagnostic du CBNPC aux stades précoces reste limité par la sensibilité et la spécificité de ces biomarqueurs (118). Ces limites incitent les chercheurs à travailler sur l'étude de nouveaux outils de biomarqueur afin d'améliorer le dépistage et le diagnostic du CBNPC.

9.1. Les miARN

Au niveau des cellules tumorales, et de leur micro-environnement, se produisent des interactions dynamiques par une communication directe de cellule à cellule ou *via* des vésicules extracellulaires (VEs). Parmi

les médiateurs impliqués dans la transmission de l'information, les ARN non codants (ARNnc) et les microARN (miARN) ont été identifiés comme des acteurs robustes.

Les miARN font partie de la classe des ARN non codants courts (moyenne de 22 nucléotides) initiés de manière endogène et qui possèdent un rôle crucial dans le développement tumoral et son évolution. Ces miARN peuvent réguler les gènes oncogènes et suppresseurs de tumeurs en se liant aux séquences spécifiques d'un ARN messenger cible (ARNm), entraînant sa dégradation ou le blocage de la traduction protéique à partir de cet ARNm. Les miARN régulent ainsi négativement l'expression de gènes cibles en réduisant la stabilité des ARNm cibles ou en inhibant post-transcriptionnellement le processus de traduction (119).

Dans le CBNPC, les miARN jouent un rôle essentiel de régulateur au niveau des voies métaboliques des cellules cancéreuses notamment impliquées dans la prolifération, l'angiogenèse, et l'invasion des cellules tumorales, ainsi que dans le développement métastatique (26,120,121). En outre, de nombreuses études ont révélé que la régulation négative ou positive des miARN est associée à l'initiation et au développement du cancer, et que ces miARN peuvent agir comme des oncogènes ou gènes suppresseur de tumeur (122). Ainsi, Wang *et coll.*, ont montré que le miR-23b inhibe la prolifération, l'invasion et la migration cellulaires au travers d'une régulation négative du facteur de transcription RUNX2 de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (123). Une autre étude a mis en évidence l'implication du miR3180-3p extrait à partir d'exosomes de cellules tumorales de CBNPC, dans la prolifération et la dissémination des métastases, la résistance à la gemcitabine, *via* l'interaction de ce miARN avec le promoteur de SOCS3 (124).

Par ailleurs, il a été montré que des miARN exosomales d'origine tumorale peuvent jouer un rôle biologique vital dans la tumorigenèse et le développement tumoral, même si les mécanismes sous-jacents restent encore flous à l'heure actuelle. L'équipe de Liu *et coll.*, a exploré l'impact du miR-433 exosomal au sein du CBNPC (122). En isolant les exosomes du plasma de patients atteints de CBNPC traités par chimiothérapie, ils ont ainsi montré que l'expression de miR-433 est plus faible dans le plasma de patients résistants à la chimiothérapie (cisplatine) par rapport à ceux qui y sont sensibles. De plus, son expression est associée négativement à une tumeur de grande taille, à des métastases à distance, à un stade TNM avancé, ainsi qu'à un mauvais pronostic. Cette étude confirme que les miARN peuvent être considérés comme des biomarqueurs pronostics, ainsi que comme de possible cible thérapeutique pour les patients atteints de CBNPC et des études complémentaires mériteront d'être envisagées.

L'expression des miARN s'avère être perturbée au sein d'épithelia bronchiques de fumeurs et de patients atteints de cancers pulmonaires par rapport à des patients témoins normaux non-fumeurs (20). Cette observation met en lumière une dérégulation moléculaire affectant l'ensemble des voies respiratoires. L'équipe de Pavel *et coll.*, a notamment mis en évidence un panel de 4 miARN (miR-146a-5p, miR-324-5p, miR-223-3p et miR-223-5p) spécifiquement sous-régulés au niveau d'épithelia bronchiques atteints de CBNPC, soutenant l'existence d'un champ lésionnel qui peut être caractérisé par une analyse moléculaire (125). Une combinaison récente de différents gènes a ainsi été proposée comme modèles de signature dans la distinction d'épithelia malins néoplasiques transformés à partir d'épithelia bronchiques normaux (126).

Les miARN peuvent être véhiculés au travers d'VEs. En situation d'hypoxie, une augmentation du nombre d'VEs produites à partir des cellules du MET est observée (127). Sur le plan moléculaire, le facteur de transcription HIF est activé. Cette activation est également modulée par différents miARN sécrétés par les cellules tumorales

et du MET. Par exemple, l'augmentation d'expression de HIF-1 α est induite par une diminution de l'expression de miR-214 concomitante à une augmentation de l'expression de miR-31-5p. Cette régulation du gène HIF-1 α permet une augmentation de l'expression du VEGF favorisant l'angiogenèse et la croissance tumorales.

Autre exemple, le miR-21 est aujourd'hui connu comme un miARN oncogène dans divers cancers dont le CBNPC. Dans le CBNPC, une augmentation de l'expression de ce miARN est associée à un mauvais pronostic. Lorsque son expression est modifiée, une perturbation se produit particulièrement au niveau de voies oncogènes critiques telles que la prolifération, l'angiogenèse ou la dissémination métastatique. Ces différents exemples sont le reflet de l'implication des miARN au cours de la tumorigenèse, avec des réponses variables suivant des expressions qui leurs sont propres.

Les biomolécules régulent à la fois les interactions entre les cellules tumorales et les composants du MET. Elles sont échangées directement ou également à l'aide de VEs dont les exosomes. Ces VEs peuvent porter des miARN qui jouent un rôle essentiel dans la modulation des niveaux d'expression de gènes importants impliqués dans les processus cellulaires néoplasiques tels que la prolifération, l'apoptose, l'autophagie, la sénescence cellulaire. De plus en plus de preuves montrent notamment que les exosomes sont impliqués non seulement dans la physiologie des cancers mais aussi dans le diagnostic (128). Ces derniers sont composés d'une enveloppe liposomale permettant une protection des ARN contre la dégradation. Une étude sur 52 patients atteints de CBNPC avec ou non une radiorésistance, a rapporté qu'outre leur utilisation pronostic, deux miARN (miR-1246 et miR-96) contenus dans des exosomes plasmatiques pouvaient être utilisés pour distinguer les patients CBNPC radiorésistants des patients radiosensibles (129). Ainsi l'étude de biomarqueurs présents au sein de VEs tel que le miR-96 peuvent servir de marqueurs diagnostics et pronostics non invasifs dans le CBNPC.

9.2. Les cellules tumorales circulantes (CTC)

La libération de cellules tumorales dans la circulation sanguine peut provenir de la tumeur primaire mais également des sites métastatiques. Ces cellules libérées sont nommées : cellules tumorales circulantes (CTC). L'avantage des CTC est le caractère non invasif de récupération de ces cellules par biopsie liquide, cependant elles présentent un inconvénient majeur qui est la rareté au sein des prélèvements (1 cellule pour 100 millions de cellules sanguines normales) (130).

Des études se sont intéressées au potentiel des CTC au cours du diagnostic et du pronostic des CBNPC (131). Ainsi, il a été mis en évidence une corrélation entre une mauvaise réponse ainsi que survie sous immunothérapie anti-point de contrôle, et le nombre de CTC (132). Par ailleurs, une proportion élevée de CTC positifs pour PD-L1 est associée à une mauvaise survie (l'ensemble des patients en progression présentaient des CTC positifs pour PD-L1 détectables). Ces données apportent la preuve que le nombre de CTC pourrait être un biomarqueur prometteur, cependant avant que les CTC ne puissent être transposées en clinique, une mise en œuvre de la recherche plus approfondie devra être réalisée.

9.3. L'ADN tumoral circulant

En conditions physiologique, de petites concentrations d'ADN acellulaire (cfADN) peuvent être détectées au sein du plasma (environ 5 à 10 ng/mL). Lors d'une pathologie telle que le cancer, ces concentrations augmentent de manière significative. Ces concentrations sont notamment beaucoup plus élevées chez des patients atteints de tumeurs à des stades avancés en rapport aux tumeurs de stades inférieurs en raison de la quantité libérée de fragments d'ADN dans la circulation sanguine (130). Cet ADN libéré par la tumeur est nommé : ADN tumoral circulant (ctADN) (133). La libération peut s'effectuer au travers de la nécrose cellulaire, l'apoptose ou encore par la sécrétion au travers de vésicules extracellulaires ou de CTC. Les niveaux de ctADN sont influencés par la charge tumorale ou encore la localisation de la tumeur, sa vascularisation et son renouvellement cellulaire (134).

Lors du CBNPC au stade avancé, il existe une forte concordance entre le ctADN retrouvé en circulation et l'ADN des cellules tumorales sur sites. Cette observation signifie que le ctADN contient les mutations spécifiques identiques à celles retrouvées au sein de la tumeur primitive et des métastases (135).

Il est par ailleurs important de noter que l'ctADN a une courte demi-vie (entre 15 minutes à 2,5 heures) induite par la clairance hépatique, splénique et rénal de cet ADN. Ces données de clairance, permettent une surveillance très rapide de l'état mutationnel des cellules tumorales, ainsi que de ses changements dynamiques au cours du temps (130). Le ctADN semble être un biomarqueur attrayant dans l'évaluation dynamique des mutations au cours des traitements, afin d'orienter au mieux la prise en charge thérapeutique sur la base de l'évaluation des cibles génétiques circulantes lors de la progression tumorale. En effet, il a pu être montré que les patients atteints de CBNPC qui présentaient des altérations somatiques supérieures à 5% de fréquence des allèles variants ont par la suite obtenus de moins bons résultats en termes de survie (136).

9.4. La charge mutationnelle tumorale (*Tumor Mutation Burden*)

La *Tumor Mutation Burden* (TMB) peut être définie comme le nombre total de mutations somatiques non synonymes par mégabase du génome étudié. Ainsi, lors de mutations, une formation de néo-antigènes peut se produire, et ces derniers seront reconnus ensuite par le système immunitaire comme des antigènes du « non-soi », activant par conséquent la réponse immunitaire anti-tumorale (137). Cette remarque suggère donc que les patients atteints de CBNPC et présentant un TMB élevé pourraient bénéficier d'une immunothérapie. Cependant, une charge mutationnelle élevée ne signifie pas pour autant qu'un nombre élevé de néo-antigènes seront exprimés à la surface des cellules cancéreuses (138).

Par ailleurs, le nombre de mutations somatiques varie selon les différents types de cancers. Des études ont montré que le CBNPC a l'une des fréquences de mutations les plus élevée (0,1 à 100 mutations/mégabases) particulièrement chez les patients fumeurs (139).

Des études rétrospectives initiées par l'équipe de Herbst R.S *et coll.*, ont ainsi évalué l'association entre le TMB tissulaire et le bénéfice clinique du pembrolizumab (anti-PD1) administré en monothérapie chez des patients atteints de CBNPC PD-L1 positifs précédemment traités ou naïfs. Dans ces deux essais, des améliorations

de survie globale et de survie sans progression ont été observées chez les patients traités et présentant un TMB tissulaire élevé (140).

D'autres chercheurs se sont intéressés au TMB sanguin. L'équipe de Wang *et coll.*, a alors observé que le TMB sanguin pouvait être corrélé au TMB tissulaire à l'aide de la technique du WES (141). D'autres résultats en concordance avec ce qui a été observé ont été montrés au travers d'études de cohortes plus importantes. En l'occurrence, les essais cliniques randomisés et rétrospectifs POPLAR phase II (total n=287 patients) et OAK phase III (total n=1225 patients) ont comparé l'anticorps atezolizumab (anti-PD-L1) à la chimiothérapie standard docétaxel sur des patients atteints de CBNPC. Les résultats obtenus à partir du plasma des patients pré-traités, ont mis en évidence que les TMB tissulaires et sanguins (sur plus de 1000 patients) présentent une corrélation positive. Autre remarque intéressante, les patients qui présentaient un TMB sanguin élevé étaient plus susceptibles de répondre au traitement par immunothérapie. Ainsi, ces données suggèrent que le TMB sanguin pourrait être un biomarqueur intéressant dans le pronostic des patients atteints de CBNPC sous immunothérapie (142).

Certaines études ont pu révéler que des mutations ponctuelles uniques pouvaient être utilisées pour surveiller les patients sous immunothérapie atteints de CBNPC. Ainsi, l'équipe de Guibert *et coll.*, a montré que la présence d'un homologue de PTEN ou d'une mutation de STK11 étaient corrélés à une progression précoce des patients sous immunothérapie anti-PD1 (134). Cependant, une autre étude a rapporté que les patients sous immunothérapie présentant les co-mutations STK11 et KRAS avaient une survie globale plus élevée que les patients ne présentant que la mutation STK11 (143).

Ces données montrent que le TMB est un biomarqueur prometteur mais encore imparfait dans la surveillance des patients notamment sous immunothérapie. Par ailleurs, des contraintes de coût du NGS (*Next Generation Sequencing*) ainsi que la variabilité des résultats de séquençage inter-laboratoire, la taille du panel ou encore les seuils de TMB sont à prendre en considération dans l'analyse des résultats. Par la suite, une meilleure compréhension du TMB est nécessaire avant l'intégration dans la pratique clinique.

10. La place du micro-environnement dans les résistances aux thérapeutiques

Même si les résistances induites par les mutations des différents gènes précédemment décrits sont prédominantes pour expliquer les résistances aux thérapies, la résistance médiée par le micro-environnement tumoral est encore sous-estimée. Malgré les progrès en termes de thérapeutiques, la plupart des patients atteints de CBNPC présenteront au cours de leur prise en charge des phénomènes de résistances.

Ainsi, une grande partie des patients ne répondent pas ou peu à l'immunothérapie, ou développent une résistance après une réponse initiale avec une progression ultérieure. L'évasion du système immunitaire peut se manifester par différentes voies comme l'émergence de nouveaux variants antigéniques, des défauts de présentation de l'antigène au système immunitaire par la perte d'HLA (*Human Leucocyte Antigen*), une régulation négative de l'expression du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) ou encore l'activation de voies inhibitrices alternatives de d'autres points de contrôle immunitaire par l'intermédiaire des récepteurs inhibiteurs

LAG-3 ou VISTA. Une étude récente a identifié les altérations de LKB1 comme un moteur génomique fréquent dans la résistance primaire aux anti-PD1 dans les adénocarcinomes pulmonaires mutant KRAS (144). Une meilleure compréhension des complexités de la réponse immunitaire et de son évasion permettra par la suite de mettre en place des schémas d'immunothérapies efficaces et durables.

Parmi les résistances aux traitements anticancéreux liées au MET, nous retrouvons la résistance médiée par les CAFs. Un exemple avec la modulation de l'efficacité du cisplatine dans le CBNPC a pu être mis en évidence *in vivo* dans un modèle murin en 2017. Dans cette étude, le cisplatine induit une augmentation de l'expression par les CAFs de GAS6 qui est le ligand du récepteur tyrosine kinase AXL, exprimé par les cellules tumorales, favorisant la migration des cellules cancéreuses (145). Par ailleurs, l'étude de Choe *et coll.*, a montré l'implication des CAFs issus de la transition épithélio-mésenchymateuse dans la résistance au CBNPC muté EGFR (146).

Les CAFs peuvent avoir un rôle dans la modulation des réponses immunitaires au sein du MET et donc dans les possibles résistances aux traitements. Un modèle de co-culture associant des CAFs de CBNPC humains et des lymphocytes T a montré une diminution de la réponse immunitaire antitumorale des lymphocytes T induit par l'expression de PD-L1 à la surface des CAFs (147).

L'EndoMT impliquée dans la production de CAFs participe directement à la résistance aux anticancéreux comme il a été montré dans l'étude de Kim *et coll.*, Dans cette étude, un modèle *in vitro* de sphéroïdes pluricellulaires associant des cellules endothéliales (HUVEC, *Human umbilical vein endothelial cells*) en transition EndoMT et des cellules tumorales a été utilisé (148). Il a été montré une inhibition de la réponse des cellules tumorales au gefitinib (ITK anti-EGFR) et au cisplatine. Cette résistance est levée en cas d'inhibition de la transition EndoMT. Par ailleurs, il a été rapporté dans une étude utilisant des cellules tumorales dérivées la lignée tumorale bronchique A549, résistantes au cisplatine, que la voie PI3K/Akt/NF- κ B contrôle la résistance au cisplatine (149). Cette voie de signalisation décrite au cours de l'EndoMT, laisse à penser que cette différenciation cellulaire pourrait jouer un rôle central dans les processus de résistances aux traitements anticancéreux. L'EndoMT, bien qu'encore très peu explorée dans le CBNPC, est au carrefour de diverses résistances.

11. Médecine de précision

Ainsi, c'est dans ce contexte que les approches de médecine de précision, utilisant des tests de sensibilité aux médicaments *ex-vivo* ont récemment fait l'objet d'études en vue d'établir des protocoles personnalisés de prise en charge des patients atteints de cancers (150). À ce jour, les principales études de testing *ex-vivo* à partir de biopsies se sont concentrées sur les cancers hématologiques tels que la leucémie myéloïde aiguë (LMA), ainsi que dans le cancer du sein (150,151). Une approche de médecine de précision utilisant l'analyse de la sensibilité aux médicaments *ex vivo* a le potentiel d'améliorer considérablement les résultats pour les patients, en particulier dans une population où des traitements multiples et continus ne sont pas une option. Ainsi, une étude de 2019 s'est intéressée au développement d'une approche de médecine personnalisée dans le cancer de l'ovaire, en travaillant à partir de lignées tumorales. Leur choix concernant les molécules thérapeutiques, s'est focalisé sur des thérapies à la fois utilisées dans le cancer de l'ovaire et certaines non indiquées en routine (152). Par la suite, il est intéressant d'imaginer que les études viseront à utiliser ces plateformes d'analyse de chimiosensibilité à des

biopsies fraîches pour établir un flux d'informations cliniques permettant une prise de décision rapide quant aux choix thérapeutiques à mettre en place.

Ces approches de médecine personnalisée présentent un intérêt dans l'amélioration de la prise en charge des patients mais également dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Actuellement, les approches de médecine personnalisée se développent, et se concentrent sur l'évolution génomique mutationnelle pour l'évaluation des réponses thérapeutiques, cependant l'implication du MET reste encore largement sous exploré.

Sur la base de ces données, notre projet pose l'hypothèse que l'évaluation *in vitro* de la chimiosensibilité des cellules tumorales pourrait permettre d'estimer la réponse au traitement, notamment à l'aide d'un modèle d'étude prenant en compte le microenvironnement tumoral. Pour répondre à cet objectif, nous avons évalué, sur différents modèles de lignées cellulaires tumorales de CBNPC (A549 et H1755), le profil de chimiosensibilité *in vitro* à diverses molécules antitumorales. Puis, à l'aide de cellule endothéliale en culture (HUVEC), nous avons déterminé la capacité du sécrétome des cellules tumorales à induire l'EndoMT en évaluant, notamment, les phénotypes endothéliaux et mésenchymateux des cellules en culture.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Culture des lignées tumorales

Deux lignées tumorales ont été étudiées dont les caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques des lignées tumorales étudiées

Lignée	Espèce	Origine	Stade métastatique	Sexe	Clinique
H1755	Humain	Métastase hépatique	4	F	Fumeuse
A549	Humain	Poumon	-	M	Non communiqué

L'ensemble des lignées a été cultivé en milieu RPMI (Sigma-Aldrich, Royaume-Uni) complémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et 1% d'antibiotiques pénicilline-streptomycine. Les cellules sont cultivées à 37°C à 5% CO₂ en atmosphère humide.

1.2. Culture des cellules endothéliales

Des cellules humaines endothéliales issues de veine de cordon ombilical (HUVEC) ont été choisies pour l'étude du compartiment vasculaire du microenvironnement tumoral et plus particulièrement pour le modèle *in vitro* de la transition EndoMT. Les HUVEC sélectionnées sont composées d'un pool de donneurs (Lonza, Belgique). Les cellules sont cultivées en milieu complet *Endothelial Cell Growth Medium-2* (EGM2) (Lonza, Belgique) à 37°C à 5% CO₂ en atmosphère humide. Les cellules ont été utilisées entre leur 3ème et 8ème passages.

1.3. Traitement des cellules endothéliales HUVEC

Les temps d'étude choisis pour l'étude de la transition EndoMT sont 48 heures, 72 heures et 7 jours. Une combinaison de TGF- β 2 (10 ng/mL) (Milteny, Allemagne) et de l'IL-1 β (10 ng/mL) (Miltenyi, Allemagne) a été utilisée comme contrôle positif de transition EndoMT.

Des milieux conditionnés (MC), ont été produits à partir des lignées tumorales A549 et H1755. Ces MC ont été récupérés après 72 heures de contact avec les cellules tumorales et un comptage cellulaire a été réalisé lors de leur récupération afin de s'assurer de la reproductibilité des expérimentations. La différence de morphologie entre les deux lignées nous a conduit à déterminer un intervalle de confluence compris entre 9×10^4

et 13×10^4 cellules/cm² pour la lignée A549 et entre 50×10^3 et 80×10^3 cellules/cm² pour la lignée H1755. Les MC sont ensuite conservés à 4°C.

Ces MC ont constitué des conditions de traitement soit pur (MC 100) ou repris avec 50% de milieu basal des HUVEC (MC 50).

Pour l'ensemble des manipulations, les HUVEC ont étéensemencées et cultivées dans leur milieu standard pendant 24 heures à l'issue desquelles les cellules étaient traitées (J0). Les traitements étaient renouvelés à 24 heures (J1) pour l'ensemble des temps étudiés, pour le temps à 7 jours, les cellules sont restimulées à 72 heures (J3) (**Figure 8**).

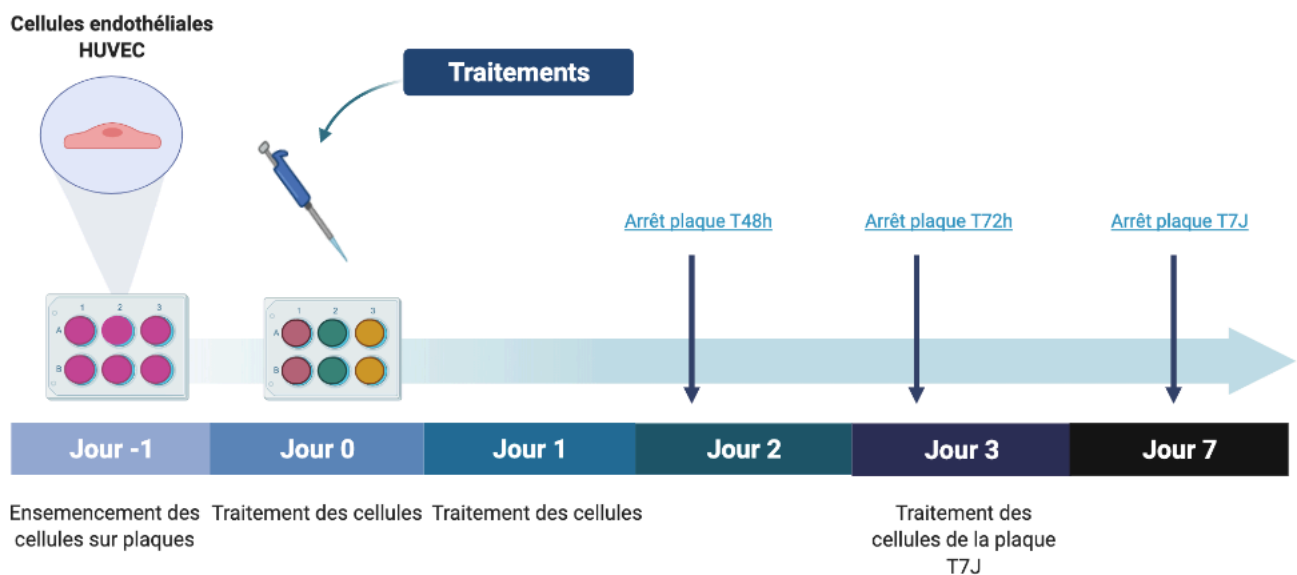


Figure 8 : Schéma explicatif temporel des traitements des cellules endothéliales type HUVEC

2. Tests de chimiosensibilité

L'ensemble des molécules testées sont présentées dans les **Tableaux 2** et **3** ci-dessous.

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques des chimiothérapies conventionnelles étudiées pour les tests de chimiosensibilité

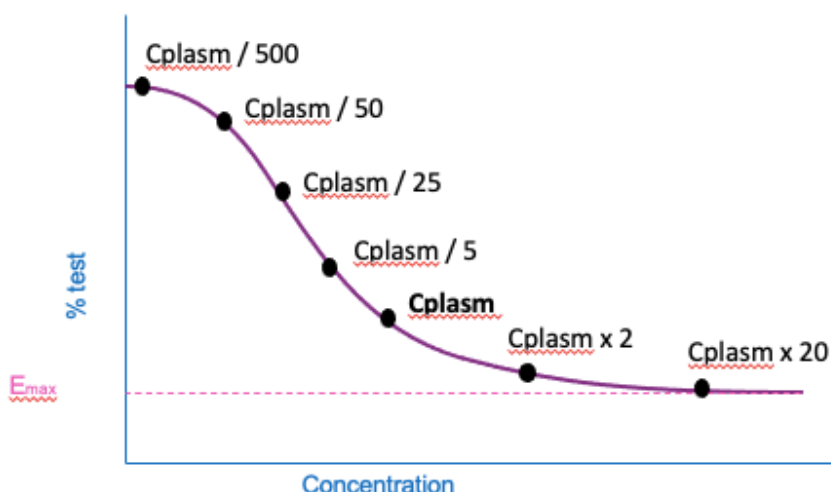
Chimiothérapies conventionnelles	Cible	Indication CBNPC	Référence fournisseur (TargetMol, USA)
Docétaxel	Fuseau mitotique	Stade avancé/ métastatique	TA-T1034
Etoposide	Topoisomérase II	Stade non avancé en association	TA-T0132
Gemcitabine	Synthèse ADN	Stade avancé/ métastatique	TA-T0251
Paclitaxel	Fuseau mitotique	Stade avancé en association	TA-T0968
Pemetrexed	TS, DHFR	Stade avancé/ métastatique en association	TA-T0189L
Vinorelbine	Fuseau mitotique	Stade non avancé en association	TA-T0190

Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques des différents ITK étudiés pour les tests de chimiosensibilité

ITK	Cible (Génération)	Indication CBNPC	Référence fournisseur (TargetMol, USA)
Afatinib	EGFR (2 ^{ème} G)	Stade avancé / métastatique muté EGFR	TA-T2303
Alectinib	ALK (2 ^{ème} G)	Stade avancé/ métastatique muté ALK	TA-T1936
Brigatinib	ALK (2 ^{ème} G)/ ROS1	Stade avancé/ métastatique muté ALK	TA-T3621
Capmatinib	MET	Stade avancé muté/ métastatique muté c-MET	TA-T1963
Certitinib	ALK/ 2 ^{ème} G	Stade avancé/métastatique muté ALK	TA-T1791
Crizotinib	ALK (1 ^{ère} G)/ ROS1/MET	Stade avancé/métastatique muté ALK, ou ROS1	TA-T1661
Dabrafenib	MAPK (Raf)	Stade avancé/métastatique muté BRAF 600V en association avec le Tramétinib	TA-T1903
Dacomitinib	EGFR (2 ^{ème} G)	Stade avancé muté/ métastatique EGFR	TA-T2483
Erlotinib	EGFR (1 ^{ère} G)	Stade avancé muté/ métastatique EGFR	TA-T0373
Entrectinib	ROS1	Stade avancé/ métastatique muté ROS1 (en essai clinique)	TA-T3678
Gefitinib	EGFR (1 ^{ère} G)	Stade avancé muté/ métastatique EGFR	TA-T1181
Larotrectinib	NTRK	Stade avancé/métastatique muté NTRK	TA-T5995
Lorlatinib	ALK (3 ^{ème} G)/ ROS1	Stade avancé/métastatique muté ALK	TA-T3061
Osimertinib	EGFR (3 ^{ème} G)	Stade avancé muté/ métastatique EGFR	TA-T2490
Pozotinib	EGFR	Stade avancé (ATU)	TA-T2630
Tramétinib	MEK	Stade avancé/métastatique mutation BRAF 600V en association avec le Dabrafenib	TA-T2125

Les molécules ont été solubilisées dans un volume de 155 μ L de DMSO dans des tubes matrix (Thermo Fischer Scientific, USA). La concentration initiale des molécules a été déterminée de façon à obtenir une gamme de concentration spécifique à chacune d'entre-elles, en tenant compte du facteur de dilution induit par les étapes qui seront décrites dans le protocole suivant. Les différentes concentrations utilisées ont été déterminées à partir de la concentration plasmatique (Cplasm) des ITK et de la concentration inhibitrice 50% (CI50) des chimiothérapies conventionnelles afin d'établir une gamme de 7 points de concentration différentes (**Figure 9**). L'ensemble des étapes du protocole, décrites ci-après et réalisées par le robot de pipetage CyBi®-Felix (CyBio®), ont été programmées à l'aide du logiciel CyBio-Composer®.

9-A



9-B

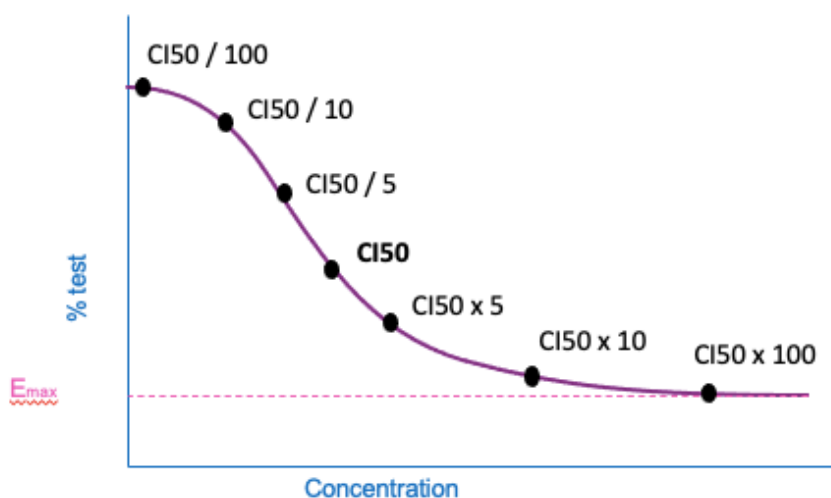


Figure 9 : Représentation graphique du choix des différentes concentrations pour les drogues utilisées au cours des tests de chimosensibilité. Concentration en abscisses et % réponse en ordonnées. **A** : Représentation graphique du choix des concentrations pour les ITK à partir de la concentration plasmatique (Cplam). **B** : Représentation graphique du choix des concentrations pour les chimiothérapies conventionnelles à partir de la concentration inhibitrice 50% (CI50). Au total 7 points de concentration ont été choisis pour chaque molécule.

2.1. Préparation des plaques « mère » et « filles chimio »

Un volume de 40 µL de chacune des molécules a été prélevé à l'aide du robot CyBi®-Felix à partir des tubes matrix, et distribué dans une plaque 384 puits « mère » DeepWell Small Volume™ à fond conique (Greiner Bio-One, Autriche). Des dilutions successives ont ensuite été réalisées par le robot CyBi®-Felix à partir de ce volume initial, afin d'obtenir une gamme de concentrations pour chacune des molécules testées. Des plaques 384 puits « filles chimio » à fond opaque (Greiner Bio-One, Autriche) ont ensuite été préparées à partir de la plaque « mère » : un volume de 25 nL a été prélevé à partir de chacun des puits de la plaque « mère » à l'aide du robot CyBi®-Felix. Les plaques « filles chimio » ont été conservées à -80 °C et décongelées au fur et à mesure des expériences de chimiosensibilité.

2.2. Transfert des plaques « filles chimio » vers les plaques « filles cellules »

Des plaques 384 puits « filles cellules » à fond transparent (Greiner Bio-One, Autriche) ont étéensemencées 12 heures avant le transfert par distribution des cellules à l'aide d'un distributeur Microplate dispenser (Thermo Fischer Scientific, USA) à la densité de $1,5 \times 10^3$ cellules/cm². Le jour du transfert, un volume de 20 µL de milieu de culture a été ajouté dans chaque puits des plaques « filles chimio », agitées à 1250 rpm durant 15 minutes puis centrifugées à 100 rcf pendant 2 minutes. Un volume de 10 µL a été prélevé dans chaque puits des plaques « filles chimio » et transféré dans les plaques « filles cellule » correspondantes par le robot CyBi®-Felix. Les plaques « filles cellules » ont été incubées durant 96 heures à 37°C.

2.3. Révélation

Un volume de 18 µL de révélateur CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay (Promega, USA) a été distribué dans chaque puits des plaques « filles cellules » à l'aide du Microplate dispenser. Les plaques ont été agitées à 1250 rpm durant 2 minutes puis incubées à température ambiante. La lecture des plaques a été réalisée à l'aide du lecteur Multimode Plate Reader EnVision® (PerkinElmer, USA) et du logiciel EnVision Manager®.

2.4. Analyse

A partir des données brutes, une modélisation des courbes de viabilité a ensuite été réalisée. Les trois paramètres expérimentaux étudiés ont été obtenus expérimentalement : la ligne de base (le pourcentage de viabilité maximale), la CI50 qui correspond à la concentration efficace pour inhibée 50% de la viabilité maximale, et Vmin (pourcentage de viabilité à la concentration la plus forte représentant l'inhibition de prolifération cellulaire maximale). Pour les calculer, une régression des courbes a été faite. Un ajustement du modèle par le coefficient de régression R² a été choisi, avec une censure des expériences lorsque sa valeur est

inférieure à 0,6. De plus, le choix d'une censure des points de concentration dont la ligne de base dépasse 120% a été retenue afin de pouvoir procéder à l'étape de régression. Ce paramètre a été déterminé à partir de la marge d'erreur de notre modèle estimée à 20%. Le pourcentage de viabilité a été normalisé à partir d'un point contrôle obtenu en condition sans traitement (contrôle positif) et d'un point contrôle en condition de milieu seul (contrôle négatif).

Les molécules dont la V_{min} ne dépassent pas 50% de la valeur de la ligne de base, ainsi que celles dont le premier point est égal ou inférieur à la CI50 sont exclues de notre étude. En effet, dans le premier cas la CI50 ne peut être calculée, et dans le second nous ne pouvons pas estimer la ligne de base.

3. Test de cytotoxicité (test de survie)

Le test de cytotoxicité permet d'évaluer la viabilité des cellules soumises aux différents traitements. Cette viabilité est évaluée par un test au MTT (sel de tétrazolium), après 48, 72 heures et 7 jours d'exposition avec les différents traitements. Ce test colorimétrique permet de quantifier la viabilité cellulaire en se basant sur l'activité mitochondriale des cellules. Le MTT de couleur jaune, est catabolisé en formazan de couleur violette par les cofacteurs NADH/NADPH, réaction caractéristique des cellules vivantes.

Ce test est réalisé sur plaque 96 puits, avec un ensemencement de cellules HUVECs à 15×10^3 cellules/cm² par puits pour les temps de traitements 48, 72 heures, et 3×10^3 cellules/cm² par puits pour le temps à 7 jours de traitement. Pour ce test, une condition contrôle RPMI a été ajoutée. Chacune des conditions est réalisée en triplicata technique. Aux temps souhaités, du milieu est déposé dans les puits et 10 μ L de réactif MTT (Invitrogen, Thermofisher, USA) à la concentration 0,5 mg/mL sont ajoutés dans chacun des puits. Les plaques sont ensuite incubées à l'abri de la lumière pendant 4 heures à 37°C. Enfin, 100 μ L de solvant de solubilisation (HCl 0,01 M + 10% SDS) sont déposés et la plaque est ré-incubée 4 heures à 37°C. La lecture est réalisée à 562 nm (Spectramax M2 - Molecular Devices). Suivant la densité optique (DO) obtenue pour chaque puits, le pourcentage de cellules vivantes est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de cellules vivantes} = \frac{(DO \text{ condition} - DO \text{ "Blanc"})}{(DO \text{ condition contrôle} - DO \text{ "Blanc"})}$$

4. Test de prolifération

La prolifération cellulaire est étudiée à l'aide du kit de prolifération cellulaire CyQUANT TM NF (Invitrogen, Thermofisher, USA). Il s'agit d'une méthode basée sur la détection de la fluorescence d'un colorant (le CyQuant GR) qui s'exprime lorsqu'il se lie aux acides nucléiques des cellules en prolifération. Les HUVECs sont ensemencés en plaques 96 puits à 15×10^3 cellules/cm² par puits pour les conditions « 48 et 72 heures », et 3×10^3 cellules/cm² par puits pour la condition « 7 jours de traitement ». Pour ce test, une condition contrôle RPMI a été ajoutée. Chaque condition est réalisée en triplicata. Aux temps souhaités, le milieu est retiré, puis la solution contenant le réactif préparé selon les indications du fournisseur est déposée dans chaque puits (50 μ L /puits). La

plaque est ensuite incubée à 37°C à l'abri de la lumière, puis lue aux longueurs d'onde suivantes : 480 nm (excitation) et 530 nm (émission) – (Spectramax M2 ; Molecular Devices).

5. Test *in vitro* angiogénique: tubulogénèse

Les cellules HUVECs sont ensemencées en plaques 6 puits à raison de $1,5 \times 10^4$ cellules/cm² par puits pour les conditions « 48 et 72h de traitement » et 8×10^3 cellules/cm² pour la condition « 7 jours de traitement ». Pour ce test, une condition contrôle RPMI a été ajoutée.

A l'issue de ces traitements, les cellules sont lavées, décollées, comptées. 10^4 cellules sont ré-implantées sur 10 µl d'ECMgel® (Sigma-Aldrich, Allemagne) déposés dans chaque puits de plaques Ibidi® µ-Slide Angiogenesis (Ibidi, Allemagne). Chaque condition est réalisée en double points techniques. Des images de chaque puits par microscopie photonique sont réalisées après 2, 4 et 6 heures à l'objectif x10. Seules les images obtenues après 6 heures sont utilisées pour l'analyse des données. Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ®.

6. Western Blotting

Le Western-Blotting en conditions dénaturantes, permet l'étude de l'expression protéique. Les protéines totales extraites sont issues de cellules HUVECs ensemencées en plaques 6 puits à 3×10^4 cellules/cm² par puits pour les conditions « 48, 72 heures » de traitement, et 10^4 cellules/cm² par puits pour la condition « 7 jours » de traitement. Les cellules ont été traitées, à ces temps, par TGF- β 2-IL-1 β , MC 50 A549, MC 50 H1755. Un contrôle positif d'expression de protéines mésenchymateuses a été intégré à l'aide de cellules musculaires lisses (CML).

6.1. Extraction et dosage protéique

À l'issue des traitements, les plaques sont lavées au PBS 1X puis sur glace, un tampon de lyse RIPA (Triton X-100, SDS 1%, Tris Base 0,5M, NaCl 5M, Sodium deoxycholate 10%, pastille antiprotéase (cOmplete Mini Protease Inhibitor Tablet, Roche, Allemagne)) est déposé dans chacun des puits. Le tampon de lyse est ajouté 15 minutes à température ambiante puis une centrifugation à 4°C 14000 rpm pendant 20 minutes est ensuite réalisée. La quantité de protéines obtenues est déterminée selon une méthode de dosage colorimétrique (méthode de Lowry) en plaque 96 puits à l'aide du kit de dosage Pierce BCATM Assay (ThermoFisher Scientific, USA). La lecture de plaque est réalisée sur le lecteur Spectramax M2 (Molecular Devices) à 562 nm.

6.2. Migration et transfert

Les protéines sont dénaturées par ajout de tampon de Laemmli 1X (BIO- RAD, USA) et chauffées 5 minutes à 95°C. 20 μ g de protéines sont déposés, par puits, sur gels de polyacrylamide 4-20% (Mini-PROTEAN TGX, BIO-RAD, USA) pour séparation par la technique de SDS-PAGE. La migration est effectuée dans un tampon de migration (BIO-RAD, USA) à 90 V pendant 15 minutes puis à 110V. Un transfert semi-liquide est réalisé sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) dans le système de transfert Trans- Blot® TurboTM (BIO-RAD, USA) à 25V pendant 30 minutes.

6.3. Révélation

Tableau 4 : Récapitulatif des différents anticorps utilisés pour l'analyse en Western Blotting

Protéine étudiée	Anticorps primaire	Protéine témoin charge	Anticorps de primaire témoin	Anticorps secondaire
vWF	Anti-vwf lapin (D8L8G) (Cell Signaling, USA) dilution 1:1000	GAPDH	Anti-GAPDH souris (G2123) (Life Technology, ThermoFischer Scientific, USA) dilution 1 :2000	Anti-lapin (G21234) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) dilution 1/2000
α-SMA	Anti α -SMA souris (A2547) (Sigma Aldrich, Israël) dilution 1:500			Anti-souris (32430) (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, USA) dilution 1/2000

Après transfert, les membranes sont rincées dans une solution de TBS + 1% Tween20 et une saturation par l'albumine de sérum bovin (BSA) 5% est réalisée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. L'anticorps primaire est incubé à 4°C durant toute une nuit sous agitation. Trois rinçages au TBS-Tween sont ensuite effectués. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est incubé durant 1 heure, suivi de trois nouveaux rinçages au TBS-Tween. La révélation se fait par chimioluminescence (ImmunoCruzTM, USA) sur l'appareil ImageQuant LAS 4000 (Cytiva, USA). Les résultats sont quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ®. L'ensemble des anticorps utilisés sont présentés dans le **Tableau 4**.

7. RT-qPCR

Afin de compléter les données sur la transition EndoMT, des échantillons pour RT-qPCR ont été préparés. Pour ce faire, des cellules HUVEC sont ensemencées en plaque 6 puits à 3x10⁴ cellules/cm² par puits pour les temps 48, 72 heures de traitement, et 10⁴ cellules/cm² par puits pour le temps à 7 jours de traitement. A l'issue des traitements, les cellules sont lavées à l'HBSS, récupérées après ajout de trypsine, puis reprises dans du milieu

EGM2 afin de neutraliser la trypsine. Enfin, des culots secs sont réalisés après centrifugation à 1600 rpm pendant 5 min puis stockés à -80°C.

Sur glace, l'extraction des ARN totaux est réalisée à partir des réactifs du kit RNeasy MicroKit (Qiagen, Allemagne). Une fois l'extraction terminée, une transcription inverse est réalisée sur les ARN à l'aide du kit Reverse Transcriptase SuperScriptII (Invitrogen, Thermofisher, USA) contenant l'enzyme de restriction SSII. La purification des ADNc a été réalisée à partir du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Allemagne). Enfin, la quantification de la PCR quantitative est faite à l'aide du composé fluorescent SYBR Green du kit Maxima SYBR Green qPCR master mix (Thermofisher Scientific, USA). Les amorces choisies correspondent aux gènes endothélial vWF (protéine vWF), et mésenchymateux ACTA2 (protéine α -SMA). La lecture a été faite sur l'appareil LightCycler480 (Roche, Allemagne). La validation des amorces a été réalisée par à Angers par la plateforme PACeM (SFR ICAT 4208). Les séquences des amorces n'ont pas été communiquées par la plateforme.

8. Cytométrie en flux

L'analyse a été réalisée sur des HUVECsensemencées en plaques 6 puits à raison de $2,6 \times 10^4$ cellules/cm² par puits pour les conditions « 48 et 72 heures de traitement », et 8×10^3 cellules/cm² par puits pour la condition « 7 jours de traitement ».

Après traitement, les cellules sont décollées et lavées une première fois dans 500 μ L de tampon de lavage (PBS 1X + BSA 0,1%). Après chaque lavage, les échantillons sont centrifugés à 1200 rpm pendant 5 minutes. Une fixation par PFA 2% est réalisée pendant 15 minutes, suivie de deux lavages dans le tampon PBS 1X – BSA 0,1%. Une perméabilisation des cellules à l'aide d'une solution contenant 0,1% de saponine est réalisée pendant 15 minutes avant l'incubation des anticorps anti-vWF couplé au FITC (ab8822, abcam) et anti- α -SMA conjugué à l'APC (IC1420A, R&D Systems, Minneapolis, USA), à raison de 10 μ L d'anticorps pour 10^6 cellules pendant 15 minutes. Après deux lavages au tampon de perméabilisation, la lecture est réalisée sur le BD FACS CantoTM II (Biosciences, USA). Un contrôle isotype a été réalisé précédemment lors d'une précédente étude pour détecter l'éventuel marquage non spécifique des anticorps

9. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont représentés par les moyennes \pm SEM (Erreur type de la moyenne). Le logiciel Prism 8 (GraphPad) a été utilisé pour l'ensemble des analyses statistiques et les représentations graphiques. L'analyse des résultats obtenus en Western-Blotting et cytométrie en flux a été réalisée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Une ANOVA one way a été utilisée pour l'analyse des résultats de survie et de prolifération cellulaire, ainsi que pour l'analyse des résultats de tubulogénèse. Pour chacun des tests, une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme significative (* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,002$; **** $p < 0,0001$).

Résultats

1. Étude des profils de réponses des lignées tumorales aux chimiothérapies

Les résultats obtenus au cours des tests de chimiosensibilité nous ont permis d'identifier la CI50 et la Vmin de 4 chimiothérapies conventionnelles sur 6, et de celles de 6 ITK sur 16. Une répartition des molécules suivant leur classe a été réalisée (**Tableaux 5, 6**). Par convention, plus la CI50 est faible et plus la molécule est puissante, de même plus la valeur de Vmin est faible et meilleure est l'efficacité.

Toutes les données obtenues en présence des chimiothérapies conventionnelles ont pu être interprétées à l'exception de la gemcitabine et du docétaxel. Des analyses indépendantes des 4 chimiothérapies, montrent peu de variation de la Vmin entre les deux lignées, par conséquent nous n'observons pas de différence d'efficacité entre les lignées A549 et H1755 pour les 4 molécules de chimiothérapies conventionnelles. Concernant la CI50 sur ces mêmes analyses, des différences de puissance sont présentes entre les deux lignées tumorales pour la vinorelbine et le pemetrexed. Les deux molécules présentent des CI50 inférieures d'un ratio de 1,5 pour la vinorelbine et de 2 pour le pemetrexed en présence de la lignée H1755 en comparaison à la lignée A549.

De plus des nuances existent lorsque l'on compare les paramètres des chimiothérapies entre elles. Ainsi, nous pouvons montrer que les poisons du fuseau sont la classe qui présente la meilleure efficacité car ils possèdent les plus faible Vmin, et que l'étoposide est la chimiothérapie la moins efficace. Par ailleurs, au sein des poisons du fuseau nous constatons une meilleure puissance de la vinorelbine en comparaison au paclitaxel sur les deux lignées avec des CI50 différents d'un ratio de 10.

Parmi les ITK anti-ALK/ROS1, trois molécules ont pu être retenues. Au sein de cette famille nous observons que le crizotinib présente les Vmin et les CI50 les plus faibles quelle que soit la lignée et présente donc la meilleure efficacité et puissance parmi les ITK anti-ALK/ROS1. Un focus sur chaque molécule de cette classe nous montre que le brigatinib a une meilleure puissance et efficacité sur les cellules H1755 en comparaison des cellules A549 (Vmin et CI50 les plus faibles pour H1755 par rapport à celles des A549). Le crizotinib présente également une meilleure efficacité sur la lignée H1755 avec un rapport de 6 entre les Vmin des deux lignées. Le loratinib quant à lui montre la même efficacité pour les deux lignées et une meilleure puissance en présence des cellules A549.

L'entrectinib (anti-ROS1) montre une efficacité trois fois supérieure et une puissance deux fois plus importante sur la lignée H1755 en comparaison à la lignée A549.

Nous n'avons pas constaté de différence d'efficacité et de puissance entre les deux types tumoraux en présence de l'osimertinib (seul anti-EGFR) et trametinib (seul anti-MEK).

Nous ne réalisons pas de comparaison entre les différentes classes d'ITK car ils ciblent des mutations précises rendant la comparaison non justifiée.

Tableau 5 : Résultats du test de chimiosensibilité des chimiothérapies conventionnelles sur les lignées tumorales A549 et H1755. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm SEM pour les paramètres étudiés : V_{min} (pourcentage de viabilité minimale à la concentration la plus forte (inhibition de prolifération cellulaire maximale)) représentant l'efficacité, et la CI_{50} (concentration inhibitrice de 50% de la viabilité maximale) représentant la puissance. N=4 expériences indépendantes.

Chimiothérapie conventionnelle	A549	H1755
poison du fuseau		
Paclitaxel		
V_{min} (%)	7,04 \pm 0,80	8,18 \pm 1,14
CI_{50} (μM)	0,010 \pm 0,0002	0,011 \pm 0,0039
Vinorelbine		
V_{min} (%)	9,80 \pm 1,61	11,39 \pm 1,87
CI_{50} (μM)	0,0057 \pm 0,0005	0,0038 \pm 0,0014
Chimiothérapie conventionnelle		
inhibiteur topoisomérase		
Etoposide		
V_{min} (%)	18,22 \pm 2,54	18,0 \pm 1,82
CI_{50} (μM)	0,46 \pm 0,10	0,48 \pm 0,20
Chimiothérapie conventionnelle		
anti-folate		
Pemetrexed		
V_{min} (%)	27,19 \pm 1,27	29,66 \pm 2,51
CI_{50} (μM)	0,037 \pm 0,0055	0,016 \pm 0,010

Tableau 6 : Résultats du test de chimiosensibilité des thérapies ciblées (ITK) sur les lignées tumorales A549 et H1755. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne \pm SEM pour les paramètres étudiés : V_{min} (pourcentage de viabilité minimale à la concentration la plus forte inhibition de prolifération cellulaire maximale) représentant l'efficacité, et la CI_{50} (concentration inhibitrice de 50% de la viabilité maximale) représentant la puissance. N=4 expériences indépendantes pour l'ensemble des molécules pour les deux lignées aux exceptions du brigatinib, crizotinib, entrectinib et lorlatinib pour la lignée H1755 avec N=3 expériences indépendantes, et pour le lorlatinib sur la lignée A549 avec N=3 expériences indépendantes.

Drogues (ITK anti-ALK/ROS1)	A549	H1755
Brigatinib		
V_{min} (%)	32,17 \pm 4,57	20,725 \pm 3,33
CI_{50} (μ M)	18,87 \pm 2,52	10,37 \pm 1,28
Crizotinib		
V_{min} (%)	6,00 \pm 1,63	1,97 \pm 0,68
CI_{50} (μ M)	4,05 \pm 0,73	3,77 \pm 0,51
Lorlatinib		
V_{min} (%)	35,52 \pm 6,98	34,83 \pm 7,65
CI_{50} (μ M)	16,08 \pm 4,22	30,05 \pm 15,19
Droque (ITK anti-MEK)		
Trametinib		
V_{min} (%)	6,32 \pm 0,51	6,42 \pm 0,69
CI_{50} (μ M)	0,049 \pm 0,004	0,050 \pm 0,010
Droque (ITK anti-EGFR)		
Osimertinib		
V_{min} (%)	2,35 \pm 0,13	2,25 \pm 0,17
CI_{50} (μ M)	4,54 \pm 0,30	3,03 \pm 0,21
Droque (ITK anti-ROS1)		
Entrectinib		
V_{min} (%)	16,07 \pm 6,02	5,23 \pm 1,96
CI_{50} (μ M)	14,26 \pm 2,52	7,45 \pm 3,67

2. Études fonctionnelles de la réponse des cellules endothéliales aux différentes conditions de traitement

Afin de vérifier la survie, l'état de prolifération mais aussi la capacité angiogénique, des cellules endothéliales soumises aux différentes conditions de traitements, un test de prolifération, de survie cellulaire, ainsi qu'un test angiogénique ont été effectués.

Une augmentation de la prolifération des cellules par rapport au contrôle est observée entre 48 et 72 heures pour l'ensemble des conditions, à l'exception de la condition RPMI. Par ailleurs, entre 48 et 72 heures, nous pouvons relever une augmentation significative de la prolifération pour les conditions TGF β 2-IL-1 β et MC50 H1755. Une diminution significative de la prolifération dans la condition RPMI par rapport au contrôle, est constatée pour l'ensemble des temps de traitements. Après 7 jours, une augmentation significative de la prolifération est observée pour la condition MC 50 A549 par rapport au contrôle à 7 jours tandis qu'une diminution significative est constatée pour la condition RPMI (**Figure 10**).

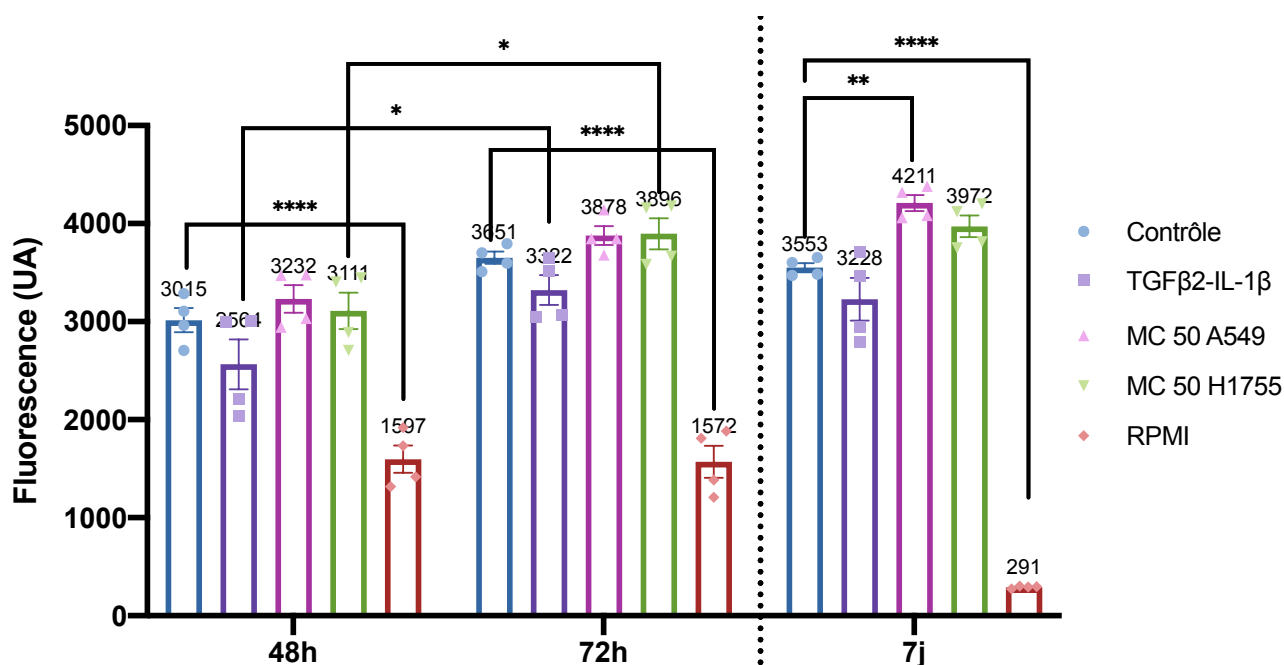


Figure 10 : Analyse des capacités proliférative des cellules HUVEC suivant les différents traitements.

Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse fonctionnelle après T48 et T72 heures de traitement. Traitement supplémentaire à T72 heures pour l'analyse du temps à T7jours. Représentation graphique de la prolifération exprimée en unité arbitraire de fluorescence. N=4 expériences indépendantes réalisée en triplicata. L'analyse statistique T7 jours a été réalisée indépendamment des points 48 et 72 heures en raison de la différence du nombre d'ensemencement de cellules par puits. * p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; **** p < 0,0001

Concernant la viabilité des cellules endothéliales, une diminution significative par rapport à la condition contrôle est constatée en présence des traitements MC 100 et RPMI ; cette diminution est observée pour chacune des deux lignées tumorales et chacun des temps de traitement. Après 72 heures, une diminution significative de la viabilité des cellules HUVECs est observée en présence du milieu MC 50 H1755. Cette même diminution, par rapport à la condition contrôle, est confirmée après 7 jours de traitement. Par ailleurs, une diminution de la viabilité des cellules HUVECs est observée après 7 jours de traitement par l'association TGF β 2-IL-1 β . S'agissant

des cellules A549, aucune modification de viabilité n'est observée en présence du milieu MC50 A549 quelque-soit les temps de traitements (**Figure 11**).

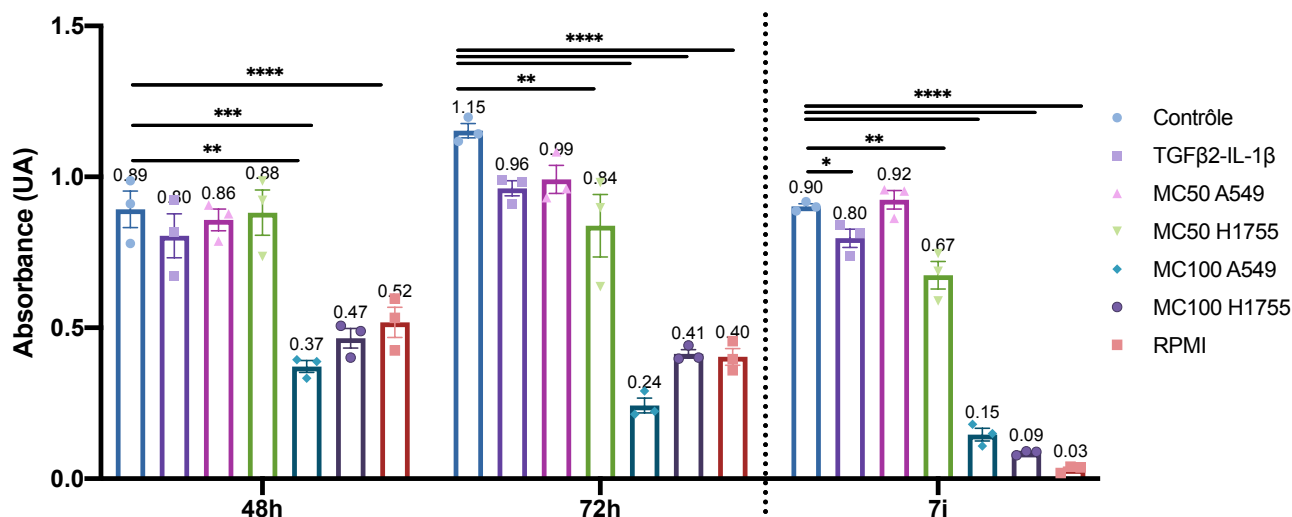


Figure 11 : Analyse de la viabilité des cellules HUVEC en contact les différents traitements. *Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse fonctionnelle après T48 et T72 heures de traitement. Traitement supplémentaire à T72 heures pour l'analyse des conditions à T7jours.* Représentation graphique de la viabilité exprimée en unité arbitraire d'absorbance. N=3 expériences indépendantes en triplicata. L'analyse statistique à T7jour a été réalisée indépendamment des points T48 et T72 heures en raison de la différence du nombre d'ensemencement de cellules par puits. * p < 0,05 ; ** p < 0,02 ; *** p < 0,002; **** p < 0,0001

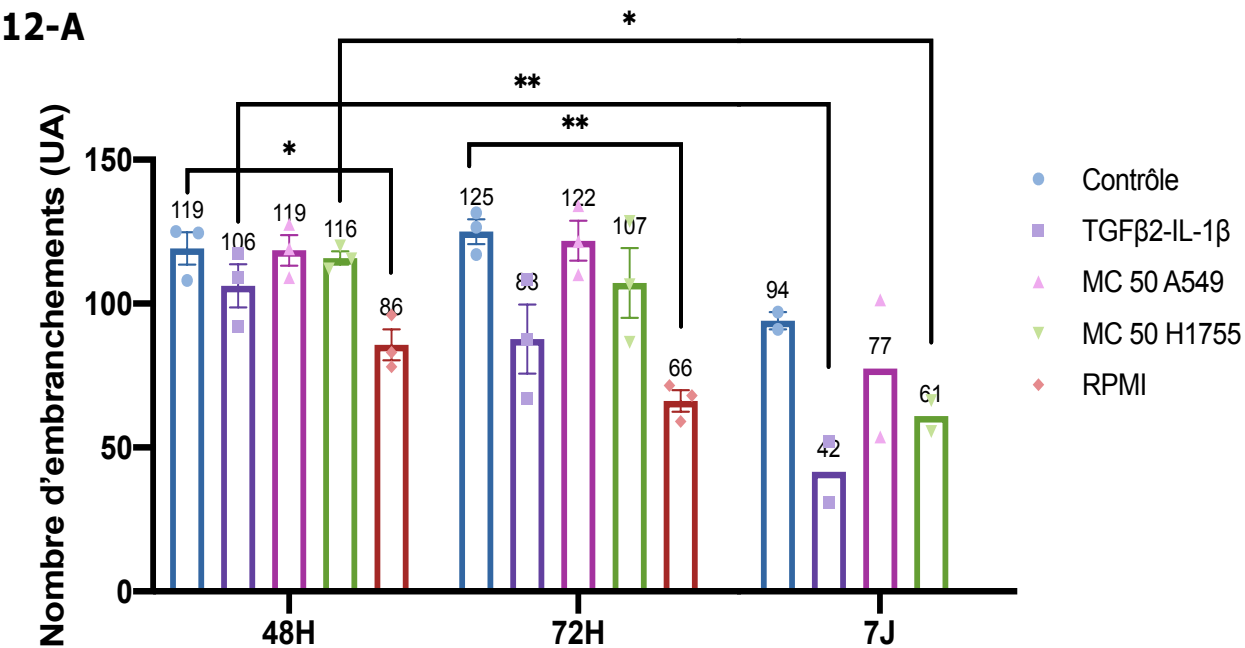
Concernant le test de tubulogénèse, l'analyse du nombre d'embranchements a montré qu'après 48 heures et 72 heures, une diminution significative est observée en présence de RPMI par rapport à la condition contrôle (**Figure 12-A**). Cette diminution est retrouvée pour l'étude du nombre de capillaires ainsi que l'analyse de leur surface (**Figures 12-B-12C**). Il est souligné que la capacité à former des capillaires ainsi que leur nombre ne diminuent pas au cours du temps dans la condition contrôle, cependant à 72 heures de traitement nous notons une diminution de la taille de ces capillaires.

Pour les conditions en présence des deux milieux conditionnés, aucune diminution du nombre d'embranchement en comparaison au contrôle n'est observée après 48 heures ou 72 heures. En revanche, une diminution du nombre d'embranchement est constatée à 72 heures dans la condition TGFβ2-IL-1β en comparaison au contrôle et aux MC50 (**Figure 12-A**). A 7 jours, une diminution pour l'ensemble des conditions est observée avec une diminution significative des conditions TGFβ2-IL-1β et MC50 H1755 en regard des valeurs à 48 heures. S'agissant du nombre du capillaires formés, une diminution par rapport au contrôle est observée pour toutes les conditions de traitement après 48 et 72 heures. Cette diminution est significative pour la condition MC 50 H1755 après 72 heures de traitement (**Figure 12-B**). A 7 jours nous observons une diminution importante des valeurs dans l'ensemble des conditions.

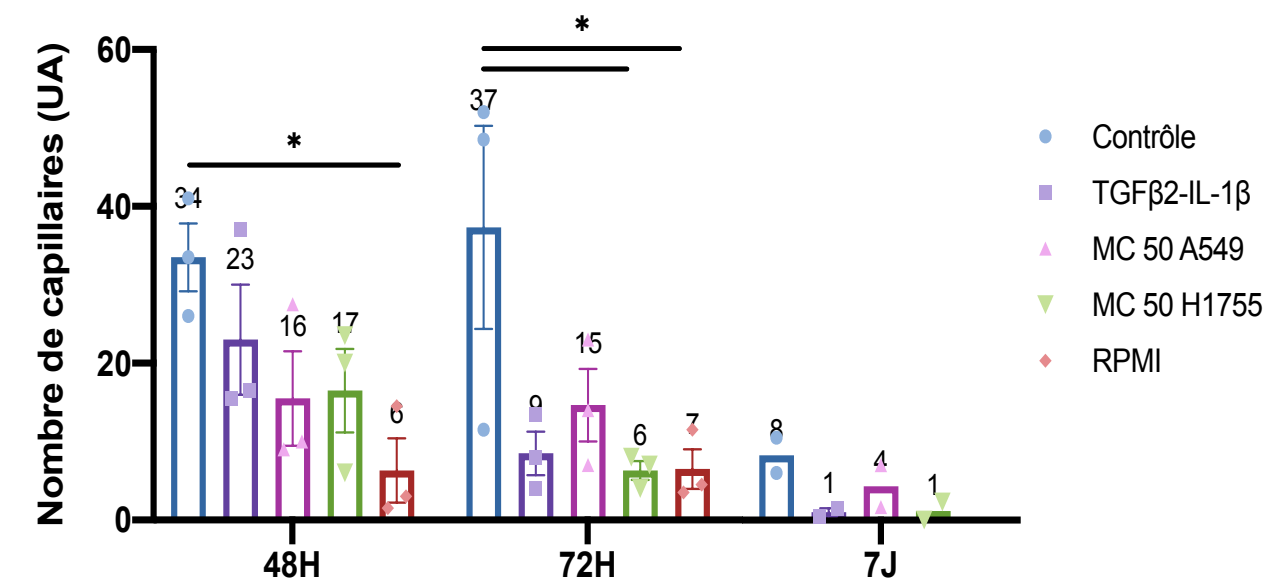
Concernant la surface des capillaires formés, une diminution est observée après 48 heures de traitement pour chacune des conditions de traitements par rapport à la condition contrôle. Cette diminution est significative

après 72 heures de traitement pour les conditions TGFβ2-IL-1β et MC50 H1755 (**Figure 12-C**). A 7 jours de traitement, une diminution des valeurs est constatée pour l'ensemble des conditions.

12-A



12-B



12-C

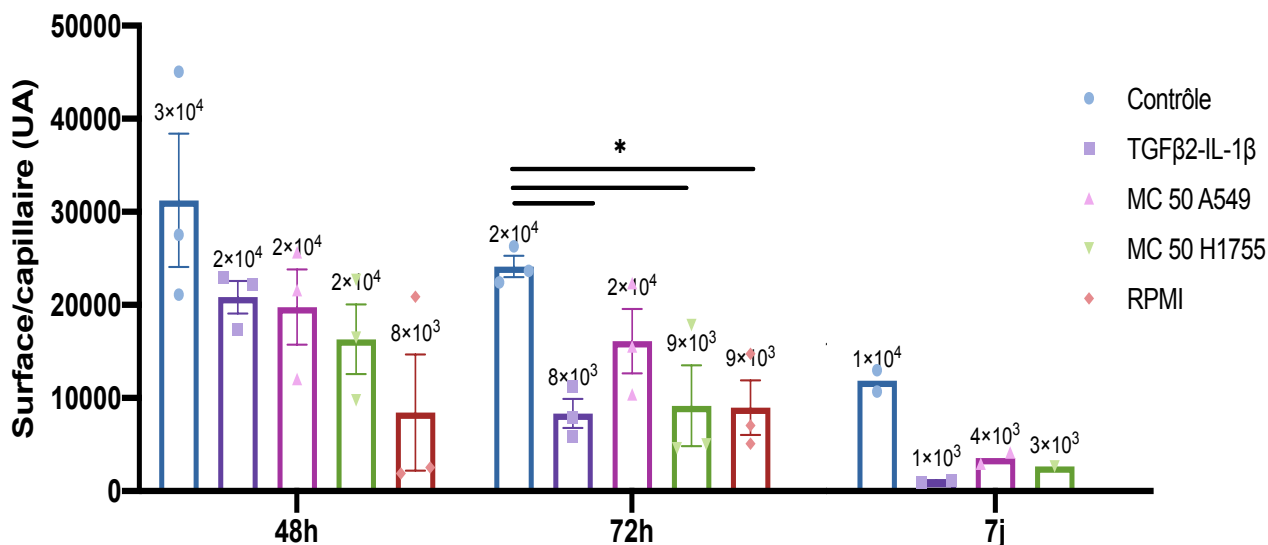


Figure 12 : Analyse des capacités fonctionnelles angiogéniques de cellules HUVEC par test de tubulogénèse. Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse fonctionnelle sur ECMgel® après T48 et T72 heures de traitement. Traitement supplémentaire à T72 heures pour l'analyse des conditions à T7jours. L'analyse des images sur ECMgel® est réalisée à 6 heures sur une image du puits à l'objectif x10 sur microscope photonique. Pour le temps à 7 jours, absence de condition RPMI dû à la mortalité cellulaire à 7 jours des HUVECs dans cette condition. **A** : Représentation graphique du nombre d'embranchement exprimé en unité arbitraire. **B** : Représentation graphique du nombre de capillaires formés exprimé en unité arbitraire. **C** : Représentation graphique de la surface moyenne par capillaire exprimée en unités arbitraires N=3 expériences indépendantes en duplicata pour les temps 48 heures et 72 heures de traitement ; N=2 expériences indépendante en duplicata pour le temps de traitement à 7 jours. * p < 0,05 ; ** p < 0,02.

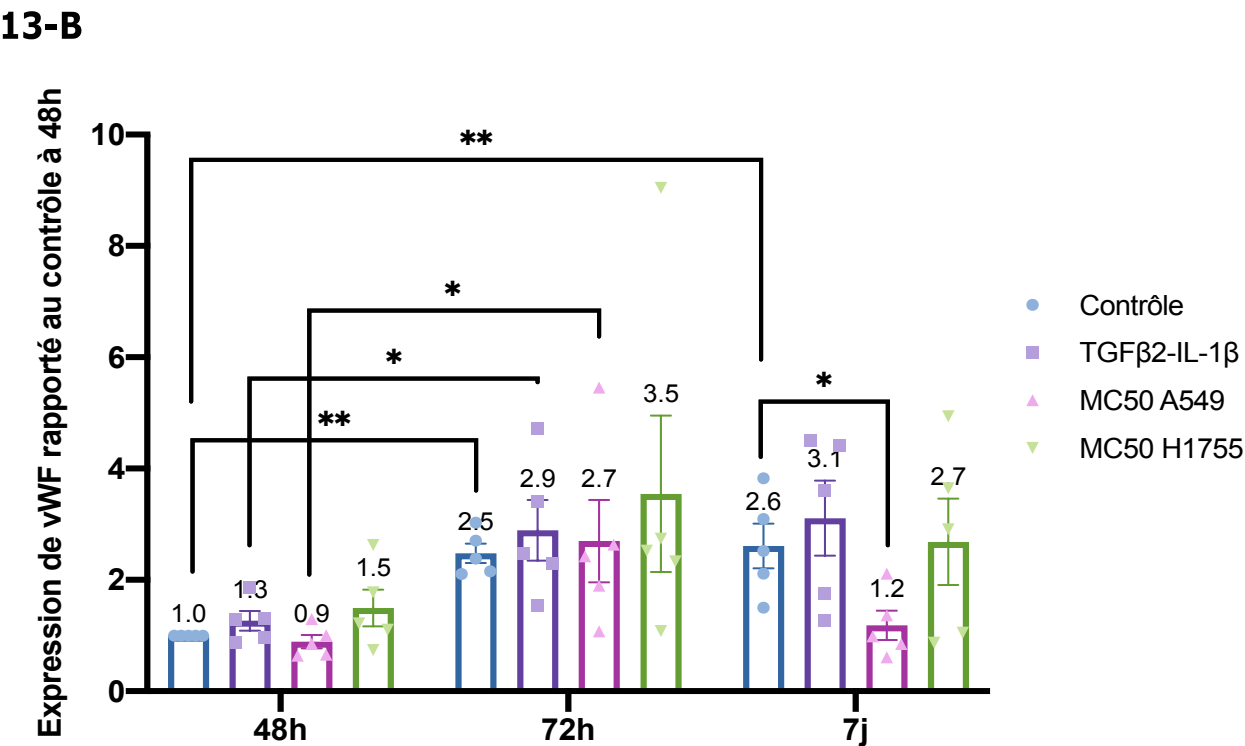
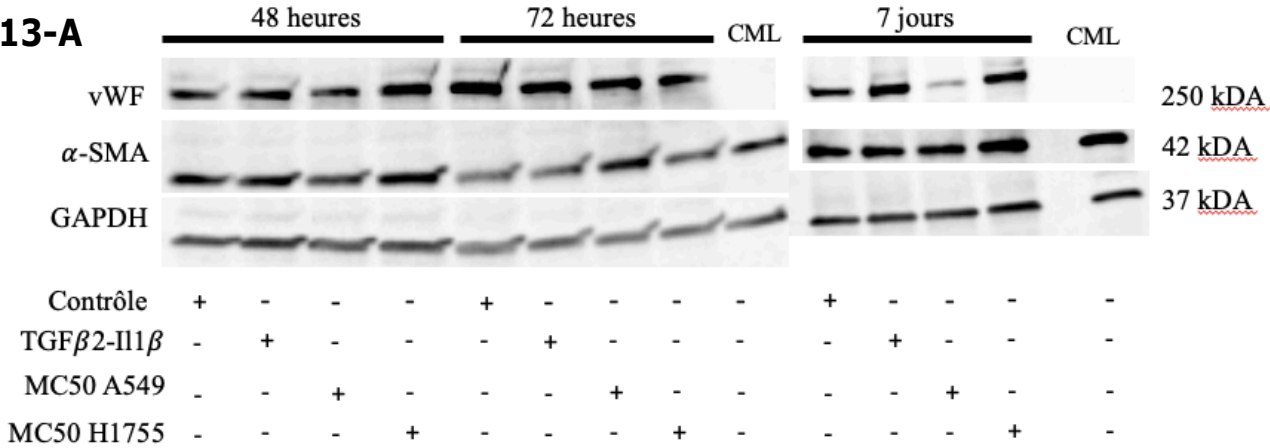
3. Caractérisation d'une transition EndoMT

3.1. Expression protéique des différents marqueurs endothéliaux et mésenchymateux

Une augmentation non significative de l'expression de vWF est observée par rapport au contrôle en présence du MC 50 H1755 à 48 heures, ainsi que dans la condition TGFβ2-IL-1β. Après 72 heures de traitement, une augmentation de l'expression de vWF est observée dans l'ensemble des conditions en comparaison au temps 48 heures, avec une augmentation significative pour les conditions contrôle, TGFβ2-IL-1β et MC50 A549. Une augmentation plus importante mais non significative après 72 heures de traitement MC50 H1755 est observée. Après 7 jours de traitement, une diminution significative de l'expression de vWF est observée pour les cellules traitées par MC50 A549 par rapport aux cellules contrôle à 7 jours, revenant à une expression similaire au temps 48 heures. (**Figures 13-A et 13-B**).

S'agissant de la protéine α-SMA, aucune modification d'expression n'est observée après 48 heures de traitement, pour l'ensemble des conditions, par rapport au contrôle. Après 72 heures, nous observons une

diminution significative de son expression en comparaison au temps à 48 heures pour les conditions contrôle et TGF β 2-IL-1 β et une diminution non significative pour la condition MC50 H1755. Une augmentation non significative pour la condition MC50 A549 est constatée par rapport à la condition contrôle au temps 72 heures. Après 7 jours de traitement, une augmentation significative de l'expression d' α -SMA dans la condition MC50 H1755 est observée entre le temps à 72 heure et 7 jours de traitement. Par ailleurs à 7 jours de traitement, une augmentation non significative est observée pour les autres conditions en comparaison aux mêmes conditions à 72 heures (**Figures 13-A et 13-C**).



13-C

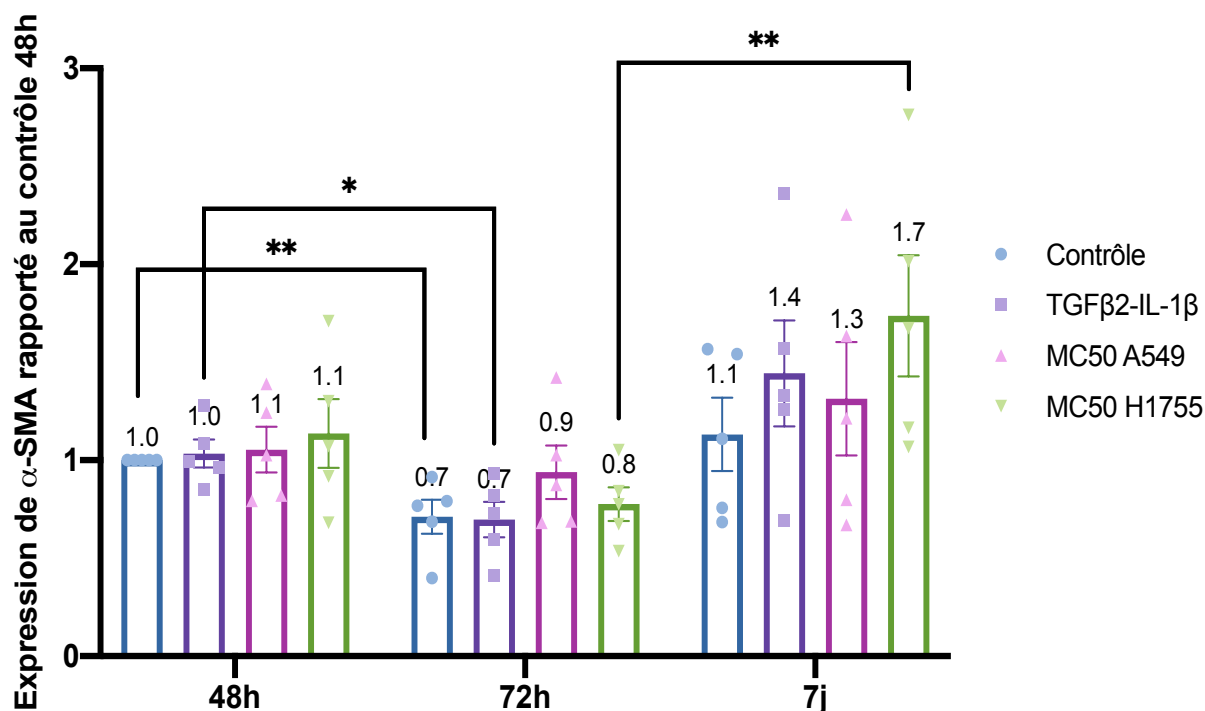


Figure 13 : Analyse par Western Blotting de la protéine endothéliale vWF et mésenchymateuse α -SMA. Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse des protéines à T48, T72 heures. Traitement supplémentaire à T72 heures pour l'analyse des cellules à T7jours de traitement. **A :** Expérience représentative de 5 expériences indépendantes pour la protéine vWF et α -SMA avec leur protéine de charge GAPDH (20 μ g de protéine/puits). **B :** Représentation graphique de la quantification de l'expression respective de la protéine vWF par rapport à sa protéine de charge en unités arbitraires. **C :** Représentation graphique de la quantification de l'expression respective de la protéine α -SMA par rapport à sa protéine de charge en unités arbitraires. Le point contrôle à 48 heures a été pris pour normaliser. N=5 expériences indépendantes. * p < 0,05 ; ** p < 0,02.

3.2. Etude de l'expression géniques modifiée au cours de la transition EndoMT

Afin de réaliser l'étude des différentes protéines vu précédemment en Western Blotting, une analyse par RT-qPCR a été réalisée dans les mêmes conditions de traitements. Pour l'expression du gène vWF, nous constatons après 48 heures de traitement une augmentation non significative dans la condition TGFβ2-IL-1β. Après 72 heures, une augmentation des conditions contrôle, TGFβ2-IL-1β et MC50 H1755 est observée entre le temps 48 heures et 72 heures de traitement pour ce même gène. Après 7 jours de traitement, nous observons une augmentation de l'expression génique de vWF dans les conditions TGFβ2-IL-1β et MC50 H1755. En parallèle, une diminution est constatée à 7 jours en présence du MC50 A549 par rapport à la condition contrôle à 7 jours (**Figure 14-A**).

S'agissant de l'expression génique de la protéine α -SMA nous n'observons pas de modification sur l'ensemble des conditions après 48 heures et 72 heures de traitement. En revanche, une augmentation non significative est relevée dans l'ensemble des conditions après 7 jours de traitement (**Figure 14-B**).

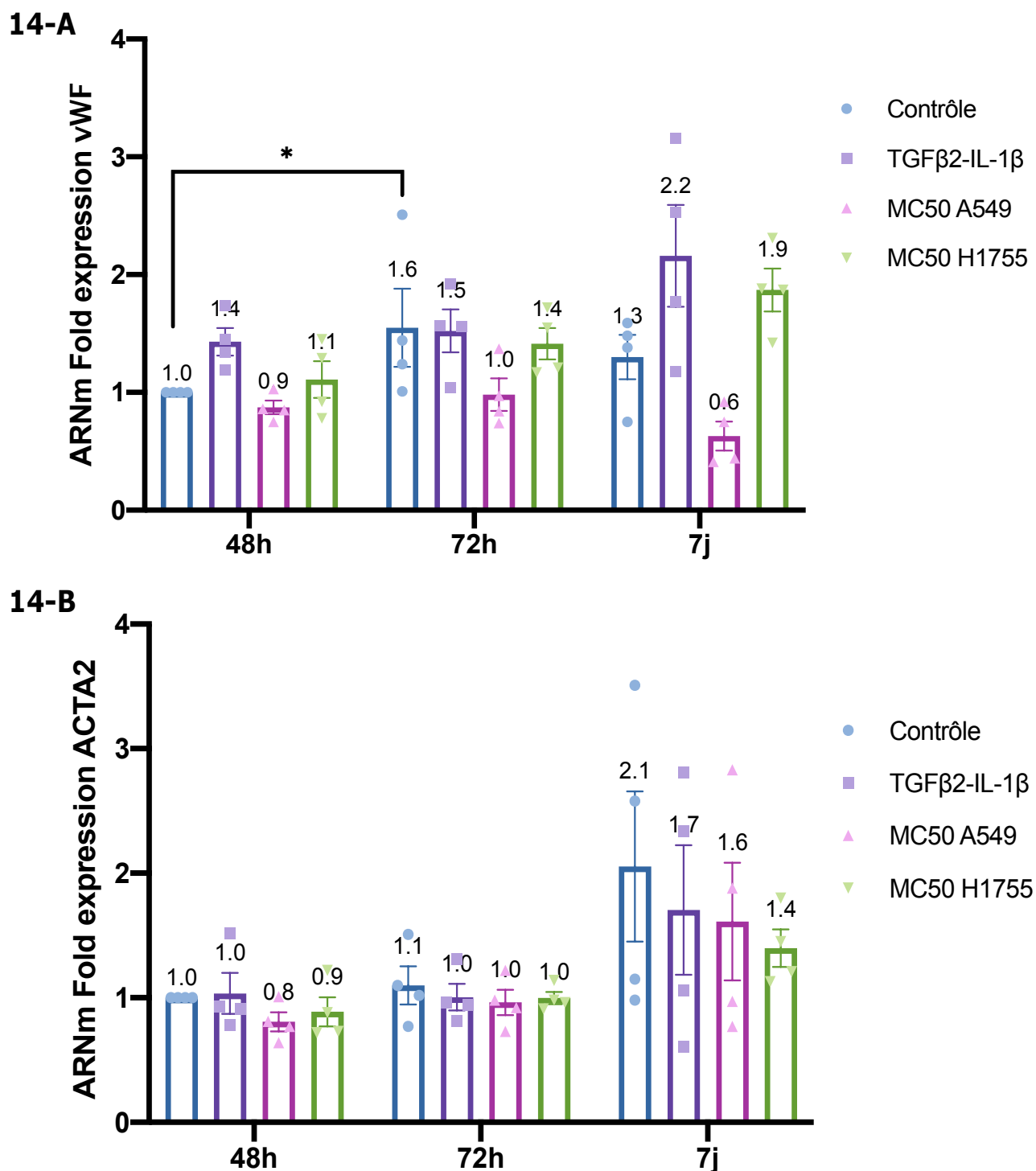


Figure 14 : Analyse RT-qPCR des gènes codant pour les protéines d'intérêt. Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse de l'expression des gènes à T48, T72 heures. Traitement supplémentaire à T72 heures pour une analyse à T7jours. **A** : Représentation graphique de l'expression du gène vWF exprimée en facteur d'expression par rapport au contrôle 48 heures. **B** : Représentation graphique de l'expression du gène ACTA2 (code pour protéine mésenchymale α -SMA) exprimée en facteur d'expression par rapport au contrôle 48 heures. N=4 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

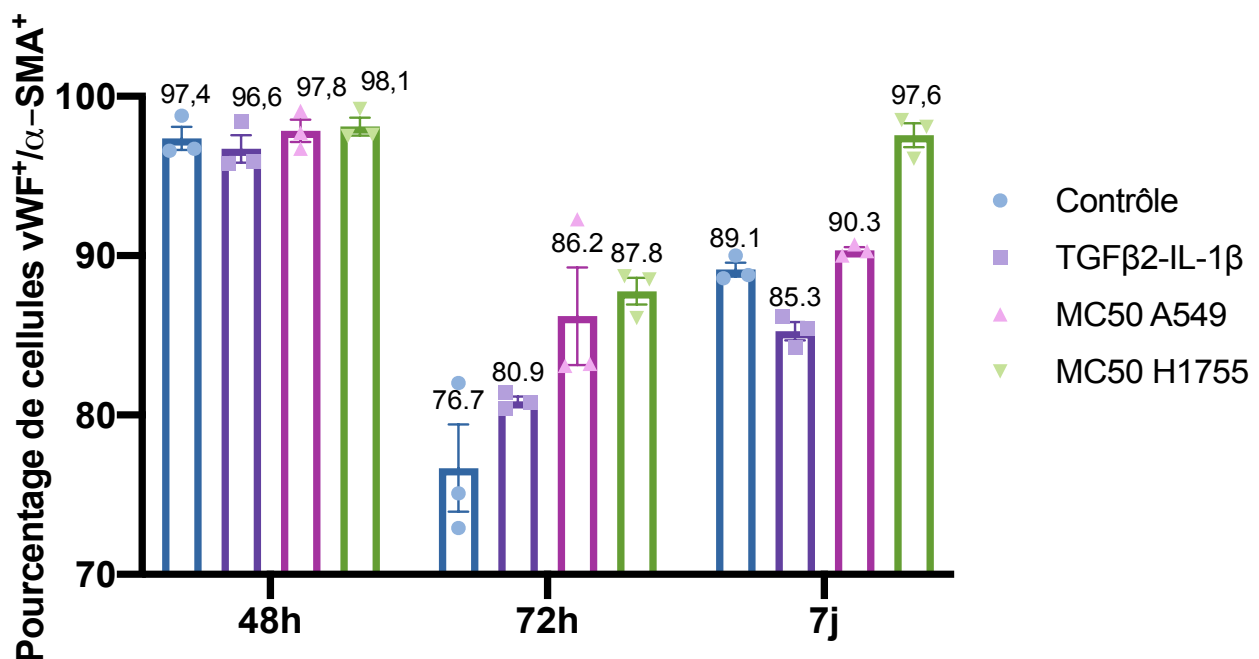
3.3. Etude des marqueurs de surface cellulaire impliqués au cours de la transition EndoMT

Après 48 heures, l'analyse du co-marquage $vWF^+/\alpha\text{-SMA}^+$ n'a révélé aucune différence quantitative entre les différentes conditions. En revanche, à 72 heures, une augmentation est observée pour l'ensemble des conditions par rapport à la condition contrôle avec une augmentation qui semble plus importante en présence des milieux conditionnés des deux lignées. Enfin, après 7 jours, en comparaison à la condition contrôle, une augmentation du pourcentage de cellules co-marquées $vWF^+/\alpha\text{-SMA}^+$ est observée en présence du MC50 H1755, mais pas en présence du MC50 A549 (**Figure 15-A**).

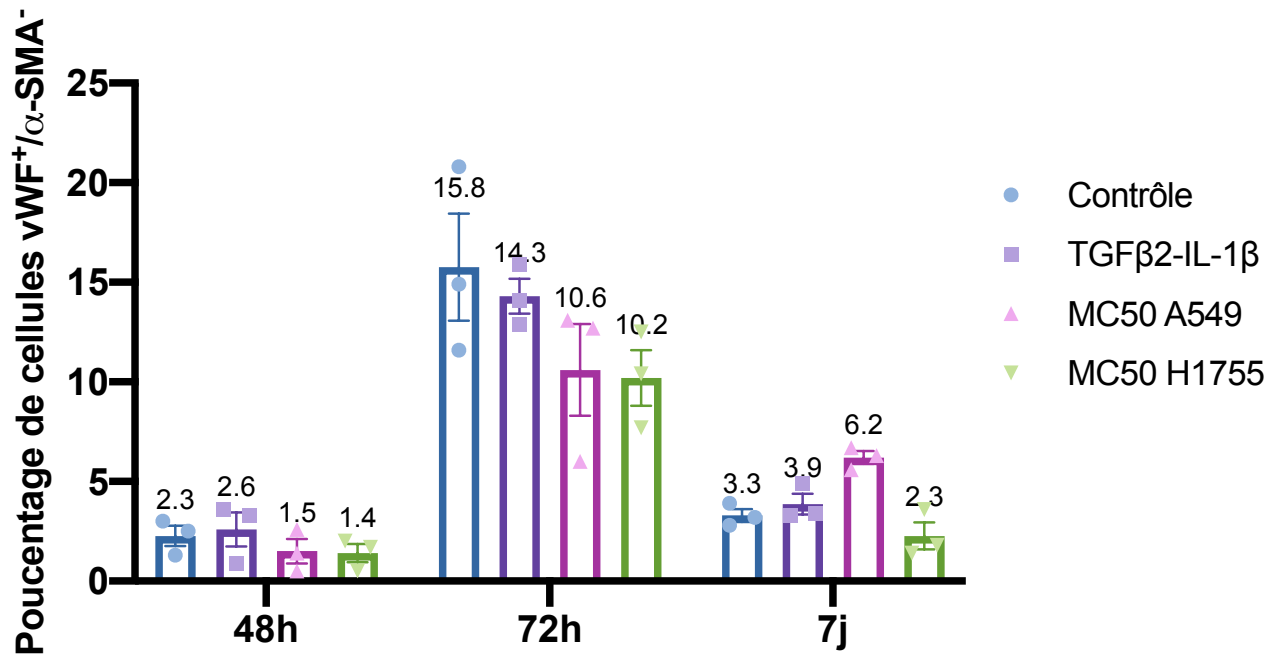
Après 48 heures de traitements, aucune différence de pourcentage de cellules $vWF^+/\alpha\text{-SMA}^-$, n'est observée quelque-soit les conditions de traitement. Après 72 heures, un pourcentage plus important de cellules $vWF^+/\alpha\text{-SMA}^-$ est observé dans les conditions contrôle et $TGF\beta 2\text{-IL-1}\beta$. Une diminution semble être observée pour les cellules traitées par les milieux conditionnés par rapport à la condition contrôle. Après 7 jours de traitements, seule la condition MC50 A549 semble induire une augmentation du pourcentage de cellules $vWF^+/\alpha\text{-SMA}^-$ (**Figure 15-B**).

S'agissant des cellules $vWF^-/\alpha\text{-SMA}^+$, aucune différence de pourcentage n'est constatée après 48 heures de traitement quelque-soit les conditions. En revanche, une diminution du pourcentage de ces cellules semble être observée pour les cellules traitées par les deux milieux conditionnés, par rapport à la condition contrôle. Après 7 jours, une augmentation du pourcentage de cellules $vWF^-/\alpha\text{-SMA}^+$, par rapport à la condition contrôle, est vérifiée pour les cellules traitées par le $TGF\beta 2\text{-IL-1}\beta$. Une diminution du pourcentage de cellules $vWF^-/\alpha\text{-SMA}^+$, est observée pour les cellules traitées par les milieux conditionnés par rapport à la condition contrôle (**Figure 15-C**).

15-A



15-B



15-C

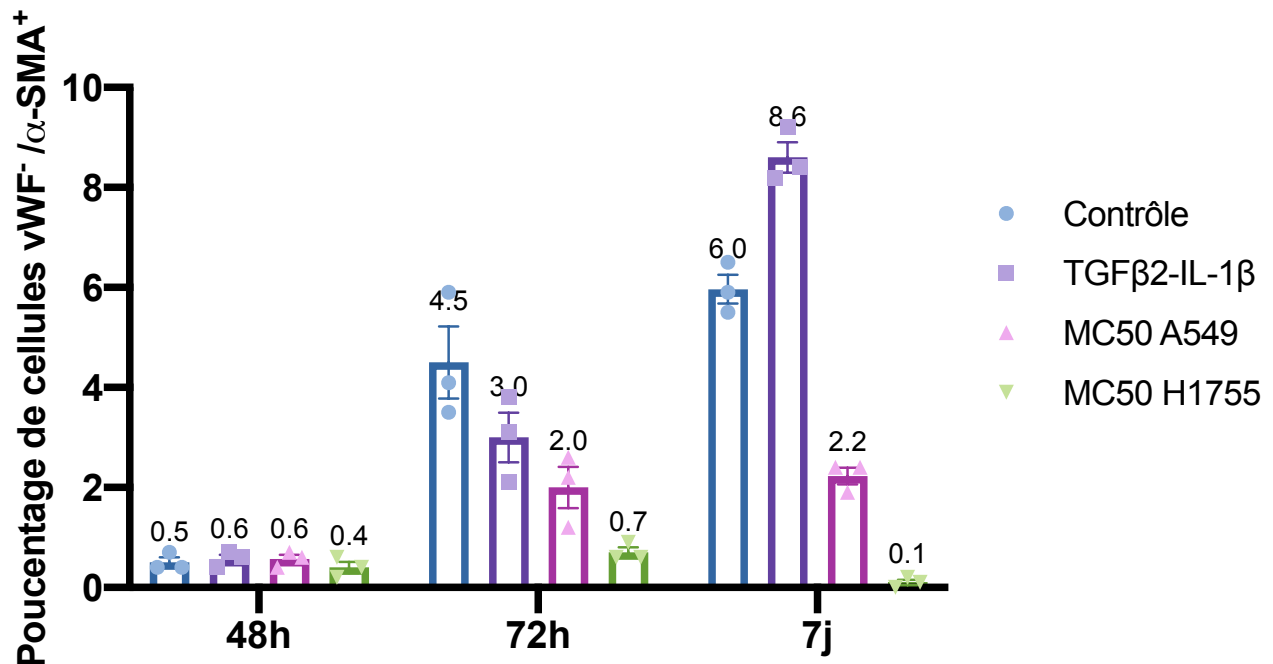


Figure 15 : Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules marquées pour les protéines d'intérêt. Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse des cellules à T48, T72 heures. Traitement supplémentaire à T72 heures pour l'analyse des cellules à T7jours de traitement. **A** : Représentation graphique du pourcentage de cellules co-marquées vWF⁺/α-SMA⁺. **B** : Représentation graphique du pourcentage de cellules marquées vWF⁺/α-SMA⁻. **C** : Représentation graphique du pourcentage de cellules marquées vWF⁻/α-SMA⁺. Résultats exprimés en pourcentage sur une population totale de 10 000 cellules. N=3 expériences indépendantes.

Discussion

L'objectif de ce projet fut de mettre en place un modèle d'étude *in vitro* dans la prise en charge thérapeutique du CBNPC, en évaluant la chimiosensibilité des cellules tumorales et en considérant le microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, à l'aide de lignées cellulaires, (i) la réponse cytotoxique à un large panel de chimiothérapies indiquées ou non dans le CBNPC et (ii) l'impact du sécrétome des cellules tumorales sur la transition EndoMT de cellules endothéliales en culture ont été étudiés.

Le choix des lignées cellulaires a été envisagé à partir des caractéristiques propres à chacune d'elle. En effet, afin de diversifier les profils, deux lignées cellulaires aux caractéristiques différentes (localisation tissulaire, stade métastatique, mutations connues) ont été sélectionnées. Ces caractéristiques peuvent être responsable de profils de réponse différents en terme de chimiosensibilité (153). La lignée tumorale A549, provient d'un carcinome épithélial connu pour être muté sur les gènes *KRAS* et *EGFR*. Notre second choix s'est porté sur la lignée H1755, adénocarcinome métastatique (métastases hépatiques) de stade 4, connu pour être muté *BRAF* (154). Ces deux lignées ont retenu notre attention par leurs mutations fréquemment confirmées en clinique : la mutation *EGFR* est retrouvée chez 10 à 35% des patients et les mutations *BRAF* et *KRAS* sont décrites chez 25% et 2% des patients atteints de CBNPC, respectivement.

Ces dernières années, la médecine personnalisée s'est considérablement développée et a permis d'optimiser les choix thérapeutiques aux regards des données de pharmacologie obtenues de plus en plus systématiquement. Les études de réponse aux différentes drogues présentées dans ce manuscrit ont montré des profils de réponse différents entre les thérapies ciblées (ITK) et les chimiothérapies conventionnelles (cytotoxiques). En effet, l'analyse de ces profils a porté sur les concentrations inhibitrices 50 (CI50) et l'inhibition de prolifération cellulaire maximale (V_{min}). Ainsi, les molécules de CI50 et de V_{min} les plus faibles ont été retenues.

Sur les deux lignées étudiées, nous avons montré que les cytotoxiques présentent une activité inhibitrice associée à une V_{min} significative pour 4 des 6 chimiothérapies testées. Pour les ITK, ces mêmes données ont été retrouvées pour 6 des 16 molécules testées. Ces résultats concernant l'efficacité peuvent être mis en parallèle du mécanisme d'action différents entre les cytotoxiques et les ITK. En effet, les cytotoxiques ont un mode d'action non spécifique sur différents médiateurs du cycle cellulaire quelque soient les cellules tumorales permettant la dégradation cellulaire, tandis que les ITK ont un mécanisme d'action très ciblé sur les cellules tumorales mutées (tels que *EGFR*, *ALK*, ou encore *ROS1*) ou les cellules du microenvironnement tumoral. Cette différence peut expliquer le potentiel cytotoxique plus faible des ITK par rapport aux chimiothérapies standards (153). L'ensemble de ces informations est en accord avec la littérature et la prise en charge recommandée du CBNPC : les cytotoxiques (chimiothérapies conventionnelles) sont indiqués en première intention pour les stades précoces et tardifs, alors que les ITK sont recommandés principalement sur les stades avancés ou métastatiques (63).

L'optimisation de la prise en charge dans le CBNPC s'inscrit dans la démarche d'un meilleur ciblage des cellules tumorales permis par les nouvelles thérapeutiques ciblées qui limitent l'impact toxique sur les cellules saines à l'opposé des chimiothérapies conventionnelles. Par exemple, le paclitaxel n'est généralement pas bien toléré et présente une limite à son utilisation en raison de sa faible hydrosolubilité et de sa toxicité proportionnelle à la dose utilisée. Pour surmonter ces limites, plusieurs systèmes nanoparticulaires ont été mis au point, comme l'Abraxane®, nanoformulation par voie intraveineuse de paclitaxel lié à l'albumine sérique humaine approuvée par

la FDA. Une autre approche innovante pour dépasser ces limites est la confection d'exosomes. Une équipe a ainsi développé une formulation d'exosomes à base de colostrum bovin comme nouveau véhicule d'administration de la chimiothérapie dans le CBNPC. Ces exosomes, combinés à l'acide folique permettent d'améliorer significativement le ciblage de la tumeur. Cette étude a mis en évidence sur un modèle *in vitro* que cette formulation présentait une meilleure efficacité antitumorale par une diminution de la prolifération et de la viabilité cellulaires. *In vivo*, cette formulation administrée sous forme orale présente des résultats équivalents en termes d'efficacité par rapport à l'Abraxane®, alors qu'administrée sous forme intraveineuse, cette nouvelle formulation a montré une efficacité supérieure à celle de l'Abraxane®. De plus, cette forme exosomale a présenté un meilleur profil d'innocuité limitant les effets secondaires (155).

L'équipe de Wang *et coll.*, s'est intéressée au docétaxel, chimiothérapie également utilisée fréquemment dans le CBNPC. Cet autre taxane présente également une mauvaise hydrosolubilité et une efficacité d'encapsulation peu satisfaisante. Ainsi, ces auteurs ont utilisé des exosomes tumoraux isolés de lignées (A549) de CBNPC et les ont chargé en docétaxel. Ils ont ainsi pu montrer sur des modèles *in vitro* que cette formulation augmente de manière significative l'absorption cellulaire du docétaxel et un meilleur ciblage des cellules tumorales en comparaison au docétaxel seul. Des résultats *in vivo* ont complété ces données en confirmant que cette formulation pouvait être utilisée comme agent ciblant les tumeurs avec une formulation à libération prolongée avec une meilleure efficacité de l'anticancéreux en comparaison des résultats ne comprenant seulement le docétaxel (156).

Ces constatations mettent en évidence le potentiel de nouvelles formes pharmaceutiques tel que les exosomes, comme vecteurs potentiels d'administration de médicament, qui limiterait les effets indésirables et améliorerait l'efficacité des thérapeutiques identifiées comme efficace dans notre étude.

L'efficacité de réponse aux thérapies ciblées est dépendante des mutations présentes au sein des cellules tumorales. Dans notre étude, nous constatons que l'osimertinib est le seul anti-EGFR, de 3^{ème} génération, capable d'inhiber la prolifération avec une efficacité et une puissance similaire sur les deux lignées cellulaires. Selon les données de la littérature, des résistances aux ITK anti-EGFR de 1^{ère} et 2^{ème} génération apparaissent 9 à 14 mois après la mise en place de ces traitements par l'apparition de nouvelles mutations ou l'utilisation par les cellules de voies de contournement, ce qui expliquerait l'absence d'efficacité de l'afatinib, du dacomitinib, de l'erlotinib, du gefitinib et du poziotinib (70). Par ailleurs, diverses mutations, liées au nombre de passages des lignées cellulaires, pourraient expliquer l'acquisition de résistances aux anti-EGFR de 1^{ère} et 2^{ème} génération, comme cela a pu être observé lors des études préliminaires réalisées au laboratoire. Cette modification phénotypique induit par la culture cellulaire a également pu être mise en évidence par l'équipe de Xu *et coll.*, (157). Par ailleurs, d'autres études ont étudié l'impact de mutations affectant la voie PI3K/AKT/mTOR à l'origine de résistances à l'erlotinib et au gefitinib dans les CBNPC. Ainsi, une analyse génomique, en parallèle des tests de chimiosensibilité, semble être capitale afin (i) d'identifier au mieux les mutations ; (ii) d'orienter de façon plus précise la prise en charge thérapeutique ; (iii) et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les stratégies thérapeutiques antitumorales associent, lorsqu'il s'agit de cytotoxiques, plusieurs molécules, tandis que pour les ITK des monothérapies sont souvent envisagées (63). Sur ce dernier point, les données de notre étude confirment des différences de réponse aux ITK anti-ALK/ROS1 puisque le crizotinib, présente une meilleure efficacité et une meilleure puissance sur les deux lignées cellulaires en comparaison aux autres molécules de seconde et troisième génération de la même classe (brigatinib et loratinib). Il est important

de rappeler que ces données sont éloignées des stratégies cliniques de prise en charge du CBNPC. En effet, le traitement de ces tumeurs implique un panel de différentes drogues modulant l'activité de plusieurs cibles cellulaires et moléculaires dans le but de limiter les résistances. Il conviendra, pour la suite de ce projet, de proposer de nouvelles études associant les molécules entre elles (selon les protocoles cliniques établis) et de vérifier si les données de cytotoxicité obtenues sont différentes de celles constatées avec les molécules seules.

Par ailleurs, il est rapporté que les chimiothérapies conventionnelles et thérapies ciblées sont associées à une réduction du nombre de clones cellulaires sensibles aux traitements et à une proportion plus élevée de clones résistants qui persistent après le traitement (158). Il est par exemple décrit dans le CBNPC qu'après traitement par chimiothérapies cytotoxiques, le taux de réponse aux ITK anti-EGFR est plus faible qu'en l'absence de ces traitements suggérant la modification du statut mutationnel de l'EGFR (159). Ces informations suggèrent qu'une comparaison de la chimiosensibilité de combinaisons associant des cytotoxiques ou des ITK pourrait être envisagée sur différents stades tumoraux du CBNPC et particulièrement sur les stades précoces pour lesquels les ITK ne sont pas indiqués. Cette approche thérapeutique anticipée pourrait, ainsi, limiter la sélection et la progression de clones résistants et identifier de nouvelles indications pour certaines des molécules testées.

En complément de la prise en charge multi-cibles faisant intervenir les ITK et les chimiothérapies conventionnelles, le développement de thérapies ciblant le microenvironnement tumoral a trouvé sa place, ces dernières années, dans l'arsenal thérapeutique des cancers (160). En effet, le rôle du MET dans la dissémination, la prolifération mais aussi dans les résistances aux traitements, a fait l'objet de nombreuses études depuis une dizaine d'années (160). Ce MET est composé de la matrice extracellulaire et de divers types cellulaires comme les cellules immunitaires, les fibroblastes associés au cancer ou encore les cellules endothéliales. Ces dernières cellules favorisent la tumorigenèse en induisant l'angiogenèse, processus décrit il y a plus de 40 ans par Judah Folkman, ou la transition endothélio-mésenchymateuse (161).

La transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) est un processus décrit, ces dernières années, dans la physiopathologie de fibrose cardiaque ou d'hypertension pulmonaire. Récemment, des études ont évalué son rôle au cours de la tumorigenèse et dans les processus de résistance aux anticancéreux (54). Cette transition est caractérisée par la perte du phénotype endothélial (avec diminution des capacités fonctionnelles et de l'expression des marqueurs endothéliaux), au profit d'un phénotype mésenchymateux caractérisé par une augmentation des capacités migratoire et proliférative et une augmentation de l'expression de marqueurs fibroblastiques (54)(162). Parmi les différents inducteurs de cette transition, Derada Troletti *et coll.* ont confirmé en 2019, sur des cellules HUVECs, que l'association $TGF\beta 2$ et $IL-1\beta$ favorisait significativement ce processus, justifiant de leur utilisation comme contrôle de la transition (163).

Peu d'études se sont intéressées à l'influence du sécrétome de cellules tumorales dans l'induction de l'EndoMT. Ainsi, nous avons montré une augmentation de la prolifération des cellules traitées par les milieux MC 50 après 7 jours suggérant une possible transition des cellules traitées. En effet, une des caractéristiques des cellules fibroblastiques est leur capacité à proliférer de manière significative comme cela a pu être montré dans une étude réalisée sur un modèle de cancer colorectal générant des CAFs issus de la transition épithélio-mésenchymateuse (164). Par ailleurs, la capacité des cellules endothéliales à former des capillaires sur l'ECMgel® a mis en évidence une perte de la capacité de tubulogenèse, au cours du temps, des cellules endothéliales en

présence des MC50. Ces résultats confirment, ainsi, que les milieux conditionnés ne sont pas capables de favoriser l'angiogenèse mais engagent les cellules endothéliales dans un processus d'EndoMT.

Afin de confirmer cette dernière hypothèse, une analyse de l'expression des protéines endothéliales et mésenchymateuses a été réalisée par western blot et RT-qPCR. Ces données suggèrent que le milieu MC50 A549 est capable d'induire une transition des cellules endothéliales comme cela a pu être rapporté par Kim *et coll.* sur un modèle de cellules HUVECs en culture (148). Aucune conclusion définitive ne peut être, en revanche, proposée pour les cellules traitées par le milieu MC50 H1755. En effet, l'analyse n'a porté que sur l'expression d'un seul couple de médiateurs régulant cette transition (vWF/ α -SMA). L'expression de différents autres marqueurs endothéliaux (PECAM-1/CD31 ou la VE-cadhérine (165) ou mésenchymateux (FSP-1 ou N-cadhérine pourra être envisagée dans de futures études (165). Par ailleurs, les temps d'analyse retenus pour cette étude pourront être repensés. En effet, les analyses de RT-qPCR et de western blot ont été réalisées aux mêmes temps, sans prendre en compte les différences de cinétique associées à la transcription et la traduction protéique.

Dans l'étude sur l'EndoMT, les *stimuli* à l'origine de ce phénomène pourront être approfondis. En effet, des travaux au laboratoire sont en cours d'étude et notamment l'identification de nouveaux facteurs pouvant induire l'EndoMT au travers de sécrétomes issus de lignées cellulaires de mélanome. Par exemple l'implication de la protéine SPARC retrouvée au sein de sécrétome de cellules de mélanome pourrait induire l'EndoMT selon un mécanisme TGF- β indépendant. Cette hypothèse encourageante reste à confirmer. De plus, ce même sécrétome est capable d'augmenter la production de ROS par les cellules endothéliales et de favoriser la transition vers un phénotype fibroblastique (article en cours). Par ailleurs, l'EndoMT a pu être montré suite à un traitement par radiothérapie (166). Cette dernière induit une fibrose pulmonaire secondaire à une hypoxie à l'origine du phénomène d'EndoMT. L'hypoxie apparaît donc comme une piste à approfondir afin de mieux comprendre son rôle au cours de l'EndoMT induites par des milieux conditionnés de CBNPC.

Si les travaux initiaux sur l'EMT et l'EndoMT considéraient ces processus comme permanents, les études de ces dernières années tendent à montrer la possibilité de stades intermédiaires où les cellules possèdent des marqueurs communs des deux phénotypes (167). Ainsi, Zeiberg *et coll.* ont montré la présence d'une co-expression de la protéine endothéliale CD31 et mésenchymateuse FSP1 lors d'EndoMT impliquée au cours de la fibrose rénale (168). Cette « EndoMT » partielle, a été retrouvée dans notre étude, à partir des données de cytométrie en flux. Ces dernières ont confirmé la présence d'un co-marquage vWF⁺/ α -SMA⁺ pour les cellules traitées par les milieux conditionnés, augmenté pour les cellules traitées par le MC50 H1755. Cette EndoMT partielle pourrait expliquer le caractère métastatique plus important pour les cellules H1755 que pour les cellules A549 comme cela a été précédemment rapporté (167). Il pourrait alors être suggéré que la plasticité des cellules du MET favoriserait le développement tumorale en induisant la prolifération des cellules tumorales et leur dissémination vers d'autres organes (169).

Cependant, il est à noter qu'un très faible pourcentage de cellules vWF- / α -SMA⁺ est retrouvé dans les conditions expérimentales choisies. Ces données confirment le caractère transitoire de l'EndoMT comme cela a été rapporté par Suzuki *et coll.* par l'identification de cellules ayant réalisé une EndoMT partielle (170). Par ailleurs, il est observé un pourcentage de co-marquage vWF⁺/ α -SMA⁺ important pour les cellules traitées par le milieu EGM-2 dès 48 heures d'incubation. Plusieurs hypothèses sont proposées afin d'expliquer ces données. Un stress, induit par la culture cellulaire, pourrait favoriser la transition spontanée des cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux (157) ; la présence de facteurs inducteurs de l'EndoMT contenus dans le sérum du

milieu de culture EGM-2 serait une seconde hypothèse pour expliquer ces résultats. Ainsi, il pourrait être envisager de réaliser ces mêmes expériences à partir d'un milieu dépourvu de sérum avec le risque de favoriser la mortalité cellulaire comme cela a été montré dans cette étude en présence du milieu RPMI.

Ces dernières études confirment le rôle des cellules endothéliales au cours de la tumorigenèse induite par les cellules A549 et H1755. Elles confirment que le sécrétome de ces cellules, dont il conviendra d'étudier la composition, est capable de favoriser la transition des HUVECs vers un profil mésenchymateux. Une attention particulière devra être portée à l'impact de cette transition sur la réponse antiproliférative des chimiothérapies. Pour ce faire, des modèles expérimentaux de sphéroïdes pluricellulaires pourront être proposés sur le modèle de ceux optimisés par Kim *et coll.* (148). Dans cette étude, des sphéroïdes associant cellules A549 et cellules endothéliales ont été traitées par du cisplatine ou du gefitinib. Les données ont été comparées à celles obtenues à partir de cultures 2D. Les résultats ont montré (i) une EndoMT significativement augmentée dans le modèle 3D par rapport au modèle 2D et (ii) une réponse antiproliférative différente selon le modèle expérimental avec une résistance au cisplatine et au gefitinib plus importante sur modèle 3D.

Des données récentes suggèrent une étude globalisée de la tumeur en vue d'apprécier le contenu de leur sécrétome et de mieux comprendre la communication établie entre les différents compartiments du MET. L'équipe de Ma *et coll.*, a pu montrer l'implication de miARN isolés d'exosomes tumoraux dans la promotion de l'angiogenèse, de la perméabilité vasculaire et la dissémination métastatique dans un modèle de CBNPC (171). Dans cette étude, le miR-3157 a été identifié comme majoritairement exprimé et il a pu être mis en évidence que son niveau d'expression dans les exosomes tumoraux circulants étaient significativement augmenté chez les patients atteints de CBNPC métastatique par rapport aux patients atteints de CBNPC non métastatique. Par ailleurs, ces travaux ont mis en évidence que ce miARN pouvait être transféré des cellules tumorales vers les cellules endothéliales au travers des exosomes et induisait la régulation de facteurs pro-angiogéniques et de perméabilité vasculaire tels que le VEGF, MMP2, MMP9 ou l'occludine. Une autre étude a identifié l'implication de miARN comme facteurs de contrôle de la promotion tumorale. Ainsi, il a été mis en évidence la production de vésicules extracellulaires à partir des cellules endothéliales tumorales, porteuses de miR-203. Après culture *in vitro* en présence de cellules A549, il a été confirmé les propriétés inhibitrices de ce miARN dans la progression des cellules tumorales *via* une potentialisation de l'activité de p21, gène suppresseur de tumeur (172). S'agissant du rôle des miARN dans le contrôle des résistances aux thérapeutiques antitumorales, l'équipe de Li *et coll.*, a identifié les miR-184 et miR-3913 dans la résistance à l'omisertinib chez des patients atteints de CBNPC (173). Cette résistance s'explique par l'activation des voies RAS-MAPK et PI3K *via* la régulation de gènes, dont la transcription se trouve modifiée par ces miARN. Une autre étude a mis en évidence l'implication du miR-210 dans la résistance à l'osimertinib à partir de cellules HCC827 ou PC-9 (174).

Outre leur capacité à véhiculer des miARN, les exosomes ont également la capacité de participer au transport de protéines pouvant expliquer certaines résistances aux anticancéreux. Ainsi, il a été rapporté par Wu *et coll.*, un transfert intercellulaire de la protéine EGFR de type sauvage au travers d'exosomes tumoraux conférait une résistance à l'osimertinib. Mécaniquement ils ont pu mettre en évidence que le transfert intercellulaire de la protéine EGFR de type sauvage exosomal conférait une résistance à l'osimertinib aux cellules cancéreuses sensibles mutées par l'EGFR *in vitro* et *in vivo*. La co-culture de cellules sensibles mutées par EGFR et de cellules résistantes non mutées par EGFR a favorisé le phénotype de résistance à l'osimertinib dans les cellules cancéreuses mutées par EGFR. Cet exemple suggère que l'inhibition de la formation d'exosomes pourrait

représenter un potentiel dans la découverte de nouvelles cibles intéressantes pour limiter les phénomènes de résistances aux récentes thérapeutiques (175).

Si la plupart des miARN sont décrits comme favorisant les résistances aux thérapies anticancéreuses, différentes études ont confirmé que ces médiateurs pouvaient inhiber les conséquences délétères de mutations constatées dans certaines formes de CBNPC. Ainsi, il a été rapporté, sur un modèle *in vitro* de CBNPC, que le miR-34 est capable de cibler le gène *C-MET* et d'inhiber la voie EGFR/PI3K/AKT restaurant la sensibilité au gefitinib des cellules traitées (176). Autre exemple intéressant avec le miR-223 capable, par ciblage de la voie EGFR/PI3K/AKT des cellules tumorales dans le CBNPC, d'induire l'apoptose des cellules tumorales et de réguler leur prolifération(177). D'autres études sont en cours dans la modélisation d'inhibiteurs de miARN impliqués dans les phénomènes de résistances, comme l'équipe de Wang *et coll.*, qui par un inhibiteur du mi-203 ont pu restaurer positivement l'expression de la protéine PTEN et ainsi restaurer la sensibilité au cisplatine. (178)

Parmi les autres stratégies visant à prévenir les résistances aux traitements anticancéreux, l'utilisation des siARN (ARN interférent) semble être une opportunité intéressante. A la différence des miARN qui agissent comme un signal pour empêcher la traduction protéique d'ARNm, les siARN empêche « physiquement » la traduction protéique par formation de duplex complémentaire avec les ARNm. Ces siARN présentent une alternative aux thérapeutiques existantes pour inhiber l'activité des oncogènes et par conséquent agir en freinant la croissance tumorale. Cependant, leur dégradation rapide et leur mauvaise internalisation dans les cellules a conduit à des études d'encapsulation à l'aide de nanoparticules. Dans ces conditions, le système nanoparticulaire doit répondre à plusieurs objectifs dont une protection efficace, un ciblage spécifique, une libération efficace du contenu dans les cellules cibles. Par ailleurs, la taille du système devra maximiser l'administration au sein de la tumeur et minimiser l'absorption par la rate et le foie, tout en garantissant une innocuité des composants utilisés (179). Différentes études ciblant le CBNPC, se sont intéressées à l'utilisation de nanovecteurs contenant des siARN pour inhiber l'angiogenèse tumorale (180), la tumorigenèse en régulant négativement les voies de signalisation dépendantes de l'EGFR (181,182) et en ciblant les protéines conférant une résistance aux ITK et aux chimiothérapies (mTOR, AXL, survivin, Bcl-2 par exemple) (183)(184). Ces siARN ont été utilisés en combinaison ou non avec différentes chimiothérapies et différentes études *in vitro* suggèrent des résultats prometteurs pour le traitement du CBNPC.

L'ensemble de ces données confirment que les échanges au sein du MET, entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales, par exemple, jouent non seulement un rôle dans les résistances aux thérapeutiques, mais aussi un rôle au sein dans le contrôle de la tumorigenèse. Ce point, encore à explorer, met en évidence l'importance des médiateurs du MET (miARN, siARN, protéines, exosomes) sur l'évolution de la tumorigenèse.

Conclusions et perspectives

Les premiers résultats prometteurs de cette étude offrent des perspectives intéressantes pour la suite de ce projet. Ainsi, ces travaux de recherche permettront de conforter la place du MET endothélial dans le développement du CBNPC. La caractérisation des acteurs moléculaires et cellulaires régulant la transition EndoMT, devrait amener à identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Ces dernières pourront être exploitées dans le

développement de nouvelles drogues afin d'améliorer la prise en charge du CBNPC qui reste encore aujourd'hui, sous sa forme agressive métastatique, un cancer de mauvais pronostic.

Par ailleurs, l'étude de la réponse des cellules tumorales aux différentes thérapeutiques en culture 3D sous forme de sphéroïdes (utilisant des lignées cellulaires ou des cellules isolées de tumeurs de patients), avec l'élaboration d'un modèle pouvant recréer un microenvironnement tumoral multicellulaire pourra être envisagée. Ces données seront complétées par des analyses de génomique et l'étude de l'implication de facteurs moléculaires (miARN, siARN, exosomes) dans la réponse aux traitements.

Enfin, afin d'améliorer le ciblage intratumorale, des stratégies de vectorisation de différentes molécules thérapeutiques (cytotoxiques par exemple) ou de médiateurs biologiques (miARN, siARN) pourront être envisagées.

Pris dans leur ensemble, ces travaux conduiront à proposer une médecine personnalisée améliorant la prise en charge des CBNPC en limitant les résistances et les potentiels effets iatrogènes.

Bibliographie

1. Le cancer du poumon - Les cancers les plus fréquents [Internet]. <https://www.e-cancer.fr>. Consulté le 6 juin 2021.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
3. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et coll. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-60.
4. Sholl LM. The Molecular Pathology of Lung Cancer. *Surg Pathol Clin*. 2016;9(3):353-78.
5. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(5):584-94.
6. Meza R, Meernik C, Jeon J, Cote ML. Lung Cancer Incidence Trends by Gender, Race and Histology in the United States, 1973–2010. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0121323.
7. Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna JD, et coll. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene*. 1999;18(3):643-50.
8. FR-Cancer-du-Poumon-non-a-Petites-Cellules-Guide-pour-les-Patients.pdf. [Internet]. <https://www.esmo.org>. Consulté le 23 juin 2021
9. Guide du parcours de soins- Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématologique- Cancers broncho-pulmonaires .pdf [Internet]. <https://www.has-sante.fr>. Consulté le 23 juin 2021.
10. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3).
11. Früh M, Rolland E, Pignon J-P, Seymour L, Ding K, Tribodet H, et coll. Pooled Analysis of the Effect of Age on Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy for Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3573-81.
12. Greene MI, Moore JS. Peter C. Nowell (1928–2016). *Science*. 2017;355(6328):913-913.
13. Bister K. Discovery of oncogenes: The advent of molecular cancer research. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(50):15259-60.
14. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
15. Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:331-48.
16. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(1):75-91.
17. Lee P, Bree R de, Brokx HAP, Leemans CR, Postmus PE, Sutedja TG. Primary lung cancer after treatment of head and neck cancer without lymph node metastasis: Is there a role for autofluorescence bronchoscopy ?. *Lung Cancer*. 2008;62(3):309-15.
18. Auerbach O, Stout AP, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. *N Engl J Med*. 1961;265:253-67.
19. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963-8.

20. Pirlog R, Cismaru A, Nutu A, Berindan-Neagoe I. Field Cancerization in NSCLC: A New Perspective on MicroRNAs in Macrophage Polarization. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):E746.
21. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727-30.
22. Frede J, Adams DJ, Jones PH. Mutation, clonal fitness and field change in epithelial carcinogenesis. *J Pathol.* 2014;234(3):296-301.
23. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;7(1):2.
24. Casbas-Hernandez P, Sun X, Roman-Perez E, D'Arcy M, Sandhu R, Hishida A, *et coll.* Tumor Intrinsic Subtype Is Reflected in Cancer-Adjacent Tissue. *Cancer Epidemiol Prev Biomark.* 2015;24(2):406-14.
25. Wang J, Li Z, Ge Q, Wu W, Zhu Q, Luo J, *et coll.* Characterization of microRNA transcriptome in tumor, adjacent, and normal tissues of lung squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;149(5):1404-1414.
26. Tian F, Li R, Chen Z, Shen Y, Lu J, Xie X, *et coll.* Differentially Expressed miRNAs in Tumor, Adjacent, and Normal Tissues of Lung Adenocarcinoma. *BioMed Res Int.* 2016;2016:1428271.
27. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, *et coll.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(1):9-31.
28. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, *et coll.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal CCS.* 2020;18(1):59.
29. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015;368(1):7-13.
30. de Sousa VML, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol.* 2018;85(1-2):96-107.
31. Zhao J, Guerrero A, Kelnar K, Peltier HJ, Bader AG. Synergy between next generation EGFR tyrosine kinase inhibitors and miR-34a in the inhibition of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2017;108:96-102.
32. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, *et coll.* Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet Lond Engl.* 2017;389(10066):299-311.
33. Yuan M, Huang L-L, Chen J-H, Wu J, Xu Q. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4:61.
34. O'Leary CG, Andelkovic V, Ladwa R, Pavlakis N, Zhou C, Hirsch F, *et coll.* Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2019;8(6):1119-24.
35. Horn L, Pao W. EML4-ALK: Honing In on a New Target in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009;27(26):4232-5.
36. D'Angelo A, Sobhani N, Chapman R, Bagby S, Bortoletti C, Traversini M, *et coll.* Focus on ROS1-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Crizotinib, Resistance Mechanisms and the Newer Generation of Targeted Therapies. *Cancers.* 2020;12(11):E3293.
37. Märkl B, Hirschbühl K, Dhillon C. NTRK-Fusions – A new kid on the block. *Pathol - Res Pract.* 2019;215(10):152572.
38. Malik R, Mambetsariev I, Fricke J, Chawla N, Nam A, Pharaon R, *et coll.* MET receptor in oncology: From biomarker to therapeutic target. *Adv Cancer Res.* 2020;147:259-301.

39. Bean J, Brennan C, Shih J-Y, Riely G, Viale A, Wang L, *et coll.* MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(52):20932-7.
40. Wang Y, Wang Y, Li J, Li J, Che G. Clinical Significance of PIK3CA Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res Int*. 2020;2020:e3608241.
41. Zhu Q-G, Zhang S-M, Ding X-X, He B, Zhang H-Q. Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies. *Oncotarget*. 2017;8(34):57680-92.
42. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, *et coll.* Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*. 2014;511(7511):543-50.
43. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-25.
44. Couraud S, Debieuvre D, Moreau L, Dumont P, Margery J, Quoix E, *et coll.* No impact of passive smoke on the somatic profile of lung cancers in never-smokers. *Eur Respir J*. 2015;45(5):1415-25.
45. Boeckx B, Shahi RB, Smeets D, De Brakeleer S, Decoster L, Van Brussel T, *et coll.* The genomic landscape of nonsmall cell lung carcinoma in never smokers. *Int J Cancer*. 2020;146(11):3207-18.
46. Banat G-A, Tretyn A, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Weigert A, Olesch C, *et coll.* Immune and Inflammatory Cell Composition of Human Lung Cancer Stroma. *PloS One*. 2015;10(9):e0139073.
47. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-22.
48. Stawowczyk M, Wellenstein MD, Lee SB, Yomtoubian S, Durrans A, Choi H, *et coll.* Matrix Metalloproteinase 14 promotes lung cancer by cleavage of Heparin-Binding EGF-like Growth Factor. *Neoplasia New York N*. 2016;19(2):55-64.
49. Salmon H, Franciszkiwicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Validire P, Trautmann A, *et coll.* Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*. 2012;122(3):899-910.
50. Markowitz GJ, Havel LS, Crowley MJ, Ban Y, Lee SB, Thalappillil JS, *et coll.* Immune reprogramming via PD-1 inhibition enhances early-stage lung cancer survival. *JCI Insight*. 2018;3(13).
51. Busch SE, Hanke ML, Kargl J, Metz HE, MacPherson D, Houghton AM. Lung Cancer Subtypes Generate Unique Immune Responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016;197(11):4493-503.
52. Hung S-P, Yang M-H, Tseng K-F, Lee OK. Hypoxia-induced secretion of TGF- β 1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant*. 2013;22(10):1869-82.
53. Ribeiro Franco PI, Rodrigues AP, de Menezes LB, Pacheco Miguel M. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathol Res Pract*. 2020;216(1):152729.
54. Clere N, Renault S, Corre I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:747.
55. Wawro ME, Chojnacka K, Wieczorek-Szukała K, Sobierajska K, Niewiarowska J. Invasive Colon Cancer Cells Induce Transdifferentiation of Endothelium to Cancer-Associated Fibroblasts through Microtubules Enriched in Tubulin- β 3. *Int J Mol Sci*. 2018;20(1).
56. Derada Troletti C, Fontijn RD, Gowing E, Charabati M, van Het Hof B, Didouh I, *et coll.* Inflammation-induced endothelial to mesenchymal transition promotes brain endothelial cell dysfunction and occurs during multiple sclerosis pathophysiology. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):1-13.
57. Wang L, Cao L, Wang H, Liu B, Zhang Q, Meng Z, *et coll.* Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(44):76116-28.

58. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007;67(21):10123-8.
59. Duda DG, Duyverman AMMJ, Kohno M, Snuderl M, Steller EJA, Fukumura D, *et coll.* Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(50):21677-82.
60. Bravaccini S, Bronte G, Ulivi P. TMB in NSCLC: A Broken Dream?. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6536.
61. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-40.
62. Fossella FV, DeVore R, Kerr RN, Crawford J, Natale RR, Dunphy F, *et coll.* Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2000;18(12):2354-62.
63. Nagasaka M, Gadgeel SM. Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(1):63-70.
64. Gilligan D, Nicolson M, Smith I, Groen H, Dalesio O, Goldstraw P, *et coll.* Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review. *Lancet Lond Engl.* 2007;369(9577):1929-37.
65. Felip E, Rosell R, Maestre JA, Rodríguez-Paniagua JM, Morán T, Astudillo J, *et coll.* Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010;28(19):3138-45.
66. Goss GD, O'Callaghan C, Lorimer I, Tsao M-S, Masters GA, Jett J, *et coll.* Gefitinib versus placebo in completely resected non-small-cell lung cancer: results of the NCIC CTG BR19 study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013;31(27):3320-6.
67. Kelly K, Altorki NK, Eberhardt WEE, O'Brien MER, Spigel DR, Crinò L, *et coll.* Adjuvant Erlotinib Versus Placebo in Patients With Stage IB-IIIA Non-Small-Cell Lung Cancer (RADIANT): A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015;33(34):4007-14.
68. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csőszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, *et coll.* Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 2021;398(10308):1344-57.
69. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, *et coll.* Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(21):3543-51.
70. Takeda M, Nakagawa K. First- and Second-Generation EGFR-TKIs Are All Replaced to Osimertinib in Chemo-Naive EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer ?. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1).
71. Chang X, Liu Z, Man S, Roys A, Li Z, Zuo D, *et coll.* Metastasis manners and the underlying mechanisms of ALK and ROS1 rearrangement lung cancer and current possible therapeutic strategies. *RSC Adv.* 2019;9(31):17921-32.
72. Thériaque [Internet]. <https://www.theriaque.org>. Consulté le 03 novembre 2021.
73. Accueil - ANSM [Internet]. <https://ansm.sante.fr>. Consulté le 03 novembre 2021.
74. Portail HAS Professionnels [Internet]. Haute Autorité de Santé. <https://www.has-sante.fr>. Consulté le 03 novembre 2021.
75. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, *et coll.* Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(2):113-25.

76. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, *et coll.* Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018;36(22):2244-50.
77. Wu Y-L, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, *et coll.* Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(11):1454-66.
78. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, *et coll.* Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet Lond Engl.* 2009;373(9674):1525-31.
79. Thatcher N, Hirsch FR, Luft AV, Szczesna A, Ciuleanu TE, Dediu M, *et coll.* Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(7):763-74.
80. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, *et coll.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1693-703.
81. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, *et coll.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(25):2385-94.
82. Soria J-C, Tan DSW, Chiari R, Wu Y-L, Paz-Ares L, Wolf J, *et coll.* First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl.* 2017;389(10072):917-29.
83. Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov.* 2017;7(2):137-55.
84. Patil T, Simons E, Mushtaq R, Pacheco JM, Doebele RC, Bowles DW. Targeted therapies for ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. *Drugs Today Barc Spain 1998.* 2019;55(10):641-52.
85. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, *et coll.* BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-109.
86. Blumenschein GR, Saintigny P, Liu S, Kim ES, Tsao AS, Herbst RS, *et coll.* Comprehensive biomarker analysis and final efficacy results of sorafenib in the BATTLE trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(24):6967-75.
87. Papadimitrakopoulou V, Lee JJ, Wistuba II, Tsao AS, Fossella FV, Kalhor N, *et coll.* The BATTLE-2 Study: A Biomarker-Integrated Targeted Therapy Study in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2016;34(30):3638-47.
88. Blumenschein GR, Smit EF, Planchard D, Kim D-W, Cadranel J, De Pas T, *et coll.* A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015;26(5):894-901.
89. Kinno T, Tsuta K, Shiraishi K, Mizukami T, Suzuki M, Yoshida A, *et coll.* Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF mutations. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2014;25(1):138-42.
90. Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* 2001;61(10):3986-97.
91. Zhou X, Wang X, Zhu H, Gu G, Zhan Y, Liu C, *et coll.* PI3K inhibition sensitizes EGFR wild-type NSCLC cell lines to erlotinib chemotherapy. *Exp Ther Med.* 2021;21(1):9.

92. Hidalgo M, Buckner JC, Erlichman C, Pollack MS, Boni JP, Dukart G, *et coll.* A phase I and pharmacokinetic study of temsirolimus (CCI-779) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12(19):5755-63.
93. Soria J-C, Shepherd FA, Douillard J-Y, Wolf J, Giaccone G, Crino L, *et coll.* Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2009;20(10):1674-81.
94. Mita M, Sankhala K, Abdel-Karim I, Mita A, Giles F. Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(12):1947-54.
95. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, *et coll.* Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731-9.
96. De Mello RA, Neves NM, Amaral GA, Lippo EG, Castelo-Branco P, Pozza DH, *et coll.* The Role of MET Inhibitor Therapies in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Clin Med.* 2020;9(6):1918.
97. Seto T, Kato T, Nishio M, Goto K, Atagi S, Hosomi Y, *et coll.* Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): an open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1236-44.
98. Saito H, Fukuhara T, Furuya N, Watanabe K, Sugawara S, Iwasawa S, *et coll.* Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(5):625-35.
99. Garon EB, Ciuleanu T-E, Arrieta O, Prabhaskar K, Syrigos KN, Goksel T, *et coll.* Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 2014;384(9944):665-73.
100. Watanabe H, Ichihara E, Kayatani H, Makimoto G, Ninomiya K, Nishii K, *et coll.* VEGFR2 blockade augments the effects of tyrosine kinase inhibitors by inhibiting angiogenesis and oncogenic signaling in oncogene-driven non-small-cell lung cancers. *Cancer Sci.* 2021;112(5):1853-64.
101. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, *et coll.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
102. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, *et coll.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-33.
103. Bordoni R, Ciardiello F, von Pawel J, Cortinovis D, Karagiannis T, Ballinger M, *et coll.* Patient-Reported Outcomes in OAK: A Phase III Study of Atezolizumab Versus Docetaxel in Advanced Non-Small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2018;19(5):441-449.e4.
104. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, *et coll.* Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1919-29.
105. Yoon SM, Shaikh T, Hallman M. Therapeutic management options for stage III non-small cell lung cancer. *World J Clin Oncol.* 2017;8(1):1-20.
106. Rodríguez-Abreu D, Powell SF, Hochmair M, Gadgeel SM, Esteban E, Felip E, *et coll.* Final analysis of KEYNOTE-189: Pemetrexed-platinum chemotherapy (chemo) with or without pembrolizumab (pembro) in patients (pts) with previously untreated metastatic nonsquamous non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2020;38(15_suppl):9582-9582.
107. Gettinger S, Hellmann MD, Chow LQM, Borghaei H, Antonia S, Brahmer JR, *et coll.* Nivolumab Plus Erlotinib in Patients With EGFR-Mutant Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2018;13(9):1363-72.

108. Oxnard GR, Yang JC-H, Yu H, Kim S-W, Saka H, Horn L, *et coll.* TATTON: a multi-arm, phase Ib trial of osimertinib combined with selumetinib, savolitinib, or durvalumab in EGFR-mutant lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2020;31(4):507-16.
109. Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, Gettinger SN, Borghaei H, Brahmer JR, *et coll.* Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):31-41.
110. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai C-M, *et coll.* Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(9):595-605.
111. Lee CK, Wu Y-L, Ding PN, Lord SJ, Inoue A, Zhou C, *et coll.* Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015;33(17):1958-65.
112. Wang L. Instant Oncology: FLAURA. *Clin Oncol.* 2021;33(10):617-8.
113. Lazzari C, Gregorc V, Karachaliou N, Rosell R, Santarpia M. Mechanisms of resistance to osimertinib. *J Thorac Dis.* 2020;12(5).
114. Papadimitrakopoulou VA, Mok TS, Han J-Y, Ahn M-J, Delmonte A, Ramalingam SS, *et coll.* Osimertinib versus platinum-pemetrexed for patients with EGFR T790M advanced NSCLC and progression on a prior EGFR-tyrosine kinase inhibitor: AURA3 overall survival analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2020;31(11):1536-44.
115. Kashima K, Kawauchi H, Tanimura H, Tachibana Y, Chiba T, Torizawa T, *et coll.* CH7233163 Overcomes Osimertinib-Resistant EGFR-Del19/T790M/C797S Mutation. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(11):2288-97.
116. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2019;121(9):725-37.
117. Gu Z-B, Liao L-M, Yao G-J, Fang M, Huang L. Patient with EGFR-mutant lung cancer harboring de novo MET amplification successfully treated with gefitinib combined with crizotinib. *Curr Probl Cancer.* 2021;100702.
118. Kamel LM, Atef DM, Mackawy AMH, Shalaby SM, Abdelraheim N. Circulating long non-coding RNA GAS5 and SOX2OT as potential biomarkers for diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer. *Biotechnol Appl Biochem.* 2019;66(4):634-42.
119. Lee SS, Cheah YK. The Interplay between MicroRNAs and Cellular Components of Tumour Microenvironment (TME) on Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Progression. *J Immunol Res.* 2019;2019:3046379.
120. Wu K-L, Tsai Y-M, Lien C-T, Kuo P-L, Hung J-Y. The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1611.
121. Braicu C, Zimta A-A, Harangus A, Iurca I, Irimie A, Coza O, *et coll.* The Function of Non-Coding RNAs in Lung Cancer Tumorigenesis. *Cancers.* 2019;11(5):605.
122. Liu B, Zhang R, Zhu Y, Hao R. Exosome-derived microRNA-433 inhibits tumorigenesis through incremental infiltration of CD4 and CD8 cells in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2021;22(2):607.
123. Wang HX, Wang XY, Fei JW, Li FH, Han J, Qin X. microRNA-23B inhibits non-small cell lung cancer proliferation, invasion and migration via downregulation of RUNX2 and inhibition of Wnt/B-catenin signaling pathway. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2020;34(3):825-35.
124. Wei F, Ma C, Zhou T, Dong X, Luo Q, Geng L, *et coll.* Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p. *Mol Cancer.* 2017;16(1):132.

125. Pavel AB, Campbell JD, Liu G, Elashoff D, Dubinett S, Smith K, *et coll.* Alterations in Bronchial Airway miRNA Expression for Lung Cancer Detection. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2017;10(11):651-9.
126. D'Andrea E, Choudhry NK, Raby B, Weinhouse GL, Najafzadeh M. A bronchial-airway gene-expression classifier to improve the diagnosis of lung cancer: Clinical outcomes and cost-effectiveness analysis. *Int J Cancer.* 2020;146(3):781-90.
127. Meng W, Hao Y, He C, Li L, Zhu G. Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019;18(1):57.
128. Liu J, Ren L, Li S, Li W, Zheng X, Yang Y, *et coll.* The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(9):2783-97.
129. Zheng Q, Ding H, Wang L, Yan Y, Wan Y, Yi Y, *et coll.* Circulating Exosomal miR-96 as a Novel Biomarker for Radioresistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Oncol.* 2021;2021:5893981.
130. Indini A, Rijavec E, Grossi F. Circulating Biomarkers of Response and Toxicity of Immunotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Comprehensive Review. *Cancers.* 2021;13(8):1794.
131. Dorsey JF, Kao GD, MacArthur KM, Ju M, Steinmetz D, Wileyto EP, *et coll.* Tracking viable circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients undergoing definitive radiation therapy: pilot study results. *Cancer.* 2015;121(1):139-49.
132. Alama A, Coco S, Genova C, Rossi G, Fontana V, Tagliamento M, *et coll.* Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells and Circulating Cell-Free DNA Association in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Nivolumab. *J Clin Med.* 2019;8(7):E1011.
133. Herbreteau G, Vallée A, Knol A-C, Théoleyre S, Quéreux G, Khammari A, *et coll.* Circulating tumour DNA: analytical aspects and clinical applications for metastatic melanoma patients. *Ann Biol Clin (Paris).* 2017;75(6):619-30.
134. Guibert N, Jones G, Beeler JF, Plagnol V, Morris C, Mourlanette J, *et coll.* Targeted sequencing of plasma cell-free DNA to predict response to PD1 inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2019;137:1-6.
135. Chang Y, Tolani B, Nie X, Zhi X, Hu M, He B. Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor DNA in cancer monitoring. *Ther Clin Risk Manag.* 2017;13:1363-74.
136. Coco S, Alama A, Vanni I, Fontana V, Genova C, Dal Bello MG, *et coll.* Circulating Cell-Free DNA and Circulating Tumor Cells as Prognostic and Predictive Biomarkers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First-Line Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):1035.
137. Augustus E, Zwaenepoel K, Siozopoulou V, Raskin J, Jordaens S, Baggerman G, *et coll.* Prognostic and Predictive Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer Patients on Immunotherapy—The Role of Liquid Biopsy in Unraveling the Puzzle. *Cancers.* 2021;13(7):1675.
138. Galuppini F, Dal Pozzo CA, Deckert J, Loupakis F, Fassan M, Baffa R. Tumor mutation burden: from comprehensive mutational screening to the clinic. *Cancer Cell Int.* 2019;19:209.
139. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, *et coll.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214-8.
140. Herbst RS, Lopes G, Kowalski DM, Nishio M, Wu Y-L, Junior G de C, *et coll.* Association between tissue TMB (tTMB) and clinical outcomes with pembrolizumab monotherapy (pembro) in PD-L1-positive advanced NSCLC in the KEYNOTE-010 and -042 trials. *Ann Oncol.* 2019;30:v916-7.
141. Wang Z, Duan J, Cai S, Han M, Dong H, Zhao J, *et coll.* Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. *JAMA Oncol.* 2019;5(5):696-702.

142. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, *et coll.* Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med.* 2018;24(9):1441-8.
143. Basher F, Saravia D, Fanfan D, Cotta JA, Lopes G. Impact of STK11 and KRAS co-mutations on outcomes with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2020;38(15_suppl):e15135-e15135.
144. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, *et coll.* STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2018;8(7):822-35.
145. Kanzaki R, Naito H, Kise K, Takara K, Eino D, Minami M, *et coll.* Gas6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes migration of Axl-expressing lung cancer cells during chemotherapy. *Sci Rep.* 2017;7(1):10613.
146. Choe C, Shin Y-S, Kim C, Choi S-J, Lee J, Kim SY, *et coll.* Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition. *OncoTargets Ther.* 2015;8:3665-78.
147. Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ, Yokota SJ, Bankert RB. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;178(9):5552-62.
148. Kim S-H, Song Y, Seo HR. GSK-3 β regulates the endothelial-to-mesenchymal transition via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs in multicellular tumor spheroid models. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2019;38(1):46.
149. Yu M, Qi B, Xiaoxiang W, Xu J, Liu X. Baicalein increases cisplatin sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells via PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2017;90:677-85.
150. Muraro MG, Muenst S, Mele V, Quagliata L, Iezzi G, Tzankov A, *et coll.* Ex-vivo assessment of drug response on breast cancer primary tissue with preserved microenvironments. *Oncoimmunology.* 2017;6(7).
151. Snijder B, Vladimer GI, Krall N, Miura K, Schmolke A-S, Kornauth C, *et coll.* Image-based ex-vivo drug screening for patients with aggressive haematological malignancies: interim results from a single-arm, open-label, pilot study. *Lancet Haematol.* 2017;4(12):e595-606.
152. Lohse I, Azzam DJ, Al-Ali H, Volmar C-H, Brothers SP, Ince TA, *et coll.* Ovarian Cancer Treatment Stratification Using Ex Vivo Drug Sensitivity Testing. *Anticancer Res.* 2019;39(8):4023-30.
153. Dholaria B, Hammond W, Shreders A, Lou Y. Emerging therapeutic agents for lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):138.
154. Furugaki K, Mochizuki M, Kohno M, Shu S, Harada N, Yoshimura Y. Expression of C-terminal ALK, RET, or ROS1 in lung cancer cells with or without fusion. *BMC Cancer.* 2019;19(1):301.
155. Kandimalla R, Aqil F, Alhakeem SS, Jeyabalan J, Tyagi N, Agrawal A, *et coll.* Targeted Oral Delivery of Paclitaxel Using Colostrum-Derived Exosomes. *Cancers.* 2021;13(15):3700.
156. Wang Y, Guo M, Lin D, Liang D, Zhao L, Zhao R, *et coll.* Docetaxel-loaded exosomes for targeting non-small cell lung cancer: preparation and evaluation in vitro and *in vivo*. *Drug Deliv.* 2021;28(1):1510-23.
157. Xu A, Deng F, Chen Y, Kong Y, Pan L, Liao Q, *et coll.* NF- κ B pathway activation during endothelial-to-mesenchymal transition in a rat model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2020;130:110525.
158. Bai H, Wang Z, Chen K, Zhao J, Lee JJ, Wang S, *et coll.* Influence of Chemotherapy on EGFR Mutation Status Among Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(25):3077-83.
159. Luo Y-H, Chen Y-M. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status. *Transl Lung Cancer Res.* 2013;2(6):442-4.

160. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, *et coll.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(1):9-31.
161. Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(1):3-10.
162. Choi KJ, Nam J-K, Kim J-H, Choi S-H, Lee Y-J. Endothelial-to-mesenchymal transition in anticancer therapy and normal tissue damage. *Exp Mol Med*. 2020;52(5):781-92.
163. Derada Troletti C, Fontijn RD, Gowing E, Charabati M, van Het Hof B, Didouh I, *et coll.* Inflammation-induced endothelial to mesenchymal transition promotes brain endothelial cell dysfunction and occurs during multiple sclerosis pathophysiology. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):1-13.
164. Jahangiri B, Khalaj-Kondori M, Asadollahi E, Sadeghizadeh M. Cancer-associated fibroblasts enhance cell proliferation and metastasis of colorectal cancer SW480 cells by provoking long noncoding RNA UCA1. *J Cell Commun Signal*. 2019;13(1):53-64.
165. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1074-80.
166. Nam J-K, Kim A-R, Choi S-H, Kim J-H, Han SC, Park S, *et coll.* Pharmacologic Inhibition of HIF-1 α Attenuates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in a Preclinical Image Guided Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2021;109(2):553-66.
167. Shu DY, Butcher E, Saint-Geniez M. EMT and EndMT: Emerging Roles in Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4271.
168. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008;19(12):2282-7.
169. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem (Tokyo)*. 2018;164(4):257-64.
170. Suzuki T, Carrier EJ, Talati MH, Rathinasabapathy A, Chen X, Nishimura R, *et coll.* Isolation and characterization of endothelial-to-mesenchymal transition cells in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2017;314(1):L118-26.
171. Ma Z, Wei K, Yang F, Guo Z, Pan C, He Y, *et coll.* Tumor-derived exosomal miR-3157-3p promotes angiogenesis, vascular permeability and metastasis by targeting TIMP/KLF2 in non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2021;12(9):840.
172. Ma T, Hu Y, Guo Y, Zhang Q. Human umbilical vein endothelial cells-derived microRNA-203-containing extracellular vesicles alleviate non-small-cell lung cancer progression through modulating the DTL/p21 axis. *Cancer Gene Ther*. 2021.
173. Li X, Chen C, Wang Z, Liu J, Sun W, Shen K, *et coll.* Elevated exosome-derived miRNAs predict osimertinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):428.
174. Hisakane K, Seike M, Sugano T, Yoshikawa A, Matsuda K, Takano N, *et coll.* Exosome-derived miR-210 involved in resistance to osimertinib and epithelial-mesenchymal transition in EGFR mutant non-small cell lung cancer cells. *Thorac Cancer*. 2021;12(11):1690-8.
175. Wu S, Luo M, To KKW, Zhang J, Su C, Zhang H, *et coll.* Intercellular transfer of exosomal wild type EGFR triggers osimertinib resistance in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2021;20(1):17.
176. Zhou J-Y, Chen X, Zhao J, Bao Z, Chen X, Zhang P, *et coll.* MicroRNA-34a overcomes HGF-mediated gefitinib resistance in EGFR mutant lung cancer cells partly by targeting MET. *Cancer Lett*. 2014;351(2):265-71.
177. Ma H-P, Kong W-X, Li X-Y, Li W, Zhang Y, Wu Y. miRNA-223 is an anticancer gene in human non-small cell lung cancer through the PI3K/AKT pathway by targeting EGFR. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1549-59.
178. Wang C, Wang S, Ma F, Zhang W. miRNA-328 overexpression confers cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via targeting of PTEN. *Mol Med Rep*. 2018;18(5):4563-70.

179. Kumar V, Yadavilli S, Kannan R. A review on RNAi therapy for NSCLC: Opportunities and challenges. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2021;13(2):e1677.
180. Li F, Wang Y, Chen W-L, Wang D-D, Zhou Y-J, You B-G, *et coll*. Co-delivery of VEGF siRNA and Etoposide for Enhanced Anti-angiogenesis and Anti-proliferation Effect via Multi-functional Nanoparticles for Orthotopic Non-Small Cell Lung Cancer Treatment. *Theranostics*. 2019;9(20):5886-98.
181. Kamrani Moghaddam L, Ramezani Paschepari S, Zaimy MA, Abdalaian A, Jebali A. The inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by hexagonal selenium nanoparticles modified by SiRNA. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(9):321-5.
182. Srikar R, Suresh D, Zambre A, Taylor K, Chapman S, Leevy M, *et coll*. Targeted nanoconjugate co-delivering siRNA and tyrosine kinase inhibitor to KRAS mutant NSCLC dissociates GAB1-SHP2 post oncogene knockdown. *Sci Rep*. 2016;6(1):30245.
183. Ganesh S, Iyer AK, Weiler J, Morrissey DV, Amiji MM. Combination of siRNA-directed Gene Silencing With Cisplatin Reverses Drug Resistance in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2:e110.
184. Gandhi NS, Godeshala S, Koomoa-Lange D-LT, Miryala B, Rege K, Chougule MB. Bioreducible Poly(Amino Ethers) Based mTOR siRNA Delivery for Lung Cancer. *Pharm Res*. 2018;35(10):188.

Table des matières

Liste des abréviations	
État de l'art du sujet de recherche	1
1. Données épidémiologiques.....	1
2. Dépistage	2
3. Diagnostic.....	2
4. Caractéristiques tumorales et champ de cancérisation	3
5. Hétérogénéité du cancer pulmonaire bronchique non à petites cellules.....	6
5.1. Hétérogénéité génomique.....	6
5.2. Les signatures mutationnelles	9
5.3. Hétérogénéité micro-environnementale.....	10
6. Stratégies thérapeutiques.....	15
6.1. La chimiothérapie néo-adjuvante.....	16
6.2. La chimiothérapie adjuvante	16
6.3. Chimiothérapie pour stade avancé (stade IV)	16
6.4. Nouvelles stratégies : les thérapies ciblées	16
7. Thérapeutiques ciblant le micro-environnement tumoral	21
7.1. Ciblage du compartiment vasculaire	21
7.2. L'immunothérapie	21
8. Place des résistances des cellules tumorales aux nouvelles thérapeutiques	24
8.1. Les résistances aux thérapies ciblées	24
9. Les outils de biomarqueage	25
9.1. Les miARN.....	25
9.2. Les cellules tumorales circulantes (CTC).....	27
9.3. L'ADN tumoral circulant	28
9.4. La charge mutationnelle tumorale (<i>Tumor Mutation Burden</i>)	28
10. La place du micro-environnement dans les résistances aux thérapeutiques	29
11. Médecine de précision	30
Matériels et méthodes.....	33

1. Culture cellulaire	33
1.1. Culture des lignées tumorales	33
1.2. Culture des cellules endothéliales	33
1.3. Traitement des cellules endothéliales HUVEC.....	33
2. Tests de chimiosensibilité	34
2.1. Préparation des plaques « mère » et « filles chimio ».....	37
2.2. Transfert des plaques « filles chimio » vers les plaques « filles cellules »	37
2.3. Révélation.....	37
2.4. Analyse	37
3. Test de cytotoxicité (test de survie)	38
4. Test de prolifération	38
5. Test <i>in vitro</i> angiogénique: tubulogenèse.....	39
6. Western Blotting	39
6.1. Extraction et dosage protéique	39
6.2. Migration et transfert.....	40
6.3. Révélation.....	40
7. RT-qPCR.....	40
8. Cytométrie en flux	41
9. Analyses statistiques	41
Résultats.....	43
1. Étude des profils de réponses des lignées tumorales aux chimiothérapies	43
2. Études fonctionnelles de la réponse des cellules endothéliales aux différentes conditions de traitement	46
3. Caractérisation d'une transition EndoMT	49
3.1. Expression protéique des différents marqueurs endothéliaux et mésenchymateux.....	49
3.2. Etude de l'expression géniques modifiée au cours de la transition EndoMT	51
3.3. Etude des marqueurs de surface cellulaire impliqués au cours de la transition EndoMT	53
Discussion.....	55
Bibliographie	63

Table des matières.....75

Table des illustrations.....79

Table des tableaux.....81

Table des illustrations

Figure 1 : Les caractéristiques cancéreuses (" <i>The Hallmarks of Cancer</i> ")	4
Figure 2 : Notion de champ de cancérisation.	5
Figure 3 : Classification moléculaire des cancers bronchiques non à petites cellules - Principales mutations identifiées.	8
Figure 4 : Protéines et voies de signalisation impliquées dans le CBNPC	9
Figure 5 : Représentation schématique des principaux acteurs du micro-environnement tumoral.....	11
Figure 6 : Modifications phénotypiques des cellules endothéliales durant la transition endothélio-mésenchymateuse.	14
Figure 7 : Représentation non exhaustive des thérapies ciblées inhibiteurs de protéines kinase dans le CBNPC	20
Figure 8 : Schéma explicatif temporel des traitements des cellules endothéliales type HUVEC	34
Figure 9 : Représentation schématique du choix des différentes concentrations pour les drogues utilisées au cours des tests de chimosensibilité	36
Figure 10 : Analyse des capacités proliférative des cellules HUVEC suivant les différents traitements. Traitement de cellules endothéliales HUVECs à T0 et T24 heures avec une analyse fonctionnelle après T48 et T72 heures de traitement.	46
Figure 11 : Analyse de la viabilité des cellules HUVEC en contact les différents traitements.....	47
Figure 12 : Analyse des capacités fonctionnelles angiogéniques de cellules HUVEC par test de tubulogenèse.	49
Figure 13 : Analyse par Western Blotting de la protéine endothéliale vWF et mésenchymateuse α -SMA.	51
Figure 14 : Analyse RT-qPCR des gènes codant pour les protéines d'intérêt	52
Figure 15 : Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules marquées pour les protéines d'intérêt	54

Table des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques des lignées tumorales étudiées	33
Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques des chimiothérapies conventionnelles étudiées pour les tests de chimiosensibilité	35
Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques des différents ITK étudiés pour les tests de chimiosensibilité ...	35
Tableau 4 : Récapitulatif des différents anticorps utilisés pour l'analyse en Western Blotting	40
Tableau 5 : Résultats du test de chimiosensibilité des chimiothérapies conventionnelles sur les lignées tumorales A549 et H1755	44
Tableau 6 : Résultats du test de chimiosensibilité des thérapies ciblées (ITK) sur les lignées tumorales A549 et H1755	45

BOURREAU Clara

Optimisation d'un modèle *in vitro* de *testing* pharmacologique prenant en compte le micro-environnement endothélial - études à partir de cellules de cancer bronchique non à petites cellules

RÉSUMÉ

A. Introduction, objectifs

Le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC) fait partie des cancers les plus fréquemment retrouvés dans la population mondiale. L'hétérogénéité mutationnelle du CBNPC, a permis le développement de nouvelles thérapies ciblées en association ou complément des chimiothérapies conventionnelles. Cette hétérogénéité est également retrouvée au sein du micro-environnement tumoral (MET) de plus en plus étudié. Ainsi, le MET participe à la croissance et la dissémination tumorales notamment par les processus d'angiogenèse ou de transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT). Ces derniers peuvent être impliqués dans les phénomènes de résistances. Notre projet se propose d'évaluer la réponse aux traitements des cellules tumorales en prenant en compte leur MET

B. Sujets et Méthodes

Deux lignées cellulaires tumorales de CBNPC (A549 ; H1755) et des cellules endothéliales (HUVECs) ont été sélectionnés pour l'étude. Des inhibiteurs de tyrosine kinase (16 ITK totaux) et chimiothérapies conventionnelles (6 totales) indiqués ou non dans le cancer broncho- pulmonaire ont été choisies. Ces molécules ont été utilisées à des concentrations voisines de leurs aires sous la courbe, En vue d'évaluer l'impact du compartiment endothélial sur la réponse aux différents traitements, la transition endothélio-mésenchymateuse, induite par les milieux conditionnés des cellules tumorales en culture, a été étudiée au travers des expériences de Western blot, cytométrie en flux, et RT-qPCR .

C. Résultats

Les concentrations inhibitrices 50 (CI50) et les pourcentages de viabilité cellulaire de chacune des molécules ont permis d'identifier 6 IT et 4 chimiothérapies conventionnelles capables d'inhiber significativement la prolifération des cellules tumorales des lignées tumorales. De plus, nous avons montré qu'en présence de milieu conditionné isolé des cellules A549 et H1755, une transition endothélio-mésenchymateuse pouvait se mettre en place.

D. Conclusion

Ce projet permet la mise en place de modèles expérimentaux permettant (i) d'apprécier les réponses aux thérapeutiques anti-tumorales et (ii) d'évaluer l'impact des milieux conditionnés sur la mise en place de l'EndoMT. L'ensemble de ces données permettra à termes de proposer des modèles de médecine personnalisée associant une analyse pharmacologique et génomique qui contribuera à améliorer la prise en charge des patients atteints de CBNPC.

Mots-clés : CBNPC, chimiosensibilité, EndoMT, ITK, médecine personnalisée, MET

BOURREAU Clara

Optimization of an *in vitro* model of pharmacological testing considering the endothelial microenvironment- studies using non-small cell lung cancer

A. Introduction, aim

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most common cancers founds in the world population. The mutational heterogeneity of NSCLC has enabled the development of new targeted therapies in combination or complement to conventional chemotherapies. This heterogeneity is also found within the tumor microenvironment (TME) which has been increasingly studied. Thus, TME participates in tumor growth and dissemination, through the process of angiogenesis or endothélio-mesenchymal transition (EndMT) which may be involved in resistance phenomena. The latter can be involved in the phenomena of resistance. Our project proposes to evaluate the reponse to treatments of tumor cells by taking into account their TME.

B. Material and methods

Two tumor cell lines of NSCLC (A549; H1755) and endothelial cells (HUVECs) were selected for the study. Tyrosin kinase inhibitors (16 total TKIs) and conventional chemotherapies (6 total) indicated or not in bronchopulmonary cancer were chosen. These molecules were used at concentrations close to their areas under the curve. To assess the impact of the endothelial compartment on the response to different treatments, the study of the endothélio-mesenchymal transition, induced by conditioned media of tumor cells in culture, was studied by Western blot experiments, flow cytometry, and RT-qPCR on endothelial cells of the HUVECs type.

C. Results

The 50% inhibitory concentration (IC50) and the percentages of cell viability of each of the molecules made it possible to identify 6 TKI and 4 cytotoxic molecules capable of significantly inhibiting the proliferation of tumor cells from A549 and H1755 cell lines studied. In addition, we were able to show that in the presence of conditioned medium isolated from A549 and H1755 cells, an endothélio-mesenchymal transition could take place.

D. Conclusion

This project allows the establishment of experimental models allowing (i) to assess the responses to anti-tumor therapies and (ii) assess the impact of conditioned media on the implementation of EndMT. These data will ultimately allow models of personalized medicine to be offered combining pharmacological and genomic analysis that will help improve the management of patients with NSCLC.

Keywords : chemosensitivity, EndMT, NSCLC, personalized medicine, TKI, TME