



Progress in prostate cancer study: 3D cell culture enables the ex vivo reproduction of tumor characteristics

Victor Tostivint, Claire Racaud-Sultan, Mathieu Roumigué, Michel Soulié, Xavier Gamé, Jean-Baptiste Beauval

► To cite this version:

Victor Tostivint, Claire Racaud-Sultan, Mathieu Roumigué, Michel Soulié, Xavier Gamé, et al.. Progress in prostate cancer study: 3D cell culture enables the ex vivo reproduction of tumor characteristics. La Presse Médicale, 2017, 46 (10), pp.954 - 965. <10.1016/j.lpm.2017.06.014>. <hal-01909570>

HAL Id: hal-01909570

<https://hal.science/hal-01909570v1>

Submitted on 26 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY 4.0 - Attribution - International License

Progrès dans l'étude du cancer de la prostate : la culture cellulaire en trois dimensions reproduit ex vivo les caractéristiques des tumeurs prostatiques

Victor Tostivint¹, Claire Racaud-Sultan², Mathieu Roumigué¹, Michel Soulié¹, Xavier Gamé¹, Jean-baptiste Beauval¹

Disponible sur internet le :

1. Hôpital Rangueil, TSA 50032, 1, avenue du professeur Jean-Poulhès, 31059 Toulouse cedex 9, France
2. IRSO, université de Toulouse, Inserm, Inra, ENVT, UPS, CS 60039, place du docteur Baylac, 31024 Toulouse cedex 3, France

Correspondance :

Victor Tostivint, CHU Rangueil, département d'urologie, andrologie et transplantation rénale, Toulouse, France.
victor.tostivint@hotmail.fr

Résumé

Malgré les progrès thérapeutiques, le cancer de la prostate (CaP) reste un enjeu de santé publique par son incidence et sa mortalité élevée. Les difficultés de la recherche sur le CaP viennent du manque de modèles précliniques in vitro et in vivo capables de reproduire ses caractéristiques. Actuellement, les cultures de lignées cellulaires de CaP in vitro en 2D sont les plus répandues, mais elles ont de nombreuses limites. Elles ne reproduisent pas la morphologie cellulaire, l'architecture tissulaire, et ne reflètent pas l'hétérogénéité tumorale entre les patients et au sein même de la tumeur. De plus, elles sont dépourvues du microenvironnement tumoral et des cellules souches cancéreuses qui sont deux acteurs incontournables du CaP. Les modèles in vivo murins du CaP ne représentent pas le spectre des altérations génétiques de la maladie et ont des difficultés à reproduire le processus métastatique. Par conséquent, la physiologie de ces modèles in vitro et in vivo est extrêmement éloignée de celle des tumeurs prostatiques des patients. Les modèles de culture cellulaire en 3D s'affranchissent de ces limites en partageant les caractéristiques des tumeurs in vivo tout en en gardant la reproductibilité expérimentale des modèles in vitro. Les modèles en 3D du CaP comprennent les sphéroïdes qui dérivent des lignées cellulaires tumorales, et les organoïdes issus des tumeurs primaires ou des métastases du CaP. Dans ces structures, la morphologie cellulaire est conservée, une matrice extracellulaire entoure les cellules et les interactions cellules-cellules et cellules-matrice sont préservées. De plus, les organoïdes conservent les altérations génétiques des tumeurs prostatiques dont ils dérivent et ils permettent l'étude des cellules souches cancéreuses au sein d'un microenvironnement. Les organoïdes ouvrent la perspective de tests thérapeutiques couvrant le large spectre des phénotypes du CaP. Les organoïdes générés à partir de biopsies de patients pourraient de plus, mener vers une médecine personnalisée.

■ Summary

Progress in prostate cancer study: 3D cell culture enables the ex vivo reproduction of tumor characteristics

Despite new therapeutic options, Prostate Cancer (PCa) remains a public health challenge because of its high incidence and mortality. Limits in PCa research come from the lack of in vitro and in vivo models that mimic the human disease. Currently, 2D in vitro tissue culture models of PCa are widely used but they present numerous limits. They do not reproduce cellular morphology, tissue architecture, inter-patients and intratumor heterogeneity. Furthermore, they lack two key components of PCa tumors, the tumoral microenvironment and the cancer stem cells. In vivo murine models of PCa cannot be representative of all the genetic alterations known in prostate tumors and they hardly reproduce the pathophysiology of human metastatic progression. Consequently, the physiology of these in vitro and in vivo models do not well represent patients tumors. 3D cell cultures overcome many of these limits by sharing morphologic characteristics with in vivo tumors as well as reproducibility of in vitro models. 3D models of PCa include spheroids derived from tumor cell lines, and organoids, derived from patient. In 3D cell cultures, cell fitness is maintained, the physiological cells-cells and cell-matrix interactions are restored and an extracellular matrix surrounds the cells. Organoids, generated from PCa primary tumors or metastases, allow studies on cancer stem cells and their microenvironment. Moreover, organoids retain genetic integrity of PCa tumors. PCa organoid model is an innovative tool that offers great perspectives of therapeutic screening. In the future, organoids generated from patients' biopsies may also lead to personalized medicine.

État des lieux

Le cancer de la prostate (CaP) est un enjeu de santé publique dans les pays occidentaux, et notamment en France, par son incidence (53 913 nouveaux cas en 2011 ; 25,6 % de l'incidence des cancers masculins) et sa mortalité élevée (8893 décès en 2011 ; 10,4 % des décès par cancer masculin). La prévalence des patients atteints de CaP augmente avec le vieillissement de la population [1].

Ces dernières années, des progrès majeurs ont été réalisés dans le contrôle de la maladie que ce soit au niveau local, locorégional ou d'emblée métastatique, avec l'amélioration des techniques chirurgicales et de radiothérapie, l'apparition de nouveaux médicaments (notamment ciblant le récepteur ou la biosynthèse de la testostérone), et la possibilité de réaliser des traitements multimodaux. Ainsi, pendant la dernière décennie, le pourcentage de survie relative à 5 ans du CaP a régulièrement augmenté en Europe en passant de 73,4 % en 1999–2001 à 83,4 % en 2005–2007 [2].

Néanmoins la meilleure séquence de traitement des formes métastatiques, responsables de la mortalité des CaP, reste encore discutée. La médiane de survie des patients métastatiques (M+) a récemment été évaluée à 42 mois, pour les patients sous hormonothérapie au long cours et ayant accès aux derniers traitements actifs après échec de l'hormonothérapie de première ligne [3]. Le groupe des patients M+ est particulièrement

hétérogène [4] du fait de cancers agressifs pouvant rapidement évoluer vers des formes résistantes à la castration. Les efforts de recherche actuels portent sur la compréhension des mécanismes biologiques responsables de l'initiation puis de l'hormono-échappement des CaP, avec l'espoir de mettre au point de nouvelles thérapeutiques.

Pour cela, la disponibilité de modèles de laboratoire est d'une importance cruciale. Cependant, l'étude du CaP est rendue difficile par le faible nombre et l'imperfection des modèles précliniques susceptibles de reproduire au mieux les caractéristiques de la pathologie humaine.

Les modèles animaux ont été le fondement de la recherche sur le CaP mais ils ont un intérêt restreint dans l'étude des pathologies humaines car ils souffrent d'importantes limites. Les seuls mammifères non humains connus pour développer spontanément un CaP sont les chiens et les primates [5] [6]. Ces deux modèles sont peu utilisés notamment à cause d'une latence importante dans le développement tumoral. Les modèles expérimentaux chez les rongeurs sont eux largement utilisés pour l'étude des mécanismes de carcinogenèse prostatique. Il s'agit de souris transgéniques avec une expression variable d'oncogènes, de récepteurs hormonaux et de suppresseurs de tumeurs [7] et de rats développant des tumeurs après induction hormonale ou chimique [8]. Malheureusement, si ces modèles animaux permettent d'étudier l'initiation et la progression du CaP,

leur handicap majeur est de ne pas ou peu produire des métastases osseuses, étape critique dans la physiopathologie humaine du CaP [9,10].

Les modèles in vivo de CaP d'origine humaine existent. Il s'agit de transplanter des cellules ou des tissus tumoraux prostatiques issus de patient chez l'animal immunodéprimé : on parle alors de xénogreffe tumorale. Les xénogreffes sont intéressantes car les tumeurs humaines conservent leurs caractéristiques histologiques et génétiques et disposent d'un microenvironnement relativement complet pour se développer. Si certaines xénogreffes, notamment après transplantation orthotopique, montrent une efficacité métastatique [9], la physiopathologie animale rend délicate l'extrapolation clinique de tests thérapeutiques.

Les modèles in vitro actuellement disponibles en routine pour l'étude du CaP sont essentiellement des lignées cellulaires tumorales cultivées en 2D. Ces modèles ne recréent ni l'architecture tissulaire et la diversité environnementale, ni les difficultés du ciblage thérapeutique retrouvées in vivo (pharmacocinétique, biodisponibilité). Souvent, ces lignées ne reflètent pas l'hétérogénéité tumorale entre les patients et au sein même de la tumeur. Ainsi, la biologie de ces modèles peut être extrêmement éloignée de celle des tumeurs chez les patients.

Au sein des tumeurs prostatiques, une sous-population cellulaire mineure, les cellules souches cancéreuses (CSC), est responsable de la carcinogenèse, du développement métastatique et de la résistance thérapeutique [11]. Les CSC sont issues de la transformation maligne des cellules souches adultes de la prostate ou de leurs progéniteurs [12] [13]. Elles ont pour propriétés la capacité de former des colonies in vitro et celle de générer des tumeurs après transplantation chez l'animal. De plus, leurs fonctions de survie, de prolifération et d'invasion sont grandement influencées par le dialogue qu'elles instaurent avec leur environnement. Un modèle d'étude qui prenne en compte le rôle de la cellule souche dans le développement tumoral serait donc le plus approprié [14].

De nouveaux modèles d'étude préclinique du CaP émergent, prenant en compte à la fois la souplesse d'investigation des modèles in vitro et certains éléments critiques de la physiopathologie in vivo tels que l'architecture et le microenvironnement tissulaire. Il s'agit de cultures cellulaires tumorales en 3D formant des sphéroïdes accompagnées ou non de cellules stromales. Parmi ces cultures en 3D, le modèle organoïde semble être le plus pertinent pour l'étude du CaP. En effet, les organoïdes se développent à partir de cellules primaires isolées de patients, grâce aux propriétés de survie et d'auto-renouvellement des cellules souches, et se différencient en respectant la hiérarchie et l'architecture tissulaires. Ainsi, une dérégulation des cellules souches et/ou de leurs progéniteurs dans le CaP produira des organoïdes morphologiquement et fonctionnellement représentatifs de la tumeur in vivo [15].

La mise en place de nouveaux modèles précliniques du CaP est cruciale pour améliorer notre connaissance de la biologie du CaP et réaliser de nouveaux tests thérapeutiques, si possible personnalisés. Cet article pointe les limites des modèles de culture cellulaire classiques, explique l'importance de la prise en compte des cellules souches et de leur microenvironnement et présente les modèles d'avenir dans l'étude du CaP.

Les lignées cellulaires tumorales en 2D : une représentation limitée de l'in vivo

Jusqu'à présent, l'étude du CaP, en particulier en ce qui concerne la découverte de médicaments et les tests précliniques, a été fortement dépendante de l'utilisation de modèles de monoculture en 2D, presque exclusivement basés sur des lignées cellulaires immortalisées (PC-3, DU-145, LNCaP sont les plus utilisées). Les caractéristiques des lignées cellulaires du CaP utilisées en laboratoire ont été largement décrites et leurs propriétés pour mener des recherches spécifiques soigneusement détaillées [16].

Dans ces modèles, les cellules sont cultivées en monocouche à température corporelle sur un support plastique rigide, en présence d'un milieu nutritif supplémenté avec du sérum bovin pour favoriser la croissance cellulaire. La grande force de la monoculture en 2D est la simplicité de sa mise en place, son coût modéré et la reproductibilité des essais et des résultats dans des laboratoires différents.

Cependant, seules une quinzaine de lignées cellulaires de CaP sont établies et disponibles (tableau I), car le rendement d'établissement à partir de matériel tumoral prostatique humain est très faible, de l'ordre de 1 % [17,18]. Surtout, ces lignées ne reproduisent pas toujours les caractéristiques biologiques courantes de la maladie, telles que l'expression du récepteur aux androgènes ou la sécrétion du Prostate Specific Antigen (PSA) [19], ce qui signifie qu'elles ne représentent pas la maladie primitive. Elles sont quasi exclusivement issues de sites métastatiques et ne permettent pas l'étude des voies de signalisation biologiques au sein des tumeurs primaires qui sont responsables de la transformation métastatique et de la résistance à la castration. C'est le cas notamment des lignées PC-3, DU-145 et LNCaP qui sont les plus couramment utilisées en recherche [17]. En dépit d'énormes efforts, seulement trois lignées issues de tumeurs primaires existent (E006AA, HH870, Bob et Serbob) mais elles sont mal documentées et ne donnent pas toujours des tumeurs après implantation chez la souris [20]. Les autres lignées primaires ne sont pas réellement représentatives du CaP car leur phénotype a pu dériver après une greffe chez l'animal (22RV1, ALVA-31, PC 346 C) ou suite à une contamination par d'autres lignées (ALVA-31, 41, 55 et 101, DuPro-1) [19,21] (tableau I).

De même, les lignées cellulaires du CaP qui sont soumises à une sélection clonale par leurs conditions de culture, ont une grande homogénéité cellulaire contrastant avec la tumeur dont elles

TABLEAU I

Lignées cellulaires disponibles pour l'étude du CaP. Les lignées peuvent être classées selon leurs origines, leurs sensibilités aux androgènes, et l'expression de marqueurs retrouvés de façon inconstante dans les tumeurs. D'après NA, Nakouzi [19].

Nom	Origine	Sensibilité aux androgènes	Marqueurs sériques et histologiques	Expression Pten	Expression TMPRSS2-ERG	Tumorigénicité in vivo
PC3	Méta Os	AI, AR-	-	- / Mut	-	+
DU 145	Méta cerveau	AI, AR	PAP	+	-	+
TSU-PR1	Méta Gang	AI, AR	PAP	ND	ND	+
DUPRO-1	Méta Gang	AI, AR	PAP	ND	ND	+
1013 L	ADK Prostate	AI, AR	-	ND	ND	+
ND-1	Dérivée DU-145	AI	PSA + -	+	ND	ND
LNcap	Méta Gang	AS, AR+	PSA, PAP	Mut	-	+
ARCaP	Ascites	AS, AR+	PSA	ND	-	+
MDA-Pca-2a	Méta Os	AS, AR+	PSA	ND	-	+
MDA-Pca-2a	Méta Os	AS, AR+	PSA	ND	-	+
VCap	Méta Os	AS, AR+	PSA	-	+	+
22RV1	XENO CW22 ADK Prostate	AI, AR+	PSA	+	-	+
ALVA-31	Dérivée PC3 ADK Prostate ?	AS, AR+	PSA-PAP	-	ND	ND
PC346 C	Xéno PC-346 ADK Prostate	AI, AR+	PSA	ND	ND	+
Bob	Prostate CRPC	AI, AR-	PAP, PSCA	ND	ND	-
SerBob	Dérivée de Bob	AI, AR-	PAP, PSCA	ND	ND	-
Nci-H 660	Méta Poumon	AI, AR-	PSA	Mut	+	+

AI : androgène-indépendant ; AR : récepteur aux androgènes ; ADK : adénocarcinome ; Méta : métastase ; Mut : muté ; ND : non déterminé ; PSA : Prostate Specific Antigen ; PAP : Phosphatase Acide Prostatique ; Gang : ganglionnaire ; XENO : xénogreffe ; Pten : gène suppresseur de tumeur dont la délétion est souvent associée au CaP ; TMPRSS2-ERG : gène de fusion représentant l'anomalie moléculaire la plus fréquente dans le CaP.

sont issues. Après de nombreux passages (repiquage des cellules pour leur multiplication), les lignées cellulaires deviennent différentes des tumeurs d'origine, avec des changements phénotypiques et génétiques progressifs, responsables de modifications dans la morphologie, la réponse aux stimuli, la croissance, l'expression protéique et la migration cellulaire [22,23].

Les progrès récents en génomique ont permis d'établir un catalogue de lésions génétiques qui sous-tendent la tumorigénèse prostatique [24,25]. Nombre de ces altérations (mutation SPOP, mutation FOXA1, perte de CHD1...) ne sont pas présentes dans les lignées disponibles en 2D. En outre, dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC), la pression thérapeutique peut conduire à significativement augmenter l'hétérogénéité cellulaire [26] et un grand répertoire de lignées CPRC serait nécessaire pour représenter les différents mécanismes de résistance. Le modèle de culture cellulaire classique en 2D ne permet pas l'obtention de ce répertoire

de lignées cellulaires du CaP primaire et métastatique dont la recherche a besoin.

La limite, peut-être principale, des cultures classiques est leur conformation spatiale qui les éloigne de l'in vivo. Les cellules cultivées de façon plane constituent un modèle idéalisé, simplifié, où toutes les cellules ont accès aux nutriments, à l'oxygène, et sont en contact avec les drogues présentes dans le milieu. Par exemple, l'hypoxie n'est pas prise en compte dans la culture in vitro classique. Or, l'hypoxie est une des caractéristiques des tumeurs solides, et ses conséquences (expression des gènes dépendant de l'hypoxie) contrôlent le métabolisme, la survie, la prolifération, l'invasion et la sensibilité thérapeutique tumorale [27]. Aussi, dans les cultures monocouches, le gradient de diffusion des drogues au sein de la tumeur n'est pas retrouvé ; toutes les cellules étant exposées, in vitro, à la même concentration de principe actif. En outre, il est désormais établi que le comportement cellulaire en 2D est altéré avec des différences de morphologie, polarité, différenciation, interaction avec la

matrice extracellulaire (MEC), par rapport à ce qui est observé in vivo [28]. Ces notions sont particulièrement importantes au regard de l'étude des CSC du CaP car les conditions de culture en 2D ne sont pas favorables à la maintenance du phénotype souche et de la hiérarchie tissulaire.

Enfin, l'absence de microenvironnement dans les modèles en 2D est un souci majeur pour le développement et la propagation de lignées tumorales. In vivo, le microenvironnement des CSC participe activement à leur survie et à leur prolifération, donc à la maintenance tumorale [29]. Les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement sont permanentes, et permettent la progression puis la dissémination tumorales [30]. Des différences importantes dans la régulation de kinases telles que la Focal Adhesion Kinase ou de facteurs transcriptionnels tels que c-Myc, qui sont particulièrement impliqués dans le dialogue de la cellule avec son environnement, ont été mises en évidence entre les conditions de culture 2D et 3D ou in vivo [31]. En conséquence, des cellules tumorales cultivées en 2D montrent un taux de prolifération anormalement élevé par rapport à celui qui est observé en 3D ou in vivo [32]. Ainsi, les contacts adhésifs et les sécrétions paracrines du stroma jouent un rôle majeur dans « l'identité » tumorale et doivent être pris en compte dans les modèles précliniques.

Les CSC et le microenvironnement tumoral : deux incontournables de la physiopathologie du CaP

La mise en place de nouveaux modèles d'étude précliniques suppose une bonne connaissance de deux acteurs clefs de la physiopathologie du CaP, les CSC et le microenvironnement.

Les CSC

Deux modèles principaux permettent d'expliquer l'hétérogénéité des cancers solides :

- le modèle stochastique (ou théorie clonale), où toute cellule même différenciée peut, à la suite de changements épigénétiques répétés et/ou génétiques, proliférer de façon indéfinie et former un clone tumoral. Le clone le plus agressif et le plus apte à survivre étant sélectionné lors de la progression tumorale [33] ;
- le modèle des CSC, où suite à la dérégulation des voies de signalisation qui contrôlent leur survie, leur prolifération et leur différenciation, les cellules souches ou leurs progéniteurs précoces donnent naissance à des cellules anormales, caractérisées par un fort potentiel de prolifération (d'emblée ou après un second évènement oncogénique) et un blocage de différenciation : les CSC. Dans ce modèle, une certaine hiérarchie tissulaire est conservée puisque les CSC donnent naissance à toutes les autres cellules tumorales et sont les seules à avoir la capacité de générer la tumeur après transplantation chez l'animal [34].

Cependant ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs (figure 1) [35]. Dans le CaP, il est probable que les CSC soient à l'initiation du développement pré-tumoral et soient responsables de la rechute post-thérapie [36] ; alors que dans un stade plus avancé, un clone dérivant d'une CSC avec des capacités proliférative et invasive accrues pourrait dominer. Ainsi, au stade pré-tumoral, les modifications épigénétiques et les mutations oncogéniques s'accumuleraient dans des cellules souches dites précancéreuses avant qu'un phénotype cancéreux émerge visiblement. Nécessairement, ces phénomènes sont lents, en raison de la quiescence relative des cellules souches, expliquant une progression lente et la découverte tardive des CaP [36,37].

Le microenvironnement tumoral et la niche des CSC

L'épithélium prostatique est entouré par un stroma, principalement composé de cellules musculaires lisses et d'une MEC. Les autres cellules stromales sont les fibroblastes, les cellules immunitaires, et les cellules endothéliales. Cet ensemble constitue le microenvironnement de la prostate [38].

Plus spécifiquement, le microenvironnement des cellules souches de la prostate ou niche, se situe au niveau de la membrane basale. À ce niveau, les cellules souches expriment fortement l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ permettant l'ancrage au collagène et développent une interaction hétérotypique avec le compartiment stromal sous-jacent dont notamment les fibroblastes [39,40].

Les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation (figure 1) des CS normales et cancéreuses sont contrôlées par des facteurs provenant de la niche. Les facteurs extrinsèques fournis par la niche, associés aux molécules contenues dans les progéniteurs eux-mêmes, ont une incidence clé sur les décisions de développement tels que la division symétrique ou asymétrique [39].

Il est probable qu'une des classes de mutations conductrices dans le CaP confère aux CS une indépendance vis à vis de leur niche et la capacité de la modifier à leur avantage [35]. La niche stromale est alors incompetente dans le contrôle de la division des CS (orientation symétrique ou asymétrique, fréquence) favorisant leur multiplication, transformation, puis leur dissémination [41].

D'autres interactions entre les cellules du stroma et l'épithélium prostatique ont un rôle dans le développement de la tumorigenèse. Par exemple, les cellules immunitaires au travers des réactions inflammatoires agissent dans le CaP. Des preuves croissantes montrent que l'inflammation chronique prostatique favorise la carcinogenèse, en perturbant la réponse immunitaire et la régulation du microenvironnement [42,43]. Il a également été démontré que les fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) ont un phénotype particulier [44,45] et sont capables de stimuler la transformation tumorale d'un épithélium prostatique sain, ce dont ne sont pas capables les fibroblastes normaux [46]. Quant au rôle de l'angiogenèse dans le CaP, son implication

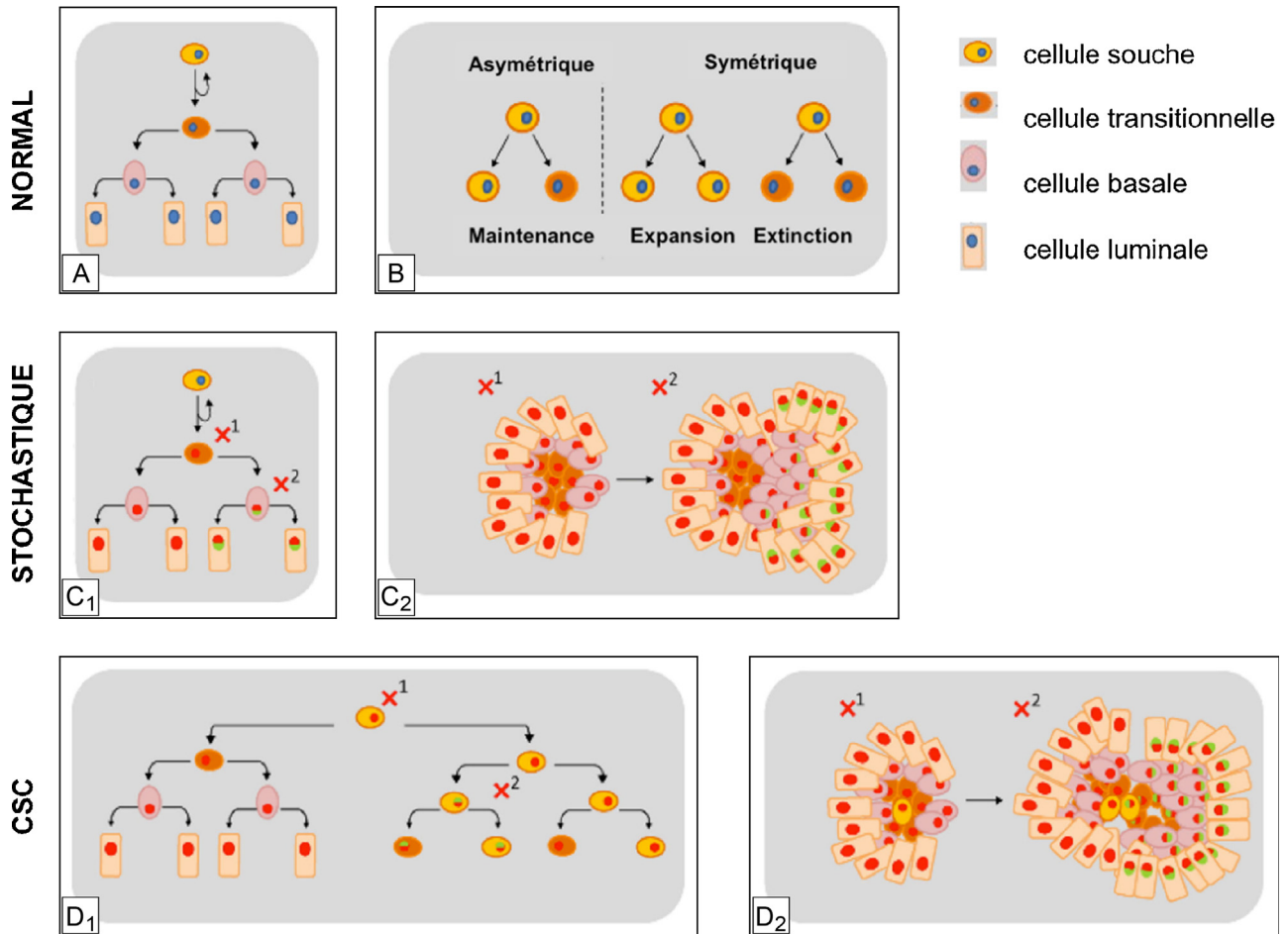


FIGURE 1

Hiérarchie des cellules épithéliales prostatiques : mode de division des cellules souches normales et les modèles stochastiques/CSC du CaP. D'après JR Packer et NJ Maitland [35]

A. À partir d'une cellule souche (CS) pouvant s'auto-renouveler, les cellules luminales (CL) sont formées après les étapes progressives d'amplification et de différenciation des cellules transitionnelles (CT) et basales (CB). B. Résultats de la division des CS. 95 % de la division se produit asymétriquement, maintenant le pool des CS et la lignée des cellules épithéliales. Les 5 % des divisions restantes sont symétriques, entraînant soit l'expansion ou l'extinction de la population des CS. C. Modèle stochastique d'hétérogénéité tumorale. En C1, la mutation x1 transforme une CT qui produit alors un champ de CB plus différencié. La seconde mutation est engagée dans une CB qui ne peut propager la mutation x2 que dans la population de CB et CL. Les mutations sont supposées conférer une capacité d'auto-renouvellement de sorte que les cellules cancéreuses ne sont pas perdues par la progression à travers la lignée de cellules épithéliales, chaque cellule cancéreuse ayant un potentiel tumorigène à peu près égale dans ce modèle d'évolution clonale d'un champ de cancérisation. C2-Schéma d'une tumeur représentant la lignée épithéliale du modèle stochastique C1. D. Modèle des CSC. L'hypothèse est que seul la CSC a le potentiel de générer une tumeur. La mutation x1 dans la CS crée une lignée tumorale dérivée de cette CSC. La mutation x2 représente une fusion des modèles stochastiques et CSC, montrant que les deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. Ici, après division symétrique de la CSC, une deuxième mutation x2 survient dans une CSC, produisant un variant tumoral génétiquement/épigénétiquement différent de la première lignée de CSC. D2-Schéma d'une tumeur représentant la lignée du modèle D1 de CSC

spécifique dans le développement et la progression tumorale n'est pas encore clairement établie [47].

Ainsi, un modèle in vitro pertinent d'étude du CaP doit absolument prendre en compte le micro environnement, ou au moins les éléments de la niche, d'une part pour s'assurer du maintien des CSC et d'autre part, parce que des thérapies anticancéreuses prometteuses ciblent désormais le stroma, l'immunité et la vascularisation tumorale.

Culture cellulaire en 3D : une évolution majeure

Les modèles de culture cellulaire en 3D des tumeurs solides ont aujourd'hui "le vent en poupe" avec des publications afférentes augmentant de façon exponentielle depuis les années 2000 [48].

Les raisons principales de ce succès tiennent au fait que la culture en 3D s'affranchit d'un grand nombre des limites de

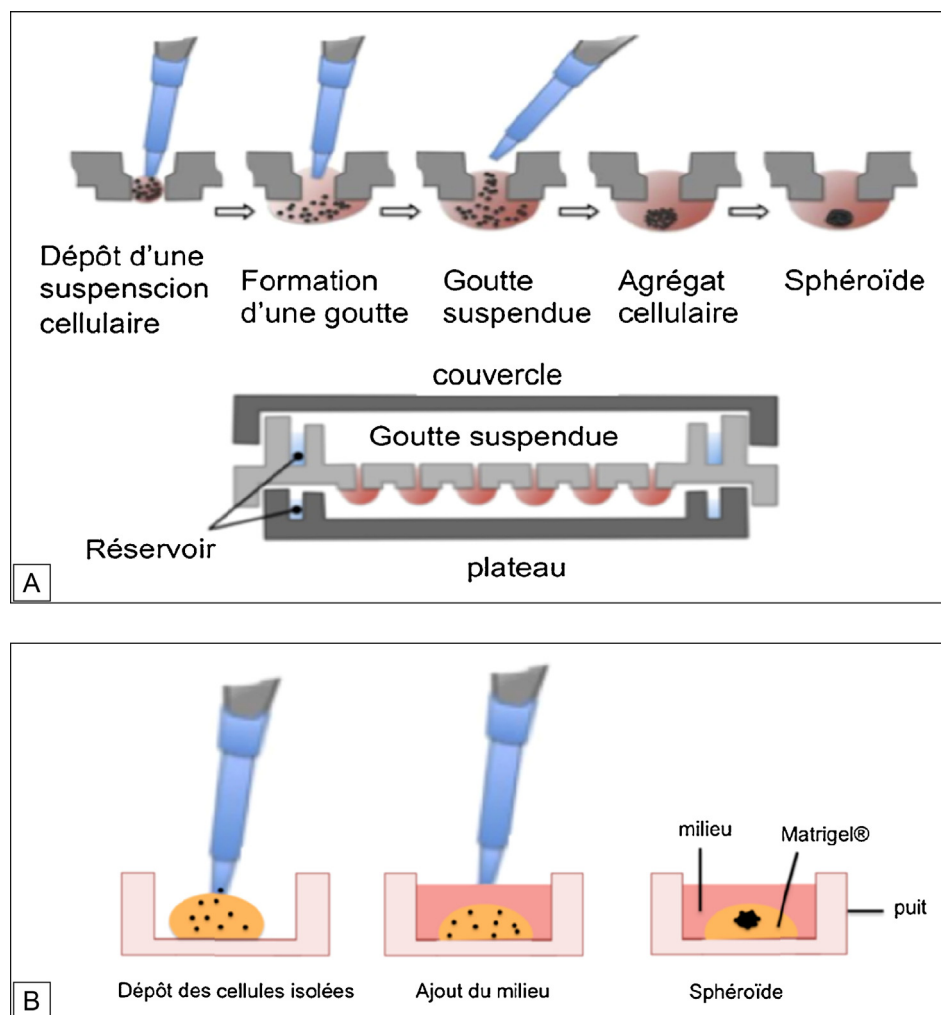


FIGURE 2

Principales techniques de culture cellulaire en 3D

A. Méthode de la goutte suspendue où les cellules s'agrègent pour former des sphéroïdes. B. Culture au sein d'une matrice d'hydrogel (ex : Matrigel®), où seules les cellules souches et progénitrices vont spontanément s'organiser, se polariser et proliférer pour former des sphéroïdes

la culture en 2D : les CSC y sont enrichies, la hiérarchie et l'architecture tissulaires respectées, récapitulant les interactions cellule-cellule et cellule-matrice in vivo [49]. De plus, il est possible de réaliser des co-cultures avec les cellules stromales rapprochant au mieux ce modèle in vitro de l'in vivo [50] [51]. Plusieurs techniques ont été mises au point pour générer des cultures cellulaires en 3D.

Cultures 3D sans support

Cultures 3D sans support, par la méthode de la goutte suspendue (figure 2A), par centrifugation des puits de culture ou par méthode microfluidique, où les cellules épithéliales isolées s'agrègent les unes aux autres dans leur milieu de culture par des moyens physiques.

Cultures 3D au sein d'un support

Le support le plus courant est une matrice d'hydrogel dérivé de l'animal. Au sein de cette matrice, les cellules souches et progénitrices isolées vont spontanément s'organiser, se polariser et proliférer sous forme de sphère. La maintenance de ce type de culture est basée sur les propriétés de survie et d'auto-renouvellement des cellules souches qui permettent une régénération cellulaire au long cours [52]. La matrice d'hydrogel la plus utilisée provient d'un extrait du sarcome murin Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), il s'agit du Matrigel (Matrigel hESC-qualified Matrix, BD Biosciences). Elle est composée des molécules de la MEC reproduisant une membrane basale native, [53] [54] (laminine, collagène de type IV, entactine et héparane sulfate), associées à des facteurs de croissance du stroma (TGF beta, le FGF, l'IGF

et le PDGF) reproduisant la niche favorable à la maintenance des CS [55] (figure 2B). Des efforts de recherche permanents ont lieu pour améliorer ces supports qui peuvent être purement biologiques comme le Matrigel ou bien créer à partir de polymères synthétiques [56].

Cultures dites organotypiques ou histotypiques de prostate

Elles consistent à prélever un fragment d'épithélium prostatique et à le cultiver directement, là encore sur un support mimant le stroma, mais sans dissociation cellulaire. Ces modèles partent directement d'un fragment glandulaire prostatique (ce qui les différencie des modèles sus-cités où l'architecture est recrée à partir des cellules souches) et permettent de préserver son histologie plusieurs jours voire semaines en primoculture [57,58]. On peut ainsi étudier la survie, la différenciation et les interactions au sein de l'épithélium prostatique et le stroma. Par contre, le maintien à long terme de ces cultures en conservant leur architecture par la réalisation de passage est impossible. Ces cultures ne sont donc pas utilisables pour des tests thérapeutiques à large échelle. Les cultures de sphéroïdes tumoraux multicellulaires (STM) par agrégation cellulaire dans une goutte suspendue ou par polarisation dans une matrice d'hydrogel biologique sont les plus utilisées, du fait de leur relative simplicité de mise en oeuvre et la possibilité de faire des cultures à grande échelle (figure 2).

Sphéroïdes tumoraux multicellulaires (STM)

Les STM ou tumosphères sont des structures pleines, organisées, constituées de cellules en plusieurs couches, un peu à l'image d'une « micro-tumeur ». Les sphéroïdes multicellulaires peuvent être obtenus à partir de lignées cellulaires initialement établies en 2D (tableau 1) ou à partir de cellules primaires de patient. Dans ce dernier cas, les structures dérivent des cellules souches du patient et sont appelées organoïdes. Les STM sont des modèles particulièrement efficaces de culture 3D, notamment pour la reproduction des tumeurs solides du cerveau (neurosphère [59]), du sein (mammosphère [60]), ou de la prostate (prostasphère [61-63]). Leur structure imite les tumeurs avasculaires et les micrométastases, et présentent les caractéristiques d'hypoxie intra-tumorale et de gradient d'accès aux nutriments [64] qui sont fondamentales pour la progression tumorale et la résistance thérapeutique.

Les STM ont montré la supériorité de la culture 3D sur la 2D dans le CaP. Les lignées métastatiques prostatiques (DU 143, PC3 et LNCaP) cultivées en 3D montrent plus de cohérence avec les observations des métastases in vivo concernant la prolifération cellulaire, la reprogrammation épigénétique, l'expression protéique et l'adaptation métabolique [61]. Aussi, la lignée LNCaP cultivée en 3D montre un profil d'expression génique différent de la lignée en 2D mais tout à fait comparable à la tumeur développée chez la souris greffée [63].

Les STM peuvent être associés aux cellules stromales dans des modèles de co-culture, permettant l'étude des interactions paracrines entre le microenvironnement et les cellules du CaP [65].

Les organoïdes de CaP : le modèle idéal ?

Les organoïdes sont un modèle particulier de sphéroïdes reposant uniquement sur les CS d'organe de patients (et non pas sur des lignées cellulaires tumorales établies). Seules les CS et leurs progéniteurs sont capables de survivre, proliférer, puis se différencier dans le Matrigel pour donner des organoïdes [52,66]. Les organoïdes cancéreux prostatiques dérivent ainsi directement des CSC de tumeurs prostatiques de patients. Étant donné le rôle clef des CSC dans la physiopathologie du CaP [14,35,67], le modèle organoïde est le plus adapté pour les étudier et progresser dans leur ciblage thérapeutique.

Les travaux de Karthaus et al. [68] sur la génération et la culture d'organoïdes sains de prostate ont jeté les bases permettant cette culture. Leurs recherches ont montré que les organoïdes se différencient (figure 3A) et expriment un récepteur aux androgènes fonctionnel, avec une réponse physiologique comparable aux glandes prostatiques en présence d'androgène. Ces organoïdes sont stables génétiquement après plusieurs passages et capables de reconstituer une glande prostatique après greffe chez la souris.

Partant de ces observations, Gao et al. [15] sont parvenus à générer sept lignées d'organoïdes tumoraux à partir de biopsies de métastases de patients ayant un cancer prostatique résistant à la castration (CPRC) ou de cellules tumorales circulantes. Ces organoïdes avaient génétiquement les caractéristiques des différents sous-types de CaP dont ils étaient issus. Le gène de fusion TMPRSS2-ERG, la mutation SPOP, la surexpression de SPINK1, et la perte de CHD1 étaient tous représentés ; tout comme les mutations de FOXA 1, PIK3R1 et celles des voies de réparation de l'ADN et de la chromatine. La perte de PTEN et de p53 était également incluse. Les organoïdes étaient histologiquement représentatifs de la tumeur en étant capables de restituer son histologie après greffe chez la souris (figure 4). Ces lignées d'organoïdes tumoraux étaient génétiquement stables dans le temps, présentaient une expression du récepteur aux androgènes concordant à leur profil génétique, et enfin avaient une réponse aux traitements anti-tumoraux in vitro concordante avec celle observée in vivo.

L'avancée majeure du travail de Gao et al. [15] fut la mise au point d'un milieu de culture assurant la propagation indéfinie des cellules prostatiques bénignes ou malignes, sans nécessité d'une transformation artificielle, sans dérive génétique, et avec un taux de réussite élevé. Cette technologie permettra la constitution pour la première fois d'une banque cellulaire à grande échelle de CaP. Le répertoire de ces organoïdes offrira prochainement la possibilité de réaliser des tests thérapeutiques in vitro

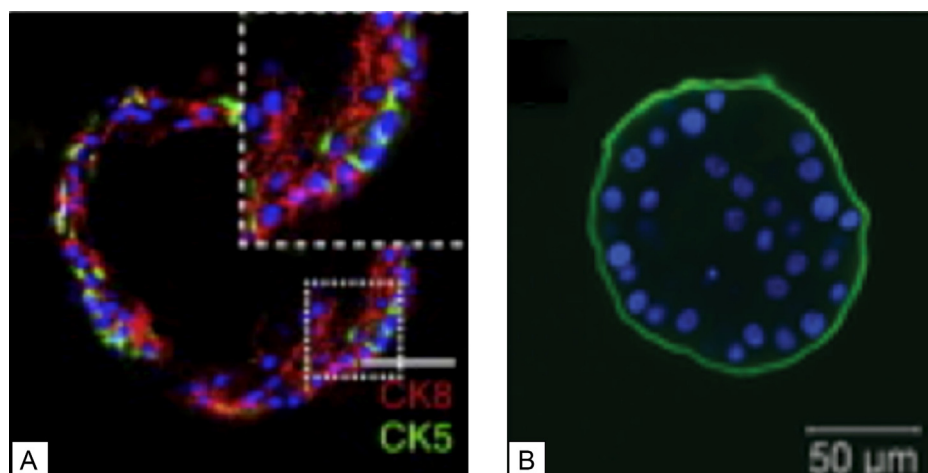


FIGURE 3

Immunomarquage en fluorescence des marqueurs de différenciation cellulaire et de la membrane basale d'organoides prostatiques humains sains

A. Cytokératine 5 (CK5) marqueur des cellules basales en vert ; Cytokératine 8 (CK8) marqueur des cellules luminales en rouge. D'après Karthus WR et al. (65). B. Laminine beta 1 marqueur de la membrane basale de l'organoïde en vert. D'après Harma V et al. [53]

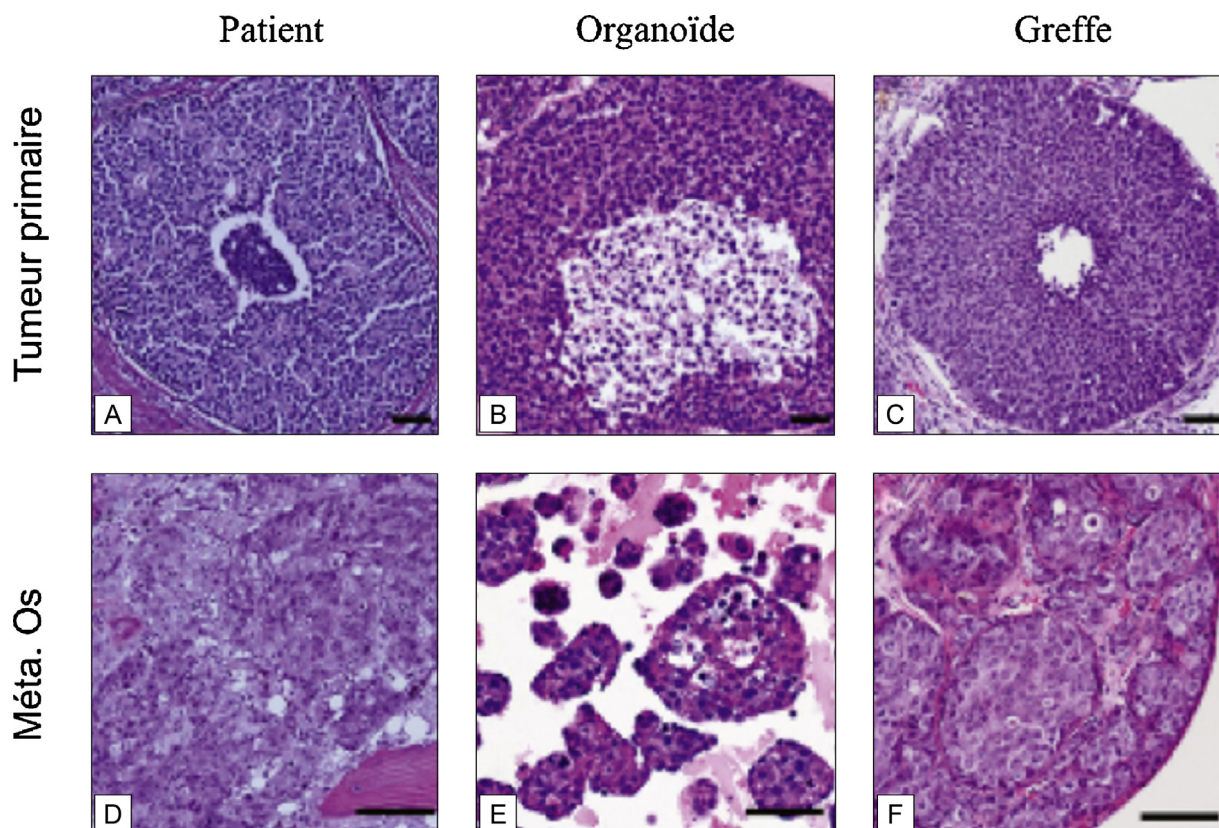


FIGURE 4

Histologie de CaP in situ, de l'organoïde, de la xénogreffe chez la souris, après coloration H&E. D'après Gao et al. [15]

A. H & E de tumeur prostatique primaire de patient. B. H&E d'organoïde issu de la tumeur primaire. C. H & E d'une xénogreffe sous cutanée d'organoides de tumeur primaire. D. H & E d'une métastase osseuse de CaP. E. H & E d'organoides issus de la métastase osseuse. F. H & E d'une xénogreffe sous cutanée d'organoides de métastase osseuse

à haut débit à travers le spectre hétérogène du CaP. Afin de maximiser l'utilisation des organoïdes, y compris l'identification de bio-marqueurs de la réponse thérapeutique, il est essentiel que, pour chaque lignée d'organoïde, les caractéristiques cliniques, histologiques, moléculaires, et de réponse au traitement du patient soient renseignées.

Désormais, les effets de différents traitements couramment utilisés en pratique clinique sont testés sur des organoïdes cancéreux prostatiques [69]. La corrélation entre les réponses effectives des patients aux traitements et les réponses in vitro de leurs organoïdes n'est pas encore connue et devra faire l'objet d'une étude clinique. L'objectif sera de valider la valeur prédictive des organoïdes pour tester l'efficacité de traitements cliniques. Les résultats d'une telle étude pourraient, à terme, orienter les choix thérapeutiques des cliniciens et mener vers une médecine personnalisée. En outre, les organoïdes cancéreux prostatiques, co-cultivés ou non avec les cellules stromales, devraient permettre de progresser au niveau des outils diagnostiques et thérapeutiques avec l'identification de nouvelles mutations et l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques.

Conclusion

Les modèles de culture cellulaire en 3D ont clairement pris le pas sur la culture classique en 2D. Il n'est plus concevable pour l'étude du cancer et le test de thérapies anti-tumorales de ne pas prendre en compte l'architecture tissulaire, le microenvironnement et le rôle des CSC. Le modèle qui prend le mieux en compte ces facteurs clés de la tumeur est le modèle organoïde. Les récents progrès techniques ont permis, pour la première fois et de façon fiable, la culture d'organoïdes cancéreux prostatiques à partir de prélèvements de patients. Cette perspective offre la possibilité très intéressante de tests thérapeutiques à haut débit couvrant le large spectre des phénotypes du CaP. Les organoïdes générés à partir de biopsies de patients permettront la réalisation de tests thérapeutiques ex vivo et une adaptation spécifique du traitement à l'individu. La médecine personnalisée deviendra une réalité avec des résultats cliniques améliorés et une diminution de la morbidité chez les patients à un stade avancé du CaP.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] ETKFRANCE16 Institut National Du Cancer Les cancers en France 2016. [cité : 14 juill 2016 ; disponible sur : <http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-Edition-2015>].
- [2] De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. *Lancet Oncol* 2014;15(1):23-34.
- [3] James ND, Spears MR, Clarke NW, Dearnaley DP, De Bono JS, Gale J, et al. Survival with newly diagnosed metastatic prostate cancer in the control arm of the STAMPEDE trial (MRC PR08CRUK/06/019). *Eur Urol* 2015;67(6):1028-38.
- [4] Glass TR, Tangen CM, Crawford ED, Thompson I. Metastatic carcinoma of the prostate: identifying prognostic groups using recursive partitioning. *J Urol* 2003;169(1):164-9.
- [5] Mubiruj N, Hubbard GB, Dick EJ, Furman J, Troyer DA, Rogers J. Nonhuman primates as models for studies of prostate specific antigen and prostatic diseases. *Prostate* 2008;68(14):1546-54.
- [6] LeRoy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet J* 2009;180(2):149-62.
- [7] Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, Rubin MA, et al. Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 2004;64(6):2270-305.
- [8] Blouin S, Baslé MF, Chappard D. Rat models of bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 2005;22(8):605-14.
- [9] Wu X, Gong S, Roy-Burman P, Lee P, Culig Z. Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(4):R155-70.
- [10] Cunningham D, You Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* 2015;2(1) [cité: 22 avril 2016] ; disponible sur : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487886/>.
- [11] Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 1990;42(9):1213-8.
- [12] Rhim JS, Li H, Furusato B. Novel human prostate epithelial cell culture models for the study of carcinogenesis and of normal stem cells and cancer stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2011;720:71-80.
- [13] Miki J, Rhim JS. Prostate cell cultures as in vitro models for the study of normal stem cells and cancer stem cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008;11(1):32-9.
- [14] Signoretti S, Loda M. Prostate stem cells: from development to cancer. *Semin Cancer Biol* 2007;17(3):219-24.
- [15] Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014;159(1):176-87.
- [16] van Bokhoven A, Varela-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 2003;57(3):205-25.
- [17] Fizazi K, Navone NM. Modèles précliniques de cancer de la prostate. *Bull Cancer* 2005;92(2):129-41.
- [18] Sramkoski RM, Pretlow TG, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, et al. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35(7):403-9.
- [19] Al Nakouzi N. Établissement d'un nouveau modèle préclinique de cancer de la prostate et identification de biomarqueurs de résistance au docétaxel. *Cancer. Université Paris Sud-Paris XI*, 2011. Français.
- [20] Attard G, Rizzo S, Ledaki I, Clark J, Reid AHM, Thompson A, et al. A novel, spontaneously

- immortalized, human prostate cancer cell line, Bob, offers a unique model for pre-clinical prostate cancer studies. *Prostate* 2009;69(14):1507-20.
- [21] Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines-part 1. *J Urol* 2005;173(2):342-59.
- [22] Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;62(5-6):391-9.
- [23] Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep* 2004;24(6):631-9.
- [24] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;18(1):11-22.
- [25] Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013;153(3):666-77.
- [26] Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castrate resistant prostate cancer. *Nature* 2012;487(7406):239-43.
- [27] Noman MZ, Janji B, Kaminska B, Van Moer K, Pierson S, Przanowski P, et al. Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res* 2011;71(18):5976-86.
- [28] Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 2012;125(13):3015-24.
- [29] Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(1):11-21.
- [30] Taylor RA, Risbridger GP. Prostatic tumor stroma: a key player in cancer progression. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8(6):490-7.
- [31] Levinger I, Ventura R. Life is three dimensional—as in vitro cancer cultures should be. *Advances in cancer research* 2014;121:383-414 [cité: 1 juin 2016 ; disponible sur : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002490000093>].
- [32] Chignola R, Schenetti A, Andrighetto G, Chiesa E, Foroni R, Sartori S, et al. Forecasting the growth of multicell tumour spheroids: implications for the dynamic growth of solid tumours. *Cell Prolif* 2000;33(4):219-29.
- [33] Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Fedor H, Heaphy CM, Walker DA, et al. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *J Clin Invest* 2013;123(11):4918-22.
- [34] Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65(23):10946-51.
- [35] Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016.
- [36] Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8(10):755-68.
- [37] Calabrese P, Tavaré S, Shibata D. Pretumor progression: clonal evolution of human stem cell populations. *Am J Pathol* 2004;164(4):1337-46.
- [38] Ellem SJ, De-Juan-Pardo EM, Risbridger GP. In vitro modeling of the prostate cancer micro-environment. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:214-21.
- [39] Blum R, Gupta R, Burger PE, Ontiveros CS, Salm SN, Xiong X, et al. Molecular signatures of the primitive prostate stem cell niche reveal novel mesenchymal-epithelial signaling pathways. *PLoS One* 2010;5(9).
- [40] Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, Neal DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on $\alpha 2 \beta 1$ -integrin expression). *J Cell Sci* 2001;114(21):3865-72.
- [41] Chung LWK, Baseman A, Assikis V, Zhou HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol* 2005;173(1):10-20.
- [42] Taverna G, Pedretti E, Di Caro G, Borroni EM, Marchesi F, Grizzi F. Inflammation and prostate cancer: friends or foe? *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc* 2015;64(5):275-86.
- [43] De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):256-69.
- [44] Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999;59(19):5002-11.
- [45] Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432(7015):332-7.
- [46] Clark AK, Taubenberger AV, Taylor RA, Niranjana B, Chea ZY, Zotenko E, et al. A bioengineered microenvironment to quantitatively measure the tumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in human prostate cancer. *Biomaterials* 2013;34(20):4777-85.
- [47] Russo G, Mischi M, Scheepens W, De la Rosette JJ, Wijkstra H. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJU Int* 2012;110(11c):E794-808.
- [48] CELNYS Differences between 3D and 2D cell culture. [cité: 30 décembre 2015 ; disponible sur : <http://www.celenys.com/3d-versus-2d/>].
- [49] Hynds RE, Giangreco A. The relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells Dayt Ohio* 2013;31(3):417-22.
- [50] 3D cell culture: just the facts 3D vs 2D cell culture [Internet]. [cité: 13 janvier 2016 ; disponible sur : http://3dcellculture.com/Just_The_Facts_3D_vs_2D_Cell_Culture].
- [51] Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha R, Solomon EFDP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J Cell Physiol* 2015;230(1):16-26.
- [52] Tang DG, Patrawala L, Calhoun T, Bhatia B, Choy G, Schneider-Broussard R, et al. Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. *Mol Carcinog* 2007;46(1):1-14.
- [53] Härmä V, Virtanen J, Mäkelä R, Happonen A, Mpindi J-P, Knuutila M, et al. A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth invasion and drug responses. *PLOS One* 2010;5(5):e10431.
- [54] Kleinman HK, Martin GR, Matrigel. basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005;15(5):378-86.
- [55] Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J, Matrigel. From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;79-80:3-18.
- [56] Bäckér A, Erhardt O, Wietbrock L, Schel N, Göppert B, Dirschka M, et al. Silk scaffolds connected with different naturally occurring biomaterials for prostate cancer cell cultivation in 3D: BÄCKER, et al. Breslau K, editor. *Biopolymers* 2017;107(2):70-9.
- [57] Papini S, Rosellini A, Campani D, DeMatteis A, Selli C, Revoltella RP. Selective growth of epithelial basal cells from human prostate in a three-dimensional organ culture. *Prostate* 2004;59(4):383-92.
- [58] Parrish AR, Sallam K, Nyman DW, Orozco J, Cress AE, Dalkin BL, et al. Culturing precision-cut human prostate slices as an in vitro model of prostate pathobiology. *Cell Biol Toxicol* 2002;18(3):205.
- [59] Jiguet Jiglaire C, Baeza-Kalle N, Denicolai E, Baretts D, Metellus P, Padovani L, et al. Ex vivo cultures of glioblastoma in three-dimensional hydrogel maintain the original tumor growth behavior and are suitable for preclinical drug and radiation sensitivity screening. *Exp Cell Res* 2014;321(2):99-108.
- [60] Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiaperio-Stanke L, et al. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10(3):R52.
- [61] Windus LCE, Kiss DL, Glover T, Avery VM. In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer. *Exp Cell Res* 2012;318(19):2507-19.
- [62] Hedlund TE, Duke RC, Miller GJ. Three-dimensional spheroid cultures of human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1999;41(3):154-65.

V. Tostivint, C. Racaud-Sultan, M. Roumigué, M. Soulié, X. Gamé, J- Beauval

- [63] Takagi A, Watanabe M, Ishii Y, Morita J, Hirokawa Y, Matsuzaki T, et al. Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. *Anticancer Res* 2007;27(1A):45-53.
- [64] Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010;148(1):3-15.
- [65] Fang X, Sittadjody S, Gyabaah K, Opara EC, Balaji KC. Novel 3D Co-Culture Model for Epithelial-Stromal Cells Interaction in Prostate Cancer. *PLOS One* 2013;8(9):e75187.
- [66] Rybak AP, He L, Kapoor A, Cutz J-C, Tang D. Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Res* 2011;1813(5):683-94.
- [67] Jaworska D, Król W, Szliszka E. Prostate cancer stem Cells: research advances. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):27433-49.
- [68] Karthaus WR, Iaquinia PJ, Drost J, Gracanin A, van Boxtel R, Wongvipat J, et al. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 2014;159(1):163-75.
- [69] Vela I, Chen Y. Prostate cancer organoids: a potential new tool for testing drug sensitivity. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015;15(3):261-3.