

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE – LILLE 2

FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2014

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN SCIENCES**

**Evaluation de combinaisons thérapeutiques ciblées en cancérologie
des voies aérodigestives supérieures.
Mise au point d'un modèle tumoral *in vivo*.**

Présentée et soutenue publiquement le 19 septembre 2014

Par François MOUAWAD

Jury

Président : Monsieur le Professeur Jacques ROBERT

Assesseurs : Madame le Professeur Beatrix BARRY

Monsieur le Professeur Emmanuel BABIN

Madame le Docteur Amélie LANSIAUX

Co-encadrant : Monsieur le Docteur Samuel MEIGNAN

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Dominique CHEVALIER

A Monsieur le Professeur Robert, université de Bordeaux,

Je vous remercie d'accepter de juger cette thèse et d'en présider le jury. Par votre participation aux comités de suivi de thèse, vous m'avez permis d'orienter ce travail dans une continuité scientifique logique. Par le prêt de certaines lignées cellulaires, nous avons pu poursuivre de façon plus approfondie les travaux sur les souris. Je vous exprime à travers ce travail ma plus profonde reconnaissance pour votre participation et cela malgré la distance.

A Madame le Professeur Barry, université de Paris VII,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Vous avez au cours de ces 3 années pu évaluer de façon progressive, lors des comités de suivi de thèse, le contenu de ce travail. Vos avis précieux m'ont été d'une grande aide. Soyez certaine de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Babin, service d'ORL université de Caen,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse malgré la distance. Vos enseignements et vos conseils au cours des différentes réunions de l'inter région ont guidé mon apprentissage de l'ORL. Votre soutien au cours des présentations théoriques et cliniques a été précieux. Vos conseils toujours judicieux me guident dans mon travail. Votre profonde implication dans les travaux scientifiques au sein de votre laboratoire et au sein de la SFORL sont pour moi un exemple. Soyez certain de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Chevalier,

Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger mon travail. J'ai beaucoup apprécié votre enseignement au cours des semestres passés et de mon clinicat dans votre service. Votre grande accessibilité, votre gentillesse et votre probité seront toujours pour moi un exemple dans la conduite de mon travail. Je vous suis très reconnaissant pour votre soutien et votre implication continus dans ce projet scientifique dont ce travail en est le premier aboutissement. Soyez certain de ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Lansiaux,

Merci de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail. Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et j'ai pu découvrir au quotidien le travail scientifique, en cela je vous suis très reconnaissant.

A Monsieur le Docteur Meignan,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail. Je te remercie d'avoir longuement et patiemment relu cette thèse, d'y avoir apporté ton savoir, tes conseils et tes qualités artistiques. Une profonde gratitude pour mon initiation à la science et à ses méandres. C'est toujours un grand plaisir de discuter et d'échanger avec toi. J'espère pouvoir poursuivre nos différents travaux scientifiques en cours toujours avec ce sens de l'humour qui te caractérise. J'espère que tu trouveras à travers ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au Dr. Darras, merci d'avoir éclairé de votre expérience, mon parcours professionnel.

Au Dr. Mortuaire, j'ai été ton premier interne et j'ai beaucoup appris en peu de temps, tu m'as fait aimer l'ORL, pour tout cela je te suis très reconnaissant.

A toute l'équipe 4 du laboratoire de pharmacologie anti tumorale, merci pour votre accueil toujours chaleureux. Particulièrement, à Christine son agréable sourire et sa disponibilité, à Nicole votre infatigable désir de voyager et compagnon de bureau, à Brigitte et son dévouement aux souris et au LOSC.

Merci à Abigaëlle, Florence et Pierre pour leur aide et leurs précieux conseils au cours de ces 3 années.

Au Dr. Langlois, merci pour votre disponibilité et votre aide toujours agréable.

Aux Dr. Lansiaux et Mallet, merci pour votre apprentissage de la chirurgie oncologique particulièrement appréciable.

Aux praticiens d'anesthésie du service d'ORL à Huriez, merci d'endormir et de réveiller nos patients !

A tous mes Co-chefs et anciens co-internes d'ORL, de chirurgie maxillo-faciale et de plastique maintenant devenu chef de clinique ou assistant, merci de m'avoir apporté votre expérience et de m'avoir aidé au début de mon internat.

A tous mes internes courageux et dévoués.

A tous mes externes, souffre-douleur !

A toutes les équipes paramédicales des services d'ORL de l'Hôpital Huriez, merci pour votre accueil lorsque j'étais jeune interne, votre bienveillance et votre gentillesse qui se poursuit.

A tous les patients que j'ai pris en charge, merci de me faire progresser tous les jours.

A Céline et Clémence, mes femmes, vous savez pourquoi.

A mes parents,

Merci de votre soutien et de votre réconfort indispensable tout au long de ses années d'étude, parfois difficiles.

Maman, tu as toujours été auprès de moi, dans ma scolarité et dans la vie, jusqu'à aujourd'hui.

Merci pour tout.

Papa, tu m'as toujours soutenu dans ce long périple des études médicales, merci pour cela. Tu as toujours été un guide pour moi et je te serais éternellement reconnaissant. J'espère à travers ce travail te faire honneur pour tout ce que tu m'as inculqué. Merci pour toujours.

A mon frère, Philippe

Merci d'être un exemple pour moi.

A ma sœur, Florence

Merci pour ta joie et ta bonne humeur. Merci pour ta spontanéité.

A mon frère, Pierre

Merci.

A Adeline, Sébastien, Louis et Marion

Merci pour votre présence.

A ma belle-famille

Merci de m'avoir intégré parmi vous.

SOMMAIRE

SOMMAIRE DES FIGURES	3
SOMMAIRE DES TABLEAUX	4
TABLE DES ABBREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	8
I. Cancers des voies aérodigestives supérieures.....	9
I.A. Anatomie descriptive et fonctionnelle des VADS	9
I.A.1. Cavité buccale et oropharynx	9
I.A.2. Hypopharynx.....	10
I.A.3. Larynx.....	10
I.A.4. Cavité nasale et sinus.....	11
I.A.5. Nasopharynx	11
I.B. Histologie.....	12
I.C. Epidémiologie des cancers des VADS	12
I.C.1. Groupe « cavité buccale-pharynx-larynx »	13
I.C.2. Groupe « fosses nasales-cavités naso-sinusiennes ».....	13
I.C.3. Groupe « nasopharynx »	13
I.D. Histoire naturelle des cancers des VADS.....	14
I.E. Facteurs de risque de cancer des VADS	15
I.E.1. Effets cancérigènes du tabac.....	16
I.E.2. Effets cancérigènes de l'alcool	16
I.E.3. Human Papilloma Virus (HPV).....	17
I.E.4. Susceptibilité génétique	18
I.E.5. Autres facteurs	19
I.F. Traitements.....	19
I.F.1. Prise en charge	19
I.F.2. Traitements	19
I.F.2.a. Chirurgie.....	20
I.F.2.b. Radiothérapie.....	20
I.F.2.c. Chimiothérapie.....	23
I.F.2.d. Thérapies ciblées ou biothérapies	23
- Les Inhibiteurs d'EGF-R.....	24
- Les Inhibiteurs de l'ATK	25
- Inhibiteurs de VEGF-R	26
- Inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR.....	28
- Inhibiteurs de MET et IGF-1R	29
- EGFR et statut HPV	31

II. Le système de transport des polyamines et le F14512	33
II.A. Les polyamines	33
II.A.1. Rôles des polyamines.....	33
II.A.2. Synthèse des polyamines.....	34
II.A.3. Le Système de Transport des Polyamines (STP)	35
II.A.4. Polyamines et cancer	36
II.B. Le F14512 : Inhibiteur de topoisomérase II	37
II.B.1. La famille des topoisomérases II.....	37
II.B.2. Le F14512 : Inhibiteur de topoisomérase II des laboratoires Pierre Fabre	38
II.B.3. La sonde fluorescente : Le F17073.....	39
II.B.4. Etudes précliniques et développement en clinique du F14512.....	40
OBJECTIFS DE LA THESE	42
RESULTATS	45
I. Evaluation <i>in vitro</i> du F14512 et de ses associations thérapeutiques	46
- Article Mouawad et al., Oral Oncology 2014 -	
II. Evaluation de l'activité STP chez les patients	50
II.A. Contexte	50
II.B. Matériels et méthodes	50
II.B.1. Prélèvement tumoral	50
II.B.2. Préparation de l'échantillon.....	51
II.B.3. Marquage par la sonde fluorescente F17073	51
II.C. Résultats	51
III. Evaluation <i>in vivo</i> du F14512 et mise au point d'un modèle de xenogreffe orthotopique endobuccal.....	53
III.A. Contexte	53
III.B. Evaluation <i>in vivo</i> du F14512	53
III.C. Mise au point secondaire du modèle de xéno greffe orthotopique endobuccale en cancérologie des VADS.....	56
III.C.1. Matériels et Méthodes.....	56
➤ III.C.1.a. Cellules CAL33 TOMATO.....	56
➤ III.C.1.b. Technique d'injection.....	56
➤ III.C.1.c. Système Xenogen®	57
III.C.2. Résultats	58
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	60
CHAPITRE 5 : CONCLUSION.....	69
BIBLIOGRAPHIE	72
ANNEXE.....	78

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de la cavité buccale et de l'oropharynx de face et en coupe sagittale.....	10
Figure 2 : Anatomie du larynx et de l'hypopharynx de face et en coupe transversale.....	11
Figure 3 : Schéma des groupes ganglionnaires cervicaux	15
Figure 4 : Stimulation de la progression du cycle cellulaire par HPV	18
Figure 5 : Gouttières vectrices de fils d'Iridium ¹⁹² pour la réalisation d'un traitement par curiethérapie d'une lésion de la cavité buccale.....	22
Figure 6 : Mécanisme d'action des biothérapies	31
Figure 7 : Métabolisme des polyamines.....	34
Figure 8 : Représentation schématique des hypothèses de transport des polyamines et de la chaîne des polyamines.....	36
Figure 9 : Mécanisme d'action de la topoisomérase II.....	37
Figure 10 : Structure de l'étoposide et du F14512.....	38
Figure 11 : Structure de la sonde fluorescente F17073 et du F14512	40

Article Mouawad et al. 2014.....49

Figure article 1 : <i>PTS activity and drugs cytotoxicity in HNSCC lines</i>	15
Figure article 2 : <i>Kinetic, localization and specific uptake of spermine-coupled fluorescent probe, F17073, in base of the tongue cancer cell lines</i>	16
Figure article 3 : <i>PTS activity and drugs cytotoxicity in normoxic and hypoxic conditions</i>	18
Figure article 4 : <i>Drugs combination</i>	19
Figure article 5 : <i>Radio-sensitizing effect</i>	20

Figure 12 : Protocole de traitement par F14512 et étoposide <i>in vivo</i>	54
Figure 13 : Photographies de la tumeur et de son exérèse pour mesure.....	55
Figure 14 : Représentation graphique de la taille tumorale à J21 après traitement par le placebo, l'étoposide ou le F14512 à la dose de 1,25mg/kg par injection	55
Figure 15 : Schéma du site de l'injection et photographies de l'otorhinoscope® et de l'injection	57
Figure 16 : Photographies des souris Balb/c <i>nude</i> au sein de l'enceinte du Xenogen® et tumeurs macroscopiques après dissection.....	58
Figure 17 : Représentations graphiques de la fluorescence mesurée (total efficiency) et des volumes tumoraux (mm ³) des xénogreffes ORL orthotopiques	59

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Anticorps monoclonaux et inhibiteurs de tyrosine kinase en essais cliniques en oncologie des VADS	26
Tableau 2 : Inhibiteurs de VEGF-R en oncologie des VADS	28
Tableau 3 : Essais cliniques impliquant des inhibiteurs PI3K/AKT/mTOR seuls ou en association en oncologie des VADS	29
Tableau 4 : Mesure du rapport d'activité STP (T/S) sur 13 prélèvements de patients issus de différentes localisations de tumeurs des VADS	52

TABLE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

AKT : Protéine kinase spécifique de sérine/thréonine

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Triphosphate

ATK : Activité Tyrosine Kinase

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EBV : Epstein Barr Virus

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

FBS : Fetal Bovine Serum

5FU : 5Fluorouracile

HER : Human Epidermal growth factor Receptor family

HIF-1 α : Hypoxia Inducing Factor-1 α

HLA : Human Leukocyte Antigen

HPV : Human Papillomavirus

IC₅₀ : Inhibition Concentration 50

IGF-1R : Insulin Growth Factor-1Receptor

IMRT : Intensity-Modulated Radiation Therapy

INCa : Institut National du Cancer

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MAT : adénosylméthionine transférase

MET : Récepteur tyrosine kinase dont le ligand est le HGF (Hepatocyte growth factor)

MFI : Mean Fluorescence Intensity

mTOR : mammalian Target of Rapamycine

MTS : 5-[3-(carboxymethoxy)phenyl]-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2-(4-sulfophenyl)-
2H-tetrazolium

NBD : Nitrobenzoxadiazole

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NO : Oxyde Nitrique

NOS2 : Oxyde Nitrique Synthétase

ODC : Ornithine Décarboxylase

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PAO : Polyamine Oxydase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PDGFR- α : Platelet-derived growth factor receptor- α

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PIK3CA : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase

pRB : protéine du Rétinoblastome

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RCMI : Radiothérapie Conformationnelle par Modulation d'Intensité

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SamDC : S-adénosylméthionine Décarboxylase

SAT1 : Spermidine/Spermine N-acétyltransférase

Spd : Spermidine

Spm : Spermine

SSAT : Spermidine/Spermine-Acétyltransférase

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

STP : Système de Transport des Polyamines

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor

TNM : Tumor Node Metastasis classification

UCNT : Undifferentiated Nasopharyngeal Cancer

UICC : Union for International Cancer Control

VADS : Voies Aérodigestives Supérieures

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

I. CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES

I.A. Anatomie descriptive et fonctionnelle des VADS

Les VADS constituent un carrefour des voies aériennes et digestives et leurs fonctions principales sont la respiration, la déglutition et la phonation.

Les Voies Aéro-Digestives Supérieures (VADS) sont constituées de plusieurs régions anatomiques individualisables. Il s'agit de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx, du larynx, des cavités naso-sinusiennes et du cavum ou nasopharynx. La trachée et l'œsophage supérieur ou cervical font partie des VADS, mais les pathologies de ces régions anatomiques sont l'apanage de spécialités différentes de l'ORL et ne seront pas décrites ici.

I.A.1. Cavité buccale et oropharynx

La cavité buccale, dont les rôles principaux sont la préparation du bol alimentaire par la mastication et l'articulation des phonèmes, débute après les lèvres et est constituée du vestibule, des dents, de la face interne des joues, du palais osseux, de la langue mobile et du plancher buccal. Elle est en communication avec l'oropharynx par le biais d'une structure virtuelle, l'isthme du gosier (Figure 1).

L'oropharynx est une zone anatomique carrefour, dotée d'organes lymphoïdes répartis entre les loges amygdaliennes et la base de langue, le voile du palais (ou palais mou). Ce dernier est l'ultime sous-unité, essentiellement musculaire, de cette structure et joue le rôle de sphincter du cavum lors de la déglutition (Figure 1).

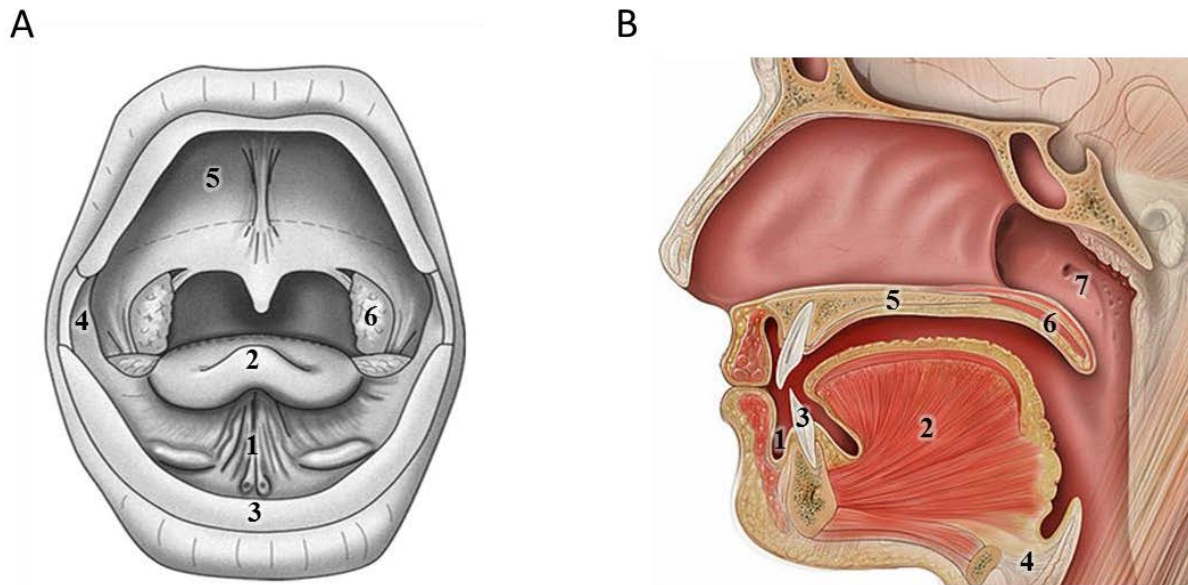


Figure 1 : Anatomie de la cavité buccale et de l'oropharynx de face et en coupe sagittale. Représentation schématique en coupes de la cavité buccale. **A. Vue de face.** 1 : Plancher buccal ; 2 : Langue mobile ; 3 : Dents ; 4 : Face interne de joue ; 5 : Palais dur ; 6 : Amygdale. **B. Coupe sagittale.** 1 : Vestibule ; 2 : Langue mobile ; 3 : Dents ; 4 : Base de langue ; 5 : Palais dur ; 6 : Palais mou ; 7 : Cavum. *Adaptés des schémas anatomiques MERCK.*

I.A.2. Hypopharynx

L'hypopharynx joue un rôle principalement digestif et fait suite à l'oropharynx, il a la forme d'un « U » ouvert en avant dont les 2 branches enserrant le larynx. Il est constitué d'une paroi postérieure et de 2 sinus piriformes, amenant le bol alimentaire jusqu'à la bouche œsophagienne (Figure 2).

I.A.3. Larynx

Le larynx constitue l'organe de la phonation et de la respiration, il est subdivisé en trois étages : la sus-glote, la glotte et la sous-glote. L'étage glottique contient les cordes vocales et les ventricules, l'étage sus glottique est formé des bandes ventriculaires, des aryténoïdes et des 2/3 inférieurs de l'épiglotte, ce qui permet la protection des voies aériennes lors de la déglutition, et la sous-glote est formée par l'anneau cricoïdien et se prolonge par la trachée (Figure 2).

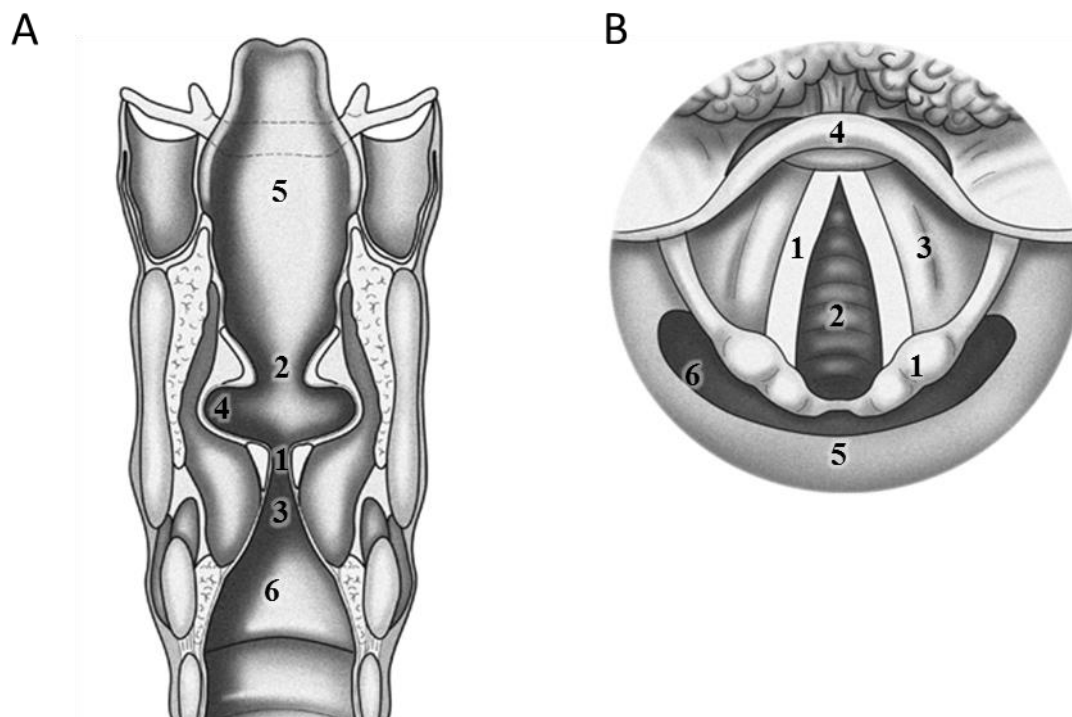


Figure 2 : Anatomie du larynx et de l'hypopharynx de face et en coupe transversale. Représentation schématique en coupes du pharyngo-larynx. **A. Vue de face.** 1 : Etage glottique ; 2 : Etage sus glottique ; 3 : Etage sous glottique ; 4 : Ventricule ; 5 : Cartilage épiglottique ; 6 : Cartilage cricoïde. **B. Coupe transversale.** 1 : Corde vocale gauche ; 2 : Trachée ; 3 : Ventricule laryngé droit ; 4 : Cartilage épiglottique ; 5 : Paroi pharyngée postérieure ; 6 : Sinus piriforme gauche. *Adaptés des schémas anatomiques MERCK.*

I.A.4. Cavité nasale et sinus

La cavité nasale et les cavités sinusiennes constituent un organe respiratoire. Le nez possède une structure ostéo-cartilagineuse recouverte en dedans par la muqueuse respiratoire. Les cavités sinusiennes au nombre de 4 sont paires et symétriques, il s'agit des sinus frontaux, sphénoïdaux, ethmoïdaux et maxillaires. Les sinus ethmoïdaux sont les seuls à être divisés par des cloisons osseuses en de multiples cellules.

I.A.5. Nasopharynx

Le nasopharynx est la partie supérieure du pharynx en arrière de la cavité nasale et des choanes. L'orifice pharyngien de la trompe d'Eustache est un élément anatomique important provenant de l'oreille moyenne et qui s'abouche dans cette région, il peut parfois se trouver obstrué par une hypertrophie de végétations adénoïdiennes (organe lymphoïde) ou une lésion tumorale.

I.B. Histologie

L'ensemble des VADS est recouvert d'une muqueuse épithéliale de type respiratoire, malpighienne, pluristratifiée non kératinisée. Les muqueuses naso-sinusiennes et trachéales possèdent des cils qui permettent la clairance muco-ciliaire.

Les carcinomes des voies aérodigestives supérieures correspondent le plus souvent à une histologie de carcinome épidermoïde (95% des cas). Certaines variantes histologiques représentent des entités anatomo-cliniques particulières comme les carcinomes épidermoïdes verruqueux, basaloïdes ou fusiformes. Il peut exister de façon plus anecdotique (5%) des histologies différentes de type glandulaire, mélanique, lymphomateuse ou sarcomateuse.

I.C. Epidémiologie des cancers des VADS

Les cancers des voies aérodigestives supérieures représentent un problème majeur de santé publique. Au niveau mondial il existe près de 600 000 nouveaux cas/an de cancer des VADS diagnostiqués avec un taux de décès global de 54%, ce qui en fait le 6^{ème} cancer en incidence. Contrairement aux autres localisations tumorales, le taux de survie à 5 ans dans les cancers des VADS n'a que faiblement progressé, avoisinant 50% toutes localisations confondues.⁽¹⁾

Au plan national, cette entité constitue le 4^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme avec près de 14 000 nouveaux cas par an. Chaque année elle est ainsi responsable de 5000 à 6000 décès malgré les mesures préventives contre le tabac et l'alcool (source : INCa).

Ces cancers touchent particulièrement la région Nord-Pas-de-Calais avec une incidence de 1460 nouveaux cas/an. De plus, l'incidence annuelle dans la métropole lilloise, pour 100 000 habitants, standardisée par rapport à la population mondiale, est chez l'homme de 46,5 contre 21,8 pour la France.⁽²⁾ D'une façon générale, l'incidence de ces cancers a tendance à diminuer sensiblement au cours des deux dernières décennies chez l'homme mais est en augmentation nette chez la femme.

Il faut distinguer 3 groupes de cancers des VADS⁽³⁾ :

1.C.1. Groupe « cavité buccale-pharynx-larynx »

Ces cancers intéressent la muqueuse du vestibule buccal, de la face interne des joues, des gencives supérieure et inférieure, de la voûte palatine et du voile du palais, du plancher de bouche et de la langue, des loges amygdaliennes et de la base de langue, de l'hypopharynx, de la paroi pharyngée postérieure et du larynx. Il s'agit, dans l'écrasante majorité des cas, de carcinomes épidermoïdes plus ou moins différenciés pour lesquels l'influence de l'alcoolotabagisme est flagrante. Dans d'autres cas plus rares, la tumeur se développe aux dépens des tissus sous-jacents et se présente sous la forme de tumeurs glandulaires, de sarcomes, de mélanomes ou de lymphomes, pour lesquels il n'y a pas de facteurs épidémiologiques bien individualisés.

Près de 500 000 nouveaux cas sont recensés annuellement dans le monde pour ce groupe, soit une incidence annuelle pour les deux sexes confondus de 8,1 pour 100 000. En France, les régions les plus touchées sont la région Nord-Pas-de-Calais, la Normandie, la Bretagne, les Pays de la Loire, la Picardie, la Champagne-Ardenne et la Lorraine.

1.C.2. Groupe « fosses nasales-cavités naso-sinusiennes »

Ces tumeurs se développent à partir de l'épithélium de recouvrement (carcinomes épidermoïdes) des fosses nasales et des sinus paranasaux ou des autres tissus : carcinomes glandulaires (adénocarcinomes, carcinomes muco-épidermoïdes et carcinomes adénoïdes kystiques) particulièrement fréquents dans cette localisation, mais aussi lymphomes et mélanomes. Ici l'influence du tabagisme est rarement retrouvée, même pour les carcinomes épidermoïdes.

En revanche, il existe une corrélation indiscutable entre les adénocarcinomes (notamment ethmoïdaux) et l'exposition aux poussières de bois, au nickel et aux tanins du cuir.

Ces cancers sont globalement peu fréquents (l'incidence annuelle est au maximum de deux pour 100 000 hommes), sans réelles zones géographiques de prédilection.

1.C.3. Groupe « nasopharynx »

Il a une répartition géographique et ethnique bien particulière. On trouve ici des carcinomes épidermoïdes bien ou, plus souvent, peu différenciés et un type histologique typique de cette localisation : le carcinome totalement indifférencié de type nasopharyngé (UCNT).

L'alcool-tabagisme n'est jamais incriminé. Le rôle du virus EBV, de certains facteurs nutritionnels et de certains profils génétiques est reconnu.

L'Asie du Sud-Est est la région de plus forte incidence (20 pour 100 000 habitants), suivie, à un degré moindre (5 à 15 pour 100 000 habitants) du Maghreb et des régions d'émigration des populations d'Asie du Sud-Est ainsi que du Groenland, de l'Alaska et du Nord canadien, alors que ce cancer est rare ailleurs dans le monde (moins de un pour 100 000 habitants).

I.D. Histoire naturelle des cancers des VADS

Les carcinomes épidermoïdes, et en particulier ceux du premier groupe, semblent pouvoir s'installer de deux façons : soit la muqueuse se cancérisse d'emblée, soit elle passe par des étapes dites précancéreuses. Il faut toutefois reconnaître, qu'en l'absence d'un suivi de toutes les lésions réputées précancéreuses et de l'impossibilité d'affirmer rétrospectivement (en dehors de la coexistence de lésions différentes) qu'un cancer a été ou non précédé d'une lésion précancéreuse, il est impossible d'évaluer la fréquence de cette séquence. Le risque de dégénérescence de ces lésions est donc difficile à préciser : il semblerait essentiellement lié au degré de dysplasie qui accompagne ces lésions macroscopiques et serait ainsi compris entre 5 % et 25 %.

Les cancers invasifs ont, en dehors de leur agressivité locale, une lymphophilie marquée puis un potentiel métastatique viscéral notable. Le traitement du cancer prendra en charge la tumeur primitive mais également les aires de drainage lymphatique classées selon leur localisation en différents groupes ou aires (Figure 3). Un risque particulier assombrit le pronostic des tumeurs des VADS : celui de localisations multiples concomitantes ou successives. L'ensemble des muqueuses soumises aux agents pathogènes (VADS, œsophage moyen et inférieur, poumon et, à un degré moindre, vessie) est, en effet, susceptible de se cancériser en des points différents, ce qui constitue l'une des particularités de ces tumeurs induites par le tabac.⁽³⁾

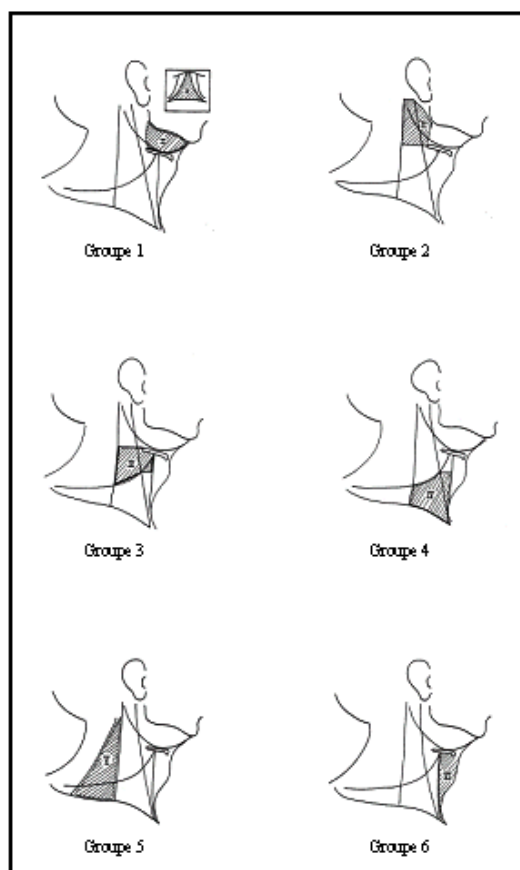


Figure 3 : Schéma des groupes ganglionnaires cervicaux adapté de la terminologie du Sloan-Kettering Memorial. Le groupe 1 correspond à l'aire sous-mentale (« 1a ») et aux aires sous-maxillaires (« 1b »), le groupe 2 à l'aire jugulaire supérieur séparée par le nerf spinal en « 2a » (en avant du nerf) et « 2b » (en arrière du nerf). Le groupe 3 correspond à l'aire jugulaire moyenne, le groupe 4 à l'aire jugulaire inférieure, le groupe 5 à l'aire spinale et le groupe 6 à l'aire cervicale antérieure ou pré-laryngée.

Le processus de cancérisation des VADS n'est pas totalement connu au plan moléculaire, contrairement au cancer du côlon, mais un certain nombre de facteurs de risque et de déterminants socio-économiques sont communs aux localisations cancéreuses des VADS.

I.E. Facteurs de risque de cancer des VADS

Le principal facteur de risque des cancers des VADS reste l'intoxication tabagique se combinant avec l'alcool comme cofacteur. Ces effets synergiques étaient connus depuis les travaux de Rothman et Keller : si le Risque Relatif (RR) était de 1 chez les « non-buveurs-non-fumeurs » il s'élevait à 2,33 chez les « grands fumeurs-non-buveurs », à 2,43 chez les « grands buveurs-non-fumeurs », et à 15,5 chez les « grands buveurs-grands fumeurs ».⁽⁴⁾ Plus récemment une étude a montré que si le RR était de 1 pour les non-fumeurs-non buveurs d'alcool, il passait en cas de tabagisme à 30 cigarettes ou plus par jour et quatre

boissons alcoolisées ou plus quotidiennes à 21,2 pour l'oropharynx, 35,6 pour le pharynx et 34,6 pour le larynx. Cet effet plus que multiplicatif a été retrouvé quelle que soit la région du monde étudiée.⁽⁵⁾

1.E.1. Effets cancérigènes du tabac

Les effets cancérigènes du tabac peuvent intervenir à travers différents phénomènes⁽³⁾ :

- ❖ Par brûlure chronique, la température de combustion du tabac étant d'environ 850 °C. La température de la fumée inhalée décroît rapidement mais, avec le temps, constitue néanmoins une agression thermique certaine,
- ❖ Par ses composants toxiques (nicotine) et son action sur le système artériel,
- ❖ Par ses composants carcinogènes, plus de 30 agents ayant été identifiés (hydrocarbures aromatiques polycycliques et nitrosamines en particulier), véhiculés par la fumée ou dissous dans la salive. Il s'agit en fait de pro-carcinogènes inactifs qui sont oxydés grâce au cytochrome P450 puis conjugués à d'autres molécules grâce à diverses enzymes (comme la glutathion-S-transférase) devenant alors hydrophiles et pouvant être éliminés par l'organisme (urine, bile, etc.). Lorsque cette enzyme est saturée, les pro-carcinogènes oxydés deviennent toxiques.

L'influence du type de tabac n'est pas clairement établie : il est habituel de dire que la chique, la pipe et le cigare prédisposent plutôt aux cancers buccaux, les cigarettes manufacturées aux cancers du larynx et les cigarettes « roulées » aux cancers pharyngés mais aucune étude rigoureuse n'a quantifié ces corrélations. En revanche, il semble acquis que le tabac brun est deux fois plus toxique que le blond et que le risque croît avec la concentration en goudrons et ce de façon encore plus nette pour les cancers oraux et pharyngés que pour les cancers laryngés.

Le risque de cancer des VADS en cas de tabagisme passif (lors du travail et/ou au domicile) a été souvent évoqué. Une étude récente confirme ce risque surtout pour le larynx, à un degré moindre pour le pharynx, mais vraisemblablement pas pour la cavité buccale.⁽⁶⁾

1.E.2. Effets cancérigènes de l'alcool

Ils sont plus difficiles à apprécier. En effet l'éthanol lui-même n'a aucun rôle cancérigène direct. En revanche, il peut contenir des substances qui en ont un, comme les esters de formol contenus dans les apéritifs anisés ou d'autres substances moins connues mais

suspectées d'être contenues dans certaines boissons comme le genièvre. L'éthanol en soit intervient cependant indirectement de trois façons⁽³⁾ :

- ❖ Par irritation locale proportionnelle à la concentration d'éthanol,
- ❖ Par dégradation de l'état général et des moyens de défense de l'organisme (insuffisance hépatique, carences nutritionnelles, défaut de stockage de la vitamine A),
- ❖ Comme solvant des agents cancérigènes du tabac.

L'alcool plus que le type de boissons alcoolisées semble intervenir. Par ailleurs, il a été noté une corrélation entre la consommation d'alcools forts (genièvre, calvados) associés au café chaud et des lésions hypopharyngées bas situées.

1.E.3. Human Papilloma Virus (HPV)

Le virus HPV dont les sérotypes 16 et 18 sont maintenant largement reconnus comme facteur de risque, principalement dans les localisations oropharyngées, apparaissent en progression constante. Il s'agit de carcinomes le plus souvent de type basaloïdes pour lesquelles une transmission sexuelle est évoquée. Les HPV oncogènes produisent des oncoprotéines E6 et E7 qui se lient à des gènes suppresseurs de tumeur. Ces protéines participent aux voies régulatrices du cycle cellulaire : p53 (E6) qui est inactivée et ne peut jouer son rôle de « gardien du génome » et la protéine du rétinoblastome, pRb, (E7) qui est ainsi dégradée ne permettant plus le blocage du cycle cellulaire (Figure 4). Les patients porteurs de cancers oropharyngés associés à l'HPV ont un meilleur pronostic vital, ces tumeurs semblant plus chimio-sensibles et plus radiosensibles, surtout en l'absence de tout contexte de tabagisme.⁽⁷⁾

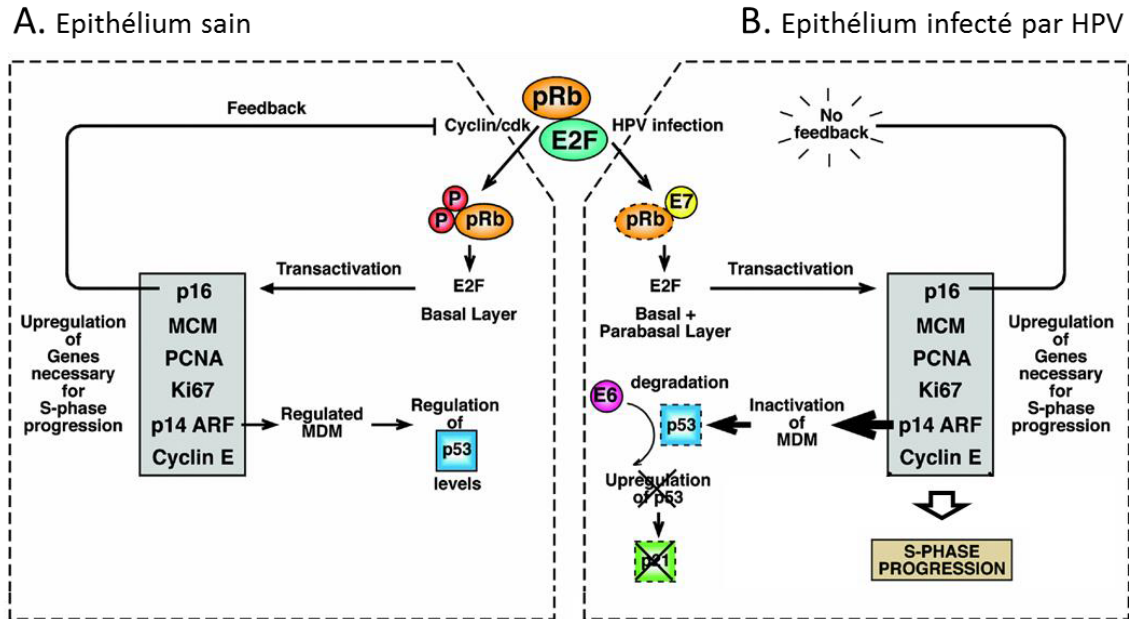


Figure 4 : Stimulation de la progression du cycle cellulaire par HPV. Contrairement à un épithélium non infecté (A), la présence de HPV (B) modifie la régulation des protéines nécessaires à la prolifération cellulaire pour stimuler l'entrée en phase S. Dans une cellule saine (A), l'expression des protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire est régulée par pRb, qui, dans les cellules non-cyclantes, est associée avec les membres de la famille des facteurs de transcription E2F. En présence de facteurs de croissance, le complexe cycline D/Cdk4/6 est activé, ce qui conduit à la phosphorylation de Rb et la libération du facteur de transcription E2F entraînant l'expression de protéines impliquées dans la progression de la phase S. La protéine p16 régule les niveaux de cycline D/Cdk actif dans la cellule et induit un rétrocontrôle de MCM, PCNA et cycline. La protéine p14^{ARF}, dont l'expression est directement liée à celle de p16, régule l'activité de la MDM qui maintient p53 à un niveau inférieur à celui requis pour l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose. Dans un épithélium infecté par HPV (B), la progression du cycle cellulaire ne dépend plus de facteurs de croissance externes, mais est stimulée par la protéine E7. L'oncoprotéine E7 se lie à pRb et le dégrade, induisant ainsi l'expression des protéines cellulaires nécessaires à l'entrée en phase S régulées par E2F. Ce phénomène, indépendant du complexe cycline D/Cdk4/6 ne peut être contrebalancé par l'élévation du niveau de p16. L'augmentation du niveau de p14^{ARF}, en l'absence de rétrocontrôle de p16, conduit à l'inhibition de MDM et à une augmentation du niveau de p53. Ceci est contré par l'oncoprotéine E6 qui s'associe à l'ubiquitine ligase E6AP afin de stimuler la dégradation de la protéine p53 et d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose.⁽⁸⁾

I.E.4. Susceptibilité génétique

Par ailleurs, il existe une susceptibilité génétique se traduisant par un polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme de l'alcool et du tabac, carcinogènes reconnus dans l'induction de cancers des VADS. Le cytochrome P450 intervient classiquement comme détoxifiant notamment de l'alcool et du tabac, mais selon le type de gène codant il existe une susceptibilité différente au développement d'un carcinome épidermoïde laryngé ou hypopharyngé. En effet, le polymorphisme CYP1A1, gène codant pour le cytochrome P450, est associé à un sur risque de développer un cancer induit par le tabac dans une population chinoise de l'ethnie Han, ethnie dominante en chine.⁽⁹⁾

En Asie et en particulier en Indonésie, les profils HLA A2, BW 46 et AW 19 B 17 sont significativement liés à un risque élevé et ont une valeur pronostique dans le cancer du nasopharynx. La prépondérance de profils particuliers a été retrouvée chez les esquimaux et les maghrébins, toutefois différents de ceux observés chez les chinois : A2 BW 40 chez les esquimaux et B5 chez les sujets d'origine algérienne.⁽³⁾

1.E.5. Autres facteurs

D'autres facteurs de risque sont évoqués plutôt comme des cofacteurs ou des éléments associés⁽³⁾. Il s'agit de certaines expositions professionnelles (amiante, vapeurs d'acide sulfurique, chrome et arsenic), le mauvais état bucco-dentaire, certaines carences nutritionnelles, le cannabis, la chique de Bétel, la marijuana, le niveau socio-économique faible et plus rarement une radiothérapie antérieure (10 ans de latence) (source : INRS).

I.F. Traitements

1.F.1. Prise en charge

La décision thérapeutique dépend des caractéristiques locorégionales de la tumeur mais également de l'état général du patient dont le bilan est réalisé au préalable. Au terme de ce bilan, la lésion tumorale est classée selon la classification internationale TNM de l'UICC. La décision de traitement fait l'objet d'une RCP à laquelle participe les principales spécialités impliquées dans la prise en charge des tumeurs des VADS (radiothérapeute, oncologue, chirurgien et radiologue).

La préparation nutritionnelle et générale, le traitement de la douleur et la prise en charge psychologique du patient constituent des étapes primordiales de la prise en charge d'un patient en cancérologie des VADS.

1.F.2. Traitements

La lymphophilie particulière de ces tumeurs rend nécessaire un traitement du site tumoral et de ses aires de drainage lymphatique. Différents traitements constituent l'arsenal thérapeutique de ces tumeurs, il s'agit de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie et/ou biothérapie. Le plus souvent ces traitements sont combinés au sein de protocoles thérapeutiques ayant démontré leur efficacité sur la survie.

I.F.2.a. *Chirurgie*

La chirurgie en cancérologie des VADS peut être réalisée par voie endoscopique ou par voie externe. Cette dernière permet de traiter la tumeur et les aires ganglionnaires de drainage de la tumeur assurant un contrôle locorégional satisfaisant. La chirurgie peut, dans quelques cas de tumeur de stade avancée T3 ou T4, être associée à une chirurgie reconstructrice par des lambeaux locaux, pédiculés ou libres, sans altérer le contrôle locorégional et en conservant la qualité de vie. En effet, l'utilisation de plus en plus fréquente de lambeaux composites pédiculés ou libres permet une reconstruction en chirurgie de cavité buccale et d'oropharynx de meilleure qualité et une réhabilitation fonctionnelle satisfaisante.^(10, 11)

Les techniques endoscopiques appliquées aux petites tumeurs ont permis une diminution de la morbidité sans altérer la survie dans les tumeurs classées T1 ou T2 du larynx.⁽¹²⁾

La chirurgie robotisée transorale, consistant en un robot à bras articulés asservis à l'opérateur, est une modalité technique actuellement toujours en cours d'évaluation, qui pourrait constituer une alternative intéressante dans les cancers de l'oropharynx ou de l'hypopharynx.

La chirurgie par voie endoscopique ou par voie externe isolée constitue classiquement le traitement de référence des tumeurs classées T1 ou T2 et la chirurgie par voie externe associée à la radiothérapie externe (\pm chimiothérapie ou biothérapie) est réalisée dans le cas de tumeurs avancées classées T3 ou T4 (Référentiel Nord-Pas-de-Calais pour les cancers des voies aérodigestives supérieures, 2006).

I.F.2.b. *Radiothérapie*

La radiothérapie est une modalité de traitement des cancers des VADS. Elle peut être réalisée par voie externe ou endocavitaire (curiethérapie).

La radiothérapie par voie externe conformationnelle, dite classique, correspond à une irradiation tridimensionnelle sans modulation d'intensité dans laquelle le nombre de faisceaux, leur géométrie et leurs incidences ont été optimisés pour conformer la dose aux volumes cibles. Elle nécessite une préparation du patient avec l'éviction des foyers infectieux notamment dentaires, un bon état général et nutritionnel et un arrêt des intoxications. Le protocole d'administration est basé sur la réalisation, d'un scanner de centrage, d'une dosimétrie et d'un masque de contention.

L'irradiation balistique simple, bidimensionnelle, par deux faisceaux latéraux opposés et un faisceau antérieur sus-claviculaire, avec adaptation des faisceaux et de l'énergie utilisés lorsque les doses limitantes ont été reçues par la moelle (40-45 Gy). Ce mode d'irradiation est maintenant remplacé par une irradiation tridimensionnelle, dans ce cas le nombre de faisceaux, leur géométrie et leurs incidences ont été optimisés pour conformer la dose aux volumes cibles, mais sans utiliser la modulation d'intensité ni la stéréotaxie.⁽¹³⁾

Les doses en cancérologie des VADS sont comprises entre 50 et 70 grays sur la tumeur et les aires ganglionnaires principales de drainage, à raison de plus de 2 grays/j/séance pendant 5 à 7 semaines de traitement. Il s'agit d'un fractionnement classique qui peut être modifié en fonction de la tolérance du patient, de son âge et de la localisation tumorale. Ce traitement est effectué en ambulatoire et dure environ 10 minutes.

La radiothérapie est exclusive pour le traitement de lésions classées T1 (larynx traitement en champ étroit) ou T2 du larynx ou de l'oropharynx. Elle peut être post-opératoire dans le cadre du traitement chirurgical premier de lésions tumorales avancées classées T3 ou T4. Enfin, elle est le plus souvent associée à la chimiothérapie, soit en post opératoire si des facteurs histologiques de mauvais pronostic sont mis en évidence, soit dans le cadre de tumeurs avancées inopérables (Référentiel Nord-Pas-de-Calais pour les cancers des voies aérodigestives supérieures, 2006).

De nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années dans le domaine du traitement par radiothérapie, et de nouvelles stratégies de traitements sont développées privilégiant l'augmentation de la dose efficace biologique à la tumeur tout en préservant les tissus sains.

Deux principales stratégies sont suivies :

- Soit l'optimisation des techniques de délivrance des rayonnements en améliorant la précision et/ou le contrôle de l'irradiation (RCMI, tomothérapie, arcthérapie dynamique, cyberknife). Dans ces techniques, la combinaison de plusieurs faisceaux ayant chacun une inhomogénéité contrôlée permet d'obtenir une distribution de dose adaptée au volume cible. Le calcul de chaque faisceau est réalisé à l'aide d'algorithmes informatiques appelés « calcul inverse ». Les contraintes et les tolérances de doses à respecter sont déterminées au préalable puis le système de calcul optimise le profil d'intensité de chaque faisceau pour respecter ces paramètres initiaux. Ainsi les courbes d'isodoses moulent parfaitement la forme géométrique des volumes cibles. Cette technique permet de créer des gradients de

doses très importants et réduit ainsi la dose reçue par les tissus sains même s'ils sont proches du tissu tumoral.^(13, 14)

- Soit en modulant le facteur « temps », en modifiant le fractionnement (hyper ou hypo) et/ou l'étalement du traitement. En faisant varier le facteur « temps », la durée totale de l'irradiation (étalement) peut être réduite, accélérant le traitement. Ainsi le repeuplement par des cellules tumorales est diminué entre les séances de radiothérapie. Le contrôle locorégional s'en trouve théoriquement amélioré. La dose quotidienne peut également être délivrée en plusieurs fractions espacées de 6 heures (hyperfractionnement) 2 ou 3 fractions de 1,1 à 1,2 Gy. Cette modalité permet d'augmenter la dose totale délivrée à la tumeur en réduisant le risque de toxicité tardive aux tissus sains (réparation des tissus sains entre les fractions). Il a été démontré un bénéfice du contrôle locorégional mais sans bénéfice sur la survie.^(13, 15)

Une technique de radiothérapie particulière dite « endocavitaire » ou curiethérapie est également utilisée dans certains centres. Il s'agit de mettre en place des fils d'iridium¹⁹² à travers des gouttières montées dans la tumeur, sous anesthésie générale (Figure 5). Cette modalité est intéressante pour des tumeurs T1 ou T2 de cavité buccale (langue mobile, lèvre) ou de l'oropharynx (voile du palais, base de langue) (Référentiel Nord-Pas-de-Calais pour les cancers des voies aérodigestives supérieures, 2006).



Figure 5 : Gouttières vectorielles de fils d'iridium¹⁹² pour la réalisation d'un traitement par curiethérapie d'une lésion de cavité buccale. Photographie prise au bloc opératoire patient sous anesthésie générale et gouttières en place.

I.F.2.c. *Chimiothérapie*

La chimiothérapie en oncologie des VADS est un traitement systémique. Elle est associée à la radiothérapie dans une modalité curative. L'utilisation de molécules anticancéreuses seules constitue un traitement des tumeurs avancées métastatiques ou est utilisée en néoadjuvant dans un but conservateur.

En chimiothérapie, ces deux dernières décennies ont vu se développer le protocole de préservation d'organe (chimiothérapie néoadjuvante puis radiothérapie) appliqué au cancer du larynx, qui permet une conservation du larynx dans 67% des cas à 5 ans sans différence significative sur la survie globale des patients, mais avec une récurrence locorégionale plus élevée.⁽¹⁶⁾

Le traitement de référence des tumeurs inopérables est basé sur la radiothérapie (70 Gy, 35 fractions) et la chimiothérapie à base de taxol, de sels de platine et/ou de 5-fluorouracile (5FU) en mode concomitant. La supériorité de ce protocole sur la radiothérapie exclusive est démontrée en terme de contrôle locorégional et de survie mais au prix d'une majoration de la toxicité précoce et tardive.^(17, 18)

La mise au point de thérapeutiques ciblées, dans ce contexte de terrain fragile et de toxicités des chimiothérapies classiques, apparaît être une alternative intéressante.

I.F.2.d. *Thérapies ciblées ou biothérapies*

Une thérapie ciblée est une molécule dont l'action pharmacologique consiste à cibler spécifiquement une caractéristique propre aux cellules cancéreuses, comme une protéine appartenant à une voie de signalisation cellulaire impliquée dans la prolifération, la différenciation, la migration ou l'invasion des cellules tumorales. En théorie, ce médicament présente donc moins d'effets néfastes sur les cellules saines et de ce fait engendre moins d'effets indésirables que les chimiothérapies anti tumorales classiques.

En cancérologie des voies aérodigestives supérieures, la seule thérapie ciblée ayant obtenu l'AMM est le Cetuximab ou Erbitux[®]. Il s'agit d'un anticorps anti-EGFR bloquant directement ce récepteur. L'indication de cette thérapie en oncologie ORL concerne les carcinomes épidermoïdes localement avancés en association avec la radiothérapie, mais également en mono-chimiothérapie en seconde ligne chez les patients en récurrence ou en situation métastatique et dont la chimiothérapie de première ligne a échoué. L'association du Cetuximab avec la radiothérapie a permis l'amélioration de la survie globale de façon

significative chez les patients présentant un cancer localement avancé par rapport à la radiothérapie seule (49 mois *versus* 29,3 mois).^(19, 20)

Devant l'émergence de différentes modalités de résistances à cette molécule, tels que le variant III d'EGFR (vIII), l'hyper régulation du ligand, l'hyper activation du récepteur indépendante du ligand et/ou l'implication d'autres membres de la famille HER (Cf. article Rysman *et al.* en annexe), de nouvelles cibles sont actuellement visées, et des associations thérapeutiques sont en cours de développement clinique.

Les thérapies ciblées en évaluation clinique concernent les anticorps monoclonaux inhibiteurs d'EGFR, directs ou *via* l'inhibition de l'ATK, mais également les inhibiteurs de VEGFR, les inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et les inhibiteurs du proto-oncogène MET et de l'IGF-1R (Figure 6).⁽²¹⁾ Ces essais cliniques s'adressent toujours à des patients atteints d'un carcinome épidermoïde des VADS en récurrence loco-régionale ou à l'état métastatique.

➤ Les Inhibiteurs d'EGF-R (Tableau 1)

Les inhibiteurs directs d'EGFR ciblent le domaine extracellulaire du récepteur et bloquent donc la liaison du ligand et en conséquence la dimérisation du récepteur, ce qui inhibe la transduction du signal de prolifération et de survie cellulaire.⁽²²⁾ Il a également été démontré que ce type d'inhibiteur activait la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et favorisait donc la réponse immunitaire (Figure 6).⁽²²⁾

Le cetuximab, dont l'action consiste en une inhibition directe, est le premier et le seul anticorps à avoir obtenu l'AMM en ORL mais un certain nombre de mécanismes de résistance à cette molécule sont maintenant bien connus. En conséquence, de nouvelles thérapies développées, possédant une meilleure demi-vie et une immunogénicité diminuée, ont été testées en clinique.

Dans l'étude SPECTRUM, le panitumumab, anticorps monoclonal anti-EGFR direct, n'a pas démontré en association avec le cisplatine et le 5FU, d'amélioration de la survie globale mais il a permis d'optimiser la survie sans progression et la réponse objective tumorale en présentant un profil de tolérance comparable à d'autres thérapies ciblées (troubles métaboliques, mucite et troubles vasculaires).⁽²³⁾ Le zalutumumab, anticorps anti-EGFR, a montré une amélioration de la survie sans progression significativement plus élevée que les soins de support seuls dans un essai clinique en phase III.⁽²⁴⁾

Cependant, des mécanismes de résistance identiques au cetuximab ont été mis en évidence pour ces deux molécules.⁽²²⁾

➤ Les Inhibiteurs de l'ATK (Tableau 1)

Les TKI se lient au domaine intracellulaire des récepteurs à comme l'EGF et rentrent en compétition avec la sous-unité de liaison à l'ATP. La conséquence est une inhibition de la phosphorylation et de la cascade de signalisation cellulaire (Figure 6).

Les premières molécules développées en ce sens (gefitinib et erlotinib) n'ont pas montré de résultats intéressants avec un taux de réponse supplémentaire de 1,4 à 10,6% par rapport à une radio-chimiothérapie classique seule.^(25, 26) D'autres molécules plus prometteuses sont en développement, il s'agit d'inhibiteurs multi kinases, ciblant non seulement EGFR mais également HER2 et HER4, et se lient de façon irréversible à la sous unité de liaison à l'ATP. Ce mode de liaison permet d'éviter l'échappement thérapeutique lié à l'hétéro-dimérisation du récepteur EGF.

Le lapatinib est un TKI avec une spécificité vis-à-vis d'EGFR et de HER2.⁽²⁷⁾ Utilisée seule cette molécule n'apporte pas de bénéfice, mais en association à la radiothérapie, les résultats apparaissent plus intéressants.⁽²⁸⁾ L'afatinib et le dacomitinib sont des TKI oraux à liaison irréversible aux récepteurs EGF, HER2 et HER4 avec la particularité pour le dacomitinib de cibler un variant du récepteur EGF impliqué dans la résistance au cetuximab, l'EGFR VIII.⁽²⁹⁾ Cette molécule montre en première ligne et en phase II, une activité anti-tumorale intéressante avec un taux de réponse objectif de 11% et peu d'effets secondaires.^(30, 31)

Les avantages principaux de ces molécules résident dans leur administration orale, ne nécessitant donc pas d'hospitalisation, et leur irréversibilité. En effet, leur action est prolongée dans le temps et moins de prises orales sont nécessaires, avec par conséquent une meilleure compliance des patients. Les effets toxiques principaux sont gastro-intestinaux (diarrhée, douleurs abdominales). Leur mode d'inhibition multi kinase permet d'annihiler l'activation persistante d'EGFR à l'origine de certaines résistances au cetuximab.

Tableau 1: Anticorps monoclonaux et inhibiteurs de tyrosine kinase en essais cliniques en oncologie des VADS.

Molécule	Cible	Phase de développement
<i>Anticorps monoclonaux</i>		
Cetuximab	EGFR	Approuvé
Panitumumab	EGFR	III
Zalutumumab	EGFR	III
Nimotuzumab	EGFR	III
<i>Inhibiteurs de Tyrosine Kinase</i>		
Lapatinib (réversible)	EGFR et HER2	III
Afatinib (irréversible)	EGFR, HER2 et HER4	III
Erlotinib (réversible)	EGFR	III (clos, pas de bénéfice)
Dacomitinib (irréversible)	EGFR, HER2 et HER4	II

➤ Inhibiteurs de VEGF-R (Tableau 2)

L'angiogenèse tumorale est un marqueur des cancers avancés et favorise l'invasion tumorale ainsi que le développement de métastases. Environ 90% des cancers des VADS expriment des facteurs angiogéniques comme le VEGF. Une des explications de cette forte expression réside dans la croissance tumorale rapide des tumeurs. En effet, celle-ci provoque une hypoxie tumorale à l'origine d'une synthèse de facteurs de survie cellulaire comme HIF-1 α et le VEGF, donnant ainsi lieu à une prolifération tumorale, une angiogenèse et une augmentation de la radiorésistance (Figure 6).⁽³²⁾

Des thérapies anti-angiogéniques seules n'ont pas démontré d'efficacité *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles précliniques. L'association de ces molécules avec la radiothérapie apparaît plus intéressante en provoquant une apoptose des cellules endothéliales et des cellules tumorales, et en augmentant les espèces réactives de l'oxygène elle-même responsables de dommages au niveau de l'ADN.⁽³³⁾

Le bevacizumab (Avastin), un anticorps monoclonal recombinant anti-VEGF-A, a été testé en phase II clinique en combinaison avec le cetuximab dans les maladies récidivantes ou métastatiques. Cette association apparaissait bien tolérée et la survie globale était de 7,5 mois.⁽³³⁾ Une étude récente de phase II combinant le bevacizumab avec le 5-FU et l'hydroxycarbamide a montré un taux de survie à 2 ans de 68% mais ce travail a été interrompu en raison d'un taux de progression loco-régionale inattendu.⁽³⁴⁾

Le vandetanib (ZD6474, Zactima) est un nouvel inhibiteur oral de l'activité tyrosine kinase de VEGFR-2 et d'EGFR. Le vandetanib apparaît comme un inhibiteur de la voie de signalisation PI3/AKT et son activité anti-angiogénique est majorée par l'irradiation. Il favorise l'apoptose et diminue la densification micro vasculaire *in vivo*. Un essai clinique randomisé de phase II associant cisplatine et irradiation avec ou sans vandetanib est en cours d'évaluation dans les stades III/IV.⁽³⁵⁾

Le sunitinib est une nouvelle petite molécule inhibitrice de RTK mais dont les cibles sont multiples. En effet, elle inhibe les mécanismes de prolifération tumorale et d'angiogenèse impliquant VEGFR-1, 2 et 3, PDGFR- α et β , Kit et fms-like tyrosine kinase 33. En phase II clinique, l'efficacité du sunitinib en monothérapie a été testée dans les maladies récidivantes et/ou métastatiques, les résultats n'ont cependant pas été satisfaisants.⁽³⁶⁾ Une association avec l'irradiation en IMRT en mode hypo fractionnée chez 25 patients dont 4 avec cancer des VADS, a démontré à 18 mois une survie sans progression de 56% et un taux de survie globale de 71%.⁽³⁷⁾

Le sorafenib, un inhibiteur oral de B-Raf, C-Raf, VEGFR-2 et 3, PDGFR, flt-3 et c-kit, a démontré un effet stabilisateur et une réponse partielle en monothérapie chez des patients traités pour maladies récidivantes et/ou métastatiques avec un taux médian de progression et de survie globale respectivement de 1,8 mois et 4,2 mois mais avec une toxicité non négligeable. Les effets sur la croissance tumorale et l'angiogenèse apparaissent plus intéressants en association à la radio-chimiothérapie *in vitro* et *in vivo*.^(38, 39)

Le motesanib est un puissant inhibiteur de VEGFR-1, 2 et 3, PDGFR et le récepteur Kit. Dans des études précliniques, il montre une augmentation significative de l'hypoxie tumorale, et majore l'effet de mort cellulaire induit, s'il est combiné à l'irradiation. Cet effet d'induction de l'hypoxie tumorale a été mis en évidence *in vivo*, il est associé à une augmentation de la nécrose tumorale. Les auteurs proposent l'hypothèse du remodelage du microenvironnement tumoral et insistent sur la nécessité d'une association d'un anti-angiogénique à l'irradiation, dans cet ordre chronologique, dans le contexte d'une séquence thérapeutique.⁽³²⁾

Le linifanib (ABT-869) est un nouvel inhibiteur du récepteur tyrosine kinase des familles VEGF et PDGF en jouant le rôle d'agoniste de l'ATP. De même que pour les autres thérapies, son action sur l'inhibition de la croissance tumorale et l'induction de l'apoptose sont majorées par l'association à la radiothérapie, en stimulant la voie de signalisation STAT3.⁽³³⁾

Tableau 2: Inhibiteurs de VEGF-R en cancérologie des VADS.

Molécule	Cible(s)	Protocole thérapeutique	Phase de développement
Bevacizumab	VEGF-A	Bevacizumab + cetuximab Bevacizumab + 5FU	Clos (SG= 7,5 mois) Interrompu (progression LR)
Vandetanib	VEGFR-2 EGFR	Vandetanib + irradiation + cisplatine	Phase II en cours
Sunitinib	VEGFR-1 -2 -3 PDGFR- α et β Kit fms like tyrosine kinase 33	Sunitinib	Phase II clos (pas de bénéfice)
Sorafenib	B-raf et C-raf VEGFR-2 et 3 PDGFR Flt-3 c-kit	Sorafenib	Clos (effet stabilisateur)
Motesanib	VEGFR-1 -2 -3 PDGFR Kit	Motesanib	Etudes précliniques (majoration de l'hypoxie tumorale)
Linifanib	VEGFR PDGFR	Linifanib	Etudes précliniques (induction de l'apoptose)

➤ Inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR (Tableau 3)

La voie de signalisation cellulaire PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans la prolifération cellulaire. Il s'agit d'une voie auto-activée dans le processus de résistance aux inhibiteurs d'EGFR (Figure 6).

Deux molécules inhibitrices de cette voie de signalisation sont actuellement utilisées dans le cadre d'études cliniques dans les cancers des VADS, l'everolimus et le temsirolimus. Certaines études ont été stoppées précocement en raison de la toxicité des produits et de l'absence d'efficacité. Des marqueurs tumoraux ont été mis en évidence pouvant prédire une efficacité de ces inhibiteurs, il s'agit de la mutation PIK3CA, de la surexpression de PTEN et de l'élévation du taux plasmatique de VEGF et de l'INF-gamma.⁽⁴⁰⁾

Tableau 3: Essais cliniques impliquant des inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR seuls ou en association en cancérologie des VADS (adapté de Bauman et al.).⁽⁴⁰⁾

N° de l'essai	Stade	Phase	Protocole	Etat	Résultats
NCT00858663	Localement avancé, radiothérapie	I	Cisplatine, IMRT, everolimus	Fermé	Dose recommandé en phase 2 : Everolimus 5mg/j, cisplatin 30mg/m ² /semaine
NCT01333085	Localement avancé, induction	I/II	Carboplatine, paclitaxel, everolimus	En cours	Non reporté
NCT01133678	Localement avancé, induction	I/II	Cisplatine, paclitaxel, cetuximab, everolimus	En cours	Non reporté
NCT01111058	Localement avancé, adjuvant	II	Everolimus vs. placebo	Pas ouvert	Non reporté
NCT01172769	R/M	II	Temsirolimus	En cours	Non reporté
NCT01051791	R/M	II	Everolimus	Terminé	Pas de réponse objective
NCT00942734	R/M	II	Everolimus, erlotinib	En cours	Non reporté
NCT01256385	R/M	II	Temsirolimus ± cetuximab	En cours	Non reporté
NCT01009203	R/M	II	Temsirolimus, erlotinib	Terminé	Arrêté précocement pour toxicité
NCT01009346	R/M	I	Cisplatine, cetuximab, everolimus	Terminé	Arrêté précocement pour toxicité
NCT01015664	R/M	I/II	Cisplatine, cetuximab, temsirolimus	En cours	Non reporté
NCT01283334	R/M	I/II	Carboplatine, cetuximab, everolimus	En cours	Non reporté
NCT01016769	R/M	I/II	Carboplatine, paclitaxel, temsirolimus	Fermé	Dose recommandé en phase 2 : Carboplatine (AUC 1,5), Paclitaxel 80mg/m ² , Temsirolimus 25mg IV à J1, J8 et J21 du cycle

➤ Inhibiteurs de MET et IGF-1R

Le foretinib (GSK 1363089) est une petite molécule délivrée par voie orale. Il s'agit d'un inhibiteur multi kinase de MET et de VEGFR2. Il agirait en se liant à la sous unité de liaison de

l'ATP de MET et de VEGFR2. Ainsi, il réduirait la prolifération tumorale et les métastases à travers l'inhibition de MET et diminuerait l'angiogenèse par inhibition de VEGFR2.

Une étude clinique de phase II a évalué l'efficacité en monothérapie et le profil de tolérance de cette molécule. Celle-ci apparaît bien tolérée (constipation, asthénie, hypertension) mais ne démontre qu'une stabilisation de la maladie (50% des cas) avec une survie sans progression de 3,65 mois et une survie globale de 5,59 mois.⁽⁴¹⁾ La synergie d'une inhibition combinée de MET/EGFR paraît plus prometteuse.⁽⁴²⁾

Le récepteur IGF1 peut stimuler un certain nombre de réponses intracellulaires de type prolifération cellulaire, différenciation, adhésion, motilité, angiogenèse et survie. Il est associé à une faible survie dans les cancers oraux.⁽⁴³⁾ Son inhibition *in vitro* et *in vivo* dans des cellules humaines cancéreuses nasopharyngées par la picropodophyllin a montré un intérêt, d'autant plus que cette molécule s'avère être un inhibiteur spécifique du récepteur IGF1 (Figure 6).⁽⁴⁴⁾ Ce travail préliminaire devra bien évidemment être confirmé par des études cliniques.

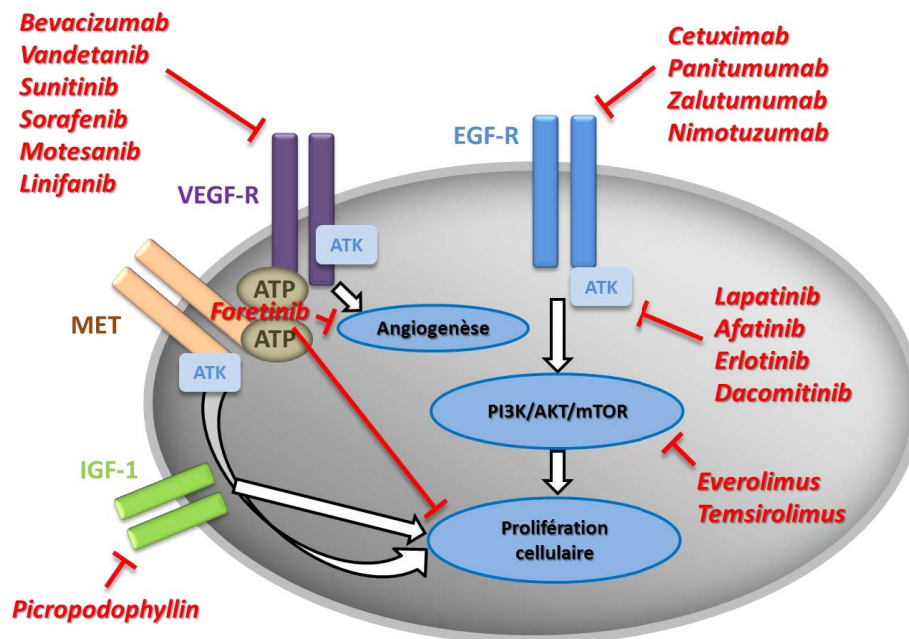


Figure 6 : Mécanismes d'action des biothérapies en développement dans les cancers des VADS. Le cetuximab, le panitumumab, le zalutumumab et le nimotuzumab sont des inhibiteurs directs du récepteur EGF. Le lapatinib, l'afatinib, l'erlotinib et le dacomitinib sont des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (ATK) du récepteur EGF. Le bevacizumab, le vandetanib, le sunitinib, le sorafenib, le motesanib, le linifanib sont des inhibiteurs de l'angiogenèse *via* l'inhibition des récepteurs de type VEGF-R. L'everolimus et le temsirolimus sont des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR. Le foretinib est un inhibiteur de l'angiogenèse et de la croissance cellulaire *via* sa fixation à la sous unité ATP des récepteurs VEGF et MET. La picropodophyllin est un inhibiteur du récepteur IGF-1.

➤ EGFR et statut HPV

Le statut HPV+ est un facteur pronostic favorable et prédictif d'une bonne réponse à un traitement par chimiothérapie d'induction et radio chimiothérapie, ou radiothérapie exclusive chez des patients présentant un carcinome épidermoïde des VADS.⁽²²⁾ Il existe un rapport inverse entre l'expression d'EGFR et le statut HPV, chez les patients HPV+.⁽⁴⁵⁾ Ces patients présentant un statut HPV+ et une faible expression d'EGFR présenteraient un meilleur pronostic et une meilleure réponse au traitement dans les cancers oropharyngés.⁽⁴⁶⁾ Mais les bénéfices entre le statut HPV et la réponse aux traitements ciblant EGFR ne sont pas encore clairement établis et les études sur ce point restent contradictoires.

Le développement clinique des thérapies ciblées en oncologie et plus encore en cancérologie des VADS s'oriente dans différentes directions. En effet, de multiples cibles sont envisagées en inhibant, les récepteurs à l'EGF directement ou l'activité tyrosine kinase, l'angiogenèse, la

voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, le proto-oncogène MET ou IGF-1R. Ces traitements restent actuellement l'apanage des maladies récidivantes ou métastatiques. L'efficacité de ces molécules reste toutefois faible en monothérapie, c'est pourquoi les études sont menées de plus en plus vers des traitements combinant la radiothérapie à une ou plusieurs thérapies ciblées.

Ces thérapies ciblées, dirigées contre des récepteurs membranaires et leur(s) voie(s) de signalisation en aval, se heurtent souvent à la plasticité des cellules cancéreuses et à l'existence de réseaux de récepteurs et à de nombreux ponts entre les voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, lorsque qu'un récepteur membranaire est touché, de nombreux mécanismes de résistance permettent un relais du signal menant à l'échec thérapeutique.

Une nouvelle classe d'agents anticancéreux ciblés existe. Elle consiste non pas à inhiber une protéine ou une fonction cellulaire spécifique des cellules tumorales, mais à utiliser une caractéristique propre à ces cellules comme cible pour un agent anticancéreux de nature plus conventionnelle. Il s'agit par exemple, d'un cytotoxique couplé à un anticorps dirigé contre une protéine dont l'expression est spécifique des cellules tumorales, comme le BAY 79-4620 (Bayer) qui combine la Monomethyl auristatin E à un anticorps anti-CAIX.⁽⁴⁷⁾ D'autres molécules s'activent uniquement dans les cellules hypoxiques, comme l'alkylant TH-302 développé par Merck⁽⁴⁸⁾, ou utilisent l'expression de transporteurs spécifiques pour véhiculer le composé toxique dans les cellules cancéreuses. Parmi ces derniers, le F14512 (Pierre Fabre), un inhibiteur de topoisomérase II couplé à une polyamine, agit comme un cheval de Troie incorporé préférentiellement par les cellules cancéreuses *via* leur système de transport des polyamines (STP) suractivé.

II. LE SYSTEME DE TRANSPORT DES POLYAMINES ET LE F14512

II.A. Les polyamines

La famille des polyamines est constituée de petites molécules ubiquitaires, cationiques et de faible poids moléculaire. Chez les procaryotes et les eucaryotes, la putrescine, la spermidine et la spermine sont les membres principaux de cette famille.

Ces polyamines peuvent être d'origine endogène (synthétisées par les cellules de l'organisme à partir de l'arginine) ou exogène (issues de l'alimentation ou des bactéries de la flore intestinale). La régulation de la concentration intracellulaire des polyamines est régie par différents mécanismes contrôlant leur biosynthèse et leur dégradation ainsi que les échanges avec le milieu extracellulaire. Ces mécanismes de régulation dépendent de systèmes de transport facilitateurs et de voies métaboliques complexes permettant le maintien d'une concentration optimale de polyamines et cela en fonction de l'état de prolifération des cellules.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾

II.A.1. Rôles des polyamines

De nombreux processus cellulaires dont la prolifération et la différenciation cellulaire sont dépendants des polyamines. La capacité de ces polyamines à interagir comme des polycations avec des structures chargées négativement telles que les acides nucléiques, les protéines ou les lipides membranaires leur permet de jouer ces rôles clés dans les processus cellulaires.⁽⁵²⁾ En neutralisant les charges négatives, les polyamines diminuent la répulsion électrostatique existant entre les brins d'ADN. La spermine et la spermidine peuvent ainsi condenser l'ADN et induire un changement de conformation de certaines de ses séquences.^(52, 53) La fixation des polyamines sur différentes protéines, se traduirait par une stimulation de certaines activités enzymatiques (Kinase II, topoisomérase) ou par la modulation de certains récepteurs (N-méthyl-D-aspartate) ou certains canaux membranaires.^(54, 55)

Les polyamines ont une action membranaire sur le mouvement des ions, tel que le calcium, mais elles peuvent également interagir avec des phospholipides de la membrane en formant des complexes protéines-phospholipides majorant la rigidité membranaire.⁽⁵⁶⁾ De même, elles jouent un rôle préventif dans la peroxydation lipidique.⁽⁵⁷⁾

II.A.2. Synthèse des polyamines

Le métabolisme des polyamines est initié à partir de l'ornithine. Cet acide aminé est formé par l'intermédiaire de l'arginase dans le cycle de l'urée ou à partir de l'alimentation (Figure 7). L'ornithine peut être ensuite décarboxylée en putrescine par le biais de l'ornithine décarboxylase (ODC). Sous l'action de la spermidine synthétase, la putrescine est alors transformée en spermidine (Spd) en greffant un groupement aminopropyl. Cette spermidine peut être transformée en spermine (Spm) par la spermine synthétase selon le même schéma réactionnel (Figure 7).

Dans les conditions physiologiques, les réactions catalysées par les synthétases de la spermine et de la spermidine sont considérées comme irréversibles. Cependant, la reconversion de la spermine en spermidine et de la spermidine en putrescine est possible par l'intervention de deux enzymes : la spermidine/spermine-acétyltransférase (SSAT) et la polyamine oxydase (PAO).⁽⁵⁸⁾

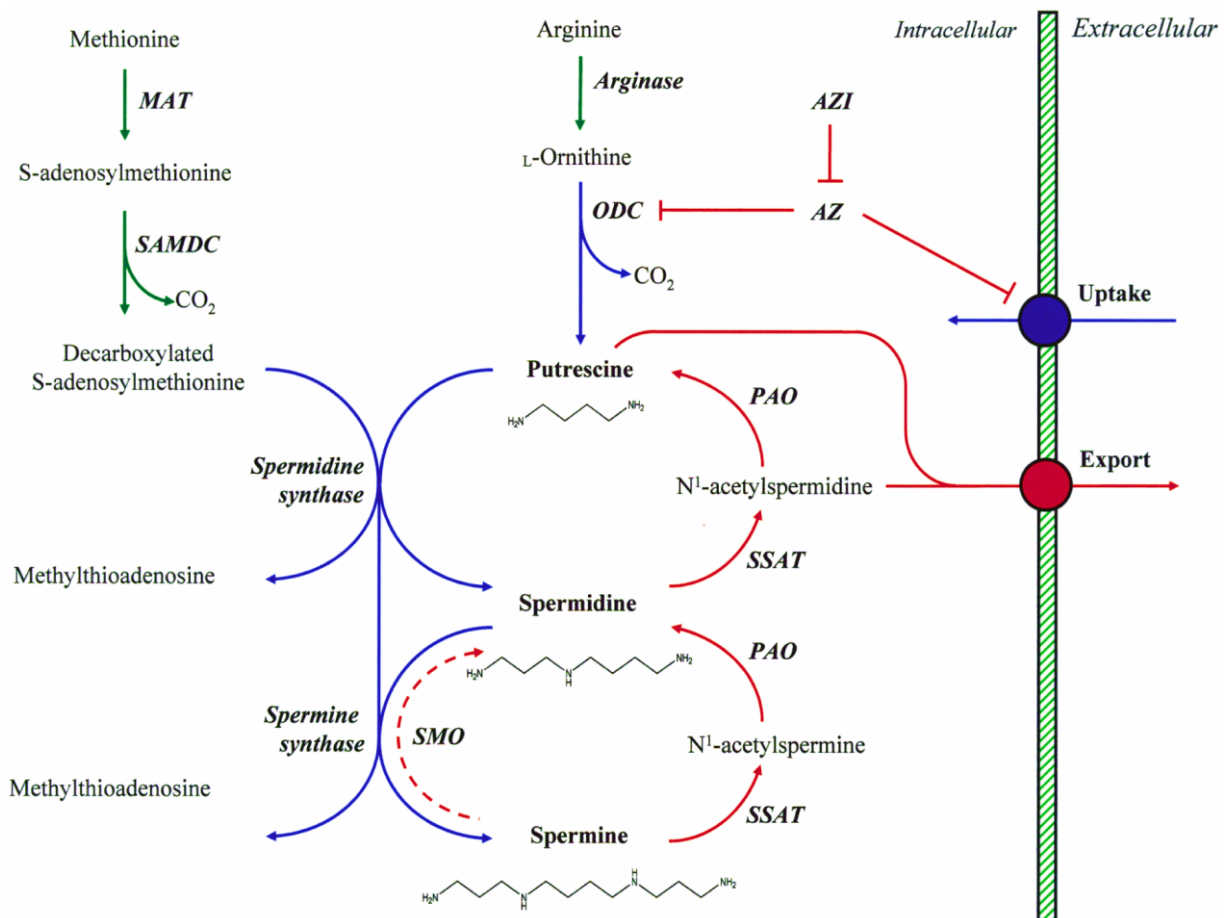


Figure 7 : Métabolisme des polyamines. L'ornithine, produite par l'activité arginase, est décarboxylée en putrescine par l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine est alors transformée en spermidine (Spd) sous

l'action de la spermidine synthétase par transfert d'un groupement aminopropyl. De la même façon, la spermidine est transformée en spermine (Spm) par la spermine synthétase. Les groupements aminopropyls transférés sont issus de l'activité de deux enzymes : l'adénosylméthionine transférase (MAT) et la S-adénosylméthionine décarboxylase (SamDC). Ces enzymes catalysent, à partir de la méthionine, la décarboxylation de la S-adénosylméthionine en S-désoxy-adénosylméthionine, donneur d'un groupement aminopropyl. Le second produit de cette réaction est du 5'-méthylthioadénosine qui, phosphorylé, produit de l'adénine et du 5'-méthylthioribose-1-phosphate. La reconversion de la spermine en spermidine et de la spermidine en putrescine est possible grâce à l'intervention de la spermidine/spermine-acétyltransférase (SSAT) et de la polyamine oxydase (PAO) (Adapté de HM. Wallace et al. 2003).⁽⁵⁸⁾

II.A.3. Le Système de Transport des Polyamines (STP)

Chez les procaryotes, le STP est connu au plan moléculaire. Un système de transport de haute affinité existe pour la spermidine et la spermine ainsi qu'un système non saturable et de faible affinité pour les trois polyamines. Une étude réalisée à l'aide de spermidine, couplée à un fluorophore, a montré que le transport était initié par la liaison de la polyamine à la membrane, suivie d'une séquestration dans un compartiment vésiculaire acide.^(54, 59)

Chez les mammifères, le STP reste à ce jour non identifié sur le plan moléculaire. Cependant, il a été démontré que son activité était ATP dépendante et que le STP est stimulé par le Na⁺. Deux hypothèses ont été émises concernant le mécanisme de transport, l'une dans laquelle l'absorption des polyamines dépendrait de protéines transmembranaires ayant une affinité élevée pour ces polycations, l'autre décrit un système d'endocytose (Figure 8).^(60, 61) Cette endocytose serait cavéoline dépendante et ferait intervenir une protéine de liaison aux polyamines. L'oxyde nitrique (NO), produit par l'oxyde nitrique synthétase (NOS2), libérerait ensuite dans la vacuole la polyamine de cette protéine de liaison. Dans l'hypothèse des protéines transmembranaires, dans des cellules gastro-intestinales de souris, celles-ci véhiculeraient l'arginine, la putrescine et les polyamines acétylées. Ces dernières sont produites par la spermidine/spermineN-acétyltransférase (SAT1) et exportées de la cellule *via* le canal transmembranaire SLC3A2.

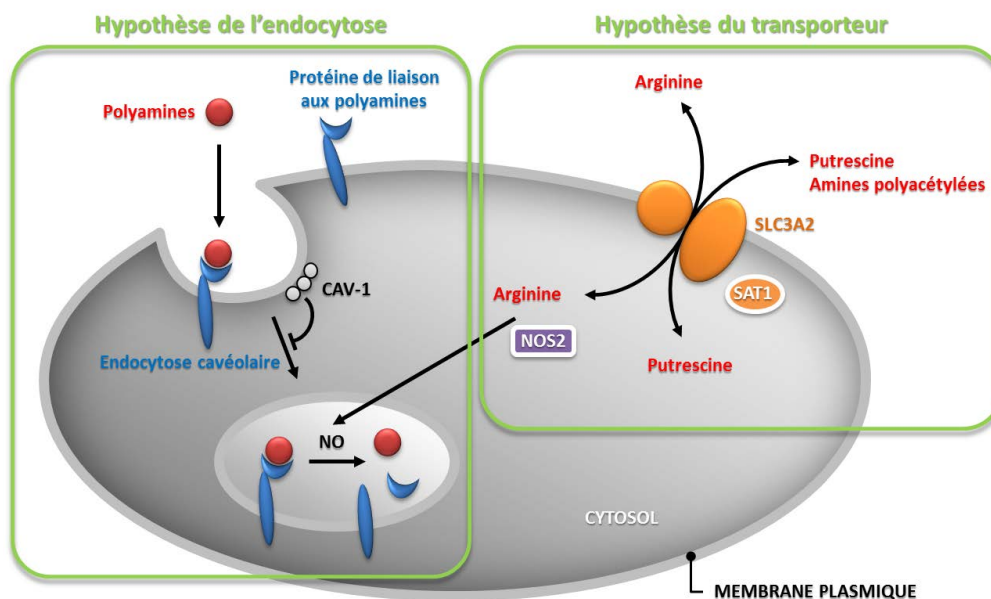


Figure 8 : Représentation schématique des hypothèses de transport des polyamines et de la chaîne des polyamines. Il existerait 2 hypothèses principales indépendantes ou associées. Dans la première hypothèse, l'endocytose qui serait cavéoline dépendante et régulée négativement par CAV-1, ferait intervenir une protéine membranaire de liaison aux polyamines. L'oxyde nitrique (NO), produit par la NOS2 à partir de l'arginine, libérerait ensuite, dans la vacuole, la polyamine de cette protéine de transport. Dans la seconde hypothèse, le canal transmembranaire SLC3A2, véhiculerait arginine, putrescine et polyamines acétylés produit par la spermidine/spermine N-acétyltransférase (SAT1) (Adapté de Uemura *et al.*, 2010).⁽⁶¹⁾

II.A.4. Polyamines et cancer

Le rôle crucial des polyamines dans la croissance cellulaire est connu. Celles-ci sont retrouvées en plus grande concentration dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.⁽⁶²⁾ De même, le STP a été retrouvé suractivé dans différents types cancéreux tels que le cancer du sein, de la prostate.⁽⁶³⁾ Deux stratégies peuvent donc être envisagées dans le traitement du cancer ciblé sur le métabolisme des polyamines. La première stratégie consisterait à inhiber les voies de synthèse des polyamines par le biais d'une réduction des sources exogènes de polyamines dans l'organisme ou par inhibition de l'ornithine décarboxylase. La deuxième solution pourrait être d'utiliser le STP, à la façon d'un cheval de Troie, afin de faire pénétrer un agent cytotoxique de façon active et ciblée dans les cellules cancéreuses.⁽⁶⁴⁾ C'est cette seconde stratégie que les laboratoires Pierre Fabre ont envisagé pour l'élaboration de leur nouvel inhibiteur de topoisomérase II, le F14512.

II.B. Le F14512 : Inhibiteur de topoisomérase II

Le F14512 est une molécule développée par les laboratoires Pierre Fabre, appartenant à la famille des inhibiteurs de topoisomérase II. Elle diffère de l'étoposide, chef de file de cette famille, par la présence sur son corps épipodophyllotoxine (corps pharmacologiquement actif) d'un groupement spermine qui en fait son originalité.

II.B.1. La famille des topoisomérases II

Les topoisomérases appartiennent à une famille d'enzymes contrôlant la topologie de l'ADN par des phénomènes de coupures-rotation-religation en brins. Elles se divisent en deux classes principales, selon la nature des mécanismes impliqués, les topoisomérases I et II.

La topoisomérase II est ainsi une enzyme majeure dans le processus de réplication, de transcription et de recombinaison de l'ADN. Celle-ci se lie à la double hélice d'ADN et stabilise les coupures double-brin. Son action peut se décomposer en cinq étapes (Figure 9).⁽⁶⁵⁾

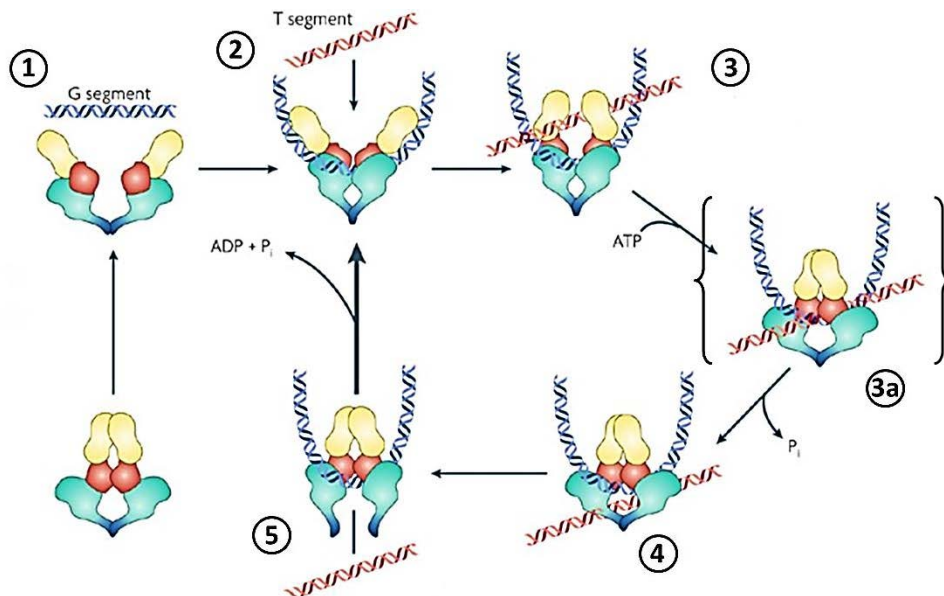


Figure 9 : Mécanisme d'action de la topoisomérase II. L'enzyme, composée de 2 sous-unités, comprend des domaines à activité ATPase représentés en vert et des domaines consacrés à l'interaction avec l'ADN représentés en orange. (1-2) Reconnaissance du substrat et liaison de l'enzyme à l'ADN. (3-3a) Clivage du double brin du segment G. (3a-4) Modifications conformationnelles et passage du segment T à travers le segment G ouvert. (5) Hydrolyse de l'ATP, libération des molécules d'ADN et recyclage de l'enzyme (Adapté de Nitiss, 2009).^(65,66)

La topoisomérase II se lie d'abord de façon non covalente à un ADN surenroulé appelé segment G (étapes 1 et 2). A la suite de cette interaction avec le segment G, la topoisomérase se trouve dans une conformation présentant une cavité interagissant avec une deuxième double hélice appelée segment T (étapes 3 et 3a). Cette cavité est générée par les extrémités N-terminales de la topoisomérase II possédant une activité ATPase. Le segment G est clivé et la fixation d'une molécule d'ATP par le complexe entraîne une modification conformationnelle de l'enzyme déclenchant la migration du segment T au travers du segment G ouvert (étapes 3a et 4). La religation du segment G s'accompagne de la libération du segment T (étape 4). La topoisomérase II retrouve ensuite sa capacité à s'engager dans un nouveau cycle catalytique grâce à l'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP en ADP et en phosphate inorganique (étape 5).

II.B.2. Le F14512 : Inhibiteur de topoisomérase II des laboratoires Pierre Fabre

Le F14512 est un nouvel inhibiteur de topoisomérase II, dérivé de l'étoposide, chef de file de la famille des épipodophyllotoxines (Figure 10).

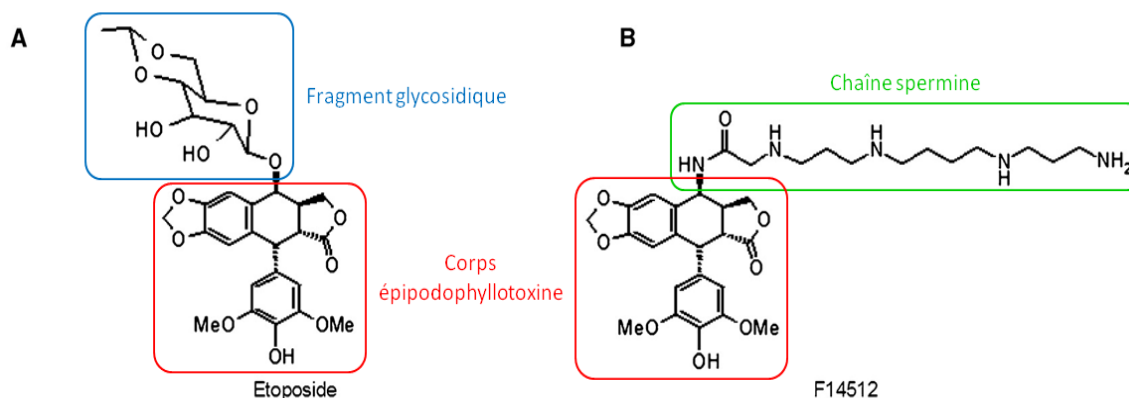


Figure 10 : Structure de l'Etoposide (A) et du F14512 (B). L'étoposide est composé d'un corps épipodophyllotoxine (encadré rouge) et d'un fragment glycosidique en C4 (encadré bleu). Le F14512 comporte le même corps épipodophyllotoxine (encadré rouge) sur lequel est greffée une chaîne spermine (encadré vert).

L'étoposide se compose d'un corps épipodophyllotoxine, responsable de son interaction avec la topoisomérase II et d'un fragment glycosidique en C4 modulant les interactions de la molécule avec l'ADN. L'étoposide est un inhibiteur de topoisomérase II dit « poison » par sa capacité à former un complexe covalent stable avec l'ADN et l'enzyme. Ce complexe provoque, à l'arrivée de la fourche de réplication, des cassures double brin de l'ADN conduisant à la mort cellulaire. L'étoposide, bien qu'efficace en mono-chimiothérapie,

apparaît comme une molécule toxique pouvant potentiellement provoquer de nombreux effets indésirables au niveau hématologique, hépatique ou encore une hypofertilité. Ce médicament est le plus souvent utilisé en association avec d'autres agents cytotoxiques tels les sels de platine ou les alkylants dans des protocoles thérapeutiques. De plus, l'étoposide, en monothérapie orale, a montré une efficacité égale à l'association cisplatine/5-FU chez des patients atteints de récurrences ou de métastases de tumeurs ORL.⁽⁶⁷⁾ La limite de l'étoposide apparaît être, dans cette étude, sa toxicité hématologique.

Pour limiter les effets indésirables de ce type de molécule, les laboratoires Pierre Fabre ont greffé un groupement polyamine, permettant la vectorisation par le STP, sur un corps épipodophyllotoxine (corps pharmacologiquement actif). Après synthèse et optimisation, différents composés ont été testés sur de l'enzyme purifiée d'abord puis *in vitro* sur des cultures cellulaires. Parmi ces composés, le F14512 s'est montré le plus efficace dans de nombreuses lignées cancéreuses (sein, poumon, leucémie, colon, mélanome, sarcome)^(64, 68) et a ainsi été sélectionné pour le développement en thérapeutique humaine.

Porteur d'un groupement spermine, le F14512 s'est révélé plus soluble et plus affiné pour l'ADN que l'étoposide. Ce nouvel inhibiteur de topoisomérase II, activement incorporé par la cellule cancéreuse présentant un STP suractivé⁽⁶⁰⁾, fonctionne donc à la façon d'un cheval de Troie. Une fois dans la cellule, la molécule peut alors inhiber sa cible, la topoisomérase II et favoriser la mort cellulaire.

II.B.3. La sonde fluorescente : Le F17073

Au plan moléculaire le STP n'étant pas parfaitement connu, son étude, nécessite l'utilisation d'une sonde fluorescente développée par les laboratoires Pierre Fabre, le F17073 (Figure 11). Cette sonde possède, comme le F14512, un groupement spermine permettant sa prise en charge par le STP et comporte un groupement fluorescent, le NBD^(69, 70). Le F17073 permet donc de mesurer en cytométrie en flux l'activité du STP et de visualiser en microscopie de fluorescence son devenir au niveau intracellulaire afin de prédire l'entrée et la localisation du F14512 dans les cellules.

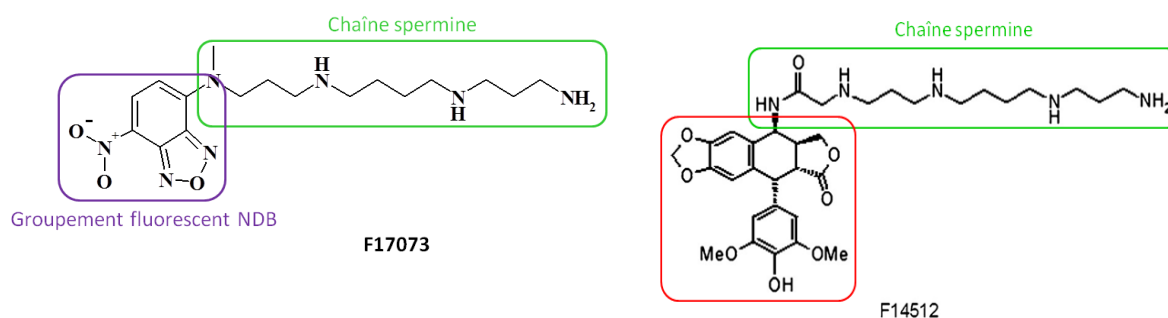


Figure 11 : Structure de la sonde fluorescente F17073 (à gauche) et du F14512 (à droite). Le F17073 se compose d'une chaîne spermine (encadré vert) associée à un fluorophore (encadré violet), le NBD. Le F14512 se compose d'un groupement épipodophyllotoxine (encadré rouge) sur lequel est greffée une chaîne spermine (encadré vert).

II.B.4. Etudes précliniques et développement en clinique du F14512

In vitro, sur des lignées cellulaires d'ovaires de hamster chinois, les concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) du F14512 et de l'étoposide montraient une forte différence d'activité, avec des valeurs respectivement de 0,12 μM et 1,1 μM. Des expériences de xénogreffes, *in vivo*, de cellules leucémiques P388 et de cellules tumorales de sein MX-1, sur des souris immunodéficientes *nude*, ont confirmé que le F14512 était un composé plus cytotoxique que l'étoposide et hautement actif chez l'animal. Dans ce modèle, le F14512 entraînait une régression complète de la tumeur chez toutes les souris greffées. Enfin, le F14512 était relativement bien toléré n'entraînant pas de perte de poids de la souris à une dose de 80 mg/Kg.⁽⁶⁴⁾

Un autre travail préclinique, mené sur des cellules A549 de cancer du poumon non à petites cellules, a montré une cytotoxicité 30 fois supérieure du F14512 par rapport à l'étoposide. Par ailleurs, une action rapide de la molécule était notée (dans les 3 heures).⁽⁷¹⁾ A l'inverse de l'étoposide, il n'était pas retrouvé d'accumulation en phase S du cycle cellulaire. Le type de mort cellulaire induit par le composé différait également de celui provoqué par l'étoposide. En effet, alors que ce dernier entraînait une mort cellulaire par apoptose, le F14512 induisait préférentiellement un mécanisme de sénescence dans ce modèle comme en témoignait l'augmentation de l'activité β-galactosidase.

Ces travaux sur le type de mort cellulaire ont été confirmés sur des lignées de leucémies aiguës myéloïdes, dans lesquelles le F14512 induisait également une sénescence majoritaire par rapport au mécanisme d'apoptose cellulaire.⁽⁷²⁾ Dans ce travail, les auteurs rapportaient

également une synergie *in vitro* du F14512 avec la gemcitabine, le bortezomib, la cytosine arabinoside et la doxorubicine.

Fort de ces résultats intéressants, un premier essai clinique de phase I a été effectué dans une population adulte de 39 patients porteurs d'une leucémie aigüe myéloïde réfractaire ou en rechute.⁽⁷³⁾ Le traitement par F14512 était administré par cycle de 5 jours consécutifs. La dose maximale tolérée était de 44 mg/m²/j et la dose recommandée pour l'étude de phase II en cours est de 39 mg/m²/j. Les réponses rapportées par les auteurs étaient de 4 réponses complètes et de 3 réponses partielles. L'activité du STP, évaluée par l'analyse de l'incorporation de la sonde F17073 était plus importante dans les cellules leucémiques que dans les lymphocytes dans cette population étudiée.⁽⁷⁴⁾

Le F14512 diffère donc de l'étoposide par son mode de pénétration ciblée (via le STP *versus* une diffusion passive), ses modalités d'action sur l'ADN (affinité accrue grâce au groupement spermine) et par le type de mort cellulaire qu'il induit. Ce nouvel inhibiteur de topoisomérase II montre ainsi une cytotoxicité majorée par rapport à l'étoposide dans la majorité des types tumoraux étudiés *in vitro* et il apparaît bien toléré chez les patients dans le premier essai clinique. En considérant son action ciblée et sa faible toxicité, il pourrait constituer une nouvelle alternative thérapeutique intéressante en cancérologie des VADS. A ce jour cependant, aucune donnée n'était disponible concernant le F14512 dans les tumeurs des VADS.

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré les progrès importants effectués depuis ces trente dernières années dans la prise en charge de la plupart des tumeurs des VADS, la survie globale à 5 ans ne s'est pas améliorée, restant inférieure à 50%. En effet, l'apparition de la chirurgie endoscopique et des lambeaux de reconstruction a transformé le pronostic fonctionnel de ces tumeurs. De plus, l'utilisation de techniques de radiothérapie conformationnelle et/ou ciblée semble diminuer à long terme les conséquences salivaires néfastes de ces techniques et l'apparition de protocoles conservateurs en chimiothérapie ou de biothérapies ciblées a permis d'améliorer les résultats fonctionnels. Cependant ces protocoles dits « conservateurs » de chimiothérapie ne sont pas sans conséquences à court et long terme en raison des toxicités induites immédiates et à long terme. Le pronostic de ces tumeurs des VADS n'apparaît pas uniquement corrélé à la maladie locorégionale, il se trouve limité par un environnement socio-économique le plus souvent défavorable, des addictions cumulatives toxiques (tabac et alcool), des comorbidités non négligeables. Dans ce cadre, il est d'autant plus nécessaire d'introduire de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouveaux traitements médicamenteux, moins toxiques et plus ciblés. Ainsi la tolérance de ces molécules ciblées pourrait être meilleure que des chimiothérapies classiques telles que l'étoposide, le 5FU ou le cisplatine. En effet, au plan hématologique par exemple l'étoposide se révèle particulièrement toxique. De plus, les patients dont les comorbidités souvent lourdes grèvent la possibilité d'un traitement complet, la survie et le pronostic fonctionnel, conserveraient une qualité de vie plus satisfaisante.

Parmi ces nouvelles stratégies développées actuellement, le « détournement » du STP constitue une stratégie de délivrance ciblée intéressante. En effet, les polyamines sont connues pour leur rôle crucial dans la croissance cellulaire et il a été démontré qu'elles se trouvaient en concentration plus importante dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines.⁽⁶¹⁾ Le système de transport des polyamines a été retrouvé suractivé dans différents types cancéreux tels que le cancer du sein et de la prostate. En revanche, malgré le potentiel que représente cette particularité des cellules tumorales, il n'existe à ce jour aucune donnée concernant l'activité du STP dans des cellules cancéreuses des VADS. La stratégie consistant à utiliser ce STP dans le but d'acheminer un agent cytotoxique de façon active a conduit les laboratoires Pierre Fabre à élaborer le F14512, un nouvel inhibiteur de topoisomérase II à action ciblée.

OBJECTIFS DE LA THESE

Compte-tenu de la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblées dans les VADS, il apparaissait nécessaire d'évaluer, sur des cellules cancéreuses des VADS, l'activité et la spécificité du STP ainsi que le potentiel antitumoral du F14512, seul et en association avec des chimiothérapies et avec les radiations ionisantes utilisées quotidiennement dans le traitement des cancers des VADS.

L'objectif de mon travail de thèse fut donc d'évaluer, *in vitro* et *in vivo* le potentiel du F14512 dans les VADS à travers différents aspects :

- L'évaluation de l'activité et de la spécificité du STP dans différentes lignées cellulaires cancéreuses des VADS.
- La détermination de la cytotoxicité du F14512 comparée à la molécule princeps non vectorisée, l'étoposide, et aux 2 molécules de référence en chimiothérapie ORL, le 5FU et le cisplatine.
- L'évaluation de l'activité STP et de la cytotoxicité du F14512 en conditions hypoxiques.
- L'évaluation de combinaisons thérapeutiques du F14512 avec la chimio- et la radiothérapie.
- La mesure de l'activité STP sur des prélèvements de patients.
- L'évaluation du F14512 *in vivo* et la mise au point d'un modèle de xénogreffe orthotopique de tumeur endobuccale sur souris *nude*.

CHAPITRE 3 : RESULTATS

I. EVALUATION IN VITRO DU F14512 ET DE SES ASSOCIATIONS THERAPEUTIQUES

A) Contexte

Les cancers des voies aérodigestives supérieures constituent un problème de santé publique. Malgré des thérapeutiques lourdes associant chirurgie et radio \pm chimiothérapie la survie à 5 ans reste faible (<50%). Le développement de nouvelles thérapies plus ciblées et moins toxiques s'avère nécessaire. Le F14512 est un composé hybride combinant un inhibiteur de topoisomérase II à un groupement spermine permettant sa prise en charge par le système de transport des polyamines (STP) suractivé dans les cellules cancéreuses. L'objectif de cette partie était de rechercher l'activité de STP dans des lignées cancéreuses ORL et d'étudier l'efficacité du F14512 seul et en association.

B) Matériels et méthodes

Nous avons utilisé 4 lignées cellulaires représentatives de l'ensemble de l'anatomie des VADS. En effet, il s'agissait des lignées CAL33 et CAL27 (base de langue), FADU (hypopharynx) et SQ20B (larynx). L'activité et la spécificité du STP ont été évaluées par microscopie confocale et cytométrie en flux en utilisant une sonde fluorescente le F17073 qui possède la même chaîne spermine que le F14512. Afin d'évaluer la cytotoxicité seule ou en association avec les agents de chimiothérapie standard utilisés en ORL (Cisplatine et 5FU) et l'effet radio-sensibilisant, des techniques utilisant respectivement le MTS et des tests clonogéniques ont été utilisés. L'efficacité du F14512 et l'activité STP ont également été mesurées en conditions hypoxiques (1% O₂).

C) Résultats

Activité STP et sensibilité au F14512 des lignées cellulaires cancéreuses des VADS

Dans un premier temps nous avons mis en évidence une activité STP dans l'ensemble de nos lignées cancéreuses étudiées et nous avons démontré la supériorité du F14512 (IC₅₀ très inférieure) par rapport à l'étoposide, inhibiteur de topoisomérase II, et aux 2 molécules de référence utilisées en ORL, le cisplatine et le 5FU. Par cette première étape nous avons

sélectionné 2 lignées de base de langue, CAL 33 et CAL 27 qui présentaient le ratio d'IC₅₀ (étoposide/F14512) le plus important.

Une incorporation des composés et une cytotoxicité dépendantes du STP

L'étude de la cinétique d'entrée et de sortie, ainsi que la localisation, d'une sonde fluorescente F17073 (présentant le même groupement spermine que le F14512), nous a permis de montrer une sortie parcellaire de la sonde dans une seule des deux lignées et une localisation intracellulaire majoritairement au noyau, site d'action d'un inhibiteur de topoisomérase II. Nous avons testé la dépendance de ces effets vis-à-vis du STP. Pour ce faire, nous avons mené des expériences de compétition des composés avec la spermine qui est naturellement prise en charge par le STP. Nous avons montré dans les deux lignées, que l'entrée de la sonde, altérée par la compétition avec la spermine, était ainsi bien dépendante du STP. La compétition de la sonde avec le F14512 a montré le même effet, indiquant une prise en charge du F14512 par le STP, contrairement à l'étoposide dépourvu de groupement polyamine. Enfin, nous avons montré, par test MTS, que la cytotoxicité du F14512 était diminuée par la compétition avec la spermine (contrairement à l'étoposide) indiquant que l'entrée et ainsi l'efficacité du F14512 sont bien liées à l'activité STP.

Effet de l'hypoxie sur l'activité STP et la cytotoxicité du F14512

La formation de zones hypoxiques radio- et chimio-résistantes étant inhérente au développement tumoral, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'hypoxie (1%O₂) sur l'efficacité du F14512. En conditions hypoxiques, et dans les deux lignées testées, l'activité STP est retrouvée augmentée en comparaison avec les conditions de normoxie sans pour autant que le potentiel cytotoxique du F14512 ne soit modifié. Néanmoins, dans ces deux conditions de culture, la large supériorité du F14512 par rapport à l'étoposide demeure comparable en normoxie et en hypoxie en dépit d'une activité STP augmentée.

Synergie du F14512 avec le cisplatine

L'association de molécules de chimiothérapie étant une constante des protocoles de traitement en ORL nous avons étudié l'association du F14512 avec le 5FU et le cisplatine. Dans les deux lignées cellulaires, une analyse par la méthode de Chou & Talalay a montré que l'association entre le F14512 et le cisplatine était significativement synergique, alors

qu'aucune synergie n'était observée avec l'étoposide. En effet, malgré des profils différents de synergie dans les 2 lignées cellulaires, l'analyse des isobogrammes de la combinaison du F14512 avec le cisplatine (CDDP) a montré dans les deux cas une nette synergie du F14512 avec le cisplatine. En revanche, l'association du F14512 avec le 5FU n'apparaissait pas synergique.

Effet radio-sensibilisant du F14512

En thérapeutique des cancers avancés des VADS, le traitement par radiothérapie est combiné à la chirurgie et/ou la chimiothérapie afin de clôturer le protocole thérapeutique ou d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie. Nous avons donc évalué le potentiel radio-sensibilisant du F14512 par test de clonogénicité. Les courbes de survie obtenues ont montré un effet radio-sensibilisant significatif du F14512, à 4 et 6 Grays pour les cellules CAL33 et à 2, 4 et 6 Grays pour les cellules CAL27. A la concentration testée (1 μ M), le F14512 s'est ainsi montré bien plus actif que l'étoposide lorsqu'il est associé aux radiations ionisantes.

Dans ce cadre, le F14512 s'est révélé être un radio-sensibilisant significatif à de faibles doses.

D) Conclusion

Nous avons donc pu montrer à travers ces expériences que le F14512 présentait une cytotoxicité supérieure au cisplatine et au 5FU, molécules de référence en cancérologie des VADS. De plus, son activité cytotoxique se révélait significativement synergique en association avec le cisplatine. L'association de la radiothérapie aux traitements chirurgicaux et/ou à la chimiothérapie faisant partie intégrante des protocoles thérapeutiques en cancérologie des VADS, nous avons pu démontrer pour la première fois que le F14512 était une molécule radio-sensibilisante dès 2 Grays. Enfin, en conditions de chimiorésistance retrouvées en ORL au sein des tumeurs primitives ou dans les métastases ganglionnaires (conditions hypoxiques), le F14512 conserve son efficacité cytotoxique et sa supériorité par rapport à l'étoposide.

Ces résultats sont développés ci-dessous dans l'article publié en Février 2014 dans la revue Oral Oncology.

The antitumor drug F14512 enhances cisplatin and ionizing radiation effects in head and neck squamous carcinoma cell lines

F. Mouawad^{1,2,3}, A. Gros^{1,3}, B. Rysman^{1,2,3}, C. Bal-Mahieu¹, C. Bertheau^{1,3}, S. Horn^{1,3,4}, T. Sarrazin⁴, E. Lartigau⁴, D. Chevalier^{2,3}, C. Bailly⁵, A. Lansiaux^{1,3}, S. Meignan^{1,3}

¹ Antitumoral Pharmacology Laboratory, Centre Oscar Lambret, Lille, France

² ENT and Head and Neck Surgery Department, Huriez Hospital, University North of France, Lille, France

³ INSERM U837, Institute for Cancer Research of Lille (IRCL), Lille, France.

⁴ Radiotherapy Department, Centre Oscar Lambret, Lille, France

⁵ Research and Development Center Pierre Fabre, Toulouse, France

Abstract

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide. The treatment of advanced stages HNSCC is based on surgical treatment combined with radiotherapy and chemotherapy or concomitant chemo-radiotherapy. However, the 5-year survival remains poor for advanced stages HNSCC and the development of new targeted therapies is eagerly awaited. F14512 combines an epipodophyllotoxin core-targeting topoisomerase II with a spermine moiety introduced as a cell delivery vector. This spermine moiety facilitates selective uptake by tumor cells via the Polyamine Transport System (PTS) and reinforces topoisomerase II poisoning. Here we report the evaluation of F14512 toward HNSCC.

Four cell lines representative of head and neck cancer localizations were used: Fadu (pharynx), SQ20B (larynx), CAL33 and CAL27 (base of the tongue). PTS activity and specificity were evaluated by confocal microscopy and flow cytometry using the fluorescent probe F17073 which contains the same spermine moiety as F14512. Cytotoxicity, alone or in association with standard chemotherapeutic agents (cisplatin, 5FU), and radio-sensitizing effects were investigated using MTS and clonogenic assays, respectively. F14512 efficiency and PTS activity were also measured under hypoxic conditions (1% O₂).

In all 4 tested HNSCC lines, an active PTS was evidenced providing a specific and rapid transfer of spermine-coupled compounds into cell nuclei. Interestingly, F14512 presents a 1.6 to 11 fold higher cytotoxic effect than the reference compound etoposide (lacking the spermine chain). It appears also more cytotoxic than 5FU and cisplatin in all cell lines. Competition experiments with spermine confirmed the essential role of the PTS in the cell

uptake and cytotoxicity of F14512. Hypoxia had almost no impact on the drug cytotoxicity. The combination of F14512 with cisplatin, but not 5FU, was found to be synergistic and, for the first time, we demonstrated the significant radio-sensitizing potential of F14512.

The spermine moiety of F14512 confers a targeted effect and a much better efficacy than etoposide in HNSCC lines. The synergistic effect observed in association with cisplatin and radiotherapy augurs well for the potential development of F14512 in HNSCC.

Keywords: F14512, head and neck cancer, etoposide, targeted therapy, ionizing radiations, Polyamine Transport System, topoisomerase II inhibition.

Introduction

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide.¹ The treatment of advanced stages HNSCC is based on surgery associated with radiotherapy and/or chemotherapy or concomitant chemo/radiotherapy.² Despite these aggressive treatments, the 5-year survival remains poor for advanced stages and has not improved significantly for the last 30 years.¹ Numerous patients with HNSCC present comorbidities and cannot receive complete therapeutic protocol. In this context, the development of new therapies is awaited to improve patient outcomes and avoid toxicities of current conventional therapies.

The hybrid compound F14512 (Figure 1A) combines an epipodophyllotoxin core-targeting topoisomerase II with a spermine moiety introduced as a cell delivery vector.^{3, 4} The carbohydrate part of the well-established drug etoposide has been replaced with a polyamine side chain. The spermine moiety of F14512 facilitates selective uptake by tumor cells *via* the Polyamine Transport System (PTS), which is particularly active in tumor cells.^{5, 6} The need for polyamines increases in tumor cells and polyamines are crucial for a number of cell processes, including cell proliferation and differentiation.⁷ At the molecular level, the spermine chain also contributes to reinforce DNA interaction and topoisomerase II poisoning.^{3, 8} F14512 has shown remarkable activities *in vivo* in a panel of tumor xenografts and proved to be considerably more potent than etoposide in leukemia models.⁹ The drug is currently in phase I-II clinical trials for the treatment of acute myeloid leukemia and exhibits a favorable safety profile.¹⁰ The clinical development of F14512 in ovarian cancer has also been initiated recently.

The activity of F14512 has been evaluated in a panel of cancer cell lines and models and in most cases F14512 was found to be considerably more potent than etoposide, especially in leukemia models but also in solid tumors such as breast, lung and colon cancer models.^{4,9} Its activity in HNSCC had never been investigated before, but we considered this option by analogy with etoposide which has shown to be well tolerated and effective in unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck.¹¹ Oral etoposide in combination with radiotherapy is also tested in HNSCC.¹²⁻¹⁴ Therefore, by analogy with etoposide and considering that F14512 is a well-tolerated PTS-vectorized drug, we evaluated its activity toward HNSCC.

Thus far, the PTS has been functionally characterized but not detailed at the molecular level. No specific transporters for polyamines have been described in Human, even if general transporters classified into the structural amino acid-polyamine-organocation superfamily (APCS) have been described.¹⁵ To characterize the PTS activity, we used the previously described probe F17073 (Figure 1A) which bears the same spermine moiety as F14512, coupled with a fluorescent N-methylspermine-nitrobenzoxadiazole core.¹⁶ F14512 and F17073 were thus evaluated in four SCC lines and the efficacy of F14512 was compared to the reference drugs etoposide, 5FU and cisplatin (CDDP). Considering the frequent chemo- and radio-resistance of Head and Neck cancers, we studied F14512 under hypoxic conditions and in association with ionizing radiations and conventional chemotherapies. Altogether, the data reveal that F14512 can be considered as a potential drug candidate for a clinical evaluation in HNSCC.

Materials and methods

Chemicals and drugs

F14512 and F17073 were provided by the Pierre Fabre Research Institute. Etoposide and spermine were purchased from Sigma Aldrich. Cisplatin and 5-FU were obtained as solutions from Mylan and Sanofi-Aventis, respectively.

Cell lines and culture

CAL27 and CAL33, head and neck squamous carcinoma cell lines derived from tongue cancers, were kindly provided by Dr J.L. Fischel (Centre Antoine Lacassagne, Nice, France)¹⁷. SQ20B, an HNSCC line derived from a larynx cancer, was kindly provided by Professor E. Deutsch (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) and Fadu, a squamous carcinoma cell line derived from pharynx cancer, was obtained from the ATCC (USA). CAL27 and CAL33 were grown in DMEM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% L-Glutamin for CAL33. SQ20B were grown in DMEM medium supplemented with 15% FBS and Fadu cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% FBS and 1% L-Glutamin. All culture media contained 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cells were routinely maintained as monolayer cultures in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. All the experiments were conducted in these culture media. Cell culture products were from Life Technologies.

Flow cytometry

Cells were seeded at 7.5×10^4 cells per well in 12-well plates. After 24 hours, the medium was replaced by medium containing $1\mu\text{M}$ of F17073 and $10\mu\text{M}$ of spermine, F14512 or etoposide. After 2 hours at 37°C , cells were isolated by exposure to trypsin and the intracellular fluorescence was monitored by flow cytometry using the 525-575nm channel (CyanADP, Beckman Coulter). Data analysis was done with the Summit software and results were expressed as Mean Fluorescence Intensity (MFI). Untreated cells were used as auto fluorescent control. The $\Delta\text{MFI} = \text{MFI considered} / \text{MFI control}$. In hypoxia, cells were maintained in a humidified incubator at 37°C , 1% O_2 and 5% CO_2 (H35 hypoxystation, Don Whitley Scientific).

Confocal microscopy

Cells were seeded in 8 chambers slides (LAB-TEK CC2, Brand Products) at 3×10^4 cells per well. After 24 hours, the medium was replaced by fresh medium containing $1\mu\text{M}$ F17073 for 12 hours at 37°C . Then cells were washed with PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. Samples were stained with DAPI and phalloidin then mounted. Images were obtained with confocal microscope Zeiss LSM 710 using 63x magnification.

Cytotoxicity assay

Cells were seeded at 3×10^3 cells per well in 96 well plates. After 24 hours, when cells grew exponentially, the medium was replaced with medium containing increased concentrations of compounds, etoposide ($0.05\mu\text{M}$ to $50\mu\text{M}$), 5FU, cisplatin or F14512 ($0.01\mu\text{M}$ to $50\mu\text{M}$). Competition between F14512, etoposide and spermine were performed in the same conditions. Cells were incubated during 72 hours, then $20\mu\text{L}$ of MTS (Promega) were added per well for 1 hour at 37°C . Absorbance was read at 492 nm using spectrophotometer. IC_{50} values were obtained from the cytotoxicity curves using the SOFTmax PRO software. In hypoxia, cells were maintained in a humidified incubator at 37°C , 1% O_2 and 5% CO_2 .

Drug combinations

Combination experiments were performed with F14512 or etoposide and 5FU or cisplatin (CDDP). Cells were seeded at 3×10^3 cells per well in 96 well plates. After 24 hours, the medium was replaced by medium containing increased concentrations of compounds ($0.125 \times \text{IC}_{50}$ to $16 \times \text{IC}_{50}$) alone or in combination. Cells were incubated during 72 hours, then $20\mu\text{L}$ of MTS were added per well for 1 hour at 37°C . Absorbance was read at 492 nm using a

spectrophotometer. A synergistic effect was evidenced by means of the CalcuSyn software (notable synergy if $ED < 0.8$ and significant if $r > 0.9$).

Clonogenic assay

Cells were seeded at 200 and 400 cells per well in 12 well plates in complete culture medium. After 24 hours, the medium is replaced by medium containing etoposide or F14512 at $1\mu\text{M}$ during 6 hours. Then drugs were eliminated and cells were irradiated by 2, 4 or 6 Grays. After 10 days, colonies were revealed by crystal violet staining and counted. The Plating Efficiency (PE) is the ratio [number of colonies at 0 Gray / number of seeded cells] and the survival rate is the ratio [number of colonies after irradiation / (PE x number of seeded cells)]. Survival curves were drawn using Microsoft Excel in logarithmic scale.

Data and Statistical analysis

IC_{50} values are presented as the mean \pm Standard Deviation. The statistical significance was evaluated with Student's *t* test. Irradiation survival curves were compared with ANOVA test. A $p < 0.05$ was considered as significant.

Results

PTS activity and sensitivity to F14512 of HNSCC lines

As spermine moiety of F14512 was introduced to facilitate selective uptake *via* the PTS, we first analyzed PTS activity in HNSCC lines. The PTS activity in the four cell lines was evaluated through the uptake of the fluorescent probe F17073 by flow cytometry. Δ MFI values indicated a strong uptake of the probe especially in the CAL33 and CAL27 cell lines (Figure 1B). Next, we tested F14512 cytotoxicity compared to etoposide, 5FU and cisplatin using a MTS assay (Figure 1C). In all cases, F14512 appeared more potent (lower IC_{50} values) than the 3 reference drugs. The difference between F14512 and etoposide is noticeable. The mean IC_{50} values of F14512 and etoposide were respectively 0.53 μ M and 5.92 μ M in CAL33, 0.15 μ M and 1.19 μ M in CAL27, 0.3 μ M and 1.53 μ M in Fadu and 3.04 μ M and 4.99 μ M in SQ20B cells (Figure 1C). The IC_{50} ratio between etoposide and F14512 ($IC_{50}^{etoposide}/IC_{50}^{F14512}$) was 11.2 for CAL33, 7.9 for CAL27, 5.1 for Fadu and 1.6 for SQ20B. Interestingly, the difference is higher for the two cell lines (CAL33 and CAL27) showing the highest uptake of the probe F17073, i.e. the strongest PTS activity. This observation led us to focus our subsequent investigation on these two PTS-positive cell lines, highly sensitive to F14512.

PTS-dependent cell uptake and cytotoxic activity

After proving that PTS is active in all HNSCC lines, we have studied the fluorescent probe become in CAL27 and CAL33 cell lines. First, we monitored the kinetics of the cell uptake of the fluorescent probe by flow cytometry over a 14 hours period. F17073 uptake was progressive, with a slow phase for the first 2 hours followed by a more rapid phase for the next 8-12 hours in CAL27 and CAL33 cells (Figure 2A). After 14 hours of incubation, cells were washed twice with PBS to eliminate the free probe from the medium. Then we observed a progressive decrease of Δ MFI values in CAL27 but not in the CAL33 cell line suggesting the absence of an active probe release (Figure 2A). Confocal microscopy revealed that after 12 hours of incubation, the incorporated probe was mainly localized in cell nuclei. The green fluorescence of F17073 is intense in cell nuclei but weak in the cytoplasmic compartments (Figure 2B), as anticipated (binding of the spermine polycation to DNA).

To evaluate the implication of the PTS for the cell uptake of the two spermine-coupled compounds, we measured the uptake of F17073 in competition with spermine, F14512 or etoposide as a control. In both cell lines, adding spermine in the culture medium induced a

drastic decrease of ΔMFI that revealed the direct competition between spermine and F17073 for cell entry (Figure 2C). In the same manner, F14512 prevented the uptake of F17073 through the PTS to a level almost equivalent to that observed with spermine. In sharp contrast, etoposide (lacking the polyamine moiety) did not affect F17073 uptake (no significant effect on ΔMFI values, Figure 2C).

To ensure that the cytotoxicity of F14512 was PTS-dependent, we performed a competition experiment between F14512 and increased concentrations of spermine. This experiment showed an increasing IC_{50} value corresponding to a decreasing cytotoxicity of F14512 due to competition with spermine (Figure 2D). We calculated a ratio to normalized IC_{50} value of F14512 (equal to 1). In the CAL27 cell line, this ratio increased in a spermine dose-dependent manner up to a value of 2.3 fold the control IC_{50} in presence of $4\mu\text{M}$ spermine. This effect was prominent in the CAL33 cell line for which the ratio reached a value of 2.8 with $2\mu\text{M}$ spermine and increased up to 5.5 with $4\mu\text{M}$ spermine. As expected, even a high spermine concentration did not alter the cytotoxicity of etoposide, neither in CAL27 nor in CAL33 cell lines. Consequently, these experiments proved that F14512 uptake and cytotoxicity were PTS dependent.

Effect of hypoxia on PTS activity and F14512 cytotoxicity

In HNSCC the hypoxia into the tumor and nodes induce a well described chemoresistance conditions. Nevertheless, it is known that polyamine needs of cancer cells are increased in hypoxia.¹⁸ So we decided to investigate PTS activity and F14512 cytotoxicity under hypoxia. PTS activity was measured after 24 hours of culture under hypoxia (1% O_2) using the F17073 probe. In the two cell lines, the ΔMFI value was more than twice the normoxia (21% O_2) one reflecting an enhanced PTS activity (Figure 3A). However, the cytotoxic potential of F14512 remained roughly identical under hypoxia or normoxia. No F14512 efficiency gain was obtained under hypoxia compared to normoxia conditions in both cell lines. In fact, in CAL33 cells, F14512 IC_{50} value slightly increased from $0.53\mu\text{M}$ in normoxia to $0.73\mu\text{M}$ in hypoxia and from $0.15\mu\text{M}$ to $0.51\mu\text{M}$ in CAL27 cells (Figure 3B). In parallel, etoposide IC_{50} values followed the same trend indicating a lesser efficiency of topoisomerase II inhibitors probably linked to the slower cell growth due to hypoxia. Nevertheless, in all cases, F14512 cytotoxicity remains largely superior to that of etoposide, with a comparable F14512 benefit in normoxia and hypoxia despite an apparent enhanced PTS activity.

F14512 synergizes with cisplatin

HNSCC treatment protocols often combine two or three drugs to increase their efficacy. Here we tested the association of F14512 with the main two chemotherapy drugs used in head and neck cancer treatment protocols in Humans: cisplatin (CDDP) and 5FU. The etoposide was tested in parallel to F14512 and for each combination, the ED50, ED75 and ED90 values were calculated (Figure 4A). ED values <0.8 reflect a synergistic effect, whereas ED values >1.2 indicate an antagonistic effect. In both cell lines, the Chou & Talalay method revealed that the association between F14512 and cisplatin was significantly synergistic (ED <0.8 and $r>0.9$), whereas no clear synergy was observed with etoposide. This is a key observation for subsequent development of F14512 in HNSCC. The isobologram analysis of the combination F14512+cisplatin (CDDP) revealed slightly different patterns of drug synergism for the two CAL cell lines, but in both cases F14512 synergizes clearly with cisplatin (Figure 4B). On the opposite, the combination of F14512 with 5FU appeared detrimental. With CAL27 cells treated with 5FU, a net antagonistic effect was observed with both F14512 and etoposide, but not in CAL33 cells (Figure 4A). The key point of these drug combination studies is the clear synergistic effect observed with F14512 combined with cisplatin.

Radio-sensitizing effect of F14512

In head and neck cancers radio-chemotherapy is a medical standard protocol of treatment. So, we finally evaluated the radio-sensitizing potential of F14512 in comparison to etoposide. Cell survival was measured after exposure to radiation, up to 6 Gy, in the absence or presence of a fixed dose of F14512 or etoposide. The plating efficiency was calculated for each condition in order to evaluate the radio-sensitizing effect independently of the growth inhibition effect of the drugs. The survival curves showed a significant radio-sensitizing effect of F14512 at 4 and 6 Grays for CAL33 cells and at 2, 4 and 6 Grays for CAL27 cells (Figure 5). At the drug concentration tested (1 μ M), F14512 proved to be much more active than etoposide when combined with radiation therapy.

Discussion

Despite aggressive treatments such as surgery plus radio and/or chemotherapy, the 5-year survival in head and neck cancer remains poor for advanced stages and was not significantly improved since the last 30 years.¹ This poor prognosis context largely associated with early and late toxicities strongly call for the development of novel innovative therapeutic agents and drug combinations. In this context, the development of drugs exploiting the polyamine transport system (PTS) represents a novel strategy for the management of several tumor pathologies.⁵⁻⁷ The PTS-vectorized topoisomerase II inhibitor F14512 was designed to target tumor cells presenting an active PTS and is currently in phase 1-2 clinical trials for the treatment of acute myeloid leukemia.³ This promising drug has revealed potent antitumor activities in a panel of tumor xenografts, including lung, breast and colon cancers for examples.⁴ F14512 bears a structural analogy with the epipodophyllotoxin etoposide but it is considerably more potent in terms of topoisomerase II inhibition and drug-induced cell death.^{8,19, 20} The superiority of F14512 compared to etoposide prompted us to evaluate the potential interest of the drug in HNSCC, using four different cell lines.

Here we observed in all tested cell lines a more or less pronounced incorporation of the PTS vectorized probe F17073 which was designed to monitor the cell uptake of the drug F14512.^{16, 21} Interestingly, F14512 appeared more cytotoxic than etoposide and the two most commonly used drugs in head and neck cancers, cisplatin (CDDP) and 5-fluorouracil (5FU). Focusing on the cell lines CAL27 and CAL33 (two base of the tongue cancer cell lines) we demonstrated a strong, quick and specific spermine-coupled compounds uptake through the PTS. In particular, the competition experiments with spermine indicate that F14512, but not etoposide, is vectorized in these cells through the PTS. Moreover the compound seems to be preferentially conveyed into cell nuclei, the pharmacological site of action of topoisomerase inhibitors. Previous studies have shown that the spermine moiety of F14512 confers an increased stability of the ternary topoisomerase II-drug-DNA complexes and a more potent inhibition of the enzyme, likely responsible for the potent antitumor activity.^{8, 22} The use of HNSCC lines reinforces the conclusion that F14512 uptake and efficiency are PTS-dependent. The CAL27 and CAL33 cell lines are among the most sensitive cell lines to F14512 tested thus far, supporting the potential use of this compound in this tumor indication for which the medical need is particularly high.

Hypoxia is well known to be involved in chemo and radio resistance in many cancers especially in head and neck tumor.^{1, 23} Nevertheless, up regulation of the polyamine system has been described to promote cancer cells survival during hypoxic stress *via* antizyme inhibitor.¹⁸ Indeed, we found an over activity of the PTS in hypoxic condition but which did not correlate with an improvement of F14512 cytotoxicity. However, F14512 maintains its strong gain compared to etoposide under hypoxia whereas CDDP and 5FU efficiency was altered (data not shown) as previously described.²⁴ In other words, the cytotoxic activity of F14512 is essentially maintained under hypoxic conditions.

Nowadays, the DCF protocol (Docetaxel + CDDP + 5FU) is considered as the most efficient treatment in head and neck cancers. However, its relatively high toxicity prevents from using it in the majority of patients.^{25, 26} In this context, other efficient drug associations are clearly required. Oral etoposide alone or in association with cisplatin has been investigated in advanced head and neck cancers with the same results as the association of 5FU and CDDP but has been stopped owing to hematologic toxicities.^{12, 13} Considering the favorable safety profile of F14512, this drug may be considered as an alternative option.¹⁰ In this work, we proved that the combination of F14512 and cisplatin is synergistic and significantly more powerful than the association etoposide/cisplatin. Topoisomerase II is well known to participate to DNA damage repair and we can hypothesize here that effect of cisplatin-induced DNA breaks are amplified by the strong topoisomerase II inhibition due to F14512.²⁷ Taking together, we could expect that association of F14512 with cisplatin provides a good therapeutic response compared to currently used protocols with a better tolerance. The association of F14512 with platinum salts could certainly be considered as a new therapeutic option in head and neck cancers with high comorbidities.

In curative intent, radiotherapy is systematically associated to chemotherapy in head and neck cancer treatments.²⁸ In our work we demonstrated for the first time that associated with cisplatin as well as with ionizing radiations, F14512 appeared more potent than etoposide in all cell lines tested. F14512 revealed a strong radio-sensitizing effect, superior to that of etoposide, even at low doses of radiations. The radiation therapy effect is known to be enhanced in cell cycle M phase.²⁹ Radio-sensitizing effect of F14512 should be due to cell accumulation in G2/M phase described in previous study.²⁰

In conclusion, we report here an efficient action of the PTS-vectorized drug F14512, alone and in combination with chemo- or radio-therapy, toward HSNCC lines. These data suggest a new therapeutic option in head and neck cancers, based on the reported clinical activity of

etoposide in this indication and the marked synergistic action observed here when F14512 is combined with cisplatin. The F14512-cisplatin combination deserves further preclinical and clinical studies.

Acknowledgements

This work was supported by funds from IRCL (Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, France), INCa (Institut National du Cancer, France) and IRPF (Institut de Recherche Pierre Fabre). Results were presented in part during the 5th meeting of the European Head & Neck Society (2012).

Conflict of interest

Christian Bailly is employed by Pierre Fabre Medicaments, where the products F14512 and F17073 were synthesized.

References

1. Vigneswaran N, Wu J, Song A, Annapragada A, Zacharias W. Hypoxia-induced autophagic response is associated with aggressive phenotype and elevated incidence of metastasis in orthotopic immunocompetent murine models of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Exp Mol Pathol* 2011;**90**(2):215-25.
2. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000;**355**(9208):949-55.
3. Barret JM, Kruczynski A, Vispe S, Annereau JP, Brel V, Guminski Y, et al. F14512, a potent antitumor agent targeting topoisomerase II vectored into cancer cells via the polyamine transport system. *Cancer Res* 2008;**68**(23):9845-53.
4. Kruczynski A, Vandenberghe I, Pillon A, Pesnel S, Goetsch L, Barret JM, et al. Preclinical activity of F14512, designed to target tumors expressing an active polyamine transport system. *Invest New Drugs* 2011;**29**(1):9-21.
5. Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 1988;**48**(4):759-74.
6. Casero RA, Jr., Woster PM. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J Med Chem* 2009;**52**(15):4551-73.
7. Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;**28**(8):843-61.
8. Gentry AC, Pitts SL, Jablonsky MJ, Bailly C, Graves DE, Osheroff N. Interactions between the etoposide derivative F14512 and human type II topoisomerases: implications for the C4 spermine moiety in promoting enzyme-mediated DNA cleavage. *Biochemistry* 2011;**50**(15):3240-9.
9. Kruczynski A, Pillon A, Creancier L, Vandenberghe I, Gomes B, Brel V, et al. F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia* 2013.
10. De Botton S, Berthon C, Bulabois C, Prebet T, Vey N, Chevallier P. F14512 a novel polyamine-vectorized anti-cancer drug targeting topoisomerase II in adults patients with acute

- myeloid leukemia (AML): results from a Phase 1 study. *EHA 17th Congress, Amsterdam* 2012;14-17.
11. Khafif A, Canfield VA, Syzek EJ, Medina JE. Results of phase I-II trial of concomitant hyperfractionated radiation and oral etoposide (VP-16) in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Otolaryngol* 2003;**24**(1):1-5.
 12. Prevost A, Merol JC, Aime P, Moutel K, Roger-Liautaud F, Nasca S, et al. A randomized trial between two neoadjuvant chemotherapy protocols: CDDP + 5-FU versus CDDP + VP16 in advanced cancer of the head and neck. *Oncol Rep* 2005;**14**(3):771-6.
 13. Gedlicka C, Kornfehl J, Turhani D, Burian M, Formanek M. Salvage therapy with oral etoposide in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Invest* 2006;**24**(3):242-5.
 14. Tao Y, Bardet E, Rosine D, Rolland F, Bompas E, Daly-Schveitzer N, et al. Phase I trial of oral etoposide in combination with radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma - GORTEC 2004-02. *Radiat Oncol* 2013;**8**:40.
 15. Schweikhard ES, Ziegler CM. Amino acid secondary transporters: toward a common transport mechanism. *Curr Top Membr* 2012;**70**:1-28.
 16. Annereau JP, Brel V, Dumontet C, Guminski Y, Imbert T, Broussas M, et al. A fluorescent biomarker of the polyamine transport system to select patients with AML for F14512 treatment. *Leuk Res* 2010;**34**(10):1383-9.
 17. Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;**24**(9):1445-55.
 18. Svensson KJ, Welch JE, Kucharzewska P, Bengtson P, Bjurberg M, Pahlman S, et al. Hypoxia-mediated induction of the polyamine system provides opportunities for tumor growth inhibition by combined targeting of vascular endothelial growth factor and ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 2008;**68**(22):9291-301.
 19. Brel V, Annereau JP, Vispe S, Kruczynski A, Bailly C, Guilbaud N. Cytotoxicity and cell death mechanisms induced by the polyamine-vectorized anti-cancer drug F14512 targeting topoisomerase II. *Biochem Pharmacol* 2011;**82**(12):1843-52.
 20. Ballot C, Jendoubi M, Kluza J, Jonneaux A, Laine W, Formstecher P, et al. Regulation by survivin of cancer cell death induced by F14512, a polyamine-containing inhibitor of DNA topoisomerase II. *Apoptosis* 2012;**17**(4):364-76.
 21. Guminski Y, Grousseau M, Cugnasse S, Brel V, Annereau JP, Vispe S, et al. Synthesis of conjugated spermine derivatives with 7-nitrobenzoxadiazole (NBD), rhodamine and bodipy as new fluorescent probes for the polyamine transport system. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;**19**(9):2474-7.
 22. Chelouah S, Monod-Wissler C, Bailly C, Barret JM, Guilbaud N, Vispe S, et al. An integrated Drosophila model system reveals unique properties for F14512, a novel polyamine-containing anticancer drug that targets topoisomerase II. *PLoS One* 2011;**6**(8):e23597.
 23. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007;**26**(2):225-39.
 24. Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shiota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* 2009;**45**(2):109-15.
 25. Posner MR, Norris CM, Wirth LJ, Shin DM, Cullen KJ, Winquist EW, et al. Sequential therapy for the locally advanced larynx and hypopharynx cancer subgroup in TAX 324: survival, surgery, and organ preservation. *Ann Oncol* 2009;**20**(5):921-7.
 26. Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, Sire C, Tuchais C, Tortochaux J, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst* 2009;**101**(7):498-506.
 27. Kolb RH, Greer PM, Cao PT, Cowan KH, Yan Y. ERK1/2 signaling plays an important role in topoisomerase II poison-induced G2/M checkpoint activation. *PLoS One* 2012;**7**(11):e50281.

28. Bozec A, Sudaka A, Toussan N, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC ,Milano G. Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model. *Ann Oncol* 2009;**20**(10):1703-7.
29. Ree AH, Stokke T, Bratland A, Patzke S, Nome RV, Folkvord S, et al. DNA damage responses in cell cycle G2 phase and mitosis--tracking and targeting. *Anticancer Res* 2006;**26**(3A):1909-16.

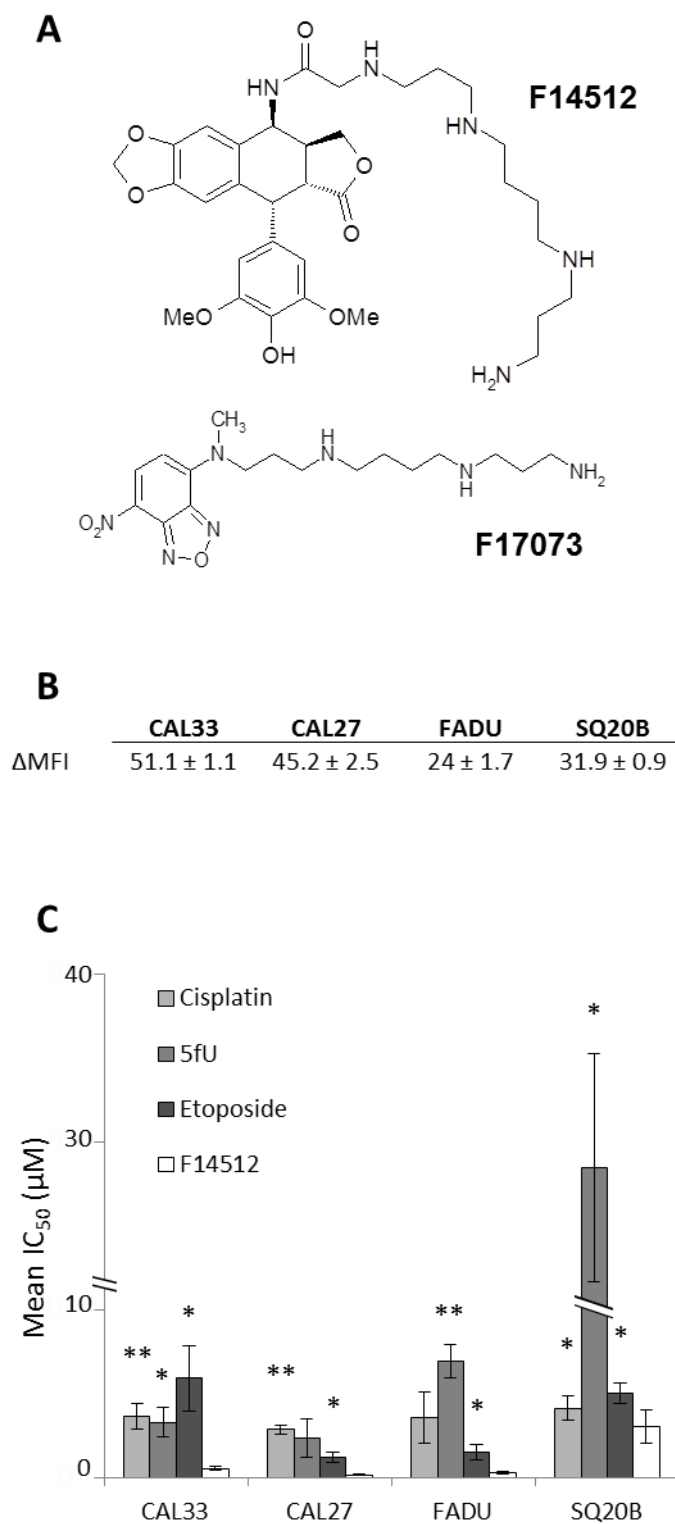
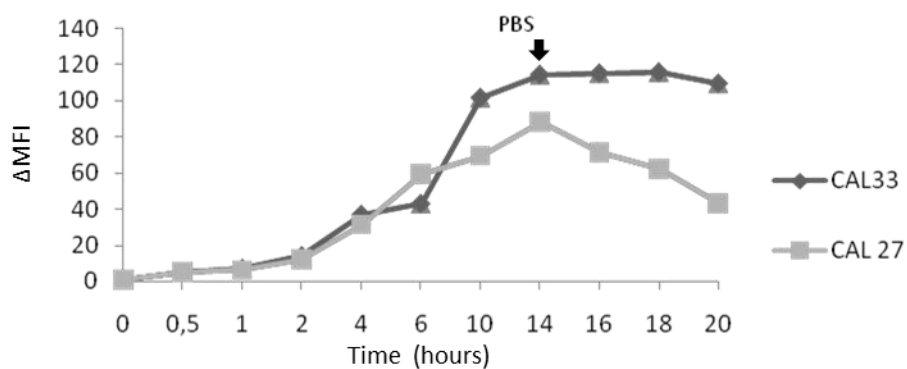
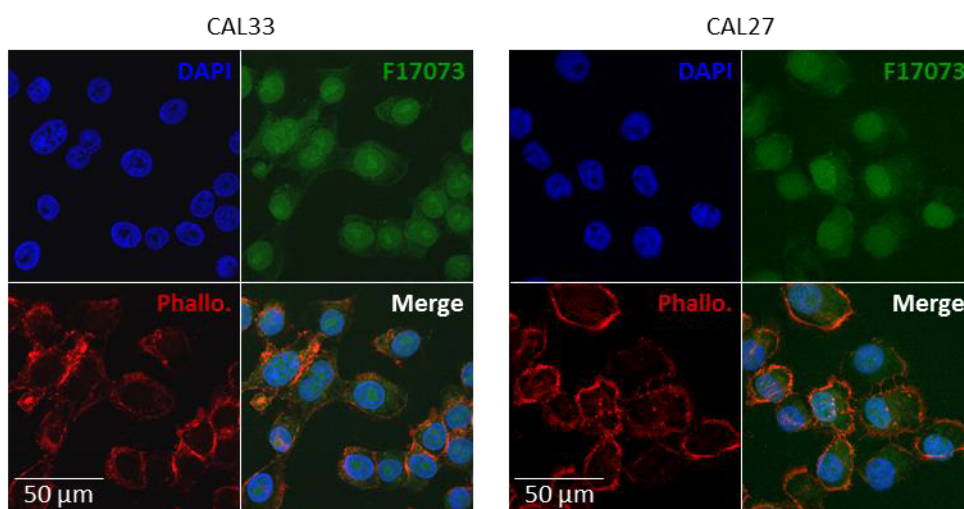


Figure 1: PTS activity and drugs cytotoxicity in HNSCC lines. (A) Structures of F14512 and F17073. (B) PTS activity, measured by flow cytometry using 1 μ M of F17073 for 2 hours. Results are expressed as Δ MFI. (C) Cytotoxicity, determined by MTS assay after 72 hours drugs exposure. IC₅₀ values are the mean of 3 independent experiments. *p<0.01; **p<0.001.

A



B



C

ΔMFI	F17073	F17073 + Spermine	F17073 + F14512	F17073 + Etoposide
CAL33	51.1 ± 1.1	4.5 ± 0.1	8.2 ± 0.5	59.3 ± 1.8
CAL27	45.2 ± 2.5	15.4 ± 1	21.2 ± 1.9	51.34 ± 4.8

D

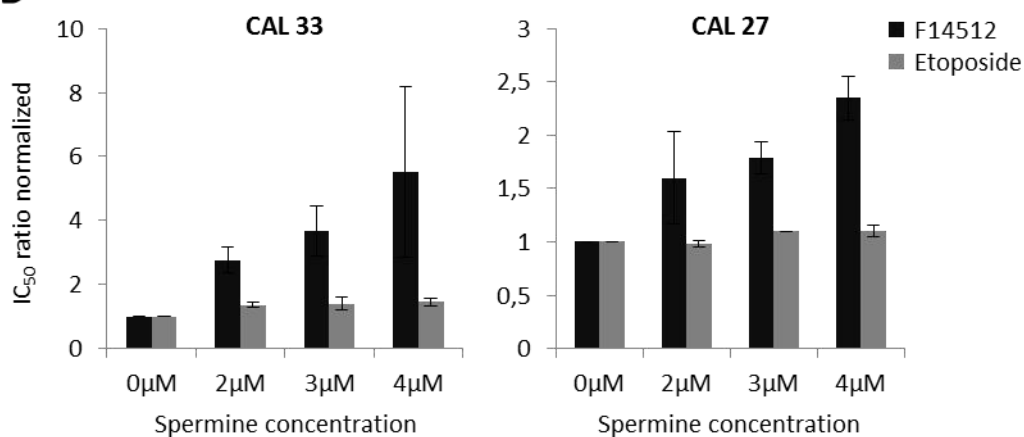


Figure 2: Kinetic, localization and specific uptake of spermine-coupled fluorescent probe, F17073, in base of the tongue cancer cell lines. (A) F17073 entry was measured by flow cytometry after exposure to 1 μ M probe during 0 to 10 hours. At 14 hours, cells were washed with culture medium without probe and fluorescence was measured every 2 hours. Results are expressed as Δ MFI. (B) Intracellular localization of probe (green) was visualized by confocal microscopy after 12 hours exposure to 1 μ M F14512. Cell nucleus and cytoskeleton were respectively stained with DAPI (blue) and phalloidin (red). Pictures were obtained using objective x63. (C) The entry of 1 μ M F17073, in competition with 10 μ M spermine, F14512 or etoposide for 2 hours, was measured by flow cytometry. Results are expressed as Δ MFI which is the mean of 3 independent experiments. (D) The F14512 and etoposide IC_{50} were evaluated in presence of 2, 3 and 4 μ M spermine. Results are normalized with control condition (without spermine).

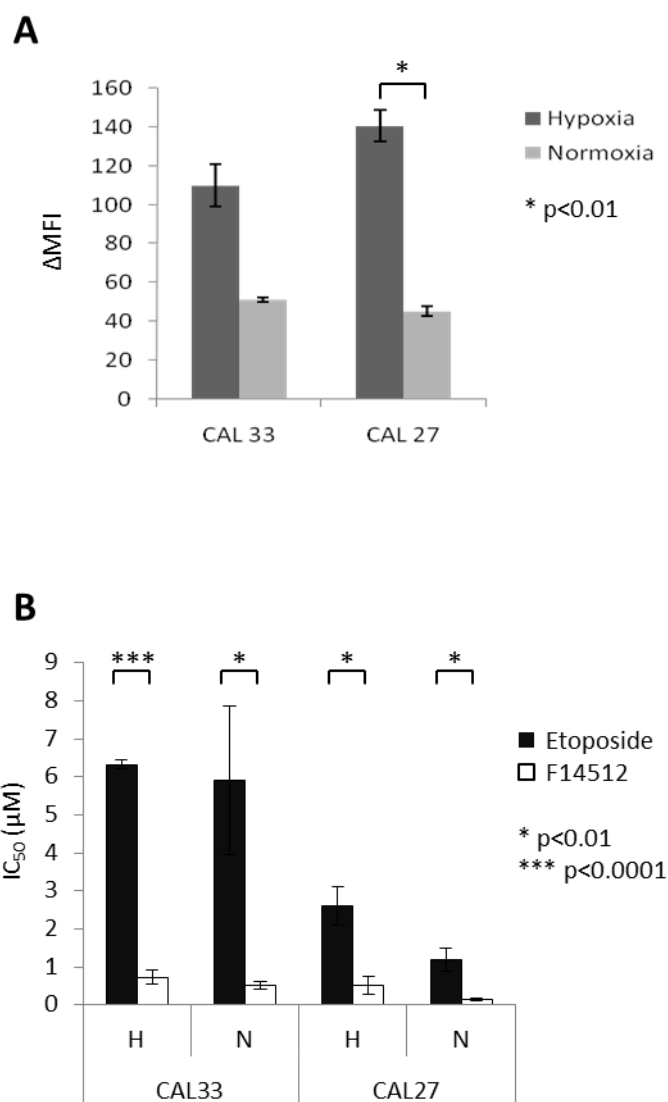


Figure 3: PTS activity and drugs cytotoxicity in normoxic and hypoxic conditions. (A) Cells were cultured in hypoxia (1% O₂) or normoxia during 24h. Then PTS activity was measured by flow cytometry using 1 μM F17073 spermine-coupled fluorescent probe for 2 hours. Results are expressed as ΔMFI. (B) Cells were cultured in hypoxia (1% O₂) or normoxia during 24h then treated with F14512 or etoposide and incubated 72h in the same conditions. Cytotoxicity was determined by MTS assay. IC₅₀ values are the mean of 3 independent experiments. *p<0.01; ***p<0.0001.

A

		Combination Index (mean)			
		ED 50	ED 75	ED 90	r
CAL 33	F14512 + CDDP	0.52 ± 0.11	0.43 ± 0.08	0.70 ± 0.13	0.98
	F14512 + 5FU	0.80 ± 0.38	0.73 ± 0.22	0.88 ± 0.10	0.99
	Eto + CDDP	0.85 ± 0.13	0.83 ± 0.15	0.82 ± 0.20	0.99
	Eto + 5FU	0.84 ± 0.23	0.9 ± 0.2	0.97 ± 0.20	0.99
CAL 27	F14512 + CDDP	0.72 ± 0.11	0.66 ± 0.07	0.70 ± 0.10	0.98
	F14512 + 5FU	1.86 ± 0.49	2.84 ± 0.13	4.56 ± 0.98	0.94
	Eto + CDDP	1.27 ± 0.46	1 ± 0.11	1.01 ± 0.03	0.96
	Eto + 5FU	1.34 ± 0.9	1.5 ± 0.21	1.93 ± 1.20	0.90

CI < 0.8 synergistic **CI > 1.2 antagonistic** **0.8 < CI < 1.2 additive**
r > 0.9 significant

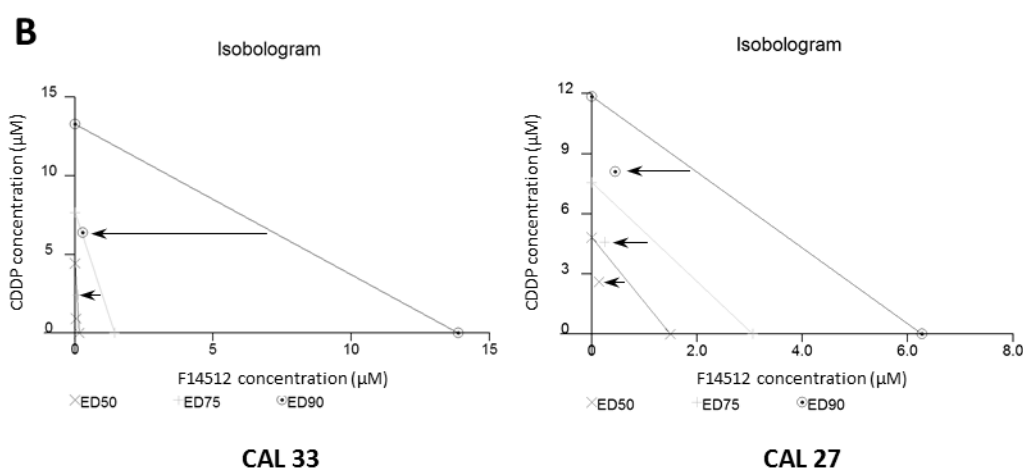


Figure 4: Drugs combination. (A) F14512 and etoposide (Eto) were tested in combination with cisplatin (CDDP) or 5FU. Cytotoxicity was determined by MTS assay after 72 hours drugs exposure and the synergistic effect was analyzed by Chou & Talalay method using CalcuSyn software. Results are the mean of 3 independent experiments and expressed as Combination Index at ED50, 75 and 90. A combination is considered synergistic if CI < 0.8. Experiment is considered significant if r > 0.9. (B) Isobologram presenting the effect values of CDDP and F14512 association. When the combination is synergistic, the data point will be depicted at the left side of the curve (black arrows)

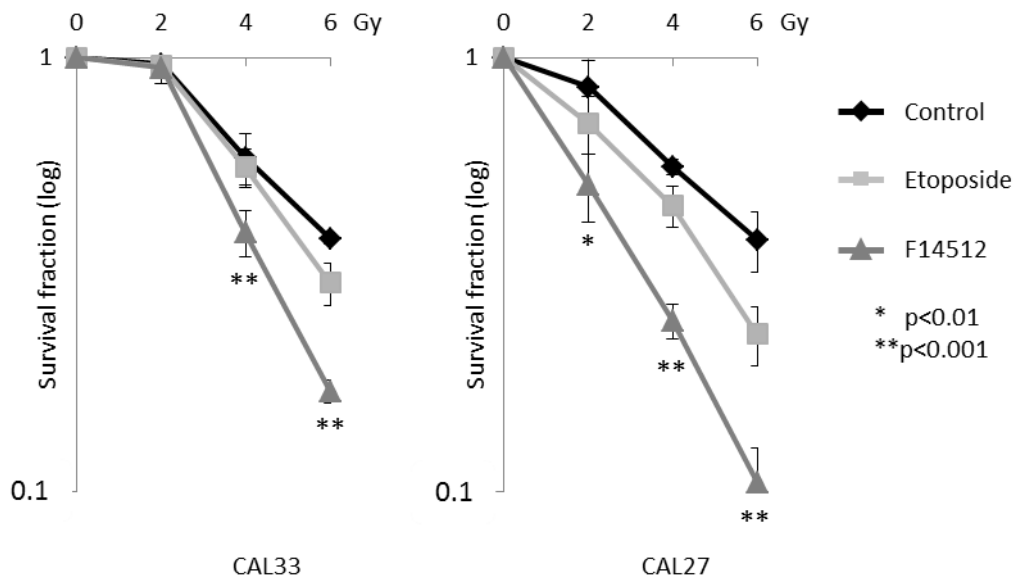


Figure 5: Radio-sensitizing effect. The combination effect of drugs with ionizing radiations was determined by clonogenic assay. Cells were treated with 1 μ M F14512 or etoposide for 6 hours, then washed and irradiated at 0, 2, 4 and 6 grays. After ten days, colonies were revealed and counted. Survival fraction is expressed in logarithmic scale. *p<0.01; **p<0.001.

II. EVALUATION DE L'ACTIVITE STP CHEZ LES PATIENTS

II.A. Contexte

En pathologie cancéreuse, le développement croissant de la médecine personnalisée et de la médecine ciblée avec la prise en compte des contraintes financières, nécessite de développer parallèlement des marqueurs biologiques de l'activité cellulaire ou de la protéine qui doit être inhibée. Or, le caractère ciblé du traitement par F14512 peut être relié à l'activité du STP, mesurable grâce à une sonde fluorescente. Une analyse de l'activité STP sur des échantillons de patients permettrait : i) de confirmer le potentiel ciblé du F14512 observé *in vitro* dans des lignées cellulaires cancéreuses ORL, et ii) de proposer une logique de pré-caractérisation permettant une prescription de ce médicament de façon privilégiée à des patients présentant une tumeur avec une activité STP augmentée de façon significative. Dans cette optique, nous avons cherché à mesurer l'activité STP sur des échantillons de tissus tumoraux *versus* de tissus sains prélevés chez les mêmes patients afin d'établir un rapport d'activité STP Tumoral / Sain (T/S).

II.B. Matériels et méthodes

Les patients étaient informés du but du travail, et le consentement obtenu, au préalable des prélèvements réalisés au cours de l'intervention chirurgicale. Les différentes localisations anatomiques des VADS ont ainsi pu être analysées excepté les cavités naso-sinusiennes, dont l'incidence est faible.

II.B.1. Prélèvement tumoral

Au cours de l'intervention chirurgicale pour traitement de la tumeur cancéreuse ORL, 2 fragments étaient prélevés : Un fragment tumoral non nécrotique et non hémorragique et un fragment de tissu sain de la même région anatomique en controlatéral. Les prélèvements frais étaient ensuite acheminés dans du sérum physiologique dans les plus brefs délais au laboratoire afin de réaliser la préparation puis l'analyse.

II.B.2. Préparation de l'échantillon

Une première étape de fractionnement tumoral mécanique était réalisée au bistouri. Puis, une digestion à l'aide d'une solution enzymatique de 2 mg/mL de collagénase (Sigma Aldrich) et de 2 mg/mL de hyaluronidase (Sigma Aldrich) était ensuite effectuée afin de dissocier la matrice extracellulaire.

Les cellules étaient ensuite passées sur un tamis de filtration de 100 µm afin d'en écarter les amas puis comptées à l'aide d'un compteur automatique (Scepter, Life technologies) afin de préparer une suspension de 100 000 cellules dans 200 µl pour l'échantillon tumoral comme pour l'échantillon de tissu sain.

II.B.3. Marquage par la sonde fluorescente F17073

La nature moléculaire du STP n'étant pas identifiée chez l'Homme, nous avons utilisé la sonde fluorescente le F17073 afin de quantifier, par cytométrie en flux, l'activité STP à travers l'intensité d'incorporation de cette sonde. Le marquage a été réalisé par l'ajout de 5 µM de F17073 puis incubation à 37°C pendant 1 heure dans l'obscurité. Le marquage était stoppé par l'ajout de PBS froid avant d'éliminer la sonde par centrifugation. L'analyse en cytométrie en flux était réalisée avant et après un marquage à l'iodure de propidium permettant de discerner les cellules viables des cellules mortes.

II.C. Résultats

Dans chacune des conditions, l'analyse en cytométrie en flux a d'abord permis de calculer un ΔMFI , rapport de la MFI des cellules marquées sur la MFI des cellules n'ayant pas été incubées avec la sonde. Les résultats sont alors exprimés sous forme d'un rapport $T/S = \Delta\text{MFI}$ des cellules Tumorales (T) / ΔMFI des cellules Saines (S). Les résultats chez les 13 patients de l'expérience sont présentés ci-après (Tableau 4).

Tableau 4 : Mesure du rapport d'activité STP (T/S) sur 13 prélèvements de patients issus de différentes localisations de tumeurs des VADS.

<i>Patient</i>	<i>Localisation tumorale</i>	<i>Rapport T/S</i>
1	Langue	4,23
2	Hypopharynx	1,17
3	Plancher buccal	0,92
4	Langue	0,94
5	Langue	1,16
6	Hypopharynx	1,09
7	Gencive	0,97
8	Hypopharynx	0,62
9	Larynx	0,32
10	Langue	1,38
11	Langue	1,06
12	Plancher buccal	1,17
13	Amygdale	1,24

Les résultats des rapports T/S font apparaitre 8 prélèvements positifs (>1) sur 13, essentiellement au niveau de la cavité buccale et de l'oropharynx (6/8). Ces résultats restent toutefois faiblement positifs ($1 < R[T/S] < 1,5$) à l'exception d'un prélèvement ($R[T/S] > 4$). Il apparait donc, devant ces résultats, qu'un intérêt plus particulier peut être porté aux prélèvements intéressants la cavité buccale et l'oropharynx. Ces éléments sont cohérents avec ceux obtenus *in vitro*, où les lignées CAL33 et CAL27 (base de langue) présentaient l'activité STP la plus importante. Par ailleurs, le prélèvement réalisé au niveau du larynx s'avère clairement négatif et les données sur l'hypopharynx (2 prélèvements faiblement positifs sur 3) soulignent ces deux sites anatomiques comme moins intéressants, de façon également cohérente avec les résultats *in vitro* qui retrouvaient une faible activité STP dans les lignées s'intéressant à ces localisations anatomiques.

III. EVALUATION *IN VIVO* DU F14512 ET MISE AU POINT D'UN MODELE DE XENOGREFFE ORTHOTOPIQUE ENDOBUCCAL

III.A. Contexte

La mise au point d'un modèle de xénogreffe orthotopique permettrait de valider l'efficacité du F14512 *in vivo* mais également de disposer d'un modèle de tumorigenèse fiable, reproductible et mesurable par des techniques objectives. En effet, le modèle de xénogreffe hétérotopique, en sous-cutanée, de cellules cancéreuses humaines de VADS chez la souris s'est révélé être un modèle peu pertinent au regard de la réponse observée en clinique. En revanche, comme dans de nombreux types tumoraux, les modèles de xénogreffes orthotopiques apparaissent être un indicateur bien plus puissant de la réponse au(x) traitement(s).⁽⁷⁵⁾ Plusieurs auteurs ont rapporté des modèles de xénogreffe au niveau de la glande parotide avec traitement par molécules ciblant EGFR/VEGFR^(76, 77), ou de la thyroïde avec un modèle de carcinome papillaire traité par thérapeutiques ciblées⁽⁷⁸⁾ mais aucun modèle de tumeur de cavité buccale n'a été développé à ce jour alors que celui-ci correspond à 40% des tumeurs des VADS. Ceci peut être expliqué par la difficulté technique d'une injection dans une structure millimétrique qu'est le plancher de bouche de la souris. Le but de cette partie du travail était donc de mettre au point un modèle fiable de xénogreffe endobuccale de tumeurs des VADS. Ce modèle animal permettrait alors de réaliser des travaux scientifiques et de recherche, appliquées dans des conditions tumorales orthotopiques endobuccales comprenant un microenvironnement mimant les conditions tumorales réelles.

III.B. Evaluation *in vivo* du F14512

Les premières expériences *in vivo* sur des souris pilotes ont permis de valider le mode d'implantation de xénogreffes orthotopiques en sous mental chez des souris immunodéficientes Balb/c *nude* par injection de cellules de la lignée CAL33 (cancer de la langue).

Cette première partie était réalisée par injection en sous mental à l'aide d'une seringue à insuline 1ml et à l'aide d'un dispositif optique grossissant permettant de guider l'injection.

Une solution tumorale de 20µl contenant 100 000 cellules CAL33 était injectée en plancher de bouche à J0. Une expérimentation réalisée sur des souris pilotes avait permis de déterminer le délai d'apparition macroscopique d'une tumeur à 4 jours.

Nous basant sur de précédentes études du F14512 et de l'étoposide *in vivo* et après évaluation préalable de la tolérance au traitement dans nos conditions (consistant en une surveillance du poids et du comportement des souris), nous avons testé, sur animaux xénotransplantés et selon un schéma d'administration identique, l'action du F14512 et de l'étoposide à dose égale de 1,25mg/kg/injection comparé au placebo selon le protocole indiqué ci-après (Figure 12). Au cours de l'expérimentation, aucun animal n'a atteint l'un des points limites fixés en début d'expérience (attitude agressive, perte pondérale, prostration ou vocalisations ; i.e. en accord avec la Directive européenne 86/609/EEC) et toutes les souris ont ainsi pu suivre l'intégralité du protocole.

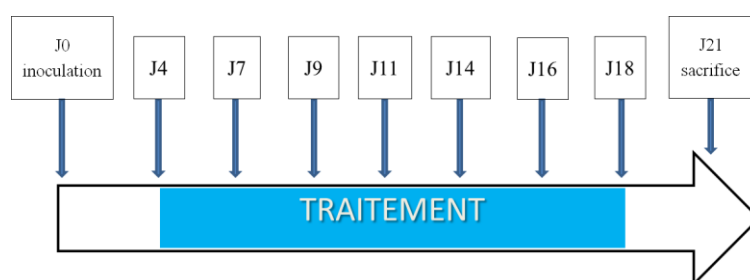


Figure 12 : Protocole de traitement par F14512 et étoposide *in vivo*. Chaque groupe (véhicule/étoposide/F14512) était constitué de 8 souris avec une attribution du traitement en mode randomisé par cage. Quatre jours après injection des cellules (correspondant au délai d'apparition des premières lésions cancéreuses macroscopiquement visibles sur les souris pilotes), le traitement était administré, par injection intra-péritonéale de 1,25mg/kg par injection, puis renouvelé 3 fois par semaine pour un total de 7 injections. Au 21ème jour, après sacrifice des souris (cage à CO₂) et exérèse des tumeurs, celles-ci étaient mesurées afin de calculer le volume tumoral à l'aide de la formule suivante (mesure d'une ellipsoïde) : $V = 4/3 \pi * r_x * r_y * r_z$ (où r est le rayon de la tumeur dans les dimensions x, y et z).

Au terme de 21 jours de suivi, le sacrifice de la totalité des souris était réalisé, en cage à CO₂ pour ne pas altérer la tumeur, et les tumeurs récupérées et mesurées (Figure 13). La mesure était réalisée à l'aide d'un pied à coulisse électronique et le volume tumoral était calculé selon la formule suivante (mesure d'une ellipsoïde) : $V = 4/3 \pi * r_x * r_y * r_z$ (où r est le rayon de la tumeur dans les dimensions x, y et z).

Les tumeurs étaient macroscopiquement identifiables par leur localisation (sous mentale), leur couleur (ivoire), leur aspect et leur consistance (ferme et régulière). Aucune tumeur n'a

donné lieu à des métastases ganglionnaires ou à distance observables macroscopiquement (foie et poumon).

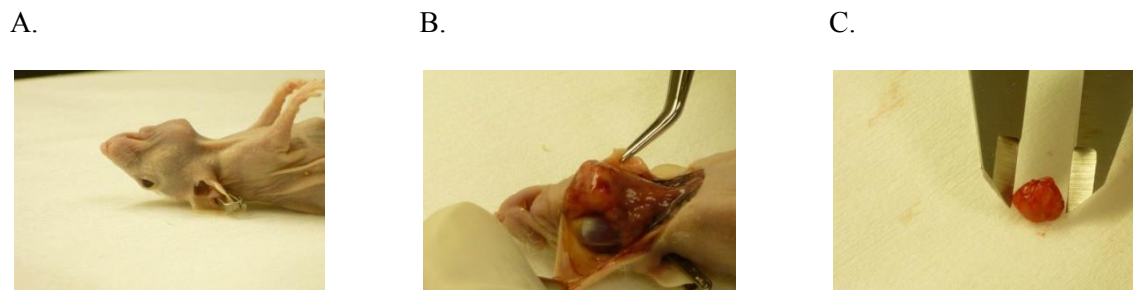


Figure 13 : Photographies de la tumeur et de son exérèse pour mesure. A. Tumeur macroscopiquement bien visualisable en sous mental à 21 jours après injection des cellules (CAL33 1.10^5 cellules dans 20 μ L de liquide physiologique). B. Dissection des tissus afin d’individualiser la tumeur. C. Mesure de la tumeur prélevée.

Les volumes tumoraux (en mm³) obtenus dans chaque conditions sont présentés ci-dessous (Figure 14).

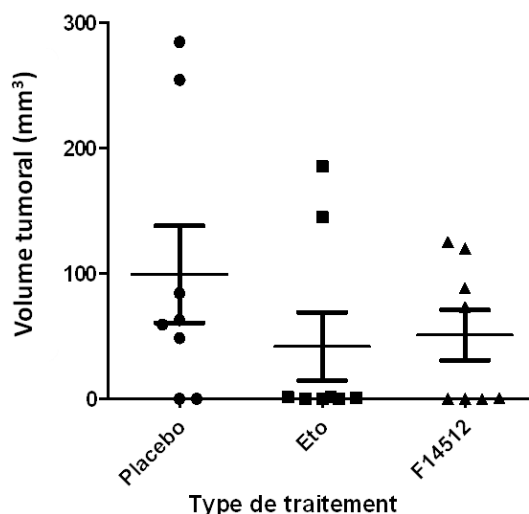


Figure 14 : Représentation graphique de la taille tumorale à J21 après traitement par le placebo, l’étoposide (Eto) ou le F14512 à la dose de 1,25mg/kg par injection. Résultats présentés sous forme de nuages de points avec la moyenne et l’écart type à la moyenne pour chaque groupe.

Les résultats montrent que le F14512 apparaît supérieur au placebo, mais ne présente pas d’effet significativement différent de l’étoposide. Néanmoins, il est à noter que la taille maximale des tumeurs du groupe placebo (290mm³) est supérieure à celle du groupe traité avec l’Etoposide (180mm³) qui est elle-même, chose intéressante, supérieure au F14512 (130mm³).

Ces résultats montrent une très grande hétérogénéité tumorale intra-groupe et inter-groupe mais également l'absence de développement tumoral à J21 chez certaines souris, et ce même au sein du groupe placebo démontrant la nécessité d'une optimisation du protocole.

III.C. Mise au point secondaire du modèle de xénogreffe orthotopique endobuccale en cancérologie des VADS

III.C.1. Matériels et Méthodes

III.C.1.a. Cellules CAL33 TOMATO

Le suivi quantifiable de la croissance tumorale dans la première modalité technique n'était pas possible. Pour pallier à cette limitation, nous avons opté pour un suivi de la croissance tumorale par fluorescence transcutanée. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules transformées CAL33 exprimant la TOMATO (fluorescence rouge) gracieusement données par le Professeur Jacques Robert. Préalablement à l'injection, la fluorescence des cellules a été vérifiée par cytométrie en flux.

III.C.1.b. Technique d'injection

Afin d'améliorer le rendement de l'injection tumorale, nous avons modifié la technique pour assurer une plus grande précision de la zone d'injection mais également limiter la diffusion de la solution injectée au niveau local en combinant dans la suspension injectée, des cellules tumorales à du Matrigel®.

➤ Le Matrigel®

Le Matrigel® est d'utilisation régulière en expérimentation animale orthotopique afin de favoriser la prise tumorale. Celui-ci permet d'observer une multiplication jusqu'à un facteur 9 du rendement de l'expérimentation animale.^(79, 80) La contrainte réside dans la préparation de la solution avant injection. En effet, à une température comprise entre 20°C et 37°C le matrigel® se solidifie, nécessitant ainsi la préparation de la solution d'injection à une température de 4°C.

➤ L'Otorrhinoscope®

Dans cette nouvelle modalité opératoire, l'injection est réalisée à l'aide d'un otorrhinoscope® de marque Olberon Medical avec visualisation directe du plancher de bouche (Figure 15). L'utilisation d'un spéculum fendu permet l'introduction de l'aiguille et une injection très précise dans le plancher de bouche grâce au maintien possible de l'otorrhinoscope en place.



Figure 15 : Schéma du site de l'injection et photographies de l'otorrhinoscope® et de l'injection. **A.** Schéma en coupe transversale représentant une tête de souris *nude* avec visualisation du site d'injection tumorale. **B.** Otorrhinoscope® de la société Olberon Medical Innovation combinant un système de spéculum éclairant dont les bords s'écartent, ce qui permet de déplisser la muqueuse du plancher de bouche et de pouvoir injecter en visualisant parfaitement le site d'injection. Ce système est destiné initialement à l'examen clinique du nez et de l'oreille. **C.** Photographie réalisée au moment d'une injection avec le positionnement en bouche et l'utilisation de l'Otorrhinoscope®.

III.C.1.c. Système Xenogen®

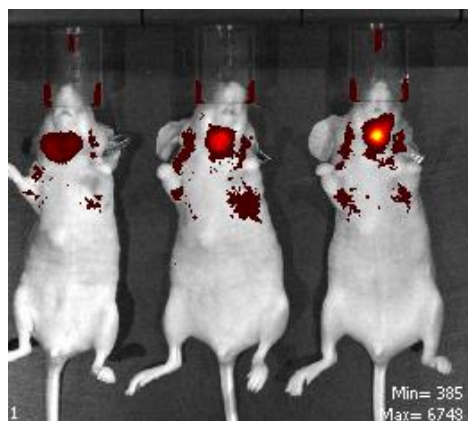
La surveillance de la croissance tumorale a été réalisée par une technique de visualisation de fluorescence à l'aide d'une caméra de type Xenogen® IVIS-200. Ce système permet de réaliser une imagerie *in vivo* grâce au couplage d'une caméra d'acquisition, intégrée au sein d'une colonne fermée, et d'un logiciel d'analyse. Ce dernier permet une analyse à travers un spectre fréquentiel étroit (dédié TOMATO rouge) et après moyennage, l'exploitation d'un résultat d'efficiency (photons/cm²).

Pour permettre une parfaite sédation des souris avant et au cours de l'acquisition des images, du gaz halogéné (isoflurane) est injecté dans une cage (avant acquisition) puis par un système de masque au sein de la colonne fermée (pendant l'acquisition) (Figure 16 A).

➤ Modalités opératoires

L'injection d'une solution tumorale de 20µL contenant 30 000 cellules CAL33 marquées TOMATO est réalisée à J0 pour 8 souris Balb/c *nude*. La première acquisition par le système Xenogen® est effectuée à partir de J9 puis toutes les 48 heures jusqu'au sacrifice de l'ensemble des animaux. En raison d'une perte de poids en dessous du seuil critique, une souris a dû être sacrifiée à J11 sans présenter de tumeur visible macroscopiquement mais cependant détectée en imagerie de fluorescence (Figure 17A). Une seconde souris a été sacrifiée à J23, également en raison d'une perte pondérale excessive. Celle-ci présentait une tumeur macroscopiquement identifiable et bien visualisable en imagerie. Les 6 dernières souris étaient sacrifiées à J25 par CO₂ puis les tumeurs étaient disséquées et récupérées selon les mêmes modalités opératoires que la technique initiale (Figure 16 B). Après mesure, une conservation dans du formol est effectuée afin de pouvoir réaliser à posteriori une étude microscopique anatomo-pathologique.

A.



B.



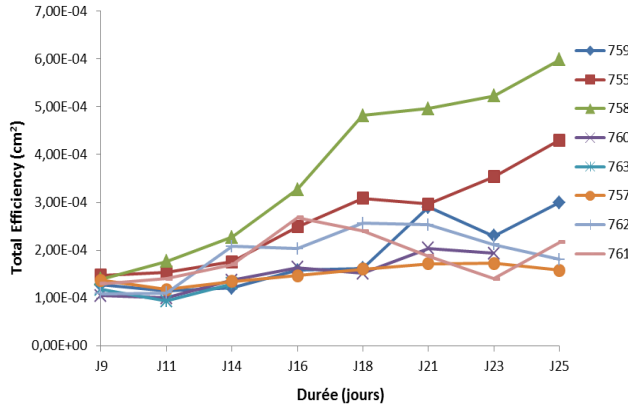
Figure 16 : Photographies des souris Balb/c nude au sein de l'enceinte du Xenogen® et tumeurs macroscopiques après dissection. A. Photographies des souris Balb/c nude au sein de l'enceinte d'acquisition du Xenogen® permettant la visualisation de la fluorescence en sous mentale (superposition lumière visible/fluorescence). B. Tumeurs macroscopiques après dissection, mesure avant mise en pot de formol.

III.C.2. Résultats

Contrairement à l'expérimentation précédente, ce protocole nous a permis d'obtenir une tumeur dans la totalité des animaux injectés (8 sur 8). Les résultats présentés ci-dessous montrent que, chez 4 souris/6, le taux de fluorescence augmente jusqu'à la fin de l'expérimentation, dans les 2 autres cas ce taux stagne voire diminue légèrement (Figure 17

A). Cependant, de façon surprenante, la fluorescence mesurée ne s'avère pas corrélée au volume tumoral final. En effet, les souris ayant une tumeur de grande taille ne présentent pas la fluorescence la plus importante (Figure 17 B).

A.



B.

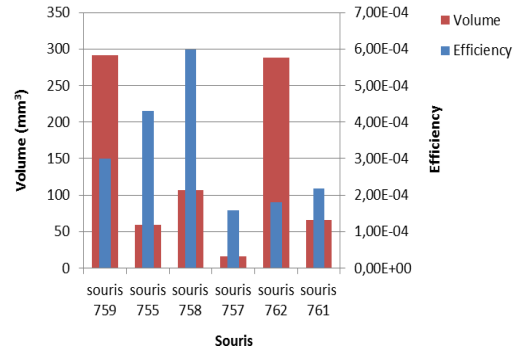


Figure 17 : Représentations graphiques de la fluorescence mesurée (Total Efficiency) et des volumes tumoraux (mm³) des xénogreffes ORL orthotopiques. A. Courbes de fluorescence (Total Efficiency en photons/cm²) en fonction du temps (jours). **B.** Représentation graphique superposée de l'Efficiency et du Volume tumoral des différentes souris en fin de protocole.

De façon comparable à la première expérimentation, les tumeurs étaient macroscopiquement identifiables par leur localisation (sous mentale), leur couleur (ivoire), leur aspect et leur consistance (ferme et régulière). Aucune tumeur n'a donné lieu à des métastases ganglionnaires ou à distance observables macroscopiquement (foie et poumon) ou détectables par Xenogen®.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

DISCUSSION

Les séquelles à court et long terme des protocoles thérapeutiques lourds utilisés en cancérologie des VADS, combinant la chirurgie à la radio \pm chimiothérapie dans les tumeurs avancées, rendent nécessaire le développement de molécules efficaces et aux effets secondaires diminués. Par ailleurs, malgré ces traitements lourds le taux de survie à 5 ans reste faible, avoisinant 50%, et la qualité de vie apparaît altérée.⁽¹⁾ Dans ce contexte, le développement de nouvelles molécules plus efficaces et/ou plus ciblées apparaît indispensable. Parmi les stratégies anticancéreuses récemment développées, celle utilisant la vectorisation via le système de transport des polyamines (STP) apparaît comme intéressante dans le traitement de ces pathologies cancéreuses avancées.^(53, 60, 81) Ainsi, le F14512, nouvel inhibiteur de topoisomérase II, a été développé par les laboratoires Pierre Fabre, et combine à un noyau épipodophyllotoxine un groupement polyamine de type spermine permettant sa prise en charge par le STP. Cette particularité permet à cette molécule de s'incorporer préférentiellement dans les cellules cancéreuses qui présentent un STP suractivé.⁽⁶⁴⁾ Le F14512 est actuellement en évaluation en essai clinique de phase 2 dans le traitement de leucémies aigües myéloïdes.⁽⁶⁴⁾ Cette molécule a démontré un potentiel d'activité anti tumorale intéressant dans un panel de xénogreffes cellulaires tumorales, incluant des cellules de poumon, de sein ou de colon mais pas de panel cellulaire cancéreux ORL.⁽⁶⁸⁾ De plus, le F14512, analogue structural de l'étoposide, chef de file des inhibiteurs de topoisomérase II, montre *in vitro* une cytotoxicité et une induction de la mort cellulaire bien plus importante que ce dernier avec, chez le patient, de moindres effets secondaires qui sont le principal obstacle à l'utilisation de l'étoposide en ORL. Aussi mes travaux de thèse avaient-ils pour principal but d'étudier, pour la première fois en cancérologie ORL, le potentiel thérapeutique d'une stratégie de vectorisation via le STP et ainsi du F14512.^(71, 82, 83) Nous avons donc évalué, à travers différents aspects, la supériorité du F14512 par rapport à l'étoposide mais également au cisplatine et au 5FU dans différentes lignées cellulaires cancéreuses des VADS.

Nous avons observé dans toutes les lignées cellulaires testées, une incorporation plus ou moins importante de la sonde fluorescente F17073. Cette quantification de l'activité STP nous a permis de présumer de l'incorporation du F14512 possédant ce même groupement spermine que le F17073.^(69, 70) Le F14512 est apparu plus cytotoxique que l'étoposide mais également que le cisplatine (CDDP) et le 5-fluorouracile (5-FU), 2 molécules de référence

DISCUSSION

dans les protocoles thérapeutiques en cancérologie des VADS. L'évaluation centrée sur les 2 lignées cellulaires cancéreuses CAL27 et CAL33 (base de langue) a démontré une entrée *via* le STP, importante, rapide et spécifique des composés couplés à la chaîne polyamine de type spermine. Les expériences de compétition réalisées avec la spermine ont montré que le F14512 était bien acheminé dans les cellules par le biais du STP, contrairement à l'étoposide. De plus, la localisation intracellulaire de la sonde F17073 permet de présumer d'un acheminement préférentiel du F14512 vers le noyau cellulaire, site d'action pharmacologique des inhibiteurs de topoisomérase. De précédentes études, avaient montré que la chaîne spermine du F14512 conférait à celui-ci une majoration de stabilité de la liaison ternaire du complexe topoisomérase II-F14512-ADN et une augmentation de la puissance d'inhibition de l'enzyme, pouvant être responsable de son activité anti tumorale puissante.^(82, 84) Toutefois, le bénéfice cytotoxique observé avec le F14512 par rapport à l'étoposide n'est pas imputable à ce seul phénomène tel que nos expériences de compétition l'ont montré. En effet dans les deux lignées testées, l'efficacité du F14512 apparaît bien liée à son transport par le STP, confirmant ainsi son caractère ciblé. Parmi les lignées cellulaires cancéreuses testées, CAL27 et CAL33 se sont révélées les plus sensibles au F14512. Cet élément s'avère intéressant dans l'hypothèse d'une utilisation clinique de cette molécule dans les tumeurs de l'oropharynx, pour lesquels le besoin de nouvelles thérapeutiques reste important.

L'hypoxie est reconnue comme étant impliquée dans la chimio et/ou la radio résistance dans de nombreux types carcinologiques dont les cancers des VADS.^(1, 85) Néanmoins, l'hyper régulation du système de transport des polyamines a été décrit comme promoteur de la survie des cellules cancéreuses lors d'un stress hypoxique *via* l'inhibiteur antizyme.⁽⁸⁶⁾ En effet, nous avons trouvé une hyper activité du STP dans des conditions hypoxiques mais sans que cela induise une majoration de la cytotoxicité du F14512. Cependant, en hypoxie le F14512 maintient un gain notable de cytotoxicité comparé à l'étoposide, et ce alors que l'efficacité du cisplatine et du 5FU était diminuée (résultats non présentés) conformément aux données de la littérature.⁽⁸⁷⁾ Ainsi, malgré les différents phénomènes responsables de la chimiorésistance des cellules cancéreuses en hypoxie, dont un taux de réplication réduit, l'activité cytotoxique du F14512 se retrouve être largement conservée en conditions hypoxiques.

DISCUSSION

De nos jours, le protocole DCF (Docetaxel + CDDP + 5FU) est considéré comme le traitement médical le plus efficace dans les cancers tête et cou. Cependant, la toxicité importante de ce protocole contre-indique son utilisation chez plus de 50% des patients.^(88, 89) Dans ce contexte, d'autres associations thérapeutiques aussi efficaces sont clairement indiquées. L'étoposide en monothérapie orale ou en association avec le cisplatine a été étudié dans les cancers avancés des VADS avec les mêmes résultats que l'association 5FU et CDDP mais a été stoppé en raison d'une toxicité hématologique.^(67, 90) En considérant le profil de tolérance favorable du F14512, celle-ci pourrait être considérée comme une alternative dans le traitement des cancers des VADS.⁽⁷³⁾ Dans ce travail, nous avons démontré que l'association du F14512 avec le cisplatine était synergique et significativement supérieure à l'association étoposide / cisplatine. La topoisomérase II est une enzyme participant à la réparation des dommages causés à l'ADN, nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'effet de cassure des brins d'ADN provoqué par le cisplatine est amplifié par la puissante inhibition de la topoisomérase II lié au F14512.⁽⁹¹⁾

Devant ces résultats obtenus *in vitro*, il apparaît que l'association du F14512 avec le cisplatine pourrait procurer une bonne réponse thérapeutique, par rapport aux protocoles thérapeutiques conventionnels utilisés en cancérologie ORL, mais avec un meilleur profil de tolérance. Ainsi, chez les patients présentant d'importantes comorbidités, l'association du F14512 avec les sels de platine apparaît comme une option thérapeutique intéressante en cancérologie des VADS.

Les tumeurs non résécables mais curables sont traitées, en oncologie tête et cou, par une association de radiothérapie et de chimiothérapie, si cette modalité n'est pas contre-indiquée par les comorbidités ou l'âge du patient.⁽⁹²⁾ Dans notre travail, nous avons démontré pour la première fois que, à l'image de son association avec le cisplatine, le F14512 apparaît également synergique avec l'action des radiations ionisantes, et ce de façon plus importante que l'étoposide dans toutes les lignées cellulaires testées. En effet, le F14512 s'avère particulièrement radio-sensibilisant et supérieur à l'étoposide, même à de faibles doses d'irradiation. Les effets des radiations ionisantes sont décrits pour être plus importants lorsque les cellules sont en phase M du cycle cellulaire.⁽⁹³⁾ Ainsi, l'effet radio-sensibilisant du F14512 pourrait être en partie expliqué par l'accumulation en phase G2/M du cycle cellulaire, comme cela est par ailleurs décrit dans la littérature pour d'autres

DISCUSSION

molécules de la même famille ⁽⁸³⁾, amenant donc les cellules cancéreuses dans un état plus propice à l'action de la radiothérapie.

Nous rapportons à travers ce travail *in vitro*, l'efficacité cytotoxique significative du F14512, molécule vectorisée au sein de la cellule *via* le STP. Cette cytotoxicité est observée à l'égard des lignées cellulaires cancéreuses des VADS étudiées, lorsque la molécule est utilisée seule ou en association avec une chimiothérapie classique, telle que le cisplatine, ou les radiations ionisantes. A la vue de l'activité clinique de l'étoposide rapportée dans ce type de cancers et à l'action synergique significative observée lorsque le F14512 est associé au cisplatine, ces données suggèrent qu'une nouvelle option thérapeutique dans les cancers des VADS est envisageable. L'efficacité du F14512 seul ou en combinaison avec le cisplatine mériterait d'être étoffée par des études précliniques réalisées sur des modèles adaptés.

La littérature scientifique précise de façon claire la pertinence et l'intérêt d'un modèle orthotopique en ORL.⁽⁷⁵⁾ Il apparaissait donc nécessaire de développer un modèle orthotopique endobuccal de tumeur ORL afin d'étudier de façon fiable le développement local, régional et métastatique de la tumeur en réponse au(x) traitement(s). En effet, le contexte tissulaire et micro environnemental, absent des études menées *in vitro* et *in vivo* en hétérotopique, est primordiale dans le développement de ces tumeurs et influe sur l'efficacité des thérapies. De plus, la mise en place d'un modèle animal fiable apparaissait nécessaire afin d'étudier l'efficacité du F14512 *in vivo*. Bien que plusieurs auteurs ont rapporté des modèles de xénogreffe au niveau de la glande parotide avec des traitements par molécules ciblant EGFR/VEGFR ⁽⁷⁶⁾, ou de la thyroïde avec un modèle de carcinome papillaire traité par thérapeutiques ciblées ⁽⁹⁴⁾, aucun modèle de tumeur de cavité buccale n'a été développé à ce jour ⁽⁹²⁾ alors que celui-ci correspond à 40% des tumeurs des VADS. Ceci peut être expliqué en partie par la difficulté technique d'une injection dans une structure millimétrique qu'est le plancher de bouche de souris. La technique d'injection en plancher de bouche chez une souris *nude*, dont cette structure anatomique correspond à un triangle à sommet antérieur et à base postérieure de 4mm, apparait donc difficile.

De façon surprenante, compte tenu des résultats obtenus *in vitro* sur la lignée CAL33, la première série d'expérimentation animale n'a pas permis de démontrer de différences significatives entre le traitement par le F14512, l'étoposide et le placebo. Notons que les résultats obtenus *in vitro*, montraient de façon inédite et intéressante un effet radio

DISCUSSION

sensibilisant du F14512 supérieur à celui de l'étoposide. Ainsi un traitement concomitant par radiations ionisantes aurait probablement permis de valider le potentiel supérieur du F14512 observé. Pour des raisons logistiques, cette modalité thérapeutique par radiothérapie n'est actuellement pas possible sur notre site.

Toutefois, le F14512 seul a montré *in vitro* un fort potentiel cytotoxique avec des IC₅₀ dix fois inférieures à celles de l'étoposide. *In vivo*, l'absence de significativité entre les différents groupes de souris, qu'elles soient traitées avec le F14512, l'étoposide ou le placebo, pourrait être en partie liée à la forte hétérogénéité tumorale mise en évidence dans ce protocole. En effet, dans plusieurs cas, nous observons une absence totale de développement tumoral, et ce même au sein du groupe placebo. Outre les contraintes imposées par un site d'implantation aussi réduit, cette hétérogénéité peut s'expliquer par une dispersion de la suspension cellulaire au sein des tissus environnants suite à l'injection, ou encore par une croissance tumorale non observable macroscopiquement. Au-delà de cette variabilité intragroupe, le développement très rapide de ce modèle tumoral ne permettait qu'une fenêtre de traitement réduite, laissant peu de temps pour discriminer l'effet même d'un cytotoxique de celui du placebo. Enfin, contrairement aux modèles de xénogreffes hétérotopiques sous-cutanés dans le flanc de l'animal, le positionnement de notre modèle empêchait toute mesure de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse, nous rendant aveugle quant au développement tumoral tout au long de l'expérimentation.

Afin de pallier aux difficultés techniques rencontrées avec ce premier protocole, plusieurs améliorations y ont été apportées. La problématique d'une injection précise dans un espace réduit et peu accessible que représente le plancher buccal de souris Balb/c *nude* a été surmontée par l'utilisation d'un système éclairant, grossissant et écarteur de type otorhinoscope® permettant une visualisation précise et directe du site d'injection.

De plus, afin de favoriser et de confiner la prise tumorale au sein du site d'injection, un plus faible volume de cellules tumorales en suspension a été associé à du matrigel®.

Le matrigel® a été initialement isolé dans des tumeurs murines.⁽⁹⁵⁾ Il s'agit d'un extrait de membrane basale à base d'une mixture protéique. Il est essentiellement constitué de laminine-111, de collagène IV, d'héparane sulfate, de protéoglycanes, de facteurs de croissance et de protéases. Celui-ci est classiquement utilisé dans les expériences de xénogreffes orthotopiques afin de favoriser la prise tumorale, permettant ainsi d'observer

DISCUSSION

une multiplication par un facteur 9 du rendement de l'expérimentation (de 10% à 90% de prise).⁽⁹⁶⁾ La solution formée, liquide à 4°C, se polymérise à une température physiologique (24-37°C) formant un gel une fois injectée dans l'animal.^(79, 80) Cette substance peut être utilisée en injection avec des cellules tumorales issues de culture ou des cellules issues de biopsies tumorales et il n'existe pas de conséquences sur l'aspect histologique observé après expérimentation, comparativement à une xénogreffe réalisée sans matrigel®.^(95, 97) Cette modalité technique peut favoriser de façon intéressante une réaction inflammatoire liée à la polymérisation du produit permettant ainsi une meilleure implantation tumorale par stabilisation de la suspension injectée au sein du plancher de bouche.

Enfin, pour la réalisation de ce nouveau protocole, nous avons utilisé des cellules CAL33 TOMATO (fluorescence rouge), gracieusement fournies par le Professeur Jacques Robert (Institut Bergonié, Bordeaux). Cette caractéristique permettait ainsi de réaliser un suivi de la croissance tumorale à travers une mesure de la fluorescence transcutanée émise par les cellules tumorales à l'aide d'un système Xenogen.

En effet, le système Xenogen, d'imagerie *in vivo*, permet de réaliser une acquisition en bioluminescence ou en fluorescence chez l'animal vivant. L'avantage de ce type d'imagerie réside dans sa sensibilité, d'autant plus si les tissus de l'animal présentent une faible auto fluorescence et que les structures analysées sont superficielles ou sous cutanées. Dans notre travail, les cellules CAL33 marquées TOMATO et dont la fluorescence est située dans le rouge, possèdent des longueurs d'onde d'excitation et d'émission situées à proximité du seuil de 600nm, ce qui en fait un marqueur de bonne pénétration tissulaire.⁽⁹⁸⁾ Ainsi, nous avons pu réaliser à partir de 9 jours après l'injection, une cinétique de croissance tumorale montrant une progression continue ou une stagnation, voire une légère diminution en fin de protocole selon l'individu. Cependant, en fin d'expérimentation, il s'est avéré que la quantité de fluorescence mesurée avant sacrifice des animaux n'était pas superposable au volume tumoral mesuré après exérèse. En effet, certaines tumeurs de petite taille présentaient une quantité de fluorescence intense alors que des tumeurs de grande taille émettaient une quantité de fluorescence moins intense. Des différences clonales de fluorescence au sein de la population CAL33-TOMATO pourraient en partie expliquer ces résultats mais semblent peu probables. En effet, l'étude anatomo-pathologique de ces xénogreffes tumorales, réalisée par le Pr Xavier Leroy, du Centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille, a permis, d'une part, de confirmer la nature histologique carcinomateuse épidermoïde bien

DISCUSSION

différenciée de l'ensemble des tumeurs, et d'autre part, de constater la présence, dans les tumeurs N°759 et 762, de pseudo-cavités kystiques constituées de matériel protéique inerte sans observer de plages de nécrose. La présence de ces zones acellulaires expliquerait l'absence de corrélation entre la taille et la fluorescence observée pour ces deux tumeurs. Dans les études à venir, la fluorescence émise apparaît donc être un meilleur critère d'évaluation de la masse cellulaire.

Il est à noter qu'aucune lésion métastatique n'a été observée en fluorescence ni en fin d'expérimentation lors de la dissection des animaux et ce au niveau des territoires ganglionnaires, des poumons ou du foie. Toutefois, une recherche fine de foci métastatiques est à l'avenir envisageable par digestion de ces organes et analyse en cytométrie en flux.

Ainsi, lors de cette seconde expérimentation animale, les modalités de préparation et la technique d'injection de la suspension de cellules tumorales ont été validées par le fait que l'ensemble des souris ont développé une tumeur. Par ailleurs, le suivi de la quantité de fluorescence a permis de confirmer la présence d'une lésion avant même que celle-ci ne soit visualisable macroscopiquement chez l'animal. Néanmoins, il n'existait pas de corrélation entre la taille tumorale observée et la quantité de fluorescence.

En raison de son mode de vectorisation *via* le STP, le F14512 peut être considéré comme une thérapie ciblée. Dans ce contexte, l'importance de l'activité STP observée dans les cellules tumorales permettrait de présager de l'efficacité du F14512 sur la tumeur. A ce titre, notons que les résultats prometteurs obtenus *in vitro*, l'ont été sur les lignées CAL33 et CAL27, présentant la plus forte incorporation de la sonde F17073. Nous avons donc entrepris, sur des biopsies de patients atteints d'un cancer des VADS, de quantifier l'activité STP dans des cellules tumorales *versus* des cellules saines de localisations identiques, issues d'un même individu et ce à l'aide de la sonde F17073 comme précédemment sur les lignées. Le ratio $T/S > 1$ permettait de conclure à une activité STP supérieure dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines. Nous avons observé 8 résultats positifs ($T/S > 1$) sur 13 prélèvements réalisés, mais seul 1 cas présentait un ratio supérieur à 4, les 7 autres patients présentaient un ratio compris entre 1 et 2.

Ces résultats, mitigés, traduiraient un faible différentiel d'activité STP entre tissus cancéreux et tissus sains en cancérologie des VADS, remettant en cause le potentiel ciblé du F14512 dans cette pathologie. Néanmoins, il apparaît intéressant de considérer séparément les

DISCUSSION

différentes localisations anatomiques au sein des VADS. En effet, les localisations tumorales en cavité buccale (langue) et oropharynx (base de langue et amygdale) présentent une activité STP plus marquée. Par ailleurs, les expériences *in vitro* avaient montré dans les lignées CAL33 et CAL27 (base de langue) une prépondérance de cette activité STP. Il est difficile de conclure sur l'importance de l'activité STP des cellules cancéreuses de patients atteints d'un cancer des VADS devant cette cohorte qui reste limitée, néanmoins les ratios plus importants observés dans les localisations oropharyngées inciteraient à limiter l'étude à cette zone anatomique. Il faut également prendre en compte le fait que les prélèvements de tissus tumoraux sont constitués d'un ensemble de cellules épithéliales cancéreuses mais également de nombreux éléments de la matrice extracellulaire et de fibroblastes pouvant fausser la valeur d'activité STP globale mesurée. La difficulté de sélection des cellules épithéliales cancéreuses en ORL, par rapport à leur environnement, réside dans le fait qu'il n'existe pas de marqueurs histologiques fiables permettant de discriminer ces cellules de leur tissu environnant.^(99, 100) En effet, l'analyse de l'activité STP nécessite d'être réalisée sur des tissus frais et n'est donc pas possible en histologie sur des tissus fixés. Seule une analyse moléculaire, qui n'est pas, dans l'état actuel des connaissances, possible, permettrait une analyse plus spécifique du STP des cellules cancéreuses des VADS.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

CONCLUSION

Les cancers des VADS constituent à l'heure actuelle un enjeu de santé publique mondial mais plus encore national. Malgré la mise en place de politiques de santé publique actives au niveau international, européen et national pour lutter contre le tabagisme, principal facteur de risque de ces cancers, celui-ci ne régresse que modérément et plus inquiétant encore il progresse chez les femmes. Cette situation est d'autant plus préoccupante que le taux de survie à 5 ans de ces cancers reste défavorable, avec moins de 50% de survie, et contrairement à d'autres localisations cancéreuses, ne s'améliore aucunement depuis 3 décennies.

Des progrès dans la prise en charge ont été réalisés ces dernières décennies. Au niveau chirurgical certaines interventions sont devenues moins invasives et la reconstruction par lambeaux des exérèses larges a permis d'améliorer la qualité de vie sans entamer la survie. En radiothérapie, les traitements sont devenus plus ciblés et en oncologie les protocoles de chimiothérapie à visée de préservation d'organe se sont développés. La préparation aux traitements à travers les soins de support (prise en charge nutritionnelle, de la douleur, psychologique et des addictions) a permis également d'améliorer la qualité de vie des patients. Néanmoins, les protocoles thérapeutiques des tumeurs avancées classées T3 ou T4 avec envahissement ganglionnaire combinent des traitements lourds par chirurgie et radio ± chimiothérapie. Ces traitements occasionnent des séquelles non négligeables à court terme et surtout à moyen et long terme. C'est dans ce contexte que le développement de thérapies dites « ciblées », dont les effets secondaires à court et long terme apparaissent moins importants, s'est inscrit. Depuis l'avènement, en cancérologie des VADS, au cours de la décennie 2000, du cetuximab dans le traitement des lésions avancées en association avec la radiothérapie, la publication scientifique fondamentale et clinique s'est enrichie de nombreuses molécules de cette large famille de thérapies ciblées.

Le F14512, nouvel inhibiteur de topoisomérase II, développé par les laboratoires Pierre Fabre, présente un mécanisme d'action original et dont la vectorisation au sein des cellules cancéreuses *via* un STP suractivé, lui confère ce caractère ciblé. Nous avons pu démontrer à travers ce travail, que cette molécule *in vitro* présentait une cytotoxicité plus importante que l'étoposide mais également que le cisplatine et le 5FU (molécules de référence en

CONCLUSION

chimiothérapie ORL), qu'elle présentait une synergie d'action avec le cisplatine et qu'enfin le F14512 s'avérait un radio-sensibilisant puissant. Cependant, ces résultats n'ont pu être confirmés *in vivo* sur des souris immunodéficientes. Les contraintes liées au modèle orthotopique utilisé et l'impossibilité logistique de réaliser le traitement combiné par radiations ionisantes pourraient être des explications aux résultats observés *in vivo*. Il apparaissait donc nécessaire, dans ce contexte, de poursuivre le développement de modèles orthotopiques adaptés, permettant de mimer avec plus d'exactitude les conditions cliniques observées. La dernière partie du travail s'est donc intéressée à améliorer le modèle animal utilisé et à parfaire également la cinétique de surveillance du développement tumoral à travers l'utilisation de cellules fluorescentes et d'une caméra de fluorescence. Ces outils permettront d'améliorer le modèle orthotopique endobuccal et de le rendre plus efficient.

En cancérologie des VADS, l'efficacité oncologique des protocoles thérapeutiques sans majoration des séquelles à court et long terme devra tenir compte du développement des thérapies ciblées combinées à la radiothérapie. L'évaluation de ces molécules et de leur association aux radiations ionisantes nécessitera l'utilisation de modèles animaux orthotopiques fiables, reproductibles permettant de tester leur efficacité avant le développement d'études cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Vigneswaran N, Wu J, Song A, Annapragada A, Zacharias W. Hypoxia-induced autophagic response is associated with aggressive phenotype and elevated incidence of metastasis in orthotopic immunocompetent murine models of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Exp Mol Pathol* 2011;90(2):215-25.
2. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008;56(3):159-75.
3. Lefebvre J, Chevalier D. *Epidémiologie des voies aérodigestives supérieures*. Encyclopédie Médico Chirurgicale 2012.
4. Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chronic Dis* 1972;25(12):711-6.
5. Zeka A, Gore R, Kriebel D. Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: a meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* 2003;14(9):897-906.
6. Lee YC, Boffetta P, Sturgis EM, et al. Involuntary smoking and head and neck cancer risk: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(8):1974-81.
7. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(23):1772-83.
8. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110(5):525-41.
9. Tai J, Yang M, Ni X, et al. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 genes are associated with an increased risk of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;196(1):76-82.
10. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL, Jr. Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;17(2):88-94.
11. Genden EM. Reconstruction of the mandible and the maxilla: the evolution of surgical technique. *Arch Facial Plast Surg* 2010;12(2):87-90.
12. Mortuaire G, Francois J, Wiel E, Chevalier D. Local recurrence after CO2 laser cordectomy for early glottic carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116(1):101-5.
13. Chabolle F, Babin E, Albert S, et al. Complications et séquelles des traitements en cancérologie ORL. Rapport de la Société Française d'ORL et de chirurgie cervico-faciale. . 2013.
14. Wolden SL, Chen WC, Pfister DG, Kraus DH, Berry SL, Zelefsky MJ. Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) for nasopharynx cancer: update of the Memorial Sloan-Kettering experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64(1):57-62.
15. Overgaard J, Hansen HS, Specht L, et al. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous-cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362(9388):933-40.
16. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med* 1991;324(24):1685-90.
17. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000;355(9208):949-55.
18. Bourhis J, Guigay J, Temam S, Pignon JP. Chemo-radiotherapy in head and neck cancer. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 10:x39-41.
19. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006;354(6):567-78.
20. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359(11):1116-27.
21. Dorsey K, Agulnik M. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Drugs* 2013;73(4):315-25.
22. Markovic A, Chung CH. Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012;12(9):1149-59.

23. Vermorken JB, Stohlmacher-Williams J, Davidenko I, et al. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2013;14(8):697-710.
24. Machiels JP, Subramanian S, Ruzsa A, et al. Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011;12(4):333-43.
25. Argiris A, Ghebremichael M, Gilbert J, et al. Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial. *J Clin Oncol* 2013;31(11):1405-14.
26. Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, et al. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2013;31(11):1415-21.
27. Kondo N, Tsukuda M, Ishiguro Y, et al. Antitumor effects of lapatinib (GW572016), a dual inhibitor of EGFR and HER-2, in combination with cisplatin or paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2010;23(4):957-63.
28. Harrington KJ, El-Hariry IA, Holford CS, et al. Phase I study of lapatinib in combination with chemoradiation in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27(7):1100-7.
29. Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res* 2007;67(24):11924-32.
30. Ather F, Hamidi H, Fejzo MS, et al. Dacomitinib, an irreversible Pan-ErbB inhibitor significantly abrogates growth in head and neck cancer models that exhibit low response to cetuximab. *PLoS One* 2013;8(2):e56112.
31. Abdul Razak AR, Soulieres D, Laurie SA, et al. A phase II trial of dacomitinib, an oral pan-human EGF receptor (HER) inhibitor, as first-line treatment in recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 2013;24(3):761-9.
32. Kruser TJ, Wheeler DL, Armstrong EA, et al. Augmentation of radiation response by motesanib, a multikinase inhibitor that targets vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res* 2010;16(14):3639-47.
33. Hsu HW, Gridley DS, Kim PD, et al. Linifanib (ABT-869) enhances radiosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 2013;49(6):591-7.
34. Salama JK, Haraf DJ, Stenson KM, et al. A randomized phase II study of 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy compared with bevacizumab plus 5-fluorouracil, hydroxyurea, and twice-daily radiotherapy for intermediate-stage and T4N0-1 head and neck cancers. *Ann Oncol* 2011;22(10):2304-9.
35. Sano D, Matsumoto F, Valdecanas DR, et al. Vandetanib restores head and neck squamous cell carcinoma cells' sensitivity to cisplatin and radiation in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* 2011;17(7):1815-27.
36. Choong NW, Kozloff M, Taber D, et al. Phase II study of sunitinib malate in head and neck squamous cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2010;28(5):677-83.
37. Tong CC, Ko EC, Sung MW, et al. Phase II trial of concurrent sunitinib and image-guided radiotherapy for oligometastases. *PLoS One* 2012;7(6):e36979.
38. Elser C, Siu LL, Winkquist E, et al. Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 2007;25(24):3766-73.
39. Yadav A, Kumar B, Teknos TN, Kumar P. Sorafenib enhances the antitumor effects of chemoradiation treatment by downregulating ERCC-1 and XRCC-1 DNA repair proteins. *Mol Cancer Ther* 2011;10(7):1241-51.
40. Bauman JE, Arias-Pulido H, Lee SJ, et al. A phase II study of temsirolimus and erlotinib in patients with recurrent and/or metastatic, platinum-refractory head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013;49(5):461-7.

41. Seiwert T, Sarantopoulos J, Kallender H, McCallum S, Keer HN, Blumenschein G, Jr. Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drugs* 2013;31(2):417-24.
42. Xu H, Stabile LP, Gubish CT, Gooding WE, Grandis JR, Siegfried JM. Dual blockade of EGFR and c-Met abrogates redundant signaling and proliferation in head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2011;17(13):4425-38.
43. Thariat J, Bensadoun RJ, Etienne-Grimaldi MC, et al. Contrasted outcomes to gefitinib on tumoral IGF1R expression in head and neck cancer patients receiving postoperative chemoradiation (GORTEC trial 2004-02). *Clin Cancer Res* 2012;18(18):5123-33.
44. Yin SC, Guo W, Tao ZZ. Picropodophyllin inhibits tumor growth of human nasopharyngeal carcinoma in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;439(1):1-5.
45. Worden FP, Kumar B, Lee JS, et al. Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3138-46.
46. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3128-37.
47. Petrul HM, Schatz CA, Kopitz CC, et al. Therapeutic mechanism and efficacy of the antibody-drug conjugate BAY 79-4620 targeting human carbonic anhydrase 9. *Mol Cancer Ther* 2012;11(2):340-9.
48. Foehrenbacher A, Secomb TW, Wilson WR, Hicks KO. Design of optimized hypoxia-activated prodrugs using pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. *Front Oncol* 2013;3:314.
49. Noack J, Kleessen B, Proll J, Dongowski G, Blaut M. Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. *J Nutr* 1998;128(8):1385-91.
50. Okamoto A, Sugi E, Koizumi Y, Yanagida F, Udaka S. Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997;61(9):1582-4.
51. Gilmour SK. Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224(3):249-56.
52. Wallace HM. The physiological role of the polyamines. *Eur J Clin Invest* 2000;30(1):1-3.
53. Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 1988;48(4):759-74.
54. Soulet D, Gagnon B, Rivest S, Audette M, Poulin R. A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J Biol Chem* 2004;279(47):49355-66.
55. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(2):244-58.
56. Igarashi K, Sakamoto I, Goto N, Kashiwagi K, Honma R, Hirose S. Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids. *Arch Biochem Biophys* 1982;219(2):438-43.
57. Ransom RW, Deschenes NL. Polyamines regulate glycine interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Synapse* 1990;5(4):294-8.
58. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003;376(Pt 1):1-14.
59. Soulet D, Covassin L, Kaouass M, Charest-Gaudreault R, Audette M, Poulin R. Role of endocytosis in the internalization of spermidine-C(2)-BODIPY, a highly fluorescent probe of polyamine transport. *Biochem J* 2002;367(Pt 2):347-57.
60. Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28(8):843-61.
61. Uemura T, Stringer DE, Blohm-Mangone KA, Gerner EW. Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299(2):G517-22.
62. Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7(2):113-26.
63. Moulinoux J, Cipolla B, Simmonet G. Polyamines and cancer: scientific basis and therapeutic potentialities. *La Revue de Gériatrie* 2010;35(6):375-383.

BIBLIOGRAPHIE

64. Barret JM, Kruczynski A, Vispe S, et al. F14512, a potent antitumor agent targeting topoisomerase II vectored into cancer cells via the polyamine transport system. *Cancer Res* 2008;68(23):9845-53.
65. Berger JM, Wang JC. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6(1):84-90.
66. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2009;9(5):338-50.
67. Gedlicka C, Kornfehl J, Turhani D, Burian M, Formanek M. Salvage therapy with oral etoposide in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Invest* 2006;24(3):242-5.
68. Kruczynski A, Vandenberghe I, Pillon A, et al. Preclinical activity of F14512, designed to target tumors expressing an active polyamine transport system. *Invest New Drugs* 2011;29(1):9-21.
69. Annereau JP, Brel V, Dumontet C, et al. A fluorescent biomarker of the polyamine transport system to select patients with AML for F14512 treatment. *Leuk Res* 2010;34(10):1383-9.
70. Guminski Y, Grousseau M, Cugnasse S, et al. Synthesis of conjugated spermine derivatives with 7-nitrobenzoxadiazole (NBD), rhodamine and bodipy as new fluorescent probes for the polyamine transport system. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19(9):2474-7.
71. Brel V, Annereau JP, Vispe S, Kruczynski A, Bailly C, Guilbaud N. Cytotoxicity and cell death mechanisms induced by the polyamine-vectorized anti-cancer drug F14512 targeting topoisomerase II. *Biochem Pharmacol* 2011;82(12):1843-52.
72. Kruczynski A, Pillon A, Creancier L, et al. F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia* 2013.
73. De Botton S, Berthon C, Bulabois C, Prebet T, Vey N, Chevallier P. F14512 a novel polyamine-vectorized anti-cancer drug targeting topoisomerase II in adults patients with acute myeloid leukemia (AML): results from a Phase 1 study. EHA 17th Congress, Amsterdam 2012:14-17.
74. Zorza G, Dumontet C, Tagoug I, Amsellem S, Roumier C, Jacob M. Vectorization of F14512, a novel targeted cytotoxic agent, towards leukemic cells: Fonctionnal biomarker implementation during a multicentric phase I trial in acute myeloid leukemia (MAL) patients. EHA 17th Congress, Amsterdam 2012:abstract 0078.
75. Sano D, Myers JN. Xenograft models of head and neck cancers. *Head Neck Oncol* 2009;1:32.
76. Younes MN, Yazici YD, Kim S, Jasser SA, El-Naggar AK, Myers JN. Dual epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor inhibition with NVP-AEE788 for the treatment of aggressive follicular thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(11 Pt 1):3425-34.
77. Choi S, Sano D, Cheung M, et al. Vandetanib inhibits growth of adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2008;14(16):5081-9.
78. Ahn D, Sohn JH, Kim H. Surgeon-performed Intraoperative Tumor Localization in Recurrent Papillary Thyroid Carcinoma by Ultrasound-guided Intratumoral Indigo Carmine Injection. *World J Surg*;38(8):1995-2001.
79. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005;15(5):378-86.
80. Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH. Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 1992;202(1):1-8.
81. Casero RA, Jr., Woster PM. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J Med Chem* 2009;52(15):4551-73.
82. Gentry AC, Pitts SL, Jablonsky MJ, Bailly C, Graves DE, Osheroff N. Interactions between the etoposide derivative F14512 and human type II topoisomerases: implications for the C4 spermine moiety in promoting enzyme-mediated DNA cleavage. *Biochemistry* 2011;50(15):3240-9.
83. Ballot C, Jendoubi M, Kluza J, et al. Regulation by survivin of cancer cell death induced by F14512, a polyamine-containing inhibitor of DNA topoisomerase II. *Apoptosis* 2012;17(4):364-76.
84. Chelouah S, Monod-Wissler C, Bailly C, et al. An integrated Drosophila model system reveals unique properties for F14512, a novel polyamine-containing anticancer drug that targets topoisomerase II. *PLoS One* 2011;6(8):e23597.
85. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):225-39.

BIBLIOGRAPHIE

86. Svensson KJ, Welch JE, Kucharzewska P, et al. Hypoxia-mediated induction of the polyamine system provides opportunities for tumor growth inhibition by combined targeting of vascular endothelial growth factor and ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 2008;68(22):9291-301.
87. Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shiota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol* 2009;45(2):109-15.
88. Posner MR, Norris CM, Wirth LJ, et al. Sequential therapy for the locally advanced larynx and hypopharynx cancer subgroup in TAX 324: survival, surgery, and organ preservation. *Ann Oncol* 2009;20(5):921-7.
89. Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(7):498-506.
90. Prevost A, Merol JC, Aime P, et al. A randomized trial between two neoadjuvant chemotherapy protocols: CDDP + 5-FU versus CDDP + VP16 in advanced cancer of the head and neck. *Oncol Rep* 2005;14(3):771-6.
91. Kolb RH, Greer PM, Cao PT, Cowan KH, Yan Y. ERK1/2 signaling plays an important role in topoisomerase II poison-induced G2/M checkpoint activation. *PLoS One* 2012;7(11):e50281.
92. Bozec A, Sudaka A, Toussan N, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Milano G. Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model. *Ann Oncol* 2009;20(10):1703-7.
93. Ree AH, Stokke T, Bratland A, et al. DNA damage responses in cell cycle G2 phase and mitosis--tracking and targeting. *Anticancer Res* 2006;26(3A):1909-16.
94. Ahn SH, Henderson Y, Kang Y, et al. An orthotopic model of papillary thyroid carcinoma in athymic nude mice. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134(2):190-7.
95. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer* 2011;128(8):1751-7.
96. Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF, Mulshine JL. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(17):6698-702.
97. Kim WH, Jun SH, Kibbey MC, Thompson EW, Kleinman HK. Expression of beta 1 integrin in laminin-adhesion-selected human colon cancer cell lines of varying tumorigenicity. *Invasion Metastasis* 1994;14(1-6):147-55.
98. Koo V, Lee A, Eldin OS, Watson C, Hamilton P, Williamson K. pcDNA3.1tdTomato is superior to pDsRed2-N1 for optical fluorescence imaging in the F344/AY-27 rat model of bladder cancer. *Mol Imaging Biol* 2010;12(5):509-19.
99. Cortesina G, Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2006;26(6):317-25.
100. Arantes LM, de Carvalho AC, Melendez ME, Carvalho AL, Goloni-Bertollo EM. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncol* 2014;50(6):587-92.

ANNEXE

“HER3 receptor, a key factor in head and neck squamous cell carcinomas: a review.”

B. Rysman, F. Mouawad, A. Gros, D. Chevalier, S. Meignan

HER3 receptor, a key factor in head and neck squamous cell carcinomas: a review.

B. Rysman^{1,2}, F. Mouawad^{1,2}, A. Gros², D. Chevalier¹, S. Meignan²

¹ ENT and Head and Neck surgery department, Huriez Hospital, University of Lille, France.

² Antitumor pharmacology unit, Centre Oscar Lambret, Inserm U908, Lille, France

Short Title: HER3 in Head and Neck Cancers

Key words: HER3, HNSCC, Resistance, Cetuximab, Tyrosine kinase inhibitor, Radiotherapy

Submitted to *Head and Neck*

Correspondence to:

Samuel Meignan, Antitumor Pharmacology Unit, Centre Oscar Lambret,
IRCL, 1 place de Verdun
59045 Lille, France
Phone : +33 3 20 16 92 14
email: samuel.meignan@inserm.fr

Abstract

HER3 is a member of the HER receptor family. Its main characteristic is that it does not possess tyrosine kinase activity unlike other HER receptors. The role of HER3 in tumorigenesis has now been recognized, particularly in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Despite conflicting studies, HER3 was found overexpressed in HNSCC samples, and correlates with disease progression and poor survival, especially when it is co-expressed with other HER receptors. HER3 is thus a significant factor in HNSCC treatment resistance. Indeed, HER3 is a major mechanism described for cetuximab resistance due to modification of EGFR internalization and by activation of PI3K/AKT signaling pathways. HER3 also affects resistance to tyrosine kinase inhibitors and thereby promotes a treatment escape and radiotherapy resistance by activation of the survival signaling pathway. To counteract this, pharmacologic inhibitors of HER3 are currently in development and could be a next significant improvement in HNSCC treatment.

Introduction

Squamous cell carcinomas represent 95% of upper aerodigestive tract cancers and are a major public health problem. HNSCC (head and neck squamous cell carcinomas) are the sixth most common cancers with 500,000 new patients diagnosed worldwide each year. Overall 5-year survival is about 50% and has not been significantly improved in the last 20 years^(1,2). These cancers are treated by surgery, radiotherapy and/or neoadjuvant or adjuvant chemotherapy. Neoadjuvant chemotherapy involves the use of platinum, 5 Fluoro-Uracile (5FU) and docetaxel as well as targeted therapies such as cetuximab (Erbix[®], Merck). Other drugs, in particular tyrosine kinase inhibitors, are under development (erlotinib, gefitinib, lapatinib and dacomitinib)⁽³⁾. All these treatments target HER receptor families and

focus on EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) which are now well known to play a role in HNSCC tumorigenesis. The HER family has 4 members in humans: HER1 (also called ERBB1 or EGFR), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) and HER4 (ERBB4). HER receptors are ubiquitous in healthy tissue but are mainly expressed in epithelial, mesenchymal and neuronal tissues. HER receptors have a common global structure with a ligand-binding extracellular domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic tyrosine kinase domain⁽⁴⁾. Several ligands are known to bind these receptors. Thus TGF α , EGF and amphiregulin bind solely to EGFRs while betacellulin, heparin binding-EGF-like growth factor (HB-EGF) and epiregulin do not bind solely to EGFR⁽⁵⁾. Neuregulin 1 and 2 bind to HER3 while HER4 binds Neuregulin 1, 2, 3 and 4⁽⁵⁻⁷⁾. No ligand for HER2 has yet been identified⁽⁸⁾.

HER receptors activate intracellular signaling pathways which result in multiple cellular responses including proliferation, differentiation, cell motility and survival. However, aberrant signaling due to mutation, amplification and/or due to the activation of autocrine loops may contribute to the development of cancer⁽⁹⁻¹¹⁾. Thus, EGFR, the most studied HER receptor, was found to be overexpressed in most HNSCC tumor samples and cell lines. This overexpression appears to correlate overall with poor survival, relapse, metastasis and resistance to radiotherapy⁽¹²⁻¹⁶⁾. In the same way, HER2 is reported to be overexpressed in HNSCC and may be involved in tumorigenesis despite the fact that its anatomoclinical value is as yet unclear⁽¹⁷⁾. Nonetheless, HER2 appears to correlate with poor survival in oral squamous cell carcinoma⁽¹⁸⁾. HER4 is the most recently described member of the HER family. The HER4 protein has been found in various normal human tissues⁽¹⁹⁾ and its role in tumorigenesis is not yet proven⁽²⁰⁾.

Finally, the critical role of HER3 in HER-mediated pathways of tumorigenesis is increasingly being recognized.

HER3 now therefore appears to be a suitable therapeutic target for improving overall survival for HNSCC^(21, 22).

HER3 receptor

1. Molecular structure

HER3 is a 180 kDa glycoprotein which is encoded by a 23.2 kb gene consisting of 28 exons mapped to human chromosome 12q13.2⁽²³⁾. It has a similar structure to the other HER receptors. The extracellular domain consists of four subdomains I, II, III, and IV. Subdomains I and III correspond to the ligand binding site and have β -helical folding while domains II and IV have a structure connected by disulfide bonds. In the absence of ligand, direct binding between the subdomains II and IV keeps HER3 in a locked shape that prevents binding between subdomains I and III^(24, 25). This shape prevents exposure of the arm dimerization of domain II.

However, a few differences should be highlighted. Unlike other HER receptors which possess two GXXXG sequences allowing homodimerization, HER3 possesses only one, which explains its trend to promote heterodimerization with other HER receptors⁽²⁶⁾. Above all, the intracellular tyrosine kinase domain of unlike the other HER receptors HER3 lacks tyrosine kinase activity⁽²⁷⁾. Despite the fact that The Cancer Genome Atlas (TCGA) project report very rare HER3 mutations in HNSCC, HER3 is described as non-mutated in this type of cancer⁽²⁸⁾,

unlike colonic and gastric tumors. Moreover, in colonic and gastric cancers, neither the prognostic value of the mutations nor their role in acquired resistance to treatment are yet fully understood⁽²⁸⁾.

2. Signaling pathways

HER3 binds neuregulin 1 and 2 and heregulin with variable affinity, depending on the isoforms present and the simultaneous presence of other HER receptors. As HER3 has no intrinsic kinase activity, its activation of phosphorylation after ligand binding depends on its association with the other HER receptors. Thus HER3 binds preferentially to EGFR and HER2 and weakly to HER4. The HER2-HER3 heterodimer has the strongest mitogenic signaling effect⁽²⁹⁾. However, in the absence of its ligand, HER3 can also be phosphorylated by activated EGFR⁽³⁰⁾. Activation of HER3 leads to the recruitment of numerous cytosolic adaptor proteins such as Shc, Grb7, Grb2, and Src as well as the p85 regulatory subunit of PI3K⁽³¹⁾. These proteins then activate several intracellular signaling pathways, particularly the PI3K/AKT pathway which is known to promote strong mitogenic signals and which is widely implicated in many cancers⁽⁴⁾.

Inactivation of HER3 occurs through dephosphorylation, internalization and proteolysis (or recycling) in endosomal compartments. Although EGFR is quickly internalized and degraded after activation, HER3 internalization occurs later⁽³²⁾. Moreover HER3 does not have any tyrosine kinase activity which appears to be important for HER receptor degradation⁽³³⁾. This leads to HER3 being preferentially recycled to the cell membrane⁽³⁴⁾. Finally, HER3 degradation by the proteasome is regulated by the neuregulin receptor degradation protein (NRDP1) which stimulates HER3 ubiquitination and degradation in a ligand-independent manner⁽³⁵⁾.

HER3 in Head and Neck cancers

1. HER3 expression pattern

HER receptors are weakly expressed in a variety of normal tissues, where they participate in biological functions. HER receptors, particularly HER3 being are overexpressed in several types of malignant tumor including HNSCC^(36, 37).

The various clinical studies have assessed HER3 expression in normal head and neck tissue, oral dysplasia and various sites of HNSCC by immunohistochemistry which demonstrated the level of protein or mRNA present (Figure 1).

In Normal Head and Neck tissue:

Overall, HER3 protein expression was found in normal adult and fetal tissues⁽⁴⁵⁾. Depending on the study, immunohistochemistry on normal upper aerodigestive tract mucosa found HER3 protein expression in 13 to 100% of normal tissue samples. This expression was always weak or moderate and predominantly cytoplasmic^(13, 38, 40, 41). However, other studies showed that there is no detectable HER3 expression in normal mucosa adjacent to tumors or in benign changes in oral mucosa^(39, 42).

HER3 protein was more specifically expressed in the basal and prickle-cell layers⁽⁴¹⁾ or only in prickle cells⁽³⁸⁾.

Dysplastic disease and in situ carcinomas:

HER3 protein expression appears to be increased compared to normal tissue in oral epithelial dysplasia. Indeed, HER3 was found to be overexpressed in 43.5% of tissue samples. Interestingly, there was no difference between expression in mild, moderate and severe dysplasia⁽⁴¹⁾. In the same way verrucous premalignant lesions were positive for HER3 protein in 39% of cases with 26% overexpression compared to normal tissue⁽³⁸⁾.

However, *in situ* carcinoma samples were all found to be negative for HER3 expression⁽³⁹⁾. These data, from a single study evaluating 10 samples, have to be considered carefully.

In primary invasive tumors:***- Protein expression***

HER3 has been found to be overexpressed in several localizations, such as in breast cancer^(23, 46) and in gastrointestinal tract tumors⁽⁴⁷⁾. Similarly, in HNSCC, various degrees of HER3 overexpression have been found both in clinical studies and in cell lines.

Regardless of the localization, HER3 expression in HNSCC varies from 40% to 100% of cases depending on the studies^(38, 40, 42-44) while HER3 was described as overexpressed in 9% to 46% of cases^(13, 39, 40, 42-44, 48, 49). In SCC arising from verrucous oral carcinoma, a particular type of HNSCC which is well differentiated, overexpression of HER3 has been found in 83% of cases⁽³⁸⁾. However, another study reported that HER3 is never overexpressed in HNSCC compared to normal tissue⁽⁵⁰⁾.

Finally, HER3 expression rates reported in studies vary greatly in HNSCC. These large differences could be explained by the fact that different antibodies, materials and techniques were used. Furthermore, no standard scoring criteria have yet been designated for HER3 protein expression⁽⁴⁴⁾.

In addition, as in other cancer sites, the staining pattern of HER3 in HNSCC is not fully understood. Mainly cytoplasmic staining of HER3 has been reported in esophageal, ovarian, lung and breast cancer, while cytoplasmic and membrane staining have been reported in colorectal carcinoma. In HNSCC, HER3 expression has been found to be strongly predominant in the cytoplasm^(38, 41, 42, 48, 50, 51). Moreover, in a series of 40 cases of laryngeal HNSCC samples, the HER3 expression was exclusively cytoplasmic⁽⁴⁴⁾.

- mRNA expression

Levels of HER3 mRNA in HNSCC tend to be higher than in normal mucosa without statistical correlations⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. However, another study found that HER3 mRNA levels were very low, regardless of the type of tissue studied (normal, pre-malignant or malignant lesion)⁽⁴¹⁾. Furthermore, no standard scoring criteria have yet been designated for HER3 mRNA expression⁽⁴⁴⁾.

- Gene amplification

No HER3 gene amplification has been found in HNSCC tissue samples^(55, 56) which is consistent with results found in breast carcinomas⁽⁴⁶⁾.

In metastasis:

HER3^{high} primary tumors seem to develop lymph node metastases more frequently^(42, 43, 54). Depending on the studies HER3 protein overexpression has been reported in 30 to 70% of metastasized lymph nodes^(44, 48). In addition, HER3 expression in metastatic lymph node

samples is described as being at least equal or greater than that in the corresponding primary tumors^(44, 54). Finally, several studies have reported a significant correlation between overexpression of HER3 and metastases^(42, 43, 49, 54). However, one study showed that HER3 expression was low in both primary tumors and metastasis⁽⁵⁰⁾. Surprisingly, amplification of HER3 gene copies has been found in metastases contrary to the primary tumor in oral squamous cell carcinoma⁽⁵⁸⁾.

This overexpression in lymph nodes and metastasis could be explained by the action of HER3 on cell adhesion systems and the correlation between HER3 and metalloproteinases and vascular endothelial growth factor (VEGF). In human cancer, HER3 appears to inhibit cadherin-mediated cell adhesion, which promotes cell motility and tumor invasion⁽⁵⁴⁾. Moreover HER3 expression appears to correlate with expression of the peptide bond cleaving enzymes, especially MMP2 and 9 and VEGF which may be involved in HNSCC angiogenesis, invasion and metastases^(54, 59-61).

In cell lines:

The HER3 protein has been found to be overexpressed in 30% to 50% of HNSCC cell lines compared to normal cells^(57, 62). In addition, HER3 mRNA levels appear increased at very variable rates between cell populations, but without any gene amplification, which suggests that the stability of mRNA may be increased or that mRNA degradation is decreased^(57, 63). These results appear to be consistent with the absence of HER3 gene amplification in tumor samples.

However, one study has shown a genetic gain, with an increase of HER3 gene copy number in 3 cell lines⁽⁶⁴⁾, but including two cell lines which were similar to those found in the previous study⁽⁶³⁾.

2. Co-expression with other HER receptors

The HER3 oncogene can contribute to cell transformation and tumorigenesis when it is co-expressed with HER2 or HER4. Conversely, HER3 alone or associated with EGFR did not show any tumorigenic effect *in vitro* and *in vivo*^(23, 65). Moreover, HER3 appears to play a key role in HER2-mediated tumor proliferation in breast cancer^(11, 66).

Co-expression of HER receptors has been found in numerous HNSCC.

HER2/HER3, HER3/HER4, EGFR/HER2/HER3 and particularly EGFR/HER2/HER3/HER4 co-expressions have been found in dysplasia and HNSCC compared to normal tissue^(17, 39-41, 43, 49).

3. Clinical implications :

In HNSCC, no correlation has been found between HER3 protein rate or gene copy number and clinical or pathological characteristics (age, gender of the patients, tumor size, histologic differentiation, tumor grading)^(18, 40, 42, 48, 57, 67).

Several studies in HNSCC have shown that tumors with HER3 overexpression mainly localized at the membrane have a poorer prognosis^(38, 42, 48). These observations were also found to be true for NSCLC⁽¹⁸⁾. However, other studies do not report any correlation between survival and HER3 expression^(40, 43). Because of these contradictory findings, HER3 is not considered to be a potential prognostic indicator in clinical practice.

HER3 co-expression with other HER receptors correlates significantly with poor survival and/or disease progression^(13, 43, 53, 56, 68). In addition, HER2 appears to be a better predictor of

disease outcome than HER3, HER4 and EGFR (listed in descending order of predictive value)⁽⁴³⁾.

4. Therapeutic implications

Overexpression of HER3 in many human cancers suggests that it could be an effective therapeutic target⁽³⁶⁾. Moreover, recent studies have shown that HER3 may be responsible for tumor resistance to therapeutic agents targeting EGFR such as the tyrosine kinase inhibitors (TKI) and cetuximab⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

HER3 and TKI resistance in HNSCC:

Because of its lack of tyrosine kinase activity, HER3 cannot be directly inhibited by TKIs, although HER3 appears to be an important mediator of TKI resistance through its heterodimerization with other HER receptors.

In most HNSCC cell lines resistant to gefitinib, the EGFR levels are low whereas HER2 and HER3 were strongly expressed. A significant correlation has been found between overexpression of HER2 and HER3 and a reduction in the efficacy of gefitinib⁽⁶²⁾. In HER2 overexpressing tumor cells in particular, HER3 could promote loss of inhibition by TKIs^(62, 72).

Conversely, another study found that HNSCC cell lines present a lower level of HER3 mRNA and HER3 protein in gefitinib-resistant cell lines⁽⁶⁴⁾. In addition, increased expression of neuregulin 1 and activated HER3 are associated with lapatinib sensitivity in HNSCC cell lines⁽⁷³⁾.

Nevertheless, in HNSCC cell lines and xenograft models, MEHD7945A (an anti-HER3 and EGFR dual target antibody) restores *in vitro* sensitivity of erlotinib-resistant cell lines and decreases tumor volume *in vivo*⁽⁷⁴⁾.

Another study in NSCLC found a strong correlation between sensitivity to gefitinib and inhibition of HER3⁽⁷⁵⁾. These data were also found to be true for colorectal and pancreatic cancers with erlotinib⁽⁷⁶⁾.

HER3 and cetuximab resistance in HNSCC:

HER3 appears to play an important role in resistance to cetuximab. Different studies have shown that cetuximab-resistant cells are unable to internalize and degrade EGFR because of increased levels of HER3: the formation of EGFR/HER3 heterodimers increases the rate of recycling of the receptor at the cell surface and promotes cell signaling, whereas the EGFR/EGFR homodimers promote its degradation^(71, 77).

In addition, heterodimers with HER3 are highly effective activators of the PI3K/AKT pathway, a key intracellular signaling pathway⁽⁷⁸⁾.

Studies have shown that HER3 inhibition by siRNA may restore the sensitivity in NSCLC cell lines^(69, 70). There are no similar data for HNSCC cell lines.

Several anti-HER3 antibodies such as LJM716 have been developed which enhanced cetuximab antiproliferative and antitumor action in HNSCC cell lines and in xenograft models⁽⁷⁹⁾. Moreover, the association of MM-121 (an anti-HER3 antibody) or LJM716 with cetuximab appears to restore cetuximab sensitivity in pulmonary, pancreatic or breast tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*^(79, 80).

Two studies have found that the dual target antibody MEHD7945A is more efficient than cetuximab in HNSCC cell lines for the xenograft model^(74, 81). Interestingly, MEHD7945A is more efficient than a combination of cetuximab and an anti-HER3 antibody⁽⁷⁴⁾.

HER3 and radiotherapy resistance in HNSCC:

Following radiotherapy, cell proliferation and survival signaling pathways, especially PI3K/AKT, are activated⁽⁸²⁾. In HNSCC cell lines, ionizing radiation treatment increases HER3 and AKT activation⁽⁸³⁾. Moreover, the combination of anti-HER3 agent, such as AMG-888 (U3-1287) or MEHD7945A with cetuximab, appeared to radiosensitize to a greater extent than cetuximab alone in HNSCC cell lines and in xenograft models^(74, 83). Therefore HER3 also appears to promote radioresistance in head and neck cancer cells.

Conclusion

It is widely known that head and neck cancers generally have a poor prognosis and new therapeutic approaches are therefore needed. The current strategy involves identifying specific targets and managing these tumors with customized treatments directed against these targets.

HER3 appears to be a promising candidate since it has been found to be overexpressed in many cancers, including HNSCC, and is recognized to be a poor prognostic indicator (despite conflicting studies). We can assume that this trend would be confirmed by studies on larger tumor samples and with a specific and reproducible score to quantify HER3 by immunohistochemistry or RT-PCR. However, because of its very variable expression, it is probable that HER3 cannot be used as a reliable prognostic biomarker in HNSCC. These discrepant findings are probably due to the different sites of HNSCC (and therefore type of mucosa) and to risk factors such as tobacco, which can cause multiple molecular damages.

More importantly, HER3 appears to be a resistance factor for many treatments. Although these findings need to be confirmed, many molecules targeting HER3 such as MM-121, LJM716, AMG-888 and MEHD7945A are showing promising results *in vitro* and *in vivo* and are already being developed, which suggests that positive outcomes may be achieved with personalized treatment and medical care for head and neck cancer.

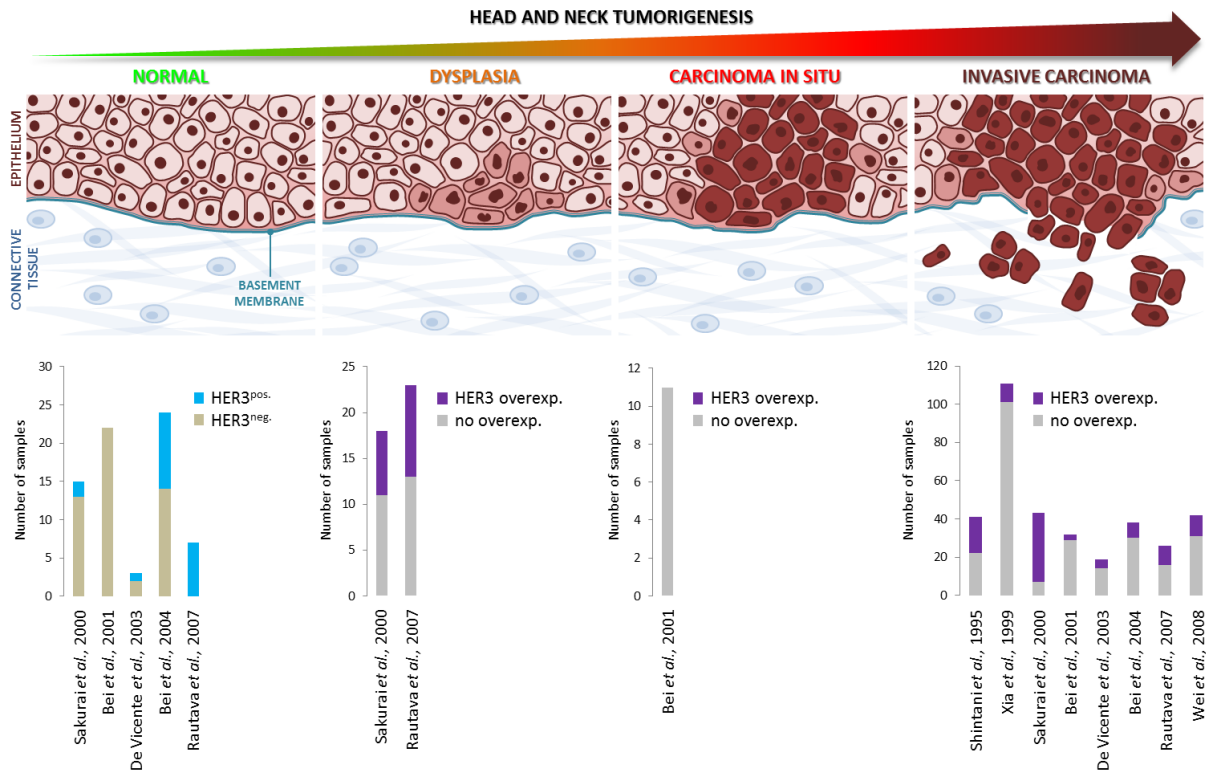


Figure 1: Overview of HER3 expression and overexpression during the different stages of Head and Neck tumorigenesis as reported in literature^(13, 38-44).

REFERENCES

1. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328(3):184-94.
2. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359(11):1143-54.
3. Ather F, Hamidi H, Fejzo MS, et al. Dacomitinib, an irreversible Pan-ErbB inhibitor significantly abrogates growth in head and neck cancer models that exhibit low response to cetuximab. *PLoS One* 2013;8(2):e56112.
4. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000;77:25-79.
5. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):341-54.
6. Carraway KL, 3rd, Sliwkowski MX, Akita R, et al. The erbB3 gene product is a receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994;269(19):14303-6.
7. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(2):127-37.
8. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(9):4995-5000.
9. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 2007;19(10):2013-23.
10. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 2004;64(24):9139-43.
11. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003;284(1):99-110.
12. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62(24):7350-6.
13. Bei R, Budillon A, Masuelli L, et al. Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients. *J Pathol* 2004;204(3):317-25.
14. Huang SM, Li J, Harari PM. Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther* 2002;1(7):507-14.
15. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993;11(10):1873-8.
16. Almadori G, Cadoni G, Galli J, et al. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer* 1999;84(2):188-91.
17. O-Chaorenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002;38(7):627-40.
18. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, et al. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3(1):3-9.
19. Srinivasan R, Poulson R, Hurst HC, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J Pathol* 1998;185(3):236-45.
20. Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP. The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;74(2):73-8.
21. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009;9(7):463-75.
22. Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer* 2007;97(4):453-7.

23. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(23):9193-7.
24. Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002;297(5585):1330-3.
25. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12(3):541-52.
26. Mendrola JM, Berger MB, King MC, Lemmon MA. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* 2002;277(7):4704-12.
27. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(17):8132-6.
28. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, et al. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell* 2013;23(5):603-17.
29. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 1997;16(7):1647-55.
30. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, et al. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *Embo J* 1996;15(10):2452-67.
31. Prigent SA, Gullick WJ. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *Embo J* 1994;13(12):2831-41.
32. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 1996;271(9):5251-7.
33. Felder S, Miller K, Moehren G, Ullrich A, Schlessinger J, Hopkins CR. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 1990;61(4):623-34.
34. Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 1998;273(22):13819-27.
35. Qiu XB, Goldberg AL. Nrdp1/FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member, ErbB3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):14843-8.
36. Gullick WJ. The c-erbB3/HER3 receptor in human cancer. *Cancer Surv* 1996;27:339-49.
37. Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2008;15(7):413-48.
38. Sakurai K, Urade M, Takahashi Y, et al. Increased expression of c-erbB-3 protein and proliferating cell nuclear antigen during development of verrucous carcinoma of the oral mucosa. *Cancer* 2000;89(12):2597-605.
39. Bei R, Pompa G, Vitolo D, et al. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001;195(3):343-8.
40. De Vicente JC, Esteban I, Germana P, Germana A, Vega JA. Expression of ErbB-3 and ErbB-4 protooncogene proteins in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Med Oral* 2003;8(5):374-81.
41. Rautava J, Jee KJ, Miettinen PJ, et al. ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol* 2008;44(3):227-35.
42. Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, Alcalde RE, Matsumura T. Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 1995;95(1-2):79-83.
43. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999;5(12):4164-74.
44. Wei Q, Sheng L, Shui Y, Hu Q, Nordgren H, Carlsson J. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases. *Ann Surg Oncol* 2008;15(4):1193-201.
45. Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 1992;7(7):1273-8.
46. Lemoine NR, Barnes DM, Hollywood DP, et al. Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 1992;66(6):1116-21.

47. Rajkumar T, Gooden CS, Lemoine NR, Gullick WJ, Goden CS. Expression of the c-erbB-3 protein in gastrointestinal tract tumours determined by monoclonal antibody RTJ1. *J Pathol* 1993;170(3):271-8.
48. Takikita M, Xie R, Chung JY, et al. Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2011;9:126.
49. Silva SD, Cunha IW, Younes RN, Soares FA, Kowalski LP, Graner E. ErbB receptors and fatty acid synthase expression in aggressive head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Dis* 2010;16(8):774-80.
50. Ekberg T, Nestor M, Engstrom M, et al. Expression of EGFR, HER2, HER3, and HER4 in metastatic squamous cell carcinomas of the oral cavity and base of tongue. *Int J Oncol* 2005;26(5):1177-85.
51. Basavaraj C, Sierra P, Shivu J, Melarkode R, Montero E, Nair P. Nimotuzumab with chemoradiation confers a survival advantage in treatment-naive head and neck tumors over expressing EGFR. *Cancer Biol Ther* 2010;10(7):673-81.
52. Shigeishi H, Higashikawa K, Hiraoka M, et al. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 2008;19(6):1557-64.
53. Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1997;17(6D):4539-46.
54. O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Archer DJ, Eccles SA. C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol* 2002;38(1):73-80.
55. Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suarez C. Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer* 1996;32A(11):2004-10.
56. Brandt B, Vogt U, Schlotter CM, et al. Prognostic relevance of aberrations in the erbB oncogenes from breast, ovarian, oral and lung cancers: double-differential polymerase chain reaction (ddPCR) for clinical diagnosis. *Gene* 1995;159(1):35-42.
57. Funayama T, Nakanishi T, Takahashi K, Taniguchi S, Takigawa M, Matsumura T. Overexpression of c-erbB-3 in various stages of human squamous cell carcinomas. *Oncology* 1998;55(2):161-7.
58. Liu CJ, Lin SC, Chen YJ, Chang KM, Chang KW. Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. *Mol Carcinog* 2006;45(10):721-31.
59. Juarez J, Clayman G, Nakajima M, et al. Role and regulation of expression of 92-kDa type-IV collagenase (MMP-9) in 2 invasive squamous-cell-carcinoma cell lines of the oral cavity. *Int J Cancer* 1993;55(1):10-8.
60. Kawamata H, Uchida D, Hamano H, et al. Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients: correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol* 1998;13(4):699-704.
61. Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, et al. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1998;186(2):144-50.
62. Erjala K, Sundvall M, Junttila TT, et al. Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2006;12(13):4103-11.
63. Issing WJ, Heppt WJ, Kastenbauer ER. erbB-3, a third member of the erbB/epidermal growth factor receptor gene family: its expression in head and neck cancer cell lines. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250(7):392-5.
64. Hickinson DM, Marshall GB, Beran GJ, et al. Identification of biomarkers in human head and neck tumor cell lines that predict for in vitro sensitivity to gefitinib. *Clin Transl Sci* 2009;2(3):183-92.
65. Alaoui-Jamali MA, Song DJ, Benlimame N, et al. Regulation of multiple tumor microenvironment markers by overexpression of single or paired combinations of ErbB receptors. *Cancer Res* 2003;63(13):3764-74.

66. Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008;68(14):5878-87.
67. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. The erbB oncogenes as prognostic markers in oral squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1996;172(6):681-3.
68. Ibrahim SO, Lillehaug JR, Johannessen AC, Liavaag PG, Nilsen R, Vasstrand EN. Expression of biomarkers (p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erbB-2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999;35(3):302-13.
69. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 2008;27(28):3944-56.
70. Wheeler DL, Iida M, Kruser TJ, et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with Src family kinases in acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther* 2009;8(8):696-703.
71. Arnoletti JP, Buchsbaum DJ, Huang ZQ, et al. Mechanisms of resistance to Erbitux (anti-epidermal growth factor receptor) combination therapy in pancreatic adenocarcinoma cells. *J Gastrointest Surg* 2004;8(8):960-9; discussion 969-70.
72. Sergina NV, Rausch M, Wang D, et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 2007;445(7126):437-41.
73. Wilson TR, Lee DY, Berry L, Shames DS, Settleman J. Neuregulin-1-mediated autocrine signaling underlies sensitivity to HER2 kinase inhibitors in a subset of human cancers. *Cancer Cell* 2011;20(2):158-72.
74. Huang S, Li C, Armstrong EA, et al. Dual targeting of EGFR and HER3 with MEHD7945A overcomes acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Res* 2013;73(2):824-33.
75. Engelman JA, Janne PA, Mermel C, et al. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(10):3788-93.
76. Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, Gibson NW, Cagnoni P, Iwata KK. Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2006;5(8):2051-9.
77. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J* 1998;17(12):3385-97.
78. Soltoff SP, Carraway KL, 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1994;14(6):3550-8.
79. Garner AP, Bialucha CU, Sprague ER, et al. An antibody that locks HER3 in the inactive conformation inhibits tumor growth driven by HER2 or neuregulin. *Cancer Res* 2013;73(19):6024-35.
80. Schoeberl B, Faber AC, Li D, et al. An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation. *Cancer Res* 2010;70(6):2485-94.
81. Schaefer G, Haber L, Crocker LM, et al. A two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer Cell* 2011;20(4):472-86.
82. Contessa JN, Abell A, Mikkelsen RB, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Compensatory ErbB3/c-Src signaling enhances carcinoma cell survival to ionizing radiation. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95(1):17-27.
83. Li C, Brand TM, Iida M, et al. Human epidermal growth factor receptor 3 (HER3) blockade with U3-1287/AMG888 enhances the efficacy of radiation therapy in lung and head and neck carcinoma. *Discov Med* 2013;16(87):79-92.

Auteur : MOUAWAD François

Date de la soutenance : 19 septembre 2014

Titre de la thèse : Evaluation de combinaisons thérapeutiques ciblées en cancérologie des voies aérodigestives supérieures. Mise au point d'un modèle tumoral *in vivo*.

Thèse, Science, Lille, 2014

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en sciences

Mots – clés : F14512 ; Thérapeutique ciblée ; Modèle tumoral ; Cancers des VADS ; Combinaisons

Résumé :

Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) constituent un problème majeur de santé publique, il s'agit du 4^{ème} cancer en fréquence et de la 4^{ème} cause de mortalité masculine par cancer en France. Les traitements basés sur la chirurgie et la radiothérapie ou la radio-chimiothérapie concomitante restent actuellement les modalités thérapeutiques des tumeurs avancées. Malgré ces traitements agressifs la survie à 5 ans reste inférieure à 50%, d'où la nécessité de nouvelles molécules plus ciblées. Le F14512 (laboratoires Pierre Fabre) est un inhibiteur de topoisomérase II dérivé de l'étoposide et porteur d'un groupement spermine. Il s'agit d'une molécule d'un genre nouveau véhiculée par le Système de Transport des Polyamines (STP), suractivé dans les cellules cancéreuses, et ce grâce à son groupement spermine, agissant ainsi de manière ciblée.

Nous disposons pour les besoins du travail d'une sonde fluorescente possédant le même groupement spermine, que le F14512, qui permet sa prise en charge par le STP et de ce fait la visualisation de son entrée par cytométrie en flux et microscopie confocale. Par ailleurs 4 lignées cancéreuses des VADS avec une répartition topographique représentative sont utilisées : Fadu (pharynx), CAL33 et CAL27 (base de langue), SQ20B (larynx). La validation *in vivo* de l'efficacité du F14512 a nécessité la mise au point d'un modèle orthotopique de tumeur endobuccale sur souris *nude*.

Notre étude a ainsi montré la présence d'une activité STP dans les 4 lignées cancéreuses des VADS testées. La cytotoxicité du F14512 évaluée par l'IC₅₀ était supérieure à l'étoposide et aux molécules de référence en cancérologie des VADS, le 5FU et le cisplatine, dans les 4 lignées testées mais de façon plus importante dans les 2 lignées de base de langue (CAL27 et CAL33). L'entrée de la sonde fluorescente F17073, possédant le même groupement spermine que le F14512, se révélait active, spécifique et rapide. Nous avons également pu mettre en évidence une localisation majoritaire de la sonde dans le noyau, site d'action des inhibiteurs de topoisomérase, nous permettant d'en déduire la localisation de la molécule d'intérêt. Dans des conditions de résistance à la chimiothérapie ou la radiothérapie telles que l'hypoxie, le F14512 conservait son bénéfice cytotoxique supérieur à l'étoposide, au 5FU et au cisplatine. De plus, le F14512 associé au cisplatine a montré une synergie significative. Enfin, pour la première fois, le F14512 a montré un effet radio sensibilisant significatif à de faibles doses d'irradiation. La mise en place d'un modèle orthotopique de tumeur endobuccale chez des souris *nude* n'a pas permis de confirmer *in vivo* les résultats obtenus *in vitro*. En effet, la mise au point de ce modèle animal s'est heurtée à des difficultés techniques, néanmoins surmontées par l'utilisation d'un matériel adapté et d'une technique d'injection rodée assurant une reproductibilité de l'opération.

Ainsi, ce modèle pourrait servir à la validation d'autres molécules testées *in vitro*.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Jacques ROBERT

Assesseurs : Madame le Docteur Amélie LANSIAUX

Madame le Professeur Beatrix BARRY

Monsieur le Professeur Emmanuel BABIN

Co-encadrant : Monsieur le Docteur Samuel MEIGNAN

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Dominique CHEVALIER

Adresse de l'auteur : 49 rue Charles Ronsse, 59650 Villeneuve d'Ascq

mouawad_francois@yahoo.fr