



HAL
open science

Analyse et caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx

Elodie Hanns

► **To cite this version:**

Elodie Hanns. Analyse et caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx. Cancer. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ063 . tel-01237281

HAL Id: tel-01237281

<https://theses.hal.science/tel-01237281>

Submitted on 3 Dec 2015

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Equipe d'Accueil 3430, Laboratoire de Biologie Tumorale,
Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss.

THÈSE présentée par :

Elodie HANNS

soutenue le : **18 Septembre 2014.**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Analyse et caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx.

THÈSE dirigée par :

Docteur JUNG Alain

Centre de Lutte contre le Cancer Paul Strauss, Strasbourg.

Docteur ABECASSIS Joseph

Centre de Lutte contre le Cancer Paul Strauss, Strasbourg.

RAPPORTEURS :

Professeur CLAVEL-CRAVOISIER Christine

Université de Champagne-Ardenne, Reims.

Docteur PRETET Jean-Luc

Université de Franche-Comté, Besançon.

EXAMINATEURS :

Professeur MERLIN Jean-Louis

Centre de Lutte contre le Cancer Alexis Vautrin,
Nancy.

Docteur DONTENWILL Monique

Université de Strasbourg, Strasbourg.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Equipe d'Accueil 3430 dans le laboratoire de biologie tumorale du Centre Régional de Lutte contre le Cancer Paul Strauss à Strasbourg dirigé par le Docteur Joseph Abecassis.

Je tiens sincèrement à remercier le Docteur Joseph Abecassis de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail de thèse. Je vous remercie également pour votre disponibilité et pour vos précieux conseils. Je vous suis également extrêmement reconnaissante de votre aide et de votre soutien même dans les moments les plus difficiles. Je tiens à vous témoigner de ma profonde reconnaissance et de mon respect.

Je remercie tout aussi sincèrement le Docteur Alain Jung pour son encadrement durant ces trois années de thèse. Je te remercie Alain pour tes conseils, ton aide, ta disponibilité et nos échanges scientifiques. Tu m'as appris à être un chercheur, à élargir mes connaissances scientifiques et à développer mon esprit critique. Et je suis honorée d'avoir été ta première étudiante thésarde.

Je souhaite remercier le Professeur Christine Clavel-Cravoisier et le Docteur Jean-Luc Prétet d'avoir accepté de participer en tant que rapporteurs à l'évaluation de ma thèse et de m'avoir accordé de leur temps.

Je remercie également le Professeur Jean-Louis Merlin et le Docteur Monique Dontenwill de me faire l'honneur de participer au jury d'évaluation de mon travail de thèse.

Je tiens également à adresser un grand merci au Docteur Bohdan Wasylyk pour avoir régulièrement, au cours de ma thèse, donné de son temps pour suivre l'évolution du projet. Vous avez toujours su me donner des conseils précieux pour la poursuite de mes travaux.

Je remercie le Docteur Erwan Pencreach pour son aide et ses conseils scientifiques tout au long de ces trois années de thèse. Je te remercie également pour la relecture du manuscrit et nos échanges scientifiques.

Je remercie également Madame Christine Wasylyk d'avoir accepté de partager avec moi ses connaissances techniques inégalables. Je vous remercie aussi pour nos discussions lors de mes visites dans votre laboratoire ou lors des soirées du Centre.

Je souhaite vivement remercier mes collègues de travail qui ont partagé ma vie d'étudiante en Master 2, puis de doctorante.

Ah ma chère Christine, l'experte de la biologie moléculaire du laboratoire ! J'ai énormément appris à tes côtés. Merci d'avoir pris ton temps pour m'expliquer les techniques de

biologie moléculaire et notamment la qPCR. Tu es une sacrée prof ! Je te remercie sincèrement pour ta grande patience, ta gentillesse, ton aide si précieuse, tes conseils toujours utiles, ta disponibilité et pour nos grandes discussions. Je te remercie pour ton écoute et tes encouragements. Tu as toujours été là, non seulement pour m'aider dans mon travail, mais aussi dans des moments plus délicats !

Ma petite Sonia, la gestionnaire de la tumorothèque, alias la « dame de l'Accueil ». Si j'ai pu mener mon étude sur les tumeurs, c'est bien, en partie, grâce à toi ! Je te remercie pour ton aide et ta disponibilité. Je me souviendrai longtemps de tes petites piques quotidiennes. Nous avons aussi souvent discuté de choses et d'autres et cela m'a toujours fait du bien.

Ma chère Ludivine, alias Lulu, l'experte de la biologie cellulaire. A tes côtés, j'ai également énormément appris. Tu m'as initiée à la biologie cellulaire et tu as partagé tes connaissances avec moi. Tu as toujours su me conseiller, m'aider et prendre ton temps pour m'expliquer diverses techniques. J'ai souvent pu compter sur toi pour que tu me redonnes des cellules lorsque les miennes avaient décidé de mourir sans prévenir ! Et ensemble, nous avons eu quelques fous rires et discussions mémorables !

Je remercie aussi Anaïs, la bio-informaticienne du labo ! Tu m'as aidée pour mes questions sur les statistiques ! Je n'aime toujours pas ça, mais il faut faire avec !

Je remercie également Pierre, mon co-thésard au labo. Je te remercie pour nos discussions et ton aide.

Je tiens également à remercier Abdel (le nouveau venu au labo du 5^{ème}) et aussi Inès, Sandra et Daniëlle « du labo du 4^{ème} », ainsi que Hélène et Elodie du laboratoire de radiobiologie.

A vous tous, un grand merci !

Je souhaite également remercier vivement Isabelle et Daniëlle, du service d'anapath, qui ont accepté de m'aider dans mon travail de thèse en réalisant toutes les immunohistochimies sur les tumeurs humaines. Votre grande expertise dans ce domaine aura été d'un grand secours. Je vous remercie toutes les deux pour votre patience et votre disponibilité.

Je souhaite aussi remercier ma meilleure amie, Angélique. Merci pour avoir toujours été là pour me soutenir, m'encourager, m'écouter et m'aider dans les moments les plus difficiles. Merci pour ton amitié depuis toutes ces années.

Je souhaite également remercier mon amie Arlette. Nous avons partagé les mêmes bancs de fac et avons réussi ensemble notre Master. Tu m'as soutenue pendant le concours de l'Ecole Doctorale. Et ensuite pendant la thèse !

Mais mon plus grand remerciement revient à toi, Maman ! Tu as toujours été mon soutien indéfectible. Tu as toujours cru en moi et tu as toujours été là. J'ai toujours pu compter sur toi. A chaque moment ! Alors merci maman pour ton aide, tes encouragements et ton écoute durant toutes ces années. Je te dédie cette thèse qui n'aurait pas vu le jour sans toi.

Ma « petite » sœur adorée, Isabelle alias Bibi, je te dois aussi un grand merci ! Toi aussi tu as toujours été là pour m'aider, me soutenir, m'encourager, m'écouter et me faire rire. Ton aide a toujours été précieuse. On est là l'une pour l'autre, et cela n'a pas de prix !

Mon grand frère, Yannick alias Yaya, un grand merci à toi aussi ! Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenue ! Grâce à tes encouragements et ton esprit positif, j'ai tenu bon ! Par contre, il faudra que tu attendes encore un peu pour avoir une sœur avec le prix Nobel !

Enfin, merci à mon amour, Valentin. Malgré la distance qui nous sépare régulièrement, tu es à mes côtés. Tu m'as soutenue dans mon travail et surtout tu as su m'écouter. Quel bonheur d'être à tes côtés ! Je t'aime fort.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	13
PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE	17
1. LES CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES (VADS).....	19
1.1. Les carcinomes épidermoïdes des VADS.	19
1.1.1. Epidémiologie.	19
1.1.2. Aspects anatomiques et histologiques.	19
1.1.3. Facteurs de risque.	21
1.2. Traitements des cancers des VADS.	27
1.3. Les cancers des VADS associés aux papillomavirus humains (HPV).....	30
1.3.1. Aspects virologiques.	30
1.3.1.1. Classification des HPV.	30
1.3.1.2. Structure et organisation du génome d'HPV.....	32
1.3.1.3. Les protéines précoces E et les oncoprotéines virales.	34
1.3.2. Cycle viral dans les cancers du col de l'utérus.	38
1.3.2.1. Entrée du virus dans les cellules basales de l'épithélium	38
1.3.2.2. Réplication de l'ADN viral	39
1.3.2.3. Synthèse des virions	39
1.3.2.4. Intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte	40
1.3.3. Histoire naturelle de l'infection d'HPV dans la sphère ORL.....	40
1.4. Modèle de la carcinogenèse multi-étape des VADS.	43
1.4.1. Les aspects histopathologiques	43
1.4.2. Les altérations chromosomiques et génétiques	44
1.4.2.1. Les altérations chromosomiques	44
1.4.2.1. Les altérations génétiques.....	44
1.4.3. Modèle de progression de la carcinogenèse multi-étapes des VADS	46
1.5. Implications cliniques et enjeux thérapeutiques.....	48
2. L'HYPOXIE TUMORALE.....	60
2.1. Définition de l'hypoxie.	60
2.2. L'angiogenèse tumorale et l'hypoxie intratumorale.....	64
2.2.1. L'angiogenèse tumorale.....	64
2.2.2. Conséquence de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale.....	64
2.3. HIF1 : Un facteur de transcription induit par l'hypoxie.....	65
2.3.1. Caractéristiques structurales de la sous-unité HIF1 α	67

2.3.2. Les autres sous-unités α : HIF2 α et HIF3 α	67
2.3.3. La sous-unité HIF1 β	69
2.4. La régulation du facteur de transcription HIF1 α	69
2.4.1. Régulation de la stabilité protéique de HIF1 α par les prolyl hydroxylases (PHD).	69
2.4.1.1 Régulation de la protéine HIF1 α par les PHDs.	69
2.4.1.2 Les PHDs.....	70
2.4.2. La régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α	71
2.4.2.1. Le rôle du complexe CBP/p300.....	71
2.4.2.2. Le rôle des facteurs inhibant HIF1 (FIH).....	71
2.5. Implication de l'hypoxie dans les tumeurs.	71
2.5.1. HIF1 α : régulateur majeur de l'expression de gènes en hypoxie.	71
2.5.2. L'hypoxie et la protéine p53.	74
2.5.2.1. Stabilisation et fonction de la protéine p53 en hypoxie.	74
2.5.2.2. Induction de l'apoptose par p53 en hypoxie.....	74
2.5.2.3. Sélection de cellules « p53 mutante » par l'hypoxie.	75
2.5.2.4. La protéine p53 et HIF1 α en hypoxie.....	75
2.5.3. Hypoxie et métabolisme cellulaire.....	77
2.5.3.1. La glycolyse et HIF1 en hypoxie.....	77
2.5.3.2. La protéine p53 et contrôle du métabolisme cellulaire.	77
2.5.4. Hypoxie et tumeurs HPV positives.....	78
2.5.4.1. Statut hypoxique et tumeurs des VADS.....	78
2.5.4.2. HPV et la protéine p53.	78
2.5.4.3. HPV et la protéine HIF1 α	80
2.5.5. L'hypoxie et le facteur de transcription Net.	80
2.5.5.1. Le facteur de transcription Net	80
2.5.5.2. Régulation des gènes cibles par Net.....	80
2.5.5.3. Implication des facteurs de transcription Net et HIF1 α dans la régulation de la réponse à l'hypoxie.	82
3. PROJET DE THESE.	84
PARTIE II : MATERIELS & METHODES.....	85
1. ETUDE D'UNE COHORTE DE TUMEURS OROPHARYNGEES HUMAINES.	86
1.1. Sélection des tumeurs.....	86
1.2. Analyse de l'expression des ARNm.....	86
1.2.1. Extraction des ARN totaux.	86
1.2.2. Reverse transcription et PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).....	89
1.2.3. Analyse statistique des résultats.....	89
1.3. Analyse d'immunohistochimie.	89
1.3.1. Marquage d'immunohistochimie.	90
1.3.2. Analyse des marquages d'immunohistochimie.....	90
2. ETUDE SUR DEUX LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES DES VADS.	90
2.1. Culture cellulaire.....	90

2.1.1. Lignées cellulaires SQ20B et UPCI-SCC90.....	90
2.1.2 Conditions de culture en normoxie et en hypoxie.....	91
2.2. Analyse de l'expression des ARNm.....	92
2.2.1. Extraction des ARN totaux.....	92
2.2.2. Reverse transcription et PCR quantitative en temps réel (qPCR).	92
2.2.3. Analyse statistique des résultats.....	92
2.3. Analyse des protéines.....	94
2.3.1. Extraction et dosage des protéines.....	94
2.3.2. Western Blot.....	94
2.4. Transfections transitoires de plasmides.....	95
2.5. Survie cellulaire au cours de l'hypoxie.....	97
3. REALISATION DE XENOGREFFES CHEZ LA SOURIS NUDE.....	97
PARTIE III : RESULTATS	98
1. ARTICLE SOUMIS	99
1.1. Avant propos	99
1.2. Article.....	100
1.3. Conclusion	127
2. DONNEES COMPLEMENTAIRES A L'ETUDE.....	128
2.1. Un statut hypoxique moindre dans les tumeurs HPV positives comparées aux tumeurs HPV négatives.....	128
2.1.1. Mesure de l'expression de gènes cibles de HIF1 α ou lié à l'hypoxie.....	128
2.1.2. Analyse de l'angiogenèse intratumorale et de l'hypoxie intratumorale.....	130
2.2. Mesure de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose.....	132
2.2.1. Dans les lignées SQ20B et SCC90 au cours d'une cinétique d'hypoxie.....	132
2.2.2. Dans la cohorte de tumeurs HPV positives et HPV négatives.....	136
2.3. Mesure de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et dans l'autophagie au cours de l'hypoxie dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90.....	138
2.4. Etude des facteurs de transcription TCF et des membres de la famille Fos.....	140
2.4.1. Etude sur les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.....	140
2.4.1.1. Analyse des niveaux d'expression du facteur de transcription Net et c-Fos dans les tumeurs oropharyngées.....	142
2.4.1.2. Analyse des niveaux d'expression de <i>Elk1/Sap1</i> et de <i>Fra-1/Fra-2/FosB</i>	142
2.4.2. Etude sur deux lignées cellulaires des VADS : SQ20B ET SCC90.....	144
2.4.2.1. Analyse de l'expression des gènes codant les facteurs de transcription TCF et les membres de la famille Fos dans les lignées SQ20B et SCC90.....	144
2.4.2.2. Analyse de l'expression protéique des facteurs de transcription TCF.....	148
PARTIE IV : DISCUSSION.....	150
PARTIE V : PERSPECTIVES.....	161
CONCLUSION GENERALE.....	164
BIBLIOGRAPHIE	165

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers du nasopharynx et de l'oropharynx dans les pays de l'Europe de l'Ouest en 2012.....	18
Figure 2 : Coupe sagittale médiane de la tête et du cou et rapports anatomiques des cavités des voies aéro-digestives supérieures.....	20
Figure 3 : L'amygdale palatine humaine.....	20
Figure 4 : Risque relatif de cancer de l'endolarynx en fonction de la consommation de tabac et d'alcool.....	23
Figure 5 : Risque relatif de cancers de la cavité orale/pharynx pour un homme en fonction de sa consommation de tabac et d'alcool.....	23
Figure 6 : Risque relatif de cancers de la cavité orale/pharynx, des cancers oropharyngés HPV positifs et des cancers oropharyngés HPV négatifs de 1988 à 2004 à Hawaï, à Iowa et à Los Angeles.....	26
Figure 7: Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ADN L1 de 118 papillomavirus.....	29
Figure 8 : Micrographie montrant la structure de la capsid de l'HPV16.....	31
Figure 9 : Représentation schématique du génome d'HPV : exemple d'HPV16.....	31
Figure 10 : Dérégulation du cycle cellulaire par les oncoprotéines virales E6 et E7 d'HPV.....	35
Figure 11 : Cycle viral d'HPV en fonction de la différenciation de l'épithélium.....	37
Figure 12 : Profil d'expression des gènes des HPV du genre alpha dans les différentes couches épithéliales au cours du cycle viral.....	37
Figure 13 : Modèle pour la pathogenèse des cancers des VADS et modèle de progression génétique multi-étapes au cours de la carcinogenèse des VADS.....	45
Figure 14 : Présence d'une région hypoxique au sein d'une coupe de glioblastome.....	61
Figure 15 : Hypoxie et angiogenèse tumorale.....	61
Figure 16 : Mécanisme de l'angiogenèse.....	63
Figure 17 : Les vaisseaux tumoraux sont partiellement fonctionnels.....	63
Figure 18 : Les sous-unités HIF α et la sous-unité HIF1 β	66
Figure 19 : Régulation de HIF1 α en normoxie et en hypoxie.....	68
Figure 20 : Induction de gènes cibles par HIF1 α au cours de l'hypoxie.....	72
Figure 21 : Modèle de régulation de la voie métabolique du glucose par HIF1 α et p53 en hypoxie.....	76
Figure 22 : Structure du facteur de transcription Net.....	79
Figure 23: Quantifications des niveaux protéiques moyens relatifs des deux facteurs de transcription <i>Net</i> et <i>HIF1α</i> normalisée par TBP au cours d'une cinétique d'hypoxie.....	81

Figure 24 : Modèle de régulation de la réponse à l'hypoxie impliquant Net et HIF1 α pour les cellules 444 (Modèle de Serchov).....	81
Figure 25 : Modèle mettant en évidence la relation entre les niveaux relatifs de Net et de c-Fos et la tumorigenèse dans le modèle cellulaire de Stanbridge.	81
Figure 26 : Analyse des niveaux d'expression des gènes PAI-1, NDRG1 et ANKRD37 dans 34 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 54 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.....	129
Figure 27 : Analyse de l'hypoxie intratumorale (CA IX) et de la vascularisation tumorale (CD31) dans 34 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 54 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.....	129
Figure 28 : Analyse des niveaux d'expression de gènes codant des enzymes de la glycolyse au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.	131
Figure 29 : Analyse des niveaux d'expression de gènes codant des enzymes de la glycolyse au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.	133
Figure 30 : Analyse des niveaux d'expression de gènes cibles de HIF1 α codant des enzymes de la glycolyse : GLUT3, ALDOC, PGK1, ENO dans 34 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 54 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.	135
Figure 31 : Analyse des niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'apoptose au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.	137
Figure 32 : Analyse des niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'autophagie au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.....	139
Figure 33 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les protéines p21 et Mdm2 au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.	139
Figure 34 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les facteurs de transcription de la sous-famille des TCF : Net, Elk1 et Sap1 dans 31 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 43 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.....	141
Figure 35 : Analyse des niveaux d'expression des gènes appartenant à la famille Fos : c-Fos, fra-1, Fra-2, FosB dans 31 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 43 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.	143
Figure 36 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les facteurs de transcription TCF (Net, Elk1, Sap1) au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.	145
Figure 37 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les membres de la famille Fos (c-Fos, Fra-1 et Fra-2) au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.....	147
Figure 38 : Expression protéique de Net, Elk1 et Sap1 au cours d'une cinétique d'hypoxie.	147
Figure 40 : L'activité de NF κ B est régulée par les PHD1 et 2 en normoxie.....	159
Figure 41 : Relation entre hypoxie et inflammation dans le cancer.....	159

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Etudes analysant l'augmentation de l'incidence globale des cancers de l'amygdale. .	26
Tableau 2 : Les protéines virales E1 à E7 et leurs principales fonctions dans la cellule hôte.	33
Tableau 3 : Matériels et méthodes d'extraction de l'ADN viral et de détection du génotype pour quatre études sur l'histoire naturelle de l'infection d'HPV dans les VADS.	41
Tableau 4 : Les prévalences d'HPV observées dans quatre études.....	42
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients atteints d'un cancer des VADS en fonction du statut HPV.	47
Tableau 6 : Références bibliographiques traitant de la survie des patients en fonction du statut HPV.....	49
Tableau 7 : La survie est indépendante du type de traitement dont bénéficient les patients HPV positifs.	52
Tableau 8 : Récapitulatif de 68 études et la prévalence des HPV dans les cancers des VADS.....	59
Tableau 9 : Séquence des amorces oligonucléotidiques pour la PCR quantitative en temps réel..	88
Tableau 10 : Augmentation des niveaux d'expression en hypoxie tardive (12h-24h à 1% d'O ₂) de gènes liés au métabolisme du glucose dans les lignées SQ20B et SCC90.	134
Tableau 11 : Relation inverse entre facteurs TCF et les membres Fos dans les lignées CGL3 et 444 et les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.	144
Tableau 12 : Niveaux d'expression des facteurs TCF et des membres de la famille Fos sur les lignées cellulaires SQ20B et SCC90.....	146

LISTE DES ABREVIATIONS.

ADN	Acide DésoxyiboNucléique
ADNc	Acide DésoxyiboNucléique complémentaire
ALDOC	Aldolase
ANGPT1 & 2	Angiopoietin 1 et 2
ANKRD37	Ankyrin Repeat Domain 37
AP-1	Activator Protein 1
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATR	ATM- and RAD3 related
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BNIP3	Bcl2 Nineteen kilodalton Interacting Protein 3
Brd4	Bromodomain containing protein 4
CA IX	Anhydrase Carbonique 9
CBP	CREB Binding Protein
CCL28	CC-Chemokine Ligand 28
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CFS	Site de chromosomes fragiles
ChiP	Immunoprécipitation de la chromatine
CID	CtBP Inhibition Domain
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CKI	Inhibiteur de de kinase dépendantes des cyclines
CREB	cAMP Response Element Binding protein
C-TAD	C-terminal TransActivation Domain
DFS	Disease Free Survival
DO	Densité Optique
DRAM-1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1
DSS	Disease Specific Survival
E	Early
EBS	ETS Binding Site
E6AP	E6 Associated Protein
E2BS	E2 Binding Site
E2F	adenovirus E2 promoter binding factor
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
Eno	Enolase
EPO	Erythropoietin
ETS	E26 Transformation Specific sequence
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FAZA	¹⁸ F-fluoroazomycin arabonoside
FBPase 2	Fructose 2,6 bisphosphatase
FGF	Fibroblast Growth Factor

FIH	Facteur inhibant les facteurs HIF
FMISO	[¹⁸ F]-Fluoromisonidazole
Fra1 & 2	Fos Related Antigen 1 & 2
GLUT1&3	Transporteur de glucose 1 & 3
HDAC	Histone Déacétylase
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HK1 & 2	Hexokinase 1 & 2
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HRE	Hypoxia Response Element
HPV	Papillomavirus humain
HSPG	Protéoglycane à héparanes sulfates
hTERT	human Telomerase Reverse Transcription
ID	Inhibitor Domain
IgG	Immunoglobuline G
IHC	Immunohistochimie
IκB	Facteur inhibiteur de NFκB
IPAS	Inhibitor of Per-ARNT-SIM
ISH	In Situ Hybridation
JAK	Janus Kinase
L	Late
LC3-GFP	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 Green Fluorescent Protein
LCR	Long Control Region
LDHA	Lactate Déshydrogénase
LOH	Loss Of Heterozygosity
M	Présence de métastase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCT4	Transporteur monocarboxylate 4
MEC	Matrice ExtraCellulaire
Mdm2	Murine Double minute 2
mTOR	mammalian target of rapamycine
N	Envahissement ganglionnaire
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucleotide H
NCI	National Cancer Institut
NDRG1	N-myc downstream regulated 1
NFκB	Nuclear Factor-κB
NID	Net Inhibitory Domain
N-TAD	N-terminal TransActivation Domain
ODDD	Oxygen Dependent Degradation Domain
O ₂	Dioxygène
2-OG	2-oxoglutarate
OS	Overall Survival
PAI-1	Inhibiteur du plasminogène 1
PAS	Per-ARNT-SIM
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PDK1	Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1

PECAM1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PFK1	6-phosphofructo-1-kinase
PFS	Progression Free Survival
PGK1	Phosphoglycérate kinase 1
PHD	Prolyl Hydroxylase Domain
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
pRb	protéine du retinoblastoma
p300	E1A binding protein p300
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PV	Papilloma Virus
pVHL	protéine de Von Hippel Lindau
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RC3D	Radiothérapie de Conformation tridimensionnelle (3D)
RCMI	Radiothérapie Conformationnelle à Modulation d'Intensité
ROS	Reactive Oxygen Species
RPLP0	Ribosomal Protein Large P0
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SEND	Cellules endothéliales
Siah1 et 2	Seven in absentia human homolog
siRNA	small interfering RiboNucleic Acid
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Taille de la tumeur
TCF	Ternary Complex Factor
TIGAR	TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator
t-PA	activateur tissulaire du plasminogène
Treg	Lymphocyte T régulateur
UBB	Ubiquitin B
u-Pa	activateur urinaire du plasminogène
VADS	Voies aéro-digestives supérieures
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION GENERALE.

Les voies aéro-digestives supérieures (VADS) constituent le carrefour entre les voies destinées à l'alimentation et à la respiration, regroupant donc la cavité buccale, les fosses nasales, le pharynx et le larynx.

Les carcinomes épidermoïdes des VADS incluent les tumeurs épithéliales malignes de la cavité buccale, du larynx et du pharynx. Ils se situent au sixième rang des cancers les plus fréquents dans le monde. Et la France présente l'incidence et la mortalité les plus élevées de l'Europe de l'Ouest (Globocan 2012). En effet, en 2012, ces cancers étaient estimés à 14 638 nouveaux cas [1]. Ces tumeurs sont d'une grande hétérogénéité clinique et pronostique. Les deux principaux facteurs de risque responsables de la survenue des cancers des VADS sont, d'une part l'intoxication éthylo-tabagique (80% des cas) et d'autre part l'infection de l'épithélium des VADS par les papillomavirus humains (HPV) à haut risque oncogène (25% des cas). L'augmentation de l'incidence globale des cancers des VADS s'expliquerait par l'augmentation des infections à HPV dans la sphère ORL. En effet, de récentes études américaines et suédoises tendent à montrer une diminution de la fréquence des cancers oropharyngés liés au tabac et à l'alcool et une augmentation du taux de cancers oropharyngés HPV positifs au cours de ces dernières années [2-4]. Le génotype HPV16 a une forte prévalence dans les cancers des VADS HPV positifs. De plus, les patients HPV positifs définissent une sous-population clinique distincte par rapport aux patients HPV négatifs. En effet, les deux mécanismes de carcinogenèse dérégulent les mêmes voies de signalisation, mais par des biais différents.

Actuellement, la prise en charge thérapeutique est déterminée principalement à partir des critères pathologiques classiques à savoir le stade TNM de la tumeur (taille, envahissement ganglionnaire, présence de métastases), le statut histologique de la tumeur (différenciation), la localisation de la tumeur et l'état général du patient. Les modalités de traitement reposent sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, seules ou en combinaison. Malgré de récentes améliorations dans les domaines du traitement, le pronostic reste sombre. En effet, la survie à 5 ans des patients atteints d'un cancer des VADS ne dépasse pas les 50%. Les tumeurs des VADS sont connues pour être résistantes aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie. Cependant, les patients atteints d'une tumeur HPV positive semblent se distinguer par un meilleur contrôle local de la maladie et bénéficient, ainsi, d'un meilleur pronostic. En effet, ces patients présentent une survie sans récurrence, une survie spécifique et une survie globale accrues. Plusieurs hypothèses sont actuellement étudiées pour tenter d'expliquer cette meilleure survie des patients HPV positifs. Trois hypothèses majeures font l'objet de recherches : 1) les tumeurs HPV positives seraient plus radiosensibles [5], 2) les patients HPV positifs développeraient une réponse du système immunitaire anti-virale [6], 3) les tumeurs HPV positives seraient moins hypoxiques [7].

L'hypoxie est une réduction du niveau physiologique en dioxygène présent dans les tissus. Ce phénomène est observé aussi bien dans des cas physiologiques tels que le développement

embryonnaire, que dans des cas pathologiques tels qu'au cours de la progression tumorale. Lorsqu'une tumeur atteint un certain volume, la seule diffusion passive de l'oxygène et des nutriments n'est plus suffisante pour assurer la survie des cellules au cœur de la masse tumorale [8]. Ces cellules sont alors en hypoxie. Ainsi, la tumeur est régulièrement soumise à des variations d'oxygénation. Afin de pallier cette hypoxie, les cellules vont, entre autres, sécréter des facteurs pro-angiogéniques, tels que le facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGF), afin de stimuler une néoangiogenèse tumorale pour créer leur propre réseau vasculaire et adapter leur métabolisme cellulaire par un « switch glycolytique » en privilégiant la production d'énergie par la glycolyse par rapport à la phosphorylation oxydative [9].

L'adaptation des cellules cancéreuses à un environnement hypoxique repose sur une famille de facteurs de transcription, *Hypoxia Inducible Factor*, dont HIF1 α est qualifié de régulateur majeur de réponse à l'hypoxie. Un microenvironnement hypoxique induit, via HIF1 α , l'expression de nombreux gènes impliqués, entre autres, dans la migration cellulaire, l'apoptose, l'immortalisation, l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaires [10]. Le facteur HIF1 α est exprimé dans les régions tumorales hypoxiques, où il est impliqué dans la réponse à l'hypoxie et dans la progression tumorale [8]. Le facteur de transcription Net est également impliqué dans la réponse à l'hypoxie. En condition de normoxie, Net est un puissant répresseur de la transcription, tandis qu'en hypoxie, Net est converti en activateur de la transcription et co-régule l'expression de gènes sensibles à l'hypoxie avec HIF1 α .

Par conséquent, l'hypoxie intratumorale induit un phénotype tumoral plus agressif qui favorise la progression tumorale, la dissémination métastatique, ainsi que la résistance aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie. L'hypoxie intratumorale est donc un facteur de mauvais pronostic.

Nous avons souhaité entreprendre une caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale dans les tumeurs humaines oropharyngées, afin de déterminer s'il existe une différence d'hypoxie entre les tumeurs oropharyngées HPV négatives et HPV positives et afin d'analyser les acteurs moléculaires de l'hypoxie dans les carcinomes épidermoïdes des VADS. En effet, d'après certaines observations cliniques, il apparaîtrait que les tumeurs oropharyngées HPV positives se caractérisent par une hypoxie moindre et que cette hypoxie moindre serait à mettre en relation avec la meilleure survie. Cependant, au niveau moléculaire, des résultats contradictoires dans la littérature ont été rapportés. Les études menées sont peu nombreuses et sont souvent menées sur de très petites cohortes de patients. De plus, ces cohortes de patients incluent souvent des tumeurs de diverses localisations des VADS. Nous nous proposons donc d'étudier l'hypoxie intratumorale dans une cohorte de tumeurs humaines de l'oropharynx comprenant des tumeurs HPV positives et des tumeurs HPV négatives.

L'ensemble de ce travail de thèse est rapporté en cinq parties.

Une première partie est consacrée à une revue de la littérature portant sur les connaissances actuelles des cancers des VADS et de l'hypoxie intratumorale, ainsi qu'à la présentation de mon sujet de thèse. Une deuxième partie présente le matériel et méthode utilisé pour réaliser les expériences. La troisième partie s'articule en deux parties. La première partie présente un article soumis dans la revue « *International Journal of Cancer* », et la seconde partie présente les données complémentaires non publiées de l'étude. Une quatrième partie est consacrée à la discussion générale et la dernière partie de l'étude introduit les perspectives ouvertes par nos travaux.

PARTIE I : REVUE DE LA LITTERATURE.

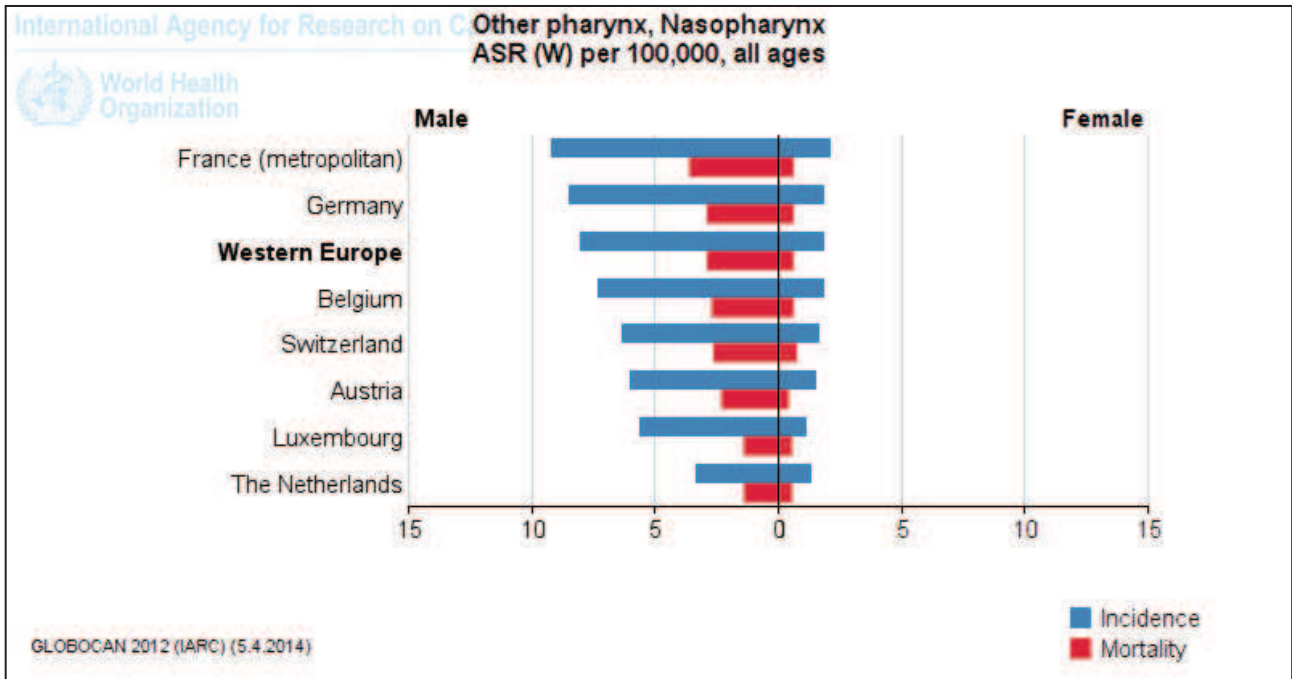


Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers du nasopharynx et de l'oropharynx dans les pays de l'Europe de l'Ouest en 2012. [Globocan 2012, IARC].

1. LES CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES (VADS).

Les cancers des VADS présentent une incidence particulièrement élevée dans les pays de l'Europe de l'Ouest, notamment en France [Globocan 2012]. Dans plus de 90% des cas, ces cancers sont des tumeurs épidermoïdes [11]. Il s'agit de tumeurs malignes d'origine épithéliale qui concernent la cavité buccale, le larynx et le pharynx. Les cancers des VADS se caractérisent par une grande hétérogénéité clinique, pronostique et anatomique.

Dans le reste du chapitre, les carcinomes de l'oropharynx seront principalement abordés.

1.1. Les carcinomes épidermoïdes des VADS.

1.1.1. Epidémiologie.

Les cancers des VADS représentaient, en 2012, 529 451 nouveaux cas dans le monde [Globocan 2012]. Les carcinomes épidermoïdes des VADS se situent ainsi au sixième rang des cancers les plus fréquents dans le Monde [12] et au huitième rang en France en 2012 [1]. La France est un des pays les plus touchés d'Europe [Figure 1] [1] avec environ 15 000 nouveaux cas de cancers des VADS en 2012. Les cancers de la cavité buccale représentent environ 30-35% des cas, les cancers du larynx 25-30% des cas, et les cancers du pharynx 30-40% des cas. Sur la période 2005-2012, l'augmentation de l'incidence ralentit. Cependant, une augmentation de l'incidence des cancers de la base de la langue et de l'amygdale palatine est observée depuis ces dernières années, du fait d'une recrudescence des carcinomes associés à l'infection par les papillomavirus humains (HPV) [12].

En France, les cancers de la cavité buccale, du larynx et du pharynx se situaient au onzième rang des causes de décès par cancer, avec plus de 3 000 décès en 2012 [1]. Les cancers de la cavité buccale et du pharynx font partie des cancers de mauvais pronostic. En effet, entre 1989 et 2004, en France, la survie nette à 5 ans ne dépassait pas les 34% [1].

1.1.2. Aspects anatomiques et histologiques.

Les voies aéro-digestives supérieures (VADS) constituent le carrefour entre les voies destinées à l'alimentation et à la respiration, regroupant ainsi la cavité buccale, les fosses nasales, le pharynx et le larynx [Figure 2].

Le pharynx se retrouve au centre de ce carrefour d'échanges où se croisent les voies aériennes et digestives et intervient dans les fonctions de respiration, de déglutition et de phonation. Sur le plan anatomique, le pharynx est un conduit musculo-membraneux subdivisé en

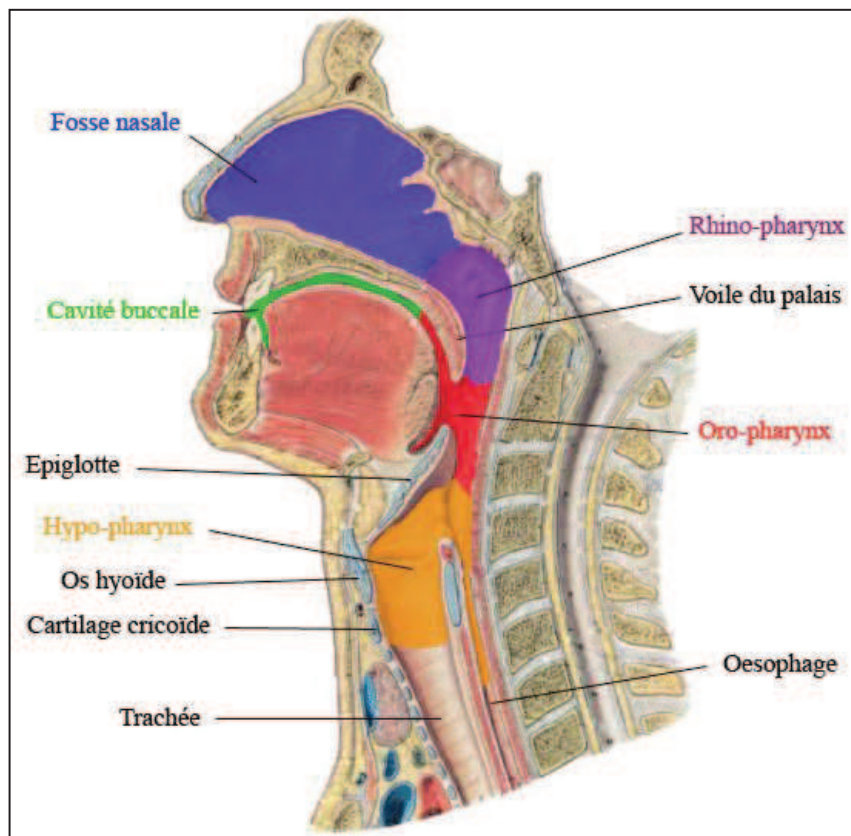


Figure 2 : Coupe sagittale médiane de la tête et du cou et rapports anatomiques des cavités des voies aéro-digestives supérieures. [Nguyen et Bourouina, 2008].

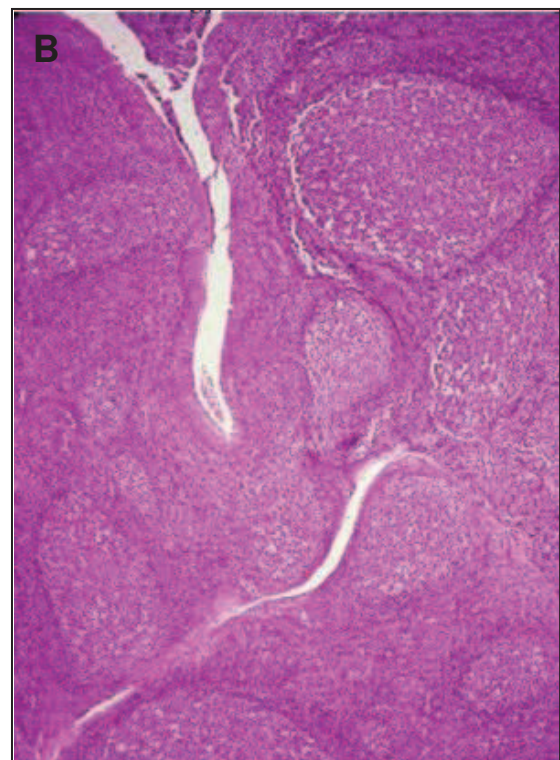


Figure 3 : L'amygdale palatine humaine.

A. Représentation de la topographie d'une amygdale palatine humaine [D'après Pai et al, 2009 [13]]. B. Coupe histologique d'une amygdale palatine (coloration hématoxyline éosine) [www.meddean.luc.edu].

trois parties : le rhinopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx [Figure 2].

Le rhinopharynx est la partie supérieure du pharynx et est situé en arrière vers les fosses nasales et le voile du palais.

L'oropharynx est le véritable carrefour des VADS et est situé en arrière de la cavité buccale. Il s'étend du voile du palais au bord supérieur de l'épiglotte. L'oropharynx comprend la base de la langue, le voile du palais, les parois latérales et postérieures du pharynx et les régions amygdaliennes. L'amygdale palatine se situe sur la paroi latérale de l'oropharynx. L'oropharynx est ainsi très riche en tissu lymphoïde (amygdales palatines et amygdales linguales) et participe à l'anneau de Waldeyer, composé également des amygdales pharyngiennes et tubaires.

L'hypopharynx fait suite à l'oropharynx qui constitue le bord limite supérieur et se poursuit par la bouche de l'œsophage qui constitue le bord limite inférieur. L'hypopharynx forme un U dans lequel vient s'encaster le larynx et comprend les sinus piriformes. Il se trouve au carrefour de séparation anatomique entre les voies aériennes et digestives.

La muqueuse de l'oropharynx est revêtue d'un épithélium pavimenteux pluristratifié, communément appelé épithélium malpighien. Cet épithélium repose sur une lame basale et sur un tissu conjonctif, appelé chorion.

Au niveau de l'oropharynx, on retrouve une structure particulière : les amygdales palatines et linguales, constituées d'un regroupement de tissu lymphoïde sous muqueux et recouvertes d'un épithélium malpighien [Figure 3]. Ces organes lymphoïdes secondaires fournissent, avec l'anneau de Waldeyer, une barrière de défense contre les pathogènes rencontrés au niveau des VADS. La surface des amygdales est augmentée par l'invagination de son épithélium formant ainsi des cryptes amygdaliennes. Cet épithélium réticulé a plusieurs fonctions : 1) créer un environnement favorable pour les cellules effectrices du système immunitaire, 2) faciliter la capture des antigènes de l'environnement, 3) produire des composants de sécrétion en continu et 4) stocker un pool d'immunoglobulines [14]. Les cryptes amygdaliennes constituent donc un compartiment très spécialisé et constituent la première ligne de défense immunitaire. Le chorion sous-jacent est riche en follicules lymphoïdes qui sont des centres réactionnels. Ces follicules sont identiques à ceux retrouvés au niveau des ganglions lymphatiques et sont caractérisés par la présence de lymphocytes B.

1.1.3. Facteurs de risque.

Il est maintenant bien établi que les deux principaux facteurs de risque de développer un cancer des VADS sont la consommation de tabac et d'alcool. En France, ce sont environ 80% des cancers des VADS qui sont attribuables au tabac et/ou à l'alcool.

Le tabac : L'hypothèse d'une association entre tabac et cancer commence à émerger dès 1920 [15]. En 1985, les experts du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) reconnaissent que la consommation de tabac est un facteur cancérigène responsable de nombreux cancers, dont ceux de la cavité orale, du pharynx et du larynx [15, 16]. Par conséquent, la consommation de tabac est associée à une augmentation du risque de ces cancers chez des sujets non buveurs [17]. Ce risque semble similaire entre les hommes et les femmes [17]. Cependant, l'étude de Macfarlane et al, en 1995, met en évidence un risque plus important pour les femmes de développer une tumeur des VADS comparé aux hommes [18].

Approximativement 24% des cas de cancers des VADS seraient dus à une consommation de tabac seul [17].

L'alcool : La consommation d'alcool a été reconnue, dès 1988, par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), comme étant un facteur de risque de cancer des VADS [1]. Certaines études tendent à démontrer cette hypothèse, notamment pour les cancers du pharynx et du larynx [19], tandis que d'autres études sont plus modérées et affirment que la consommation d'alcool est un faible facteur de risque et n'est évident que pour des doses élevées d'alcool [17]. Ceci est cohérent avec une autre étude qui montre que l'augmentation du risque de cancer ne dépend pas du type de boissons alcoolisées, mais dépend de la dose d'alcool consommée [20]. Ainsi, le risque augmente significativement avec la dose d'alcool consommée pour les cancers de la cavité orale, du pharynx et de l'œsophage [21]. D'autres études suggèrent que l'alcool ne serait associé qu'aux cancers du pharynx et du larynx [17]. L'alcool seul ne serait responsable que de 7% des cas de cancers des VADS [17].

L'association éthylo-tabagique : Le tabac et l'alcool se retrouvent presque toujours associés dans les cancers des VADS. Les effets synergiques du tabac et de l'alcool sur les risques de cancer des VADS, en particulier pour les cancers de la cavité buccale et du pharynx, ont été démontrés dans plusieurs études, dont celle de Hashibe et al en 2009 [19]. L'alcool agirait comme un solvant des composants cancérigènes contenus dans la fumée de tabac permettant ainsi sa pénétration dans les muqueuses des VADS. Ainsi, environ 74% des cancers des VADS seraient dus à une intoxication éthylo-tabagique [17, 19]. Les consommateurs de plus de 120g d'alcool par jour et de plus de 25 grammes de tabac par jour multiplient le risque de cancer de l'endolarynx par 43 comparés à un sujet de référence qui ne boit pas et ne fume pas [Figure 4] [20]. Le risque de cancers de la cavité orale et du pharynx est multiplié par 80 chez des personnes fumant plus 25 cigarettes par jour pendant au moins 40 ans et buvant plus de 60 verres d'alcool par semaine [Figure 5] [21].

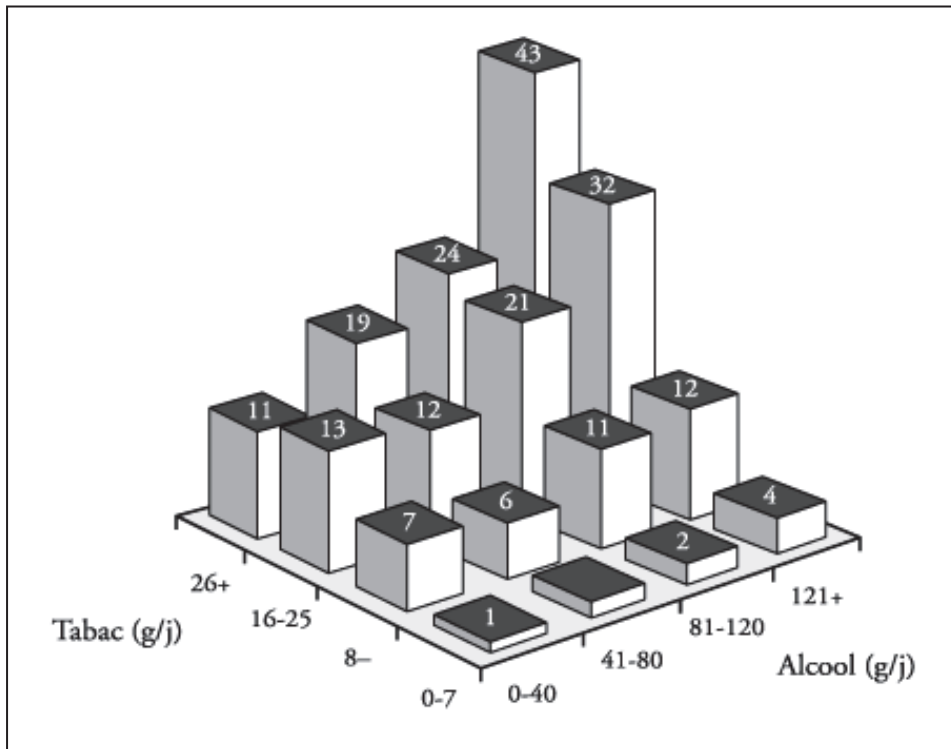


Figure 4 : Risque relatif de cancer de l'endolarynx en fonction de la consommation de tabac et d'alcool. Grille de lecture : un sujet qui boit plus de 120 g d'alcool et fume plus de 25 grammes de tabac par jour a un risque de cancer de l'endolarynx 43 fois plus élevé qu'un sujet de la catégorie de référence qui boit entre 0 et 40 g d'alcool et fume entre 0 et 8g de tabac par jour. [D'après C.Hill, 2000 [20]].

Statut fumeur	Consommation d'alcool : nombre de verre/semaine			
	< 35	35-59	60 et +	Total
Cavité orale/pharynx				
Non fumeur	1 ^c	1.6	2.3	1 ^c
Faible	3.1	5.4	10.9	3.7
Modéré	10.9	26.6	36.4	14.1
Fort	17.6	40.2	79.6	25.0
Total	1 ^c	2.3	3.4	

Figure 5 : Risque relatif de cancers de la cavité orale/pharynx pour un homme en fonction de sa consommation de tabac et d'alcool. Etude sur une population masculine de l'Italie du Nord de 1986 à 1989. [D'après Franceschi et al, 1990 [21]].

Un autre facteur de risque, les Papillomavirus humains (HPV) : l'infection de l'épithélium des VADS par les papillomavirus humains (HPV) est un autre facteur de risque associé à environ 20 à 25% des cas. Dès 1980, le rôle putatif des HPV dans les cancers de l'oropharynx a été étudié [22]. Plusieurs études épidémiologiques, de pathologies moléculaires et expérimentales ont apporté la preuve du rôle carcinogène des HPV dans les cancers oropharyngés [23-26]. Les preuves épidémiologiques reposent sur :

- des études montrant l'association entre la détection d'anticorps sériques anti HPV L1 (protéine de la capsid virale L1) et l'augmentation du risque de développer un cancer de l'oropharynx. Plusieurs études ont montré des odds ratio variant de 1,7 à 7,5 pour les cancers des VADS et de 2,3 à 182,3 pour les cancers oropharyngés [25]. En effet, la majorité des études portant sur la sérologie de L1 dans les cancers des VADS rapporte une très forte association pour les cancers oropharyngés comparés aux autres localisations [25].

- des études montrant l'association entre la détection d'anticorps sériques dirigés contre les oncoprotéines virales E6 et E7 d'HPV et l'augmentation du risque de développer un cancer de l'oropharynx [3, 25]. L'expression de ces deux oncoprotéines est nécessaire pour la carcinogenèse.

- des études sur des infections génitales à HPV et le risque de cancers des VADS. Plusieurs études ont observé une forte corrélation entre cancers des VADS et cancers du col de l'utérus. Par exemple, une étude norvégienne a montré que les femmes ayant des antécédents de cancers du col de l'utérus avaient un risque augmenté de développer un second cancer au niveau de la cavité orale et du pharynx. Cette analyse reposait sur une cohorte de 37 000 femmes diagnostiquées pour un carcinome *in situ* du col de l'utérus entre 1970 et 1992 [27].

- l'étude de la prévalence d'HPV dans des cancers des VADS. Ces études comparent la prévalence des HPV entre des tumeurs des VADS et des tissus sains contrôles des VADS. Dans ces études, la plus forte prévalence d'HPV est généralement retrouvée dans les tumeurs comparées aux tissus non tumoraux contrôles [28]. Ainsi, d'après la méta-analyse de quatorze études, publiée par Franceschi et al, en 1996, 29% des tumeurs étaient HPV positives, tandis que seul 9% des tissus sains étaient HPV positifs [28]. La méta-analyse de Miller et al, en 2001, reposant sur des études publiées entre 1982 et 1997, a rapporté que la probabilité de détecter de l'HPV augmente avec le degré de dysplasie [29]. Ainsi, 10% des tissus normaux étaient positifs pour l'HPV, contre 22% pour des tumeurs épithéliales bénignes, 26% pour des néoplasies et 46,5% pour des carcinomes des VADS [29].

- la comparaison entre des tumeurs HPV positives et des tumeurs HPV négatives. La prévalence d'ADN d'HPV dans les tumeurs des VADS varie énormément allant de 8% jusqu'à 100% [30]. Par exemple, dans l'étude de Gillison et al de 2000, la prévalence d'HPV dans les carcinomes des VADS était de 22% [24]. Globalement, la prévalence d'HPV est la plus forte pour l'oropharynx (35%), comparée à la cavité orale (23%) et au larynx (24%) [24]. Les variations importantes de la prévalence dans les différentes études s'expliquent par des différences de la

population d'étude (nombre de cas, origines ethniques), des méthodes de détection du génome viral d'HPV (PCR, hybridation *in situ*, type d'amorce, etc.), de l'échantillon et de la méthode de collection (biopsie, gargarisme, bain de bouche, etc.).

La détection seule du génome viral n'est pas suffisante pour prouver le rôle carcinogène d'HPV dans ces cancers. Ainsi, des preuves expérimentales et de pathologies moléculaires ont également confirmé que l'HPV est responsable du développement de cancers des VADS. Ces preuves reposent sur [25, 31] :

- des études montrant que les tumeurs HPV positives sont caractérisées par la présence d'ADN viral (hybridation *in situ*) et par l'expression des transcrits E6 et E7 d'HPV. De plus, la détection de l'ADN viral ou l'expression de l'ARNm E6 et E7 est corrélée à la surexpression de la protéine p16, un régulateur négatif du cycle cellulaire, par immunohistochimie (voir paragraphe 1.3.1.3). Cette relation est retrouvée de façon similaire dans les cancers du col de l'utérus.

- des études de surexpression de E6 et E7 dans des cellules de kératinocytes humains, qui conduisent à leur transformation maligne et à leur immortalisation. En fait, la surexpression de ces deux oncoprotéines induit une inactivation fonctionnelle de la protéine p53 et de la protéine pRb (protéine du rétinoblastome), un régulateur négatif du cycle cellulaire (voir paragraphe 1.3.1.3) [31].

- des études *in vitro* rapportant que les cellules épithéliales d'amygdales ou de la cavité orale pouvaient être immortalisées grâce à l'expression de E6 et E7 seules ou par celle du transcrit longueur totale codant E6 et E7 d'HPV16 [25]. Par conséquent, ces expériences montrent la nécessité de l'expression de ces transcrits dans la carcinogenèse des cellules épithéliales de l'amygdale. En effet, des études de « *knockdown* » de E6 et E7 par ARN interférent ont permis de réactiver les voies de p53 et pRb, ayant pour conséquence l'induction de la mort cellulaire par apoptose [25].

La plus grande prévalence des HPV est retrouvée dans les cancers de l'oropharynx et plus particulièrement dans les carcinomes des amygdales palatines et linguales [24, 32]. Le génome d'HPV16 est retrouvé dans près de 90% des cas de tumeurs HPV positives [23, 24]. Les génomes d'HPV18, 31, 33 et 35 sont retrouvés dans les autres cas [32]. La détection de l'ADN d'HPV au niveau de l'oropharynx augmente de 50 fois le risque de développer un cancer HPV positif [32].

Des études américaines et suédoises [2-4] démontrent une diminution des cancers oropharyngés HPV négatifs et une augmentation des cancers de l'amygdale HPV positifs ces dernières décennies [Figure 6] [Tableau 1]. La diminution des tumeurs oropharyngées HPV négatives seraient liées à une réduction de la consommation de tabac et d'alcool [3, 4, 33]. Cette tendance s'observe en Australie, au Canada, en Norvège et aux USA [25]. L'augmentation de

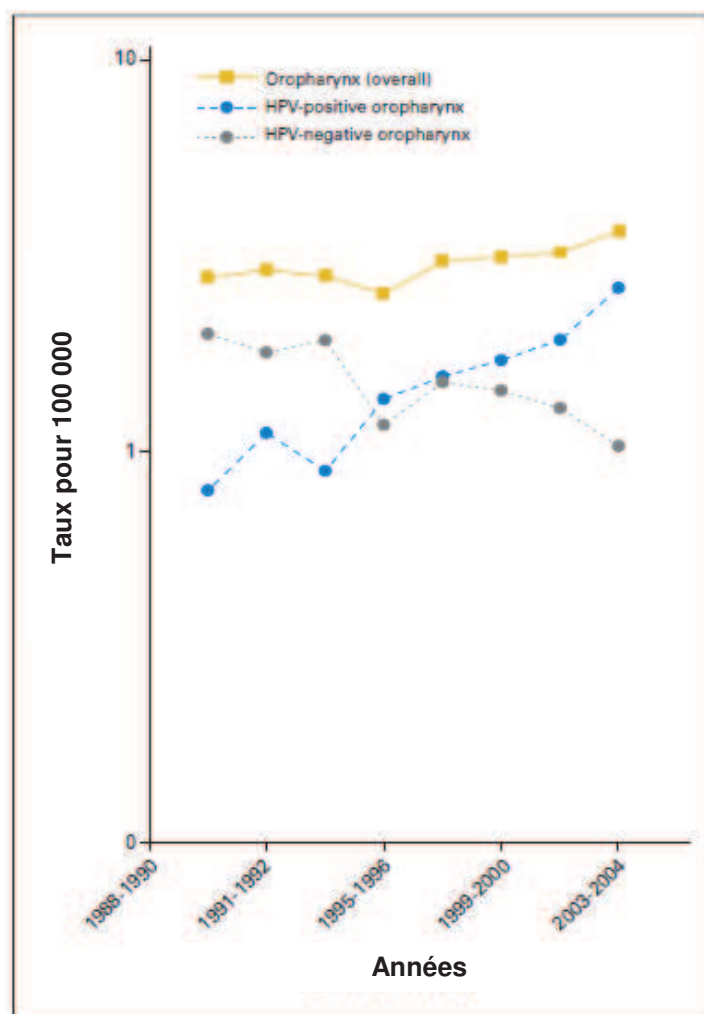


Figure 6 : Risque relatif de cancers de la cavité orale/pharynx (en jaune), des cancers oropharyngés HPV positifs (en bleu) et des cancers oropharyngés HPV négatifs (en gris) de 1988 à 2004 à Hawaï, à Iowa et à Los Angeles. L'incidence des cancers HPV positifs augmente de 1988 à 1990 et de 2003 à 2004. L'incidence des cancers HPV négatifs diminue de 1988 à 2004. [Adapté de Chaturvedi et al, 2011 [2]].

Etudes	Années	Pourcentage de tumeurs de l'amygdale HPV positives	Facteur d'augmentation des cancers de l'amygdale HPV positives
Hammarstedt (2006) (Suède) [4]	1970	23%	Entre 1970 et 2002 = 2,8 fois
	1990	57%	
	2000-2002	68%	
Ramqvist (2010) (Suède) [3]	2006-2007	93%	Entre 1970 et 2007 = 7 fois
Chaturvedi (2011) (USA) [2]	1980	16%	Entre 1980 et 2000 = 4,5 fois
	2000	72%	

Tableau 1 : Etudes analysant l'augmentation de l'incidence globale des cancers de l'amygdale.

l'incidence globale des cancers des VADS s'expliquerait par l'augmentation des infections à HPV dans la sphère ORL [2-4]. HPV est un pathogène sexuellement transmissible. L'augmentation du nombre de patients atteints d'une tumeur HPV positive serait due à une activité sexuelle plus précoce et à l'augmentation du nombre de partenaires sexuels au cours de la vie. Cela serait aussi associé à la pratique du sexe oral [24, 25, 32, 34]. En effet, il existe une association entre les comportements sexuels et le risque de cancer des VADS HPV positif [35]. Les personnes ayant eu, au cours de leur vie sexuelle, une histoire avec plus de six partenaires sexuels (odds ratio 1,3) et plus de quatre partenaires de sexe oral (odds ratio 2,3) ont plus de risque de développer un cancer oropharyngé [35].

Les données d'épidémiologie, ainsi que les données de pathologies moléculaires et expérimentales sont donc en faveur d'un rôle d'HPV dans la carcinogenèse des VADS.

1.2. Traitements des cancers des VADS.

La prise en charge thérapeutique des patients dépend de la localisation de la tumeur, du statut TNM de la tumeur (taille (T), envahissement ganglionnaire (N), présence ou non de métastases (M)), du statut de différenciation de la tumeur et de l'état général du patient. Les modalités thérapeutiques reposent sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, seules ou en combinaison. Les dernières décennies ont été marquées par de réelles améliorations dans les trois modalités thérapeutiques [12].

La chirurgie consiste, idéalement, en une exérèse complète de la tumeur associée à un curage ganglionnaire. Ainsi, celle-ci sera plus ou moins mutilante en fonction de l'organe touchée, de sa localisation et de son extension anatomique. Ce traitement a pour objectif de préserver la fonction de l'organe. Les progrès les plus spectaculaires concernent notamment 1) la chirurgie conservatrice et mini-invasive des stades précoces, qui vise à préserver l'intégrité des organes sans diminuer le contrôle de la maladie et 2) la chirurgie radicale des stades avancés qui vise à améliorer le contrôle local en réduisant les mutilations.

Les techniques chirurgicales moins invasives se sont améliorées, grâce au développement de la chirurgie trans-orale 1) au laser CO₂ et 2) robotisée. Par exemple, les tumeurs oropharyngées sont de plus en plus réséquées sans mandibulotomie.

La radiothérapie, modalité thérapeutique standard des cancers des VADS, est utilisée selon différentes techniques :

- soit exclusive : Une dose de 70 Gy sur 7 semaines est délivrée sur la tumeur. Le traitement est à but curatif.
- soit associée à d'autres traitements tels que la chirurgie ou la chimiothérapie.

- la radiothérapie peut être externe (1,8 à 2Gy par jour, 5 fois par semaine) ou mettre en œuvre la curiethérapie (tube chargé d'irridium 192 placé directement au site tumoral).

La puissance actuelle des outils informatiques a permis un développement important dans les domaines de l'imagerie médicale et de la radiothérapie. Actuellement, il est possible d'étudier en trois dimensions la distribution de dose dans une tumeur, grâce à la radiothérapie de conformation tridimensionnelle (RC3D). Une évolution récente de la radiothérapie conformationnelle est la radiothérapie conformationnelle à modulation d'intensité (RCMI). Elle est indiquée dans les cancers des VADS où elle permet, entre autre, de réduire la dose d'irradiation reçue par les glandes salivaires. Avec ces deux techniques, la précision des irradiations a beaucoup progressé.

La chimiothérapie était, généralement, utilisée à but palliatif. Son rôle a évolué et est aussi utilisé à but curatif dans les cancers des VADS localement avancés [12]. Différentes classes d'agents chimiothérapeutiques sont utilisées : les sels de platine, les anti-métabolites et les taxanes. Le cisplatine ou le carboplatine peuvent être associés aux irradiations ou à d'autres agents. Les taxanes associés à d'autres agents ont été testés en chimiothérapie d'induction dans les tumeurs localement avancées.

Les thérapies ciblées : une nouvelle voie de traitement a émergé ces dernières années avec le développement des thérapies ciblées [12]. L'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) est retrouvé surexprimé dans certains cancers des VADS. Différents anticorps dirigés contre l'EGFR sont actuellement commercialisés, dont le cetuximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF. Le cetuximab est utilisé en association avec la radiothérapie.

Prise en charge des stades précoces : ces tumeurs, qui représentent un tiers des cas, sont traitées par chirurgie ou par radiothérapie dans un but curatif. La guérison est de 90% pour les stades I et de 70% pour les stades II. L'approche diffère en fonction de la localisation de la tumeur. Pour les cancers oropharyngés de stade précoce, la radiothérapie est privilégiée. Elle permet des résultats comparables à la chirurgie [12].

Prise en charge des stades avancés : la radiochimiothérapie concomitante est le standard pour les tumeurs non opérables. Plusieurs essais cliniques de phase III ont démontré l'efficacité de ce traitement par rapport à la radiothérapie seule ou en post-opératoire seule. Chez les patients avec une tumeur opérable, le standard peut être soit une chirurgie d'exérèse suivie d'une radiochimiothérapie post-opératoire, soit une radiochimiothérapie concomitante. Les patients avec une tumeur oropharyngée sont généralement traités par radiochimiothérapie concomitante (radiothérapie externe associée à une chimiothérapie par cisplatine) avec une bonne efficacité et une conservation fonctionnelle des organes [12].

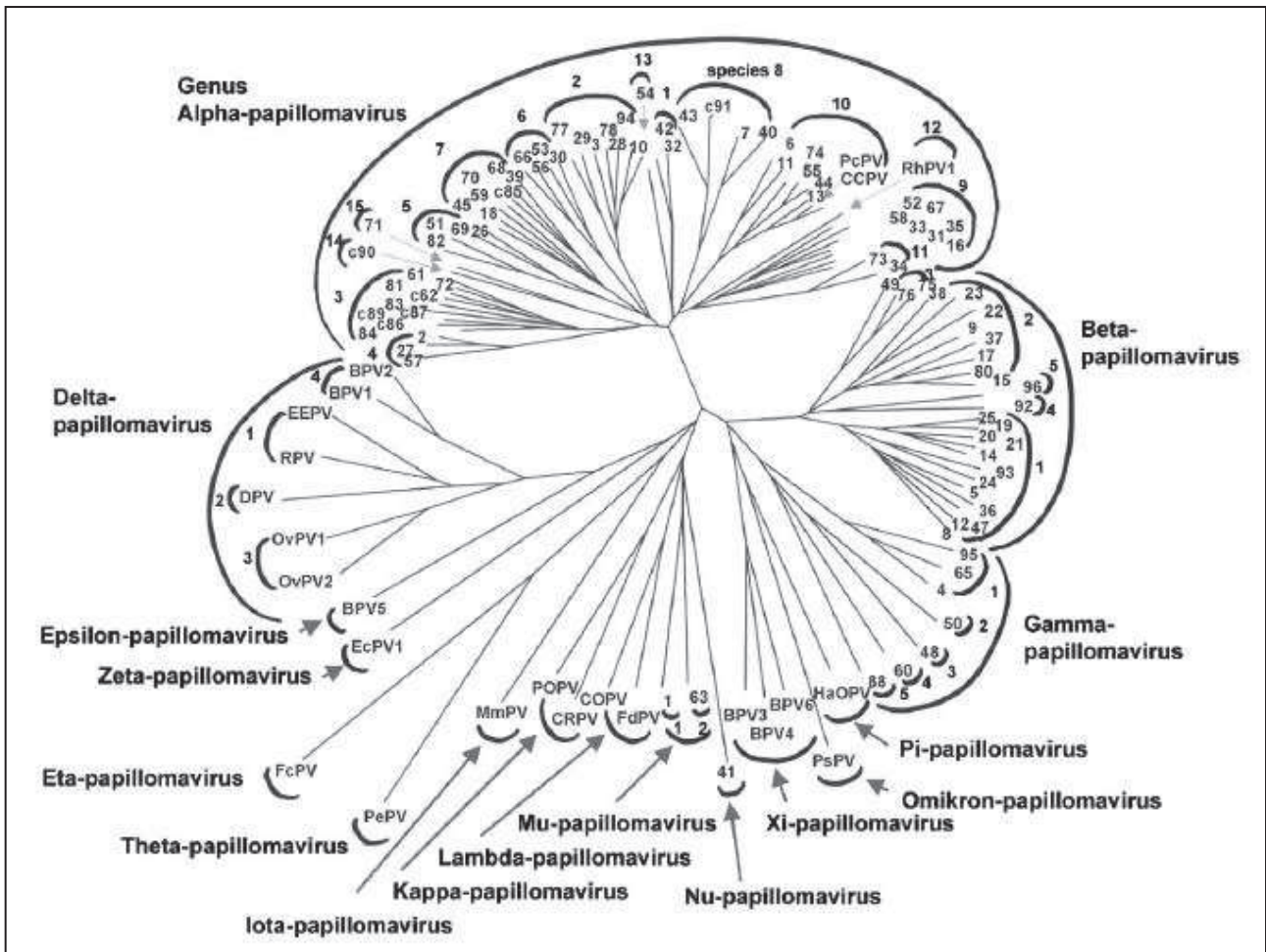


Figure 7: Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ADN L1 de 118 papillomavirus. [De Villiers et al, 2004 [36]].

L'association de la radiothérapie avec le cetuximab a été comparée à la radiothérapie seule chez ces patients [37]. Le contrôle locorégional a été amélioré passant de 34% avec la radiothérapie seule à 47% en association avec l'anticorps monoclonal. La survie sans récurrence est augmentée (42% versus 31%), ainsi que la survie globale (55% versus 45%). La radiothérapie associée au cetuximab pourrait être une alternative pour les patients ne tolérant pas la chimiothérapie.

1.3. Les cancers des VADS associés aux papillomavirus humains (HPV).

1.3.1. Aspects virologiques.

1.3.1.1. Classification des HPV.

Il existe différentes classifications des HPV, selon qu'elles soient basées sur leur séquence génomique, leur tropisme ou leur pouvoir oncogène.

Actuellement, ce sont près de 200 types différents de papillomavirus (PV) qui sont connus, dont 170 types qui sont entièrement séquencés [36, 38]. Les PV sont de petits virus très anciens qui ont évolué en parallèle de leur hôte spécifique. En effet, ces virus infectent diverses espèces de mammifères et d'oiseaux [36]. Les PV humains (HPV) sont ceux qui ont été étudiés de la manière la plus extensive.

En 2004, sur la base d'analyses phylogénétiques du gène codant la protéine de capsid L1, les papillomavirus sont regroupés au sein d'une famille distincte de virus, les *Papillomaviridae* [Figure 7] [36]. Cette famille regroupe 16 genres désignés par une lettre grecque. L'appartenance à un même genre est définie par une identité de séquence L1 supérieure à 60 %. Les genres sont subdivisés en espèces et les virus d'une même espèce partagent une identité de séquence comprise entre 60 et 70%. Les espèces sont elles-mêmes subdivisées en types (entre 71 et 89% d'identité), sous-types (entre 90 et 98% d'identité) et en variants (moins de 2% de différence) [36, 39].

La diversité génétique des PV s'accompagne également d'une diversité biologique. Ainsi, ces virus, qui sont strictement épithéliotropes, infectent les épithéliums muqueux ou cutanés [39]. Les PV humains (HPV) ont longtemps été classés selon leur tropisme tissulaire et leur pouvoir oncogène. On distingue les HPV à tropisme muqueux, qui appartiennent au genre alpha, et les HPV à tropisme cutané, qui appartiennent essentiellement aux genres bêta, gamma et mu [36]. Les HPV à tropisme muqueux peuvent également être classés en fonction de leur potentiel oncogène [36] :

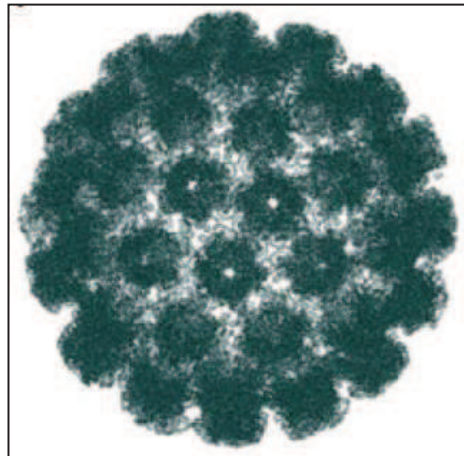


Figure 8 : Micrographie capsidie de l'HPV16. [Sapp

montrant la structure de la et al, 2009 [40]].

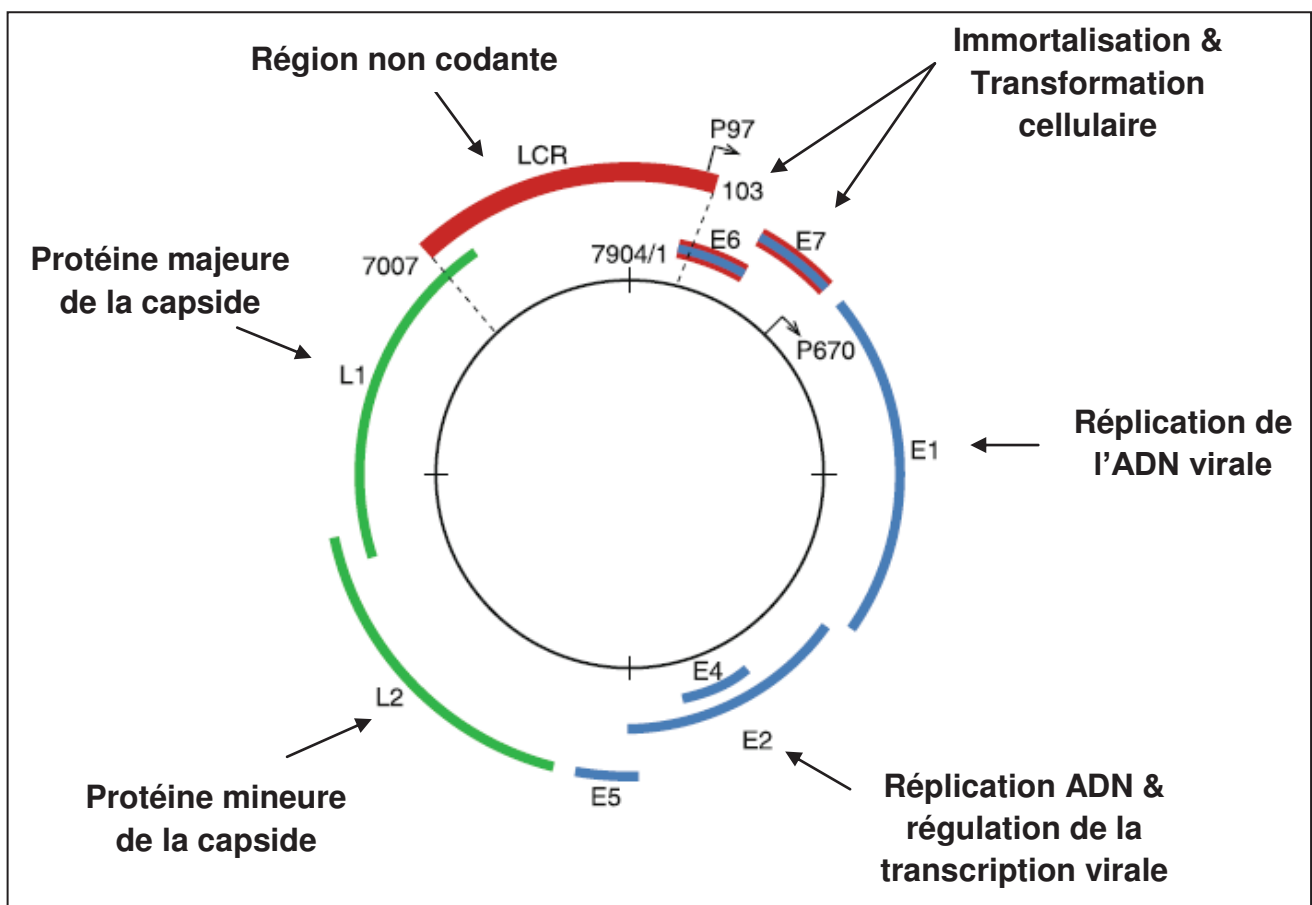


Figure 9 : Représentation schématique du génome d'HPV : exemple d'HPV16. Les gènes précoces codant pour les protéines de régulation sont en bleu. Les oncogènes E6 et E7 sont en bleu et rouge. Les gènes tardifs codant pour les protéines structurales L1 et L2 sont en vert. La région non codante LCR est en rouge. Les deux promoteurs P97 et P670 sont aussi représentés [Adapté de Rautava et Syrjanen, 2012 [41]].

- les HPV de haut risque oncogène sont notamment impliqués dans la genèse des cancers de la sphère ano-génitale (col de l'utérus, vulve, vagin, pénis, canal anal) et des VADS et sont retrouvés préférentiellement dans les lésions pré-cancéreuses et cancéreuses. Ces HPV incluent les types 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 et 70. Dans l'étude de Prétet et al (2008), basée sur l'analyse de 516 échantillons histologiques, les HPV 16 et 18 étaient retrouvés dans 82% des cancers invasifs du col de l'utérus [42]. Les autres types contribuent au quart des cancers du col de l'utérus dans le monde [39].

- les HPV de bas risque oncogène, tels que les HPV6 et 11, sont responsables de verrues ano-génitales bénignes et d'autres lésions non malignes, comme les papillomatoses laryngées.

Cependant, cette classification basée sur la diversité biologique ne reflète pas l'évolution phylogénétique des PV [36, 38].

Nous nous intéresserons principalement à l'HPV 16 qui appartient à l'espèce 9 du genre α -papillomavirus. Ce virus est un HPV muqueux de haut risque oncogène.

1.3.1.2. Structure et organisation du génome d'HPV.

Les HPV sont de petits virus (45 à 55 nm) [39] non enveloppés, dont la capsid, à symétrie icosaédrique, est constituée de 72 capsomères [Figure 8]. Cette capsid renferme un ADN circulaire double brin de 8 000 paires de base (pb), dont un seul des deux brins est codant. Cet ADN viral est constitué de huit phases ouvertes de lecture qui se chevauchent. Le génome des HPV est divisé en trois régions [Figure9] [39, 41] :

- une région non codante LCR (*Long Control Region*) de 400 à 1000 pb qui contient les promoteurs des gènes précoces. En amont de ces promoteurs, elle comporte des séquences de régulation de la réplication et de la transcription.
- une région précoce E (*Early*) qui code les protéines exprimées précocement E1 à E8 dans le cycle viral. Cette région code pour les protéines de régulation du cycle viral.
- une région tardive L (*Late*) qui code les protéines exprimées tardivement de la capsid L1 et L2 dans le cycle viral. Cette région code pour les protéines de structure.

La capsid du virion est composée de deux protéines, la protéine majeure de capsid L1, hautement conservée entre les HPV, et la protéine mineure de capsid L2. La capsid est formée de 72 pentamères composés de cinq protéines L1 en plus d'une protéine L2 [41]. Ces deux protéines sont uniquement exprimées dans les cellules bien différenciées de la partie supérieure de l'épithélium [41]. La protéine tardive L1 est nécessaire à l'auto-assemblage des particules virales. La protéine L2 est impliquée dans l'encapsidation de l'ADN viral, car c'est la seule protéine capable de lier l'ADN.

Protéines précoces	Localisation cellulaire	Fonction	Activité moléculaire
E1	Nucléaire	Réplication génome viral Maintien du génome	E1 interagit avec l'ADN polymérase. E1 a une activité hélicase.
E2	Nucléaire	Réplication génome viral Régulation de la transcription Maintien génome viral Ségrégation du génome viral	E2 recrute E1 pour initier la transcription. E2 interagit avec Brd4 pour la ségrégation de l'ADN viral dans les cellules filles. Faible expression de E2 active la transcription de E6 et E7. Forte expression de E2 inhibe la transcription de E6 et E7.
E3	-	Inconnue	Inconnue
E4	Cytoplasme	Relarguage des particules virales Déstabilisation du cytosquelette	E4 pourrait lier les kératines et amènerait à la déstabilisation du cytosquelette.
E5	Cytoplasme	Production de particules virales Transformation cellulaire	E5 interagirait avec E6 et E7 pour stimuler la prolifération cellulaire. E5 retarde la différenciation. E5 interagit avec le récepteur de l'EGF.
E6	Nucléaire	Transformation cellulaire Prolifération cellulaire Immortalisation cellulaire	E6 module l'ubiquitination et la dégradation de p53. E6 active l'expression de hTERT.
E7	Nucléaire	Transformation cellulaire Prolifération cellulaire Immortalisation cellulaire	E7 dérégule le cycle cellulaire par dissociation de pRb au facteur de transcription E2F. E7 active la prolifération cellulaire en inhibant l'activité de p21 et p27.

Tableau 2 : Les protéines virales E1 à E7 et leurs principales fonctions dans la cellule hôte.

1.3.1.3. Les protéines précoces E et les oncoprotéines virales.

Les protéines précoces E1 à E8 ont différentes fonctions, notamment dans la réplication et dans la transcription du génome viral, dans l'immortalisation et la transformation des cellules hôtes [Tableau 2].

La protéine E1 initie la réplication de l'ADN viral grâce à son activité ATPase et à sa fonction hélicase. La protéine E1 est aussi impliquée dans le maintien du génome viral sous forme épisomale.

La protéine E2 est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la réplication et dans la modulation de la transcription de l'ADN viral. La protéine E2 se lie à l'origine de réplication située dans la région LCR et recrute E1 pour initier la réplication virale. E2 est aussi capable d'interagir avec la protéine Brd4 (*Bromodomain containing protein 4*) qui s'associe avec le fuseau mitotique et facilite ainsi la ségrégation de l'ADN viral dans les cellules filles. E2 peut aussi agir comme un facteur trans-inhibiteur en se liant à des sites E2BS (*E2 Binding Site*) situés à proximité de la boîte TATA du promoteur précoce P97. Cette liaison empêche la transcription des gènes précoces E6 et E7 par encombrement stérique, en empêchant la liaison d'autres facteurs de transcription cellulaires.

La protéine E3 n'est présente que dans de très rares HPV et sa fonction n'est pas connue [39].

La protéine E4, codée par une région très variable du génome, est très divergente entre les HPV. Cette protéine est exprimée sous la forme d'une protéine de fusion E1^{E4}. Bien que cette protéine soit codée par un gène précoce, elle est exprimée tardivement au cours du cycle viral et en abondance. La protéine E4 est impliquée dans le relargage des particules virales à partir des cellules épithéliales desquamantes. Elle favoriserait également la déstabilisation du cytosquelette grâce à sa capacité à lier la cytokératine.

La protéine E5 jouerait principalement un rôle dans la production de particules virales. E5 est une protéine associée à la membrane des compartiments cytosoliques des endosomes, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Elle est essentiellement exprimée par les HPV de haut risque [39]. La protéine E5 module la voie du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) en se liant à une sous-unité de l'ATPase vacuolaire. Le blocage de l'ATPase contribue au recyclage de l'EGFR à la surface de la cellule. En effet, l'expression de E5 retarde l'internalisation et la dégradation de l'EGFR. L'EGFR n'est plus internalisé, ni dégradé ayant pour conséquence une surexpression de l'EGFR à la surface de la cellule.

L'oncoprotéine virale E6 est une des protéines majeures de la transformation maligne par plusieurs types de PV. L'activité de E6 la mieux caractérisée est sa capacité à se lier à p53 avec une grande affinité et à induire sa dégradation. La dégradation de p53 nécessite la formation d'un complexe ternaire entre l'oncoprotéine E6, la protéine p53 et l'ubiquitine ligase de type E3 E6AP (*E6 associated protein*). E6AP participe à la modification post-traductionnelle de protéines cibles

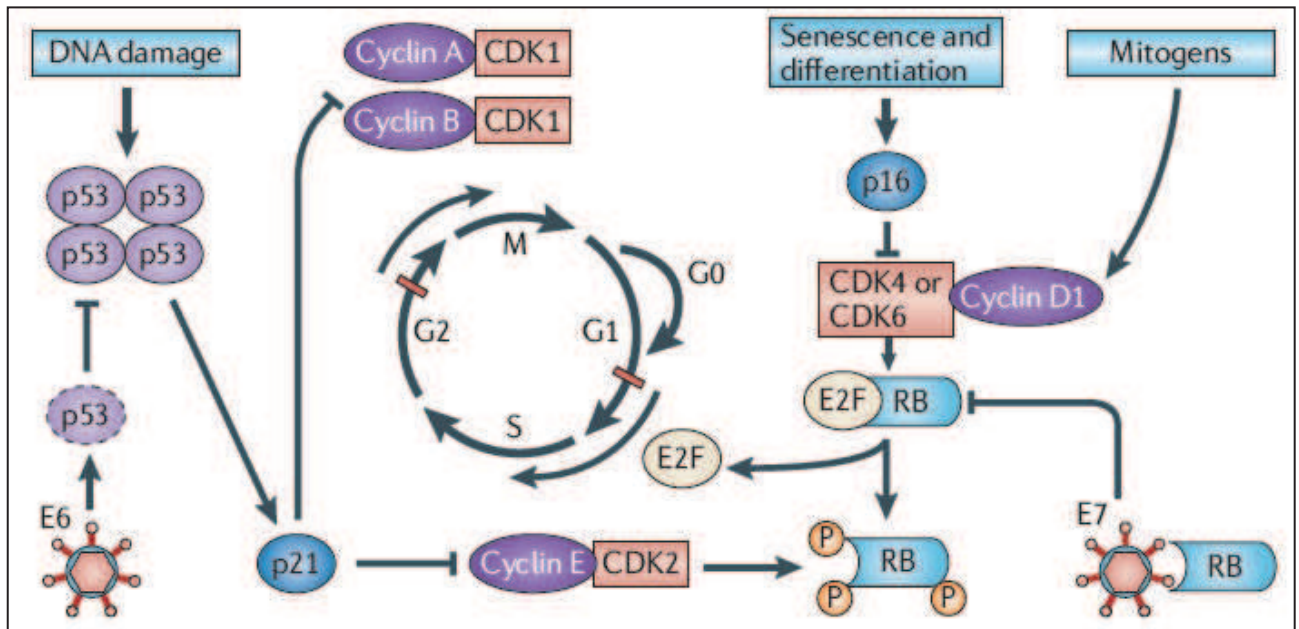


Figure 10 : Dérégulation du cycle cellulaire par les oncoprotéines virales E6 et E7 d'HPV.
 [Leemans et al, 2011 [22]].

en catalysant l'ajout d'ubiquitine sur des résidus lysines. Ainsi, la protéine p53 polyubiquitinée par E6AP est dégradée par le protéasome.

Le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur, dont la protéine p53 active la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2, tels que p21, lors du contrôle du cycle cellulaire ou à l'occasion de la formation de dommages à l'ADN. De plus, p53 est capable d'induire l'apoptose des cellules, lorsque ces dommages s'avèrent irréparables. La perte d'activité de p53 a pour conséquence d'induire une instabilité génétique et d'augmenter le risque de transformation maligne [41]. L'oncoprotéine virale E6 apparaît donc comme un important facteur d'initiation et de progression tumorales en favorisant une instabilité génétique, en empêchant l'apoptose et en évitant les contrôles de l'intégrité génomique lors du passage de la phase G1-S [Figure 10].

La protéine E6 est aussi capable d'inhiber l'apoptose, indépendamment de l'inactivation de p53, en s'associant à des protéines pro-apoptotiques, telles que Bak et Bax [43]. E6 se lie à Bak et la dégrade via E6AP. De plus, E6 inhibe aussi l'expression de l'ARNm de Bax et déstabilise la protéine.

L'oncoprotéine virale E6 est aussi connue pour être capable d'activer la transcription du gène *hTERT* (*human Telomerase Reverse Transcription*) qui code la sous-unité catalytique de la télomérase. Cette activation par E6 a pour effet de favoriser l'activité de la télomérase et donc le maintien des télomères au cours des divisions successives, ayant pour conséquence l'immortalisation des cellules [22].

La protéine virale E7 est le principal acteur de la dérégulation du cycle cellulaire [41]. Elle induit la prolifération cellulaire en induisant la dégradation de la protéine du rétinoblastome (pRb), une protéine suppresseur de tumeur, via le protéasome [Figure 10]. L'activité de pRb dépend de son état de phosphorylation. Sous forme hypophosphorylée, elle forme un complexe avec différents facteurs de transcription de la famille E2F (*adenovirus E2 promoter binding factor*). La famille des facteurs E2F induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la progression du cycle cellulaire, notamment dans l'entrée en phase S. La protéine pRb complexée à E2F joue alors le rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire en empêchant l'entrée en phase S. Sous l'influence de mitogène ou au moment de l'entrée en phase S, la protéine pRb est phosphorylée par des complexes cyclines-cdk (*cyclin-dependant kinase*), et libère le facteur E2F.

Le facteur E2F libéré induit la surexpression du gène *CDKN2A*, qui code la protéine p16, un régulateur négatif du cycle cellulaire. De plus, p16 est un inhibiteur de la phosphorylation de pRb et bloque donc la progression du cycle cellulaire. Cependant, E7 est capable d'empêcher cette inhibition de p16 en activant directement les cyclines A et E responsables de l'entrée en phase S du cycle cellulaire. E7 lève également l'inhibition exercée par les inhibiteurs de kinase dépendantes des cyclines (CKI), tels que p21 ou p27, sur le facteur E2F.

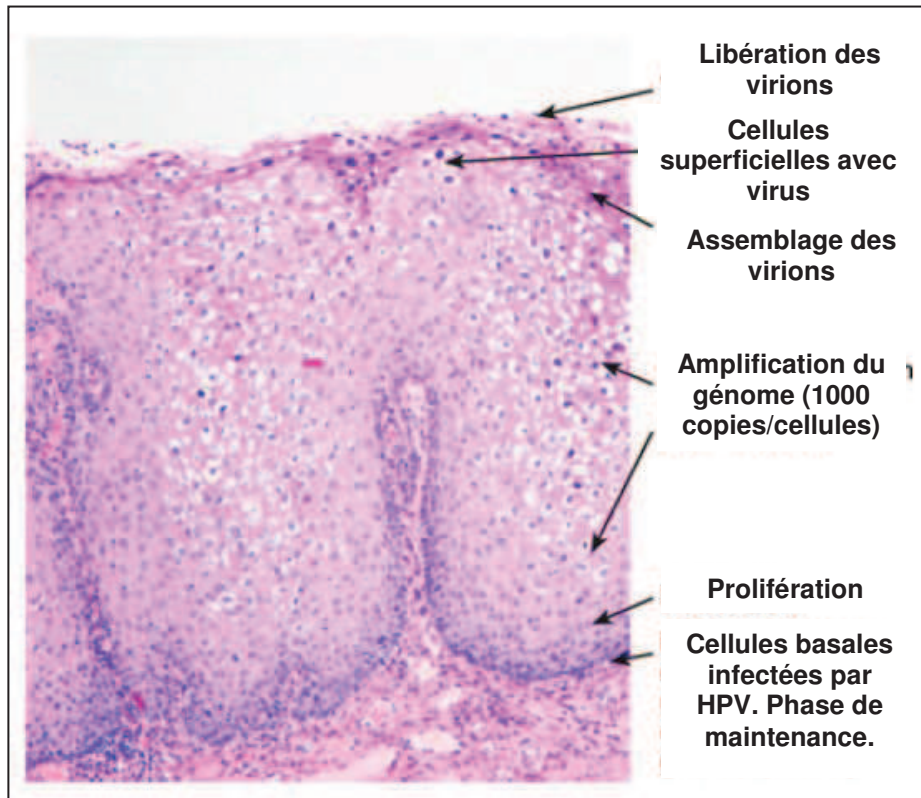


Figure 11 : Cycle viral d'HPV en fonction de la différenciation de l'épithélium. [Adapté de Rautava et Syrjanen, 2012 [41]].

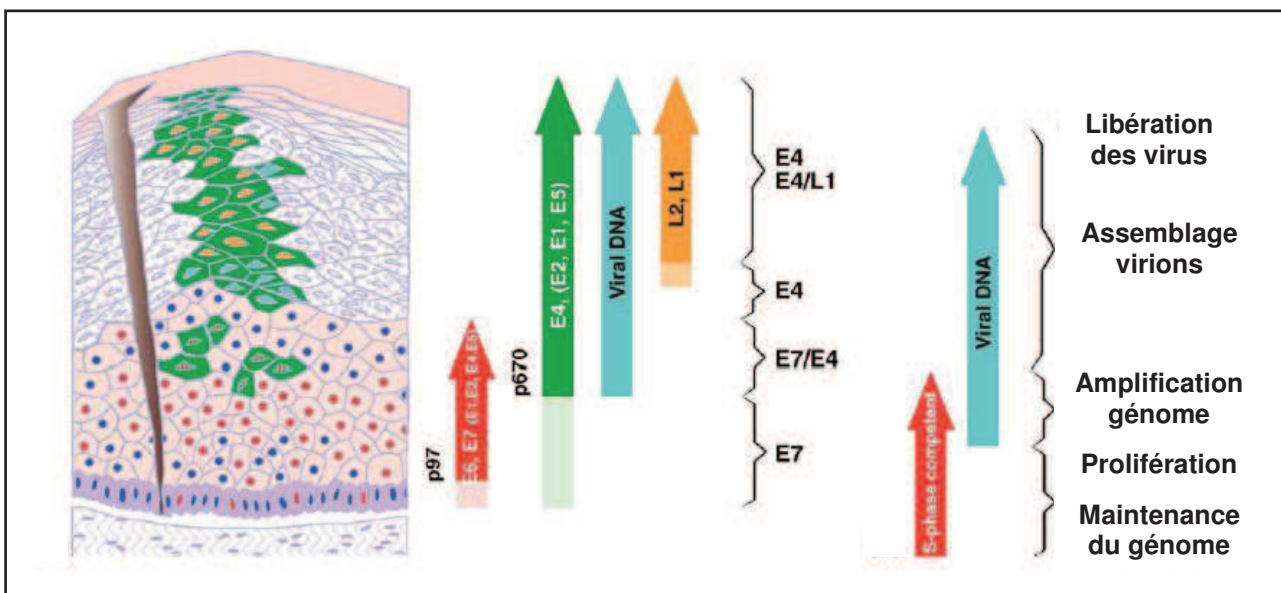


Figure 12 : Profil d'expression des gènes des HPV du genre alpha dans les différentes couches épithéliales au cours du cycle viral [Adapté de Doorbar et al, 2005 [43]].

La liaison de E7 à pRb a lieu quelque soit l'étape du cycle cellulaire et entraîne alors la libération du facteur E2F. Ceci a pour conséquence une prolifération cellulaire accrue et incontrôlée.

1.3.2. Cycle viral dans les cancers du col de l'utérus.

Le cycle viral complet d'HPV est étroitement lié à la différenciation des cellules épithéliales [43]. La phase d'établissement a lieu dans les couches basales et consiste en une multiplication limitée (5 à 100 copies par cellules) du génome viral sous forme épisomale. La phase d'amplification du génome est caractérisée par une réplication virale, le génome est amplifié et peut dépasser les 1 000 copies par cellule. Cette phase conduit à la synthèse des protéines tardives de la capsid, à l'assemblage des virions et à la libération des particules virales dans les couches supérieures de l'épithélium. Le cycle viral d'HPV dans le cancer du col de l'utérus est bien caractérisé et connu [Figure 11 et 12] [41, 43].

1.3.2.1. Entrée du virus dans les cellules basales de l'épithélium

Au niveau du col utérin, les particules virales d'HPV pénètrent dans les couches basales non différenciées de l'épithélium au travers d'une microlésion.

Actuellement, le mécanisme d'entrée du virus à l'intérieur des cellules basales n'est pas clairement élucidé. L'adsorption des virions sur les cellules se ferait par l'intermédiaire :

- de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, qui a été le premier récepteur proposé pour participer à la reconnaissance des cellules par HPV [44]. Le complexe $\alpha 6\beta 4$ est quasi-exclusivement exprimé par les cellules basales des épithéliums malpighiens stratifiés [44].
- des résidus héparane sulfate (HSPG), tels que le syndecan-1, connus pour être impliqués dans la liaison entre les HPV et les cellules hôtes. Après un traumatisme, syndecan-1 est surexprimé sur les cellules basales et parabasales. Cette molécule pourrait donc servir de récepteur primaire d'attachement *in vivo* à l'HPV16 [41].

D'autres hypothèses suggèrent que HPV pourrait être transféré d'un récepteur primaire, tel qu'une intégrine $\alpha 6\beta 4$, sur un récepteur secondaire HSPG [41].

En fonction du type d'HPV, l'entrée du virus dans la cellule se fait par endocytose médiée ou non par les clathrines ou les cavéoles [39]. Ainsi, l'internalisation d'HPV16 et 58 se fait par endocytose dépendant de la clathrine, tandis que l'internalisation d'HPV31 se fait par endocytose dépendant des cavéoles [45]. Après endocytose, les vésicules de clathrine contenant le complexe ligand-récepteur fusionnent avec des endosomes à pH acide (pH6). Le virus migre ensuite vers le noyau grâce au réseau de microtubules et de filaments d'actine du cytosquelette. Après décapsidation de l'ADN, la protéine L2 est liée à l'ADN viral et permet ainsi son adressage dans le noyau.

1.3.2.2. Réplication de l'ADN viral

La première phase de la réplication consiste en l'établissement du génome viral. La réplication de l'ADN viral a lieu au cours de la phase S dans les cellules basales et suprabasales de l'épithélium. Elle nécessite l'action des protéines précoces E1 et E2 et la machinerie cellulaire de la réplication [41]. La multiplication du génome viral sous forme épisomale est, à ce stade, relativement limitée (10 à 200 copies par cellule) [14]. De plus, E2 limite l'expression des deux oncoprotéines virales E6 et E7, par encombrement stérique au niveau du promoteur précoce P97, empêchant la fixation d'autres facteurs de transcription. Les deux oncoprotéines sont exprimées à des taux faibles, permettant malgré tout la perturbation du cycle cellulaire ayant pour conséquence de maintenir les cellules en mitose.

La deuxième phase est la phase de maintenance du génome viral par un faible nombre de copies épisomales dans les cellules basales et suprabasales. A ce stade, **le cycle viral est non productif**, c'est-à-dire que seules les protéines précoces sont exprimées et qu'il n'y a pas de production de virions [41]. Il est admis que les protéines E1 et E2 suffisent pour maintenir le génome viral sous forme épisomale [14].

La troisième phase correspond à la phase d'amplification. Le cycle viral est dans **une phase de production** de virions. Elle débute dans les cellules suprabasales de l'épithélium par une augmentation de l'expression des protéines virales impliquées dans la réplication virale (E1, E2, E4 et E5). Cette augmentation d'expression n'affecte pas directement l'expression de E6 et E7 qui sont toujours nécessaires au passage en phase S [43]. En effet, dans un épithélium non infecté, les cellules suprabasales quittent le cycle cellulaire et entament un processus de différenciation. Lors de l'infection par HPV, ces cellules expriment E7, et probablement aussi E6, ayant pour conséquence la poursuite du cycle cellulaire et un retard dans la différenciation. Ces deux oncoprotéines virales (E6 et E7) coopèrent pour induire ces deux effets [43]. L'assemblage du complexe E1-E2 sur l'origine de réplication initie la réplication virale. Cette phase permet donc d'amplifier le génome viral de 1 000 à 10 000 copies par cellule.

1.3.2.3. Synthèse des virions

Dans les couches superficielles de l'épithélium, les protéines tardives de la capsid, L1 et L2, sont exprimées, permettant ainsi l'encapsidation de l'ADN viral dans un assemblage icosaédrique [43]. Cette encapsidation a lieu dans le noyau de la cellule hôte. Les HPV ne sont pas des virus à cycle lytique. Ainsi, la libération des particules virales n'a lieu qu'une fois que les cellules ont atteint la surface de l'épithélium et abordent un processus de desquamation.

1.3.2.4. Intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte

L'intégration du génome viral ne fait pas partie du cycle normal de l'HPV [46], car elle n'autorise plus la réplication et l'amplification du virus [47]. On parle alors d'infection abortive. L'intégration est un évènement important dans la transformation maligne [47]. Bien qu'il ait été démontré que la plupart des cancers invasifs comportait des séquences d'ADN viral intégrées, il est maintenant connu que le phénomène d'intégration peut survenir dans les stades précoces de la cancérogenèse. Le mécanisme d'intégration n'est pas clairement établi, cependant certaines études suggèrent que l'intégration serait un évènement aléatoire, avec une prédilection pour les sites fragiles de chromosomes [46]. En effet, ces sites présentent une grande instabilité génomique. Cependant, tous les « intégrants » ne vont pas mener à la transformation maligne de la cellule hôte. L'interruption d'éléments de régulation, par l'intégration du génome viral, augmente le risque de progression vers un cancer [46].

L'intégration de l'ADN viral est précédée par une linéarisation du génome dans la région E1/E2, au niveau des phases ouvertes de lecture. Ceci entraînerait une perte d'expression de la protéine E2, qui ne pourrait alors plus réguler la transcription de E6 et E7, menant à une prolifération cellulaire accrue des cellules basales. Cet évènement serait donc une étape importante dans la transformation maligne, dans l'instabilité génétique, la différenciation épithéliale, etc. La surexpression de ces oncoprotéines (E6 et E7) autoriserait l'accumulation de mutations et par conséquent l'acquisition de propriétés cancéreuses des cellules. Ces données concernent le cancer du col de l'utérus. En effet, actuellement, ces données sont mal définies pour les cancers des VADS.

1.3.3. Histoire naturelle de l'infection d'HPV dans la sphère ORL.

L'histoire naturelle des infections à HPV de la sphère ORL, à l'origine des cancers VADS, n'est pas clairement connue, contrairement à celle des cancers du col de l'utérus.

Les études cherchant à comprendre l'histoire naturelle de l'infection d'HPV dans les VADS s'appuient sur des échantillons sains d'adultes ou d'enfants provenant soit de biopsies, soit d'écouvillonnages, de gargarismes ou de rinçages buccaux. Les méthodes d'extraction de l'ADN viral et de détection du génotype varient d'une étude à l'autre [Tableau 3].

Tableau 3 : Matériels et méthodes d'extraction de l'ADN viral et de détection du génotype pour quatre études sur l'histoire naturelle de l'infection d'HPV dans les VADS.

Etude	Nombre de sujets sains	Type d'échantillons	Extraction ADN viral	Détection HPV
Etude 2010, NCI [48]	4 500	Ecouvillonnages Gargarismes Rinçages buccaux VADS	Kit Puregene Kit Magna (Roche) Protéinase K Qiamp DNA (Qiagen)	MY09/11 PGMY09/11 Divers kits
Etude 2011, USA, Mexique, Brésil [49]	1 700	Gargarismes Rinçages buccaux VADS	Kit Puregene Kit Qiagen	PGMY09/11
Etude 2012, USA [32]	5 500	Gargarismes Rinçages buccaux VADS	Protéinase K Kit Qiagen	PGMY
Etude 2011, Belgique [50]	80	Biopsies d'amygdale incluses en paraffine	Protéinase K Kit Qiagen	GP5+/GP6+

En 2010, le National Cancer Institute (NCI) américain a réalisé une analyse de la littérature concernant les infections orales à HPV par la recherche d'ADN d'HPV [48] [Tableau 4]. Cette analyse s'appuie sur 18 études publiées entre 1997 et 2009 et regroupe plus de 4500 adultes sains (Amérique du Nord et du Sud, Europe de l'Ouest, Afrique). Cette étude rapporte une prévalence de 4,5% de « tout type » d'HPV, de 3,5% d'HPV de haut risque et de 1,3% d'HPV 16 [Tableau 4]. Ainsi, HPV16 représente 28% de toutes les infections à HPV (bas risque et haut risque) détectées dans les régions orales de ces individus. Ce génotype représente donc, comme au niveau du col de l'utérus, un peu plus d'un quart des HPV détectés. Paradoxalement, HPV16 est responsable de plus de 90% des cancers des VADS HPV positifs, alors qu'il n'est responsable que de 50% des cancers du col de l'utérus [48]. Cependant, en analysant individuellement les 18 études de la méta-analyse du NCI, on peut observer que la prévalence globale d'HPV et la prévalence d'HPV16 varient selon les études [Tableau 4].

Des prévalences comparables à l'étude du NCI ont été retrouvées dans une étude plus récente (2011) menée dans une population de près de **1700 adultes sains** (Etats-Unis, Mexique et Brésil) [Tableau 4] [49]. Dans cette étude, la prévalence d'HPV diffère d'un pays à l'autre avec une plus forte prévalence globale d'HPV au Mexique (5,9%) comparée au Brésil (2,1%) et aux Etats-Unis (3,6%). Cependant, la prévalence d'HPV de haut risque et la prévalence d'HPV16 sont similaires entre les trois pays étudiés.

Une autre étude (de 2009 à 2010) menée sur plus de **5500 adultes sains** d'origine américaine montre que la prévalence d'une infection à HPV est de 20% chez les personnes ayant plus de 20 partenaires sexuels au cours de leur vie ou chez des fumeurs consommant plus de 20 cigarettes par jour [32]. Il existerait une distribution bimodale de la prévalence d'HPV en fonction

de l'âge [32]. En effet, les plus fortes prévalences sont retrouvées pour les catégories d'âge 30-34 ans et 60-64 ans. Contrairement aux deux précédentes études, qui montrent une prévalence similaire entre les deux sexes, cette analyse suggère une plus forte prévalence globale d'HPV chez les hommes (10,1%) par rapport aux femmes (3,6%). La plus grande prévalence d'HPV16 est retrouvée chez les hommes (1,6%) comparée aux femmes (0,3%).

Une étude belge menée sur **80 amygdales palatines** d'adultes et d'enfants sains (2001 à 2007) a rapporté une prévalence élevée de 12,5% d'HPV à haut risque, de 10% d'HPV16 et de 15% d'HPV à bas risque, comparées aux trois autres études [Tableau 4] [50]. Cette étude montre qu'il existerait une prévalence liée à l'âge : la catégorie des 15-20 ans affiche une plus grande prévalence d'HPV haut risque. On ne retrouve pas les mêmes classes d'âge entre les deux études [32, 50].

Tableau 4 : Les prévalences d'HPV observées dans quatre études. Les échelles de variations de la prévalence sont indiquées en rouge.

Etude	Nombre de sujets sains	Prévalence globale HPV	Prévalence HPV haut risque	Prévalence HPV16
Etude 2010, NCI [48]	4500	4,5% De 0,6% à 20,7%	3,5% De 0,2% à 18,3%	1,3% De 0,2% à 14%
Etude 2011, USA, Mexique, Brésil [49]	1700	4% De 2,1% à 5,9%	1,3% De 1% à 1,6%	0,6% De 0,5% à 0,7%
Etude 2012, USA [32]	5500	6,9%	3,7%	1%
Etude 2011, Belgique [50]	80	27,5%	12,5%	10%

La prévalence plus élevée dans la cohorte belge peut s'expliquer par le type d'échantillon utilisé et les modalités de prélèvement. Ici, les échantillons sont constitués de biopsies d'amygdales palatines, tandis que dans les autres études, les prélèvements sont obtenus par écouvillonnages, gargarismes ou rinçages buccaux. Il est connu que l'HPV présente un fort tropisme pour les amygdales. De plus, les différences de prévalence observées entre ces différentes études s'expliquent aussi par la méthode d'extraction de l'ADN et de détection du génotype d'HPV utilisées, les caractéristiques cliniques des sujets (origine ethnique et géographique, âge, nombre de partenaires sexuels, consommation de tabac, etc.), le nombre de sujets inclus dans chacune de ces études. Ainsi, ces données sont globalement hétérogènes, tant au niveau des échantillons utilisés et des sites anatomiques, qu'au niveau des techniques moléculaires utilisées et de la taille des cohortes.

Il est donc nécessaire de comprendre l'histoire naturelle de l'infection à HPV afin de développer les outils qui permettront à terme le dépistage et la prévention d'un cancer des VADS. Plusieurs études affirment que la transmission des infections orales à HPV se fait par voie sexuelle [32]. Toutefois, d'autres modes de transmissions sont discutés. En effet, il existe une forte prévalence d'infection à HPV chez les enfants dans d'autres cohortes [50]. Et cette prévalence ne peut s'expliquer que par un autre mode de transmission, telle que la transmission verticale. La transmission verticale peut être divisée en trois sous-types :

- Au moment de la fécondation.
- Durant la grossesse.
- Au moment de la naissance.

1.4. Modèle de la carcinogenèse multi-étape des VADS.

L'initiation et la progression d'un cancer sont des processus complexes et multi-étapes [15], qui résultent d'une accumulation progressive d'altérations génétiques, épigénétiques, moléculaires et morphologiques des cellules. Selon Hanahan et Weinberg [51], les cellules cancéreuses partagent des propriétés communes qui les différencient des cellules normales. Ainsi, les cellules cancéreuses voient dix propriétés essentielles dérégulées par rapport aux cellules normales. Ces propriétés sont 1) une prolifération incontrôlée des cellules par une stimulation autocrine par les facteurs de croissance, 2) un échappement aux facteurs d'inhibition de croissance (inactivation de gènes suppresseurs de tumeur), 3) l'immortalisation (potentiel de divisions illimitées), 4) la résistance à l'apoptose, 5) l'induction d'une angiogenèse tumorale soutenue, 6) la capacité d'invasion tissulaire et de former des métastases, 7) la modification du métabolisme cellulaire, 8) la résistance au système immunitaire, 9) l'accumulation de mutations et d'instabilités génomiques et 10) une réponse inflammatoire. Ces différentes altérations et propriétés acquises autorisent ainsi le développement d'un cancer. Cependant, c'est l'accumulation de ces événements génétiques, et non l'ordre d'apparition, qui serait déterminante dans la progression vers un cancer [52].

Plusieurs études [23, 53, 54] ont proposé un modèle de progression génétique multi-étapes de la carcinogenèse des VADS. Ces modèles s'appuient sur les descriptions histopathologiques (les progressions phénotypiques) et les mécanismes moléculaires et génétiques de développement des cancers des VADS.

1.4.1. Les aspects histopathologiques

Les lésions pré-néoplasiques se caractérisent par un état dysplasique qui peut s'accompagner de changements au niveau de l'architecture tissulaire incluant une augmentation de la densité cellulaire, une diminution de la différenciation cellulaire, des anomalies de la polarité

cellulaire et une désorganisation de l'épithélium. Au niveau de la cellule, les changements observés incluent une activité mitotique accrue et une augmentation du rapport nucléocytoplasmique. Une dysplasie légère correspond à une atypie limitée au premier tiers de l'épithélium, une dysplasie modérée correspond au deux tiers de l'épithélium et une dysplasie sévère ou carcinome *in situ* lorsque les atypies touchent toute l'épaisseur de l'épithélium. A ce stade, les cellules épithéliales ne franchissent pas la lame basale et donc n'envahissent pas le tissu conjonctif. Le carcinome évolue, dans la plus grande majorité des cas, en carcinome invasif. Les cellules cancéreuses ont franchi la lame basale et envahissent leur environnement proche.

1.4.2. Les altérations chromosomiques et génétiques

Le modèle de progression multi-étapes des cancers des VADS repose sur la caractérisation génétique des changements phénotypiques observés au cours du développement d'un cancer des VADS [12, 22, 52]. Des événements spécifiques aux VADS, tels que perte ou amplification de régions alléliques, se produisent au cours de la progression tumorale.

1.4.2.1. Les altérations chromosomiques

Les pertes d'hétérozygotie des chromosomes 3p, 9p et 17p sont des événements précoces de la carcinogenèse des VADS, car ils sont déjà détectables dans les lésions pré-cancéreuses [52]. D'autres altérations sont typiquement retrouvées dans les carcinomes *in situ*, telles que la perte des régions 11q, 13q et 14q. Les pertes des régions chromosomiques 4q, 6p et 8 seraient associées aux métastases [52].

Plusieurs auteurs ont décrit les altérations chromosomiques communes et différentes entre les tumeurs des VADS HPV positives et HPV négatives [55, 56]}. Les tumeurs HPV négatives sont caractérisées par des pertes alléliques sur les chromosomes 3p, 5q, 9p et 17p et par une amplification ou un gain en 11q13, alors que les tumeurs HPV positives présentent plus rarement des pertes alléliques 3p, 5q, 9p et 17p et une amplification en 11q13 [55, 56]. Cette observation montre que les tumeurs HPV positives constituent une sous-population génétique distincte. D'autre part, les deux types de tumeurs présentent également des altérations chromosomiques communes, comme des gains dans les régions chromosomiques 3q, 5p, 8p, 8q, 9q, 20p et 20q ou des pertes d'hétérozygotie de 11q14 et 13q [55, 56]. Ainsi, les deux étiologies partagent aussi des événements génétiques communs [55].

1.4.2.1. Les altérations génétiques

L'inactivation du gène *TP53* se produit dans les stades précoces (dysplasie légère/modérée) de la maladie. Les tumeurs HPV négatives sont caractérisées par de fréquentes mutations du gène *TP53*, tandis que les tumeurs HPV positives sont généralement caractérisées par un gène *TP53* sauvage [55, 57]. De récentes études de séquençage ont confirmé qu'il existe

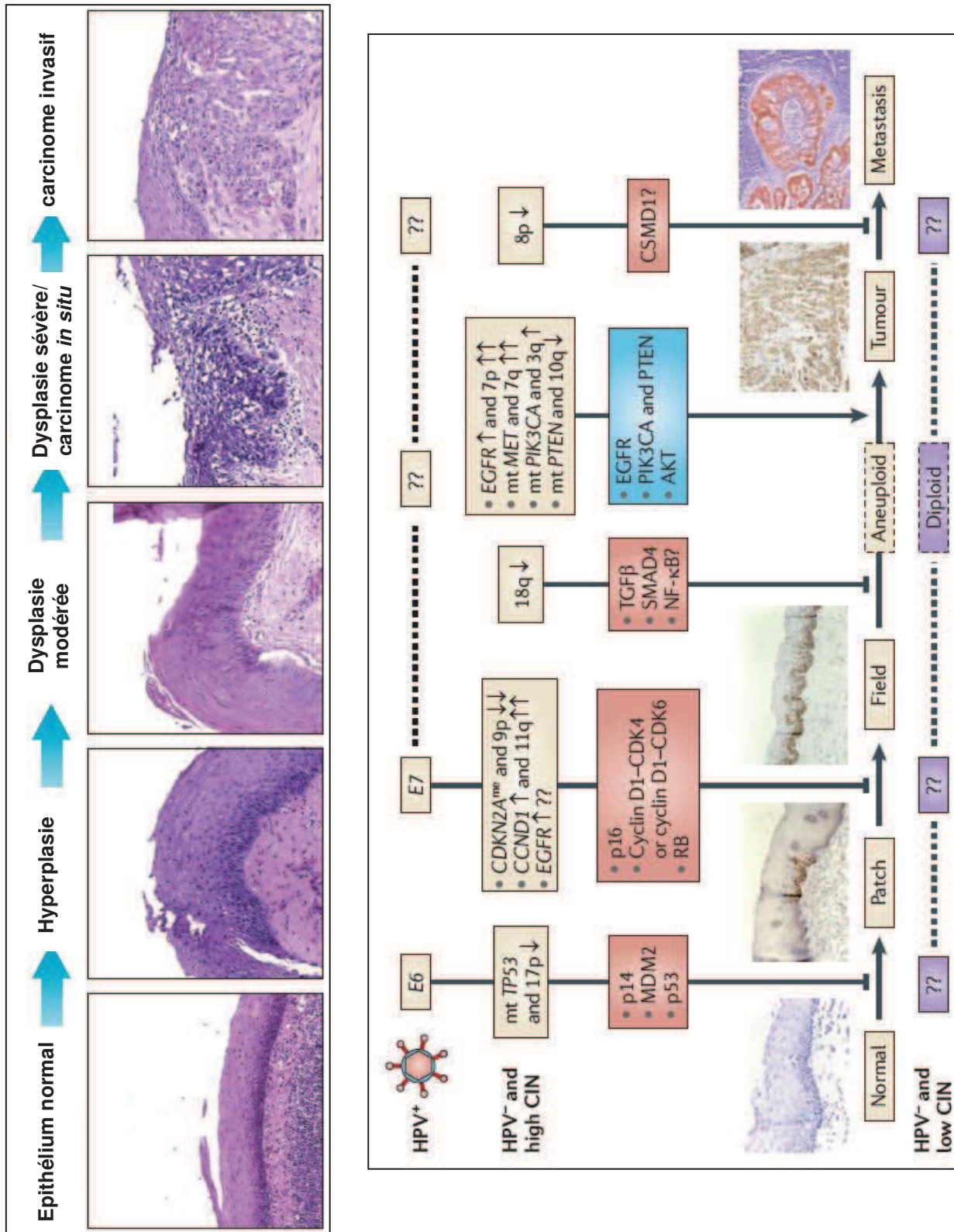


Figure 13 : Modèle pour la pathogenèse des cancers des VADS (A) : coupes histologiques marquées à l'hématoxyline éosine au grossissement x200 (adapté d'Argiris et al, 2008). B. Modèle de progression génétique multi-étapes au cours de la carcinogenèse des VADS. [D'après Leemans et al, 2011 [22]].

une corrélation inverse entre le statut HPV et les mutations de *TP53* [58, 59]. Ainsi, les tumeurs HPV positives présentent moins souvent une mutation du gène *TP53* [24, 55, 57-63]. En effet, en fonction des études, la proportion de tumeurs HPV négatives ayant un gène *TP53* muté varie entre 17% et 78%, tandis que la proportion de tumeurs HPV positives présentant une version mutée du gène *TP53* varie entre 0% et 25%. Dans le cas des tumeurs HPV positives, les mutations du gène *TP53* n'affectent pas la structure et la fonction de la protéine p53 [63], autorisant malgré tout une liaison de la protéine p53 à l'ADN. En effet, les mutations affectant le gène *TP53*, dans les tumeurs HPV positives, sont de type silencieuse [61, 63].

1.4.3. Modèle de progression de la carcinogenèse multi-étapes des VADS

Un modèle de progression de la carcinogenèse multi-étape des VADS a été décrit en fonction de l'étiologie [Figure 13].

Dans les tumeurs HPV positives, l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 permet d'altérer respectivement les voies de signalisation p53 et pRb [12, 22].

Dans les tumeurs HPV négatives, la voie p53 est altérée soit par mutation somatique du gène, soit par perte allélique en région 17p13. La voie p16 est souvent altérée dans les tumeurs HPV négatives. Le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A*, qui code la protéine p16, peut être inactivé soit par méthylation du promoteur, soit par mutation du gène [64, 65], soit par perte allélique en 9p21. Dans plus de 80% des cas de tumeurs HPV négatives, le gène *CCDN1* (région 11q13), qui code la protéine Cycline D1, est amplifié. Le complexe cycline D1/cdk4 ou 6 est responsable de la phosphorylation de pRb et donc de l'entrée en phase S du cycle cellulaire [22].

Ainsi, dans les tumeurs HPV négatives, la voie p16 est inactivée par mutation ou par perte chromosomique du gène *CDKN2A* (9p21) et par une amplification du gène *CCDN1* (11q13). Tous ces événements apparaissent dans les premiers stades de la carcinogenèse et permettent d'obtenir un potentiel réplicatif illimité.

Ainsi, les deux mécanismes de carcinogenèse concernent les mêmes voies de signalisation, mais par des biais différents.

Des études récentes ont permis de compléter ce modèle. Une amplification de la région chromosomique 7p11 corrèle avec une surexpression du gène codant le récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGFR) dans les cancers des VADS [22]. Cet événement serait plus tardif dans la progression vers le cancer. Cette altération est retrouvée dans plus de 90% des cas de cancers des VADS [12]. L'EGFR peut transloquer dans le noyau et joue alors le rôle de facteur de transcription ou de co-activateur. Un des gènes cibles de l'EGFR est *CCDN1* [11]. L'EGFR a été démontré pour être un oncogène impliqué dans les cancers du pharynx et de la cavité orale [11, 22].

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques des patients atteints d'un cancer des VADS en fonction du statut HPV.

Caractéristiques	Tumeurs HPV positives	Tumeurs HPV négatives	Références
Age	Patients plus jeunes 45-55 ans	Patients plus âgés 55-65 ans	[66]; [67]; [68]; [69]; [70];[71]; [72]; [73]; [74]; [75]
Facteurs de risque	Moins consommateurs de tabac/alcool Sexuel : nombre de partenaires sexuels, âge précoce du 1er rapport sexuel, pratique sexe oro-génital.	Tabac et/ou Alcool	[66]; [76]; [77]; [78]; [79]; [80]; [81]; [67]; [82]; [83]; [69]; [70]; [84]; [24]; [73]; [23]; [75]; [85]; [5]
Localisation tumeurs	Majoritairement oropharyngées (amygdales)	Toutes localisations des VADS	[66]; [78]; [86]; [81]; [87]; [67]; [68]; [69]; [70];[71]; [88]; [89]; [24]; [23]; [74]; [85]
Anatomo-pathologie	Carcinome épidermoïde peu différencié ou basaloïde.	Carcinome épidermoïde moyennement ou bien différencié	[66]; [76]; [79]; [80]; [67]; [83]; [92]; [24]; [85]
Taille tumeur (T)	T1/T2	T3/T4	[76]; [79]; [80]; [81]; [90]; [71]; [75]
Envahissement ganglionnaire (N)	N+	N-/N+	[76]; [80]; [81]; [87]; [82]; [68]; [69]; [74]
Expression de la protéine p16	Souvent surexpression	Souvent non surexpression	[66]; [76]; [90]; [87]; [91]; [82]; [83]; [69]; [70]
Gène TP53/ Expression p53	Généralement gène wild type/ Pas de surexpression de p53*	Souvent gène muté/ Surexpression de p53*	[62]; [82]; [83]; [24]; [5]

Les voies de signalisation activées par l'EGFR sont :

- **la voie PI3K-AKT-PTEN-mTOR** (phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) – Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) - mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)), qui est associée à de nombreux cancers et qui est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, dans la prolifération cellulaire et dans l'angiogenèse.

- **la voie RAS/MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinase) qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaires, ainsi que dans l'angiogenèse.

- **la voie JAK-STAT** qui permet d'activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires.

Il a été démontré que dans les cancers des VADS la voie de signalisation qui présente le plus fort taux de mutation est la voie **PI3K-AKT-PTEN-mTOR** (30,5% des cas de tumeurs). Alors que les voies **RAS/MAPK** et **JAK-STAT** sont mutées dans moins de 10% des cas [93]. [94]. Parmi les tumeurs présentant une mutation dans la voie PI3K, environ 22% de ces cas ont au moins une deuxième mutation dans la même voie. Alors qu'il est très rare de voir deux mutations dans la même voie **RAS/MAPK** ou **JAK-STAT** [94].

Dans les tumeurs HPV positives, la voie EGFR est modulée par l'oncoprotéine E5 d'HPV.

1.5. Implications cliniques et enjeux thérapeutiques.

Les patients ayant une tumeur HPV positive sont généralement plus jeunes (entre 45 et 55 ans) et moins consommateurs de tabac et d'alcool et définissent un sous-groupe distinct de cancers des VADS [Tableau 5]. En effet, ces tumeurs semblent présenter :

- une histologie de type basaloïde peu différenciée et sont souvent associées à un envahissement ganglionnaire concomitant.
- un stade tumoral moins avancé comparé aux carcinomes dus à l'alcool et au tabac.
- un profil moléculaire spécifique.

Dans les années 2000, plusieurs études démontrent que la plus grande prévalence des HPV est retrouvée au niveau de l'oropharynx, plus particulièrement au niveau des amygdales palatines [Tableau 5]. La prévalence des HPV dans les cancers des VADS varie grandement entre les différentes études allant de 11% à 84% et la prévalence des HPV16 varie entre 31% et 100%, selon les études [Tableau 5]. Ces discordances importantes de prévalence peuvent s'expliquer par la variabilité de la population (origine ethnique, localisation géographique, nombres de femmes et d'hommes de la population, etc.), par le nombre d'individus inclus dans l'étude et les sites anatomiques étudiés, ainsi que par les techniques de détection d'HPV.

Survie					
Références	Type de survie	Etude	Références	Type de survie	Etude
Chernock et al 2011 [90]	DFS	Rétrospective	Sugiyama et al 2007 [101]	OS	Rétrospective
Lau et al 2011 [70]	OS, DFS	Rétrospective	Weinberger et al 2006 [102]	OS, DFS	Rétrospective
Smith et al 2010 [87]	OS, DSS, DFS	Rétrospective	Licitra et al 2006 [57]	OS	Rétrospective
Ang et al 2010 [75]	OS, PFS	Rétrospective	De Petrini et al 2006 [103]	DSS	Rétrospective
Al-Swiabh et al 2010 [82]	OS	Rétrospective	Ritchie et al 2003 [67]	OS	Rétrospective
Hong et al 2010 [68]	OS, DSS	Rétrospective	Dahlgren et al 2003 [104]	DSS	Rétrospective
Maxwell et al 2010 [73]	OS, DFS	Rétrospective	Li et al 2003 [105]	DSS	Rétrospective
Zhao et al 2009 [80]	DSS	Rétrospective	Mellin et al 2002 [106]	OS, DSS	Rétrospective
Alos et al 2009 [83]	OS, PFS	Rétrospective	Ringström et al 2002 [107]	OS, DSS	Rétrospective
Shi et al 2009 [69]	OS, DFS	Rétrospective	Sisk et al 2002 [61]	OS	Rétrospective
Fei et al 2009 [95]	OS, DFS	Rétrospective	Lindel et al 2001 [5]	OS, DFS	Rétrospective
Ritta et al 2009 [96]	OS, DFS	Rétrospective	Schwartz et al 2001 [74]	OS	Rétrospective
Kong et al 2009 [97]	OS, PFS	Rétrospective	Mellin et al 2000 [71]	DFS	Rétrospective
Sedaghat et al 2009 [98]	OS, DFS	Rétrospective	Gillison et al 2000 [24]	OS, DFS	Rétrospective
Worden et al 2008 [33]	OS, DFS	Rétrospective	Haraf et al 1996 [108]	OS	Rétrospective
Charfi et al 2008 [66]	OS	Rétrospective	Koutcher et al 2010 [109]	OS, DFS	Rétrospective
Smith et al 2008 [62]	DFS, DFS	Rétrospective	Jo et al 2009 [89]	OS, PFS	Rétrospective
Hafkamp et al 2008 [76]	DSS	Rétrospective	Straetmans et al 2009 [79]	OS, DSS, DFS	Rétrospective
Smith et al 2008 [91]	DSS, DFS	Rétrospective	Badaracco et al 2007 [110]	OS, DFS	/
Fahkry et al 2008 [85]	OS, PFS	Rétrospective	Hoffman et al 2005 [111]	OS, DFS	Rétrospective
Kuo et al 2008 [84]	OS	Rétrospective	Azzimonti 2004 [112]	OS	/
Chien et al 2008 [78]	DSS	Prospective	Koskinen et al 2003 [113]	OS	Rétrospective
Klozar et al 2008 [86]	DSS	Rétrospective	Strome et al 2002 [114]	OS, DSS	Rétrospective
Furniss et al 2007 [77]	OS	Rétrospective	Pintos et al 1999 [115]	OS, DFS	Rétrospective
Na et al 2007 [99]	OS	Rétrospective	Rietdorf et al 1997 [116]	OS	Rétrospective
Ernster et al 2007 [72]	DSS	Rétrospective	Paz et al 1997 [117]	OS	Rétrospective
Lindquist et al 2007 [92]	DSS	Rétrospective	Kozomara et al 2005 [118]	OS	Rétrospective
Jung et al, 2010 [100]	OS	Rétrospective			

Tableau 6 : Références bibliographiques traitant de la survie des patients en fonction du statut HPV. Les études présentant une survie améliorée des patients ayant une tumeur HPV positive comparés aux patients ayant une tumeur HPV négative sont en **jaune**, celles n'observant pas de différence de la survie entre les deux groupes de patients sont en **rouge**. En **bleu**, l'étude montrant une meilleure survie des patients ayant une tumeur HPV négative comparés aux patients ayant une tumeur HPV positive. DFS : Disease-free survival; DSS : Disease-specific survival; OS : Overall survival; PFS : Progression-free survival

Certaines études ne détectent pas de différence dans la survie globale, la survie sans récurrence et/ou la survie sans progression entre les patients ayant une tumeur HPV positive et HPV négative [Tableau 6]. L'étude de Kozomara et al, en 2005 [118], observe, quant à elle, une meilleure survie des patients ayant une tumeur HPV négative comparés aux patients ayant une tumeur HPV positive. La majorité des tumeurs incluses dans ces analyses sont des tumeurs de la cavité orale et du larynx [109, 110, 115, 116]. D'autres études ont inclus uniquement des tumeurs de l'oropharynx ou de l'amygdale et n'observent qu'une légère tendance d'une meilleure survie des patients ayant une tumeur HPV positive comparés aux patients HPV négatifs [79, 89]. Ceci peut s'expliquer par une faible cohorte et par l'utilisation de tumeurs incluses en paraffine.

Des études rétrospectives [Tableau 6] ont démontré que les patients porteurs d'une tumeur des VADS HPV positive présentaient une survie sans récurrence, une survie sans progression et/ou une survie globale accrues comparés aux patients avec une tumeur des VADS HPV négative. Le nombre de patient inclus dans ces études varie de 22 à 323 patients. Dans la plupart de ces études, les auteurs ont inclus dans leur étude divers sites anatomiques des VADS, tels que larynx, cavité orale et pharynx. Seul un faible nombre de ces études de comparaison de survie est composé exclusivement de tumeurs oropharyngées et d'amygdales.

Ainsi, la présence d'HPV serait corrélée à une meilleure survie des patients [24, 74, 75]. Les récurrences locorégionales sont moins importantes chez les patients ayant une tumeur HPV positive par rapport aux patients HPV négative [75]. De plus, les patients HPV positifs ont un risque diminué de décéder des suites de leur cancer par rapport aux patients HPV négatifs [24]. La présence d'HPV est également un facteur pronostic indépendant pour la survie [74].

Très peu d'études sont basées sur une analyse prospective [85]. L'étude de Fakhry et al, en 2008, issue de l'analyse d'une série de 96 patients inclus dans un essai clinique, confirme que les patients ayant une tumeur HPV positive ont une survie sans progression et une survie globale améliorées par rapport aux patients ayant une tumeur HPV négative [85]. La survie globale à 2 ans des patients HPV positifs est de 95% contre 62% pour les patients HPV négatifs. La survie sans progression de la maladie à 2 ans est de 86% contre 53% pour les patients HPV négatifs.

Parmi les patients ayant une tumeur oropharyngée, il apparaît que les patients HPV positifs ont une meilleure survie sans progression et globale comparés aux patients HPV négatifs [75, 85]. Le statut HPV est un facteur pronostic indépendant associé à la survie globale et à la survie sans progression dans les tumeurs oropharyngées [85].

Les résultats des études ne détectant pas de différence de la survie entre les deux types de tumeurs étudiés peuvent s'expliquer par :

- l'inclusion de divers sites anatomiques des VADS (pharynx, larynx, cavité orale, etc.).
- de faibles cohortes (une moyenne de 74 échantillons par étude).
- l'utilisation de biopsies, plutôt que la tumeur opérée.

Certains facteurs tels que le tabac peuvent modifier le pronostic des patients HPV positifs. Ainsi, les patients HPV positifs non fumeurs auraient une meilleure survie sans récurrence, spécifique et globale, par rapport aux patients HPV positifs fumeurs. Ces derniers ont une meilleure survie comparés aux patients HPV négatifs fumeurs [66, 76, 92]. Cependant, la survie spécifique serait la même entre les patients HPV positifs fumeurs et les patients HPV négatifs fumeurs [76]. Les tumeurs oropharyngées pourraient, ainsi, être regroupées selon leur pronostic en fonction du stade tumoral, de la consommation de tabac et le statut HPV [75]. Par conséquent, les patients HPV positifs non fumeurs seraient de bon pronostic, les patients HPV positifs fumeurs et les patients HPV négatifs non fumeurs seraient de pronostic intermédiaire et les patients HPV négatifs fumeurs seraient de mauvais pronostic. Par ailleurs, les patients HPV positifs actuellement fumeurs ont plus de risque de développer une récurrence par rapport aux patients HPV positifs anciennement fumeurs [73]. Par conséquent, la consommation de tabac dans la population HPV positive augmenterait le risque de récurrence et/ou de second cancer et de décès lié au cancer.

Un autre facteur pouvant modifier le pronostic des patients ayant une tumeur des VADS est le statut *TP53* [Tableau 5]. Les tumeurs HPV positives exprimant une version sauvage du gène *TP53* auraient une meilleure survie comparées aux tumeurs HPV positives exprimant une version mutée du gène *TP53*, ainsi qu'aux tumeurs HPV négatives ayant ou non une version mutée de *TP53* [57]. Cependant, dans ces études, le type de mutation affectant le gène *TP53*, dans les tumeurs HPV positives, n'est pas connu. Paradoxalement, les patients ayant une tumeur HPV positive surexprimant la protéine p53 auraient un plus faible taux de survie que les patients ayant une tumeur HPV positive ne surexprimant pas la protéine p53 [62]. De même, dans cette étude, le statut mutationnel de p53 n'a pas été déterminé.

Dans la plupart de ces études de comparaison de survies, le statut HPV est uniquement déterminé par la détection d'ADN viral d'HPV dans l'échantillon par PCR et/ou par hybridation *in situ*. Or, la seule détection de l'ADN viral n'est pas suffisante pour affirmer que ces tumeurs sont HPV positives. Il est nécessaire de détecter, en plus de l'ADN viral, les deux transcrits E6 et E7 afin de conclure à une tumeur HPV positive. Actuellement, la détection de l'ARN viral de E6 et E7 est considérée comme le « *gold standard* » pour affirmer qu'une tumeur est HPV positive [50-51]. La seule détection de l'ADN viral peut donc expliquer, dans certaines études, l'observation de fortes prévalences d'HPV dans les tumeurs des VADS.

Certaines études s'appuient également sur l'expression de la protéine p16 par immunohistochimie pour déterminer le statut HPV des tumeurs. La stratification des tumeurs basée sur l'expression de la protéine p16 montre que les patients ayant une tumeur surexprimant p16 ont une meilleure survie comparés aux patients ayant une tumeur sans surexpression de p16. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par une stratification des tumeurs en fonction du statut HPV [70, 75, 76, 85]. Au vu de ces résultats, l'expression de p16 a été considérée comme un marqueur fiable de la présence d'HPV dans les tumeurs. Or, approximativement 15 à 30% des

Etude	Traitements	Réponse au traitement
Lau et al, 2011 [70]	radiochimiothérapie concomitante (cisplatine + irradiation 3D conventionnelle).	Réponse complète au traitement des patients HPV positifs est de 96,6% versus 76,9% pour les patients HPV négatifs (p=0,043)
Ang et al, 2010 [75]	les patients ont tous été traités par une chimiothérapie d'induction (cisplatine), puis randomisés dans deux groupes : Un groupe a bénéficié d'une radiothérapie fractionnée accélérée et un autre groupe une radiothérapie fractionnée standard.	Taux à 3 ans de rechutes loco-régionales est moindre chez les patients HPV positifs : 13,6% versus 35,1% (p<0,001)
De Jong et al, 2010 [119]	Chimioradiothérapie concomitante (cisplatine + irradiation standard).	Patients HPV négatifs ont 6 fois plus de risque de récives locales que les patients HPV positifs (Hazard Ratio = 6,2)
Jo et al, 2009 [89]	2 cycles de chimiothérapie néoadjuvante (docetaxel, cisplatine, fluoruracile, leucovorine), puis les patients avec réponse partielle reçoivent un 3 ^{ème} cycle de chimiothérapie, suivi d'une chirurgie et radiothérapie. Les patients avec progression de la maladie ou une maladie stable sont opérés et radiothérapie. Radiothérapie = fractionnée standard.	Fort pourcentage de patients HPV positifs qui ont besoin de moins de dose de radiation : 76,9% versus 50% pour les patients HPV négatifs (p = non significatif)
Fahkry et al, 2008 [85]	les patients sont traités uniformément par deux cycles de chimiothérapie d'induction (paclitaxel + carboplatine), suivie d'une radiochimiothérapie concomitante (paclitaxel + irradiation fractionnée standard).	Fort taux de réponse des patients HPV positifs : - après une chimiothérapie d'induction : 82% versus 55% pour les patients HPV négatifs (p=0,01). - après une radiochimiothérapie : 84% versus 57% pour les patients HPV négatifs (p=0,007).
Lindel et al, 2001 [5]	Radiothérapie +/- chimiothérapie concomitante	Risk ratio (RR) pour contrôle local de la maladie : 0,33 (p=0,063), pour la survie globale 0,35 (p=0,046) => analyse univariée

Tableau 7 : La survie est indépendante du type de traitement dont bénéficient les patients HPV positifs. Ces patients répondent mieux aux traitements anticancéreux.

tumeurs p16 positives sont HPV négatives [70]. La proportion de tumeurs HPV négatives p16 positives varie considérablement en fonction des études allant de 0% à 86%, selon le site anatomique des VADS [120]. La détection de l'expression de p16 ne peut donc être utilisée seule pour identifier les patients HPV positifs.

Une grande majorité de ces études est basée sur des analyses rétrospectives, entraînant une limite dans l'étude. Ensuite, toutes ces études ne contiennent pas le même nombre de patients inclus, sont constituées de divers échantillons tumoraux des VADS et utilisent diverses méthodes d'extraction et de détection d'ADN pour le génotypage d'HPV. Toutes ces divergences expliquent des résultats différents pour les survies entre les patients HPV positifs et les patients HPV négatifs. Il serait intéressant et nécessaire dans l'avenir de conduire des études prospectives sur le modèle de Fahkry et al [85].

Des études tendent à prouver également que les tumeurs HPV positives répondent mieux aux traitements de radio et chimiothérapie comparées aux tumeurs HPV négatives. Ces données suggèrent que les tumeurs HPV positives seraient plus sensibles aux traitements et que la survie améliorée des patients HPV positifs ne dépendrait pas du type de traitement [Tableau 7].

D'après ces études, les tumeurs HPV positives sont une entité distincte et de meilleur pronostic. Actuellement la décision du choix de traitement ne prend pas en compte le statut HPV des patients. Les études cliniques futures devraient envisager de stratifier les patients en fonction du statut HPV, du statut de fumeur et du stade tumoral. D'autre part, certaines études [22, 75, 85] suggèrent l'utilisation de traitements moins intensifs pour les patients HPV positifs, afin de diminuer la toxicité liée aux traitements.

ETUDE	PATIENTS	TUMEUR	SITE	PREVALENCE HPV (%)	PREVALENCE HPV16 (%)	DETECTION ADN VIRAL
Reimer et al, 2007 [121]	106	Conservé à -80°C	Amygdale BOT Autres	28	97	PCR
Na et al, 2007 [99]	108	Paraffine	Langue Amygdale	10	90	PCR
Sugiyama et al, 2007 [101]	66	Paraffine	Amygdale Autres	36	100	PCR
De Petrini et al, 2006 [103]	44	Paraffine	Cavité orale Oropharynx	46	100	PCR
Licitra et al, 2006 [57]	90	Paraffine	Amygdale Base langue Autres	19	100	PCR
Weinberger et al, 2006 [102]	77	Paraffine	Oropharynx	61	100	PCR
Ritchie et al, 2003 [67]	139	Paraffine	Cavité orale Oropharynx	21	83	PCR
Dahlgren et al, 2003 [104]	25	Conservé à -80°C	Amygdale	60	93	PCR
Li et al, 2003 [105]	67	Paraffine	Amygdale	46	90	PCR
Ringstrom et al, 2002 [107]	89	Conservé à -80°C	Cavité orale Oropharynx Hypopharynx Larynx Autres	20	100	PCR
Mellin et al, 2002 [106]	22	Conservé à -80°C	Amygdale	55	92	PCR
Lindel et al, 2001 [5]	99	Paraffine	Oropharynx	14	79	PCR
Koch et al, 1999 [122]	211	Conservé à -80°C	VADS	18	97	PCR
Azzimonti et al, 2004 [112]	34	Paraffine	Larynx Amygdale	56	41	PCR

ETUDE	PATIENTS	TUMEUR	SITE	PREVALENCE HPV (%)	PREVALENCE HPV16 (%)	DETECTION ADN VIRAL
Sisk et al, 2002 [61]	32	Conservé à -80°C	Cavité orale Oropharynx Hypopharynx Larynx	47	60	PCR
Schwartz et al, 2001 [74]	254	Paraffine	Amygdale Base langue Autres	24	65	PCR
Gillison et al, 2000 [24]	253	Conservé à -80°C	Cavité orale Oropharynx Hypopharynx Nasopharynx Larynx	25	90	PCR
Haraf et al, 1996 [108]	66	Paraffine	Cavité orale Oropharynx Hypopharynx Larynx	18	92	PCR
Hoffman et al, 2005 [111]	73	Conservé à -80°C	Cavité orale Amygdale Oropharynx Hypopharynx Larynx	38	100	PCR
Koskinen et al, 2003 [113]	61	Conservé à -80°C	Hypopharynx Amygdale Langue Cavité orale Larynx	11	84	PCR
Paz et al, 1997 [117]	167	Conservé à -80°C	Amygdale Langue Larynx Cavité orale Autres	15	76	PCR

ETUDE	PATIENTS	TUMEUR	SITE	PREVALENCE HPV (%)	PREVALENCE HPV16 (%)	DETECTION ADN VIRAL
Strome et al, 2002 [114]	52	Paraffine	Amygdale	46	88	PCR
Pintos et al, 1999 [115]	101	Paraffine	Cavité orale Pharynx Larynx	17	Non dét	PCR
Riethdorf et al, 1997 [116]	92	Conservé à -80°C	Cavité orale Pharynx Larynx Amygdale	42	62	PCR
Snijders et al, 1996	63	Conservé à -80°C	Cavité orale Hypopharynx Larynx	21	100	PCR
Kozomara et al, 2005 [118]	50	Conservé à -80°C	Amygdale Autres	64	31	PCR
Fakhry et al, 2008 [85]	96	Paraffine	Oropharynx Larynx	40	95	PCR
Worden et al, 2008 [33]	66	Paraffine	Oropharynx	41	100	PCR
Charfi et al, 2008 [66]	52	Paraffine	Oropharynx Amygdale	62	84	PCR
Pintos et al, 2008 [123]	72			19	93	PCR
Westra et al, 2008 [63]	89	Paraffine	Cavité orale Amygdale Larynx Hypopharynx Autres	13	100	PCR
Kutler et al, 2003 [124]	25	Paraffine	Cavité orale Oropharynx Larynx Hypopharynx Autres	84	91	PCR

ETUDE	PATIENTS	TUMEUR	SITE	PREVALENCE HPV (%)	PREVALENCE HPV16 (%)	DETECTION ADN VIRAL
Smith et al, 2008 [91]	301	Paraffine	Cavité orale Oropharynx Larynx Hypopharynx	27	95	PCR
Hafkamp et al, 2008 [76]	81	Paraffine	Amygdale	41	100	PCR
D'Souza et al, 2007 [23]	100	Paraffine Tumeur Salive	Oropharynx	40	88	PCR
Furniss et al, 2007 [77]	486	Paraffine	Cavité orale Pharynx Larynx	30	100	PCR
Hammarstedt et al, 2006 [4]	203	Biopsie	Amygdale	49	87	PCR
Ragin et al, 2006 [60]	125	-	Cavité orale Oropharynx	24	100	PCR
Braakhuis et al, 2004 [55]	143	Tumeur	Cavité orale Oropharynx	17	100	PCR
Klussman et al, 2001	98	Tumeur	Cavité orale Oropharynx Larynx Hypopharynx Nasopharynx	26	84	PCR
Mork et al, 2001 [125]	292	Paraffine	VADS	30	40	PCR
Badaracco et al, 2007 [110]	115	Tumeur Paraffine	Cavité oral Oropharynx Amygdale Hypopharynx Larynx Autres	18	67	PCR

ETUDE	PATIENTS	TUMEUR	SITE	PREVALENCE HPV (%)	PREVALENCE HPV16 (%)	DETECTION ADN VIRAL
Ernster et al, 2007 [72]	72	Paraffine	Amygdale Base langue	69	100	PCR
Lindquist et al, 2007 [92]	203	Biopsie inclus paraffine	Amygdale	49	87	PCR
Kuo et al, 2008 [84]	92	Paraffine	Amygdale	75	84	PCR & ISH
Klozar et al, 2008 [86]	81	Paraffine	Cavité orale Oropharynx	64	92	PCR & hybridation
Chien et al, 2008 [78]	111	Paraffine	Amygdale	13	54	PCR & ISH
Smith et al, 2008 [91]	156		Cavité orale Oropharynx	33	100	PCR
Kong et al, 2009 [97]	82	Paraffine	Cavité orale Oropharynx Larynx Hypopharynx Nasopharynx	62	98	PCR
Alos et al, 2009 [83]	60	Paraffine	Fosse nasale	20	92	PCR & ISH
Shi et al, 2009 [69]	111	Paraffine	Amygdale Langue Autres	66	100	PCR & ISH
Sedhagat et al, 2009 [98]	49	Paraffine	Oropharynx	53	100	ISH
Jo et al, 2009 [89]	24	Biopsie Paraffine	Oropharynx	58	100	PCR
Straetmans et al, 2009 [79]	81	Paraffine	Amygdale	41	100	PCR & ISH
Zhao et al, 2009 [80]	52	Paraffine	Cavité orale	40	64	PCR
Fei et al, 2009 [95]	85	Paraffine	Amygdale	49	90	PCR

ETUDE	PATIENTS	TUMEUR	SITE	PREVALENCE HPV (%)	PREVALENCE HPV16 (%)	DETECTION ADN VIRAL
Ritta et al, 2009 [96]	59	Paraffine	Cavité orale Oropharynx Larynx	46	93	PCR
Lacau St Guily et al, 2011 [126]	523	Paraffine	Oropharynx Cavité orale	32	90%	PCR
Smith et al, 2010 [87]	237	Paraffine	Cavité orale Oropharynx Larynx Hypopharynx	28	94	PCR
Ang et al, 2010 [75]	323	Paraffine	Oropharynx	64	96	ISH
Al-Swiahb et al, 2010 [82]	274	Paraffine	Oropharynx	16	78	PCR & ISH
Hong et al, 2010 [68]	266	Paraffine	Amygdale Base langue Oropharynx	37	91	PCR
Koutcher et al, 2010 [109]	61	Paraffine	VADS	56	Non dét	ISH
Attner et al, 2010	95	Paraffine	Base langue	75	86	PCR
Lau et al, 2011 [70]	55	Paraffine	VADS	58	100	PCR & ISH
Chernock et al, 2011 [90]	174	Paraffine	Oropharynx	56	Non dét	ISH
Mellin et al, 2000 [71]	60	Paraffine	Amygdale	43	100	PCR
Maxwell et al, 2010 [73]	124	Biopsie	Base langue Amygdale Oropharynx	82	95	PCR
Lacau St Guily et al, 2011[127]	185	Paraffine	Oropharynx Cavité orale	57	89	PCR

Tableau 8 : Récapitulatif de 68 études et la prévalence des HPV dans les cancers des VADS.

2. L'HYPOXIE TUMORALE.

L'oxygène est l'élément indispensable à la vie des organismes aérobies [128]. En effet, chez les organismes eucaryotes, la production d'énergie, sous forme de molécules d'ATP, est possible grâce à l'oxydation du glucose en CO_2 et en H_2O . Ce processus métabolique est appelé phosphorylation oxydative et a lieu dans la mitochondrie. L'oxydation complète du glucose dans la cellule s'accompagne de la production de cofacteurs réduits (NADH, H^+ , FADH_2) via la glycolyse et le cycle de Krebs. Ces molécules riches en énergie alimentent la chaîne respiratoire qui permet le transport d'électrons à travers des réactions d'oxydoréduction, jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Ces processus (glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative) sont responsables de la formation de la majorité des molécules d'ATP à partir du glucose utilisables par la cellule.

L'utilisation de l'oxygène comme substrat pour la production d'énergie n'est pas sans risque. Au niveau du complexe IV (appelé Cytochrome C oxydase) de la chaîne de transport des électrons, l'accepteur final des électrons est l'oxygène, la réaction finale donne de l'eau. Or, certains électrons peuvent échapper à cette chaîne et se combiner prématurément avec l'oxygène (O_2) pour former des ions superoxydes (O_2^-), communément appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS) [128]. Ces ions très réactifs sont capables d'altérer l'homéostasie cellulaire en oxydant les protéines, les lipides, l'ADN et les membranes des cellules. Une augmentation (hyperoxie) ou une diminution (hypoxie) de la pression en oxygène dans les tissus se traduit par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et conduit à la synthèse excessive de ROS [128].

En 1924, Otto Heinrich Warburg observe pour la première fois que les cellules tumorales *in vitro* produisent davantage de lactate à partir du glucose que les cellules normales, même en présence de quantités suffisantes d'oxygène pour permettre la phosphorylation oxydative [129]. En 1956, il est le premier à avoir démontré que les cellules tumorales produisent principalement leur énergie (ATP) à partir de la glycolyse, même en présence d'oxygène. Warburg attribue cette altération métabolique à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et considère que ceci serait la signature des cellules cancéreuses [130]. Cependant, il existe certaines cellules tumorales qui n'ont pas de taux important de glycolyse [130].

2.1. Définition de l'hypoxie.

En condition physiologique, les organes et les tissus se caractérisent par une pression partielle en oxygène qui leur est spécifique. L'hypoxie est une réduction du niveau physiologique en dioxygène présent dans les tissus [Figure 14] [8]. Ainsi, la pression partielle en oxygène sera toujours plus faible dans les tissus en hypoxie comparés aux valeurs physiologiques des tissus normaux [131]. En effet, la pression partielle en oxygène des tissus sains varie entre 40 et 100

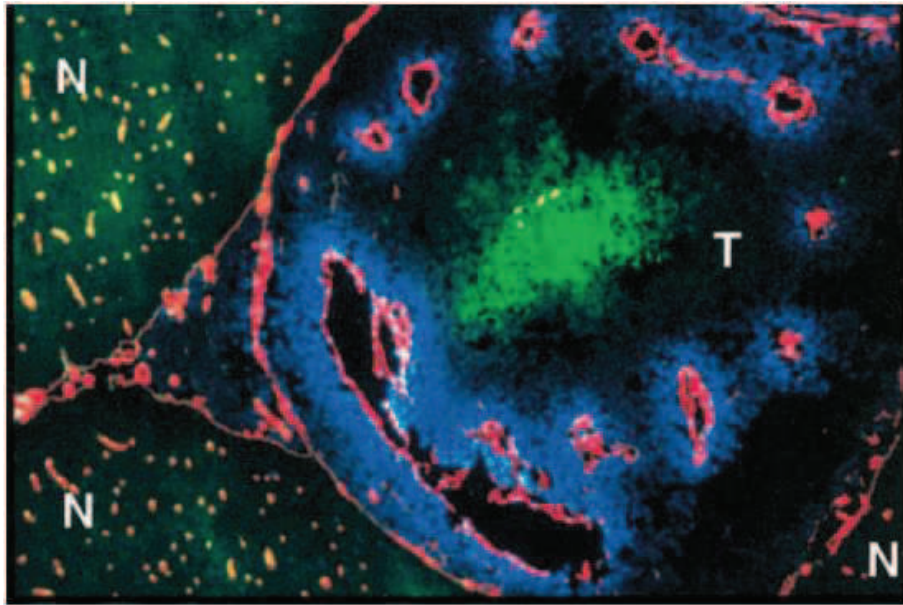


Figure 14 : Présence d'une région hypoxique au sein d'une coupe de glioblastome. La région hypoxique est marquée grâce au pimonidazole (marqueur de l'hypoxie) (en vert). Les vaisseaux sanguins sont marqués au ME 9F1 (en rouge) et les régions perfusées sont marquées au Hoechst (en bleu). La région hypoxique est éloignée des vaisseaux sanguins, et par conséquent, de la zone de diffusion passive de l'oxygène et des nutriments. [D'après Bernsen et al, 2000 [132]].

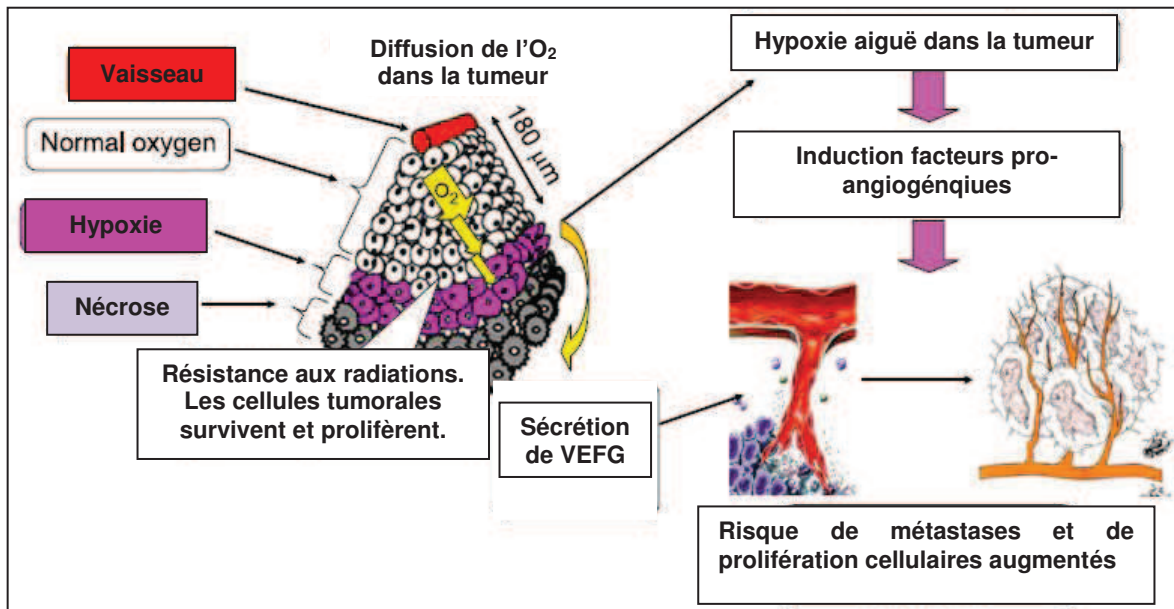


Figure 15 : Hypoxie et angiogénèse tumorale. Les cellules tumorales distantes de plus de 180μm des vaisseaux sanguins entrent en hypoxie puis en nécrose. En effet, un gradient d'oxygène se développe allant de la source d'oxygène à la périphérie de la tumeur. Les cellules hypoxiques sécrètent des facteurs angiogéniques. Ainsi, la tumeur développe son propre système vasculaire, indépendant des tissus originaux. [Adapté de Chen et al, 2009 [8]].

mmHg (millimètre de mercure), tandis que cette pression partielle est généralement inférieure à 10 mmHg dans les régions hypoxiques [133].

Le phénomène de l'hypoxie est retrouvé aussi bien dans des processus physiologiques (développement embryonnaire, cicatrisation, etc.) que dans des processus pathologiques (ischémie cérébrale, développement d'un cancer, etc.) [9].

Ainsi, l'hypoxie est un phénomène indispensable au développement embryonnaire des mammifères [134]. Les concentrations en oxygène dans l'environnement utérin varient entre 1% et 5%. L'hypoxie joue aussi un rôle important dans la chondrogenèse (formation du cartilage), l'adipogenèse, le développement des lymphocytes B, l'ostéogenèse, l'hématopoïèse, la différenciation des lymphocytes T et dans l'immunité innée [134].

L'hypoxie intratumorale est souvent retrouvée au sein des tumeurs solides, telles que les cancers du sein, du col de l'utérus, des VADS, du côlon et des glioblastomes [9, 105, 132]. L'hypoxie tumorale est variable dans le temps et dans les territoires tumoraux [8, 135] :

- **l'hypoxie chronique** correspond à la limite de la diffusion passive de l'oxygène selon un gradient transversal. Cette hypoxie peut être décrite comme une inadéquation entre le réseau vasculaire et la masse tumorale, menant à une inadéquation entre les besoins cellulaires et l'apport possible. Ce type d'hypoxie se caractérise par des temps longs de privation en oxygène.

- **l'hypoxie aiguë ou intermittente** correspond à la limite de perfusion. Cette hypoxie se caractérise par des cycles successifs d'hypoxie suivis par des cycles de ré-oxygénation. Ces cycles sont la conséquence d'arrêts transitoires du flux sanguin dus à l'architecture vasculaire tumorale aberrante et inefficace. Toutes les cellules autour de ces vaisseaux sont privées d'oxygène et de nutriments. L'hypoxie aiguë est fréquente dans les tumeurs.

En conclusion, un microenvironnement hypoxique apparaît lorsque les quantités en oxygène délivrées aux tissus deviennent insuffisantes par rapport aux besoins cellulaires ou lorsque la néoangiogenèse tumorale donne naissance à des vaisseaux anormaux, aberrants et trop petits ou à des occlusions vasculaires [105].

Dans la phase initiatrice de la croissance tumorale, très peu de vaisseaux sanguins sont observés. En effet, la diffusion passive des nutriments et de l'oxygène suffisent aux cellules tumorales pour croître et proliférer. Cependant, dès qu'une tumeur atteint un diamètre de plus de 180 μm (distance maximale de diffusion passive), cette seule diffusion passive n'est plus suffisante pour subvenir aux besoins énergétiques des cellules tumorales profondes [Figure 15] [8]. En effet, les besoins énergétiques des cellules tumorales sont 100 à 400 fois supérieurs aux besoins des cellules normales, ayant pour conséquence la nécessité d'un apport accru en oxygène et en nutriments [138]. Or les cellules tumorales éloignées de ces vaisseaux sanguins en sont privées et sont alors dans un environnement hypoxique [138]. Les cellules n'arrivant pas à s'adapter à ce milieu hypoxique vont rapidement mourir par nécrose ou par apoptose [138]. Paradoxalement, ce

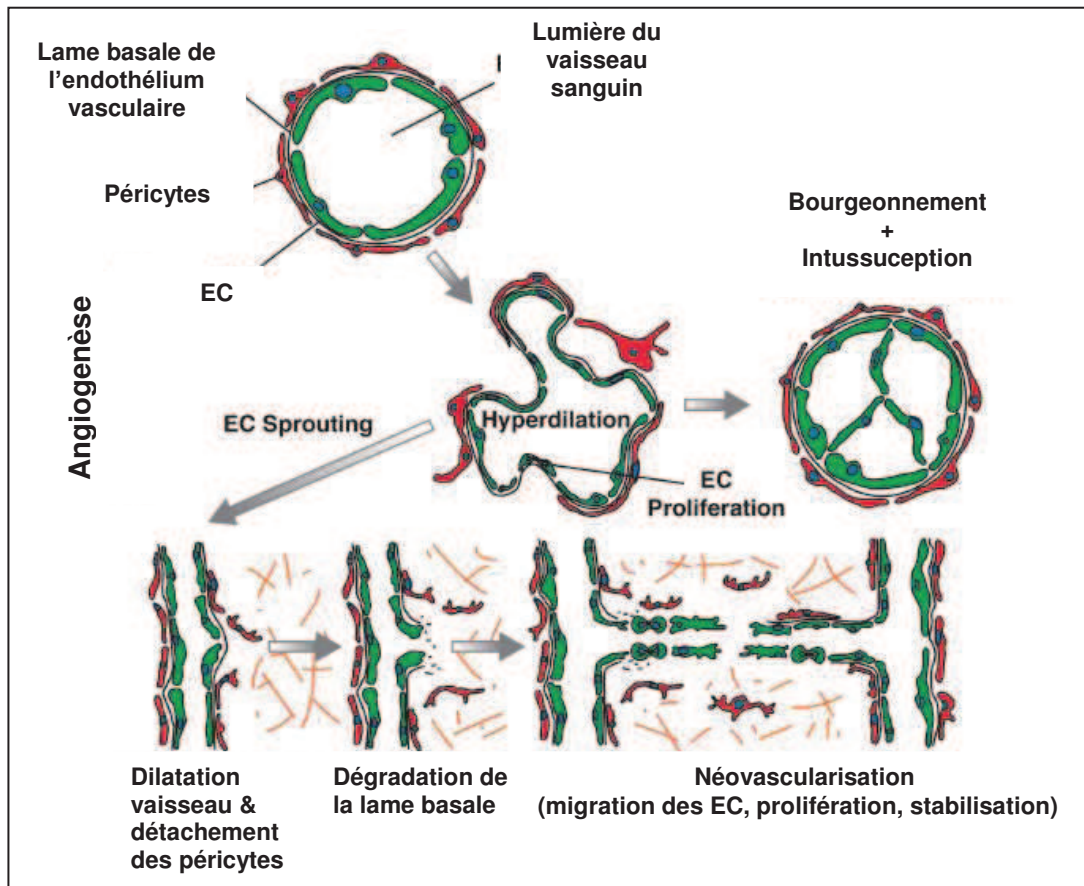
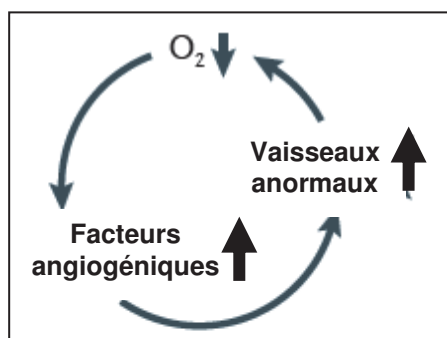


Figure 16 : Mécanisme de l'angiogenèse. Les nouveaux vaisseaux sanguins sont formés par bourgeonnement ou par intussusception à partir de vaisseaux existants. L'angiogenèse est précédée par la déstabilisation des interactions entre les péricytes et les cellules endothéliales, provoquant une hyperdilatation des vaisseaux sanguins. Sous l'action d'un stimulus pro-angiogénique, la lame basale des cellules endothéliales est rompue afin de permettre la prolifération et la migration de ces cellules à travers la matrice extracellulaire. Les capillaires néoformés sont stabilisés par le recrutement et la maturation de péricytes. EC : Cellules endothéliales. [Adapté de Bergers et al, 2005, [136]].



- Perméable
- Hétérogènes
- Tortueux et irrégulier
- Obstruction anormale
- Flux hétérogène
- Faible diffusion des drogues
- Faible chimiosensibilité

Figure 17 : Les vaisseaux tumoraux sont partiellement fonctionnels. Une diminution de la pression en oxygène induit une augmentation des facteurs angiogéniques afin de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, ces néovaisseaux présentent une architecture anormale et non fonctionnelle, ne permettant pas une bonne oxygénation des territoires tumoraux hypoxiques [Adapté de Carmeliet et al, 2011,[137]].

microenvironnement appauvri en nutriment et en oxygène peut aussi exercer une pression de sélection sur les cellules tumorales aboutissant à la survie d'une sous-population cellulaire capable de s'adapter, de survivre et de proliférer [138]. En effet, afin de pallier l'hypoxie, les cellules vont, entre autres, adapter leur métabolisme en passant à la glycolyse [9] et vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques, tel que le facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGF) [8], afin de stimuler une néoangiogenèse tumorale pour créer son propre réseau vasculaire [Figure 15].

2.2. L'angiogenèse tumorale et l'hypoxie intratumorale.

2.2.1. L'angiogenèse tumorale.

L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire existant par bourgeonnement (prolifération des cellules endothéliales) ou par intussusception (le vaisseau existant est scindé en deux par compartimentation).

En condition physiologique, telle qu'au cours d'une cicatrisation, l'angiogenèse est régulée par un équilibre entre des facteurs pro-angiogéniques (activateurs) et des facteurs anti-angiogéniques (inhibiteurs). La première étape de cette angiogenèse physiologique correspond à la perméabilisation vasculaire en déstabilisant les interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes (cellules localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium vasculaire), via la liaison du facteur pro-angiogénique angiopoïétine 2 sur le récepteur Tie2 exprimé au niveau des cellules endothéliales. Le facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGFA) peut alors se lier au récepteur du VEGFA (VEGFR2) exprimé à la surface des cellules endothéliales et induire la prolifération et la migration de celles-ci, afin de former de nouveaux « tubes » vasculaires. Les capillaires néoformés sont ensuite stabilisés par le système angiopoïétine1/Tie2, qui permet le recrutement et la maturation des péricytes [Figure 16] [136].

Une étape importante pour l'angiogenèse tumorale est le « switch angiogénique » qui mène à un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques, aboutissant à un recrutement et à une prolifération des progéniteurs endothéliaux [139]. Les tumeurs se caractérisent donc par une activation constante de l'angiogenèse, au cours de laquelle les étapes de déstabilisation et de stabilisation ont lieu simultanément, aboutissant à des néovaisseaux aberrants et non fonctionnels [136].

2.2.2. Conséquence de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale.

Défaut d'oxygénation : L'hypoxie est un des facteurs essentiels de la régulation du switch angiogénique, en stimulant l'expression des facteurs pro-angiogéniques et en inhibant l'expression des facteurs anti-angiogéniques [136]. Cependant, les vaisseaux sanguins tumoraux néoformés présentent souvent une architecture hétérogène et aberrante. Ils ont des formes et des

branchements vasculaires irréguliers, ayant pour conséquence un flux sanguin irrégulier. De plus, l'irrégularité des diamètres des vaisseaux sont aussi à l'origine d'un flux hétérogène. Ils sont souvent discontinus, du fait de la déstabilisation/stabilisation simultanée des vaisseaux, conduisant à un épanchement sanguin au niveau de la matrice extracellulaire [137]. Cette vascularisation tumorale non fonctionnelle induit donc un défaut fréquent d'oxygénation tissulaire [Figure 17].

Résistance aux traitements : L'hypoxie intratumorale induit un phénotype tumoral plus agressif qui favorise la progression tumorale, la dissémination métastatique [9, 138], ainsi que la résistance aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie [9, 105, 133, 135, 138]. L'efficacité de la radiothérapie s'appuie sur la présence d'oxygène. Or dans les régions hypoxiques la pression partielle en oxygène est de moins de 5 mmHg [135]. En présence d'oxygène, l'irradiation des cellules induit, par la production de radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau, des cassures double brin de l'ADN. L'oxygène va intervenir dans cette cascade en produisant des radicaux libres à durée de vie plus ou moins longue. En absence d'oxygène, ces radicaux libres sont présents en plus faible quantité et induisent donc moins de dommages à l'ADN. De plus, l'hypoxie contribue également aux résistances contre les agents thérapeutiques, qui ne peuvent diffuser au cœur de la tumeur. En effet, dans les tumeurs, l'architecture vasculaire est souvent aberrante, ayant pour conséquence un flux sanguin diminué, une pression et une viscosité augmentées [138]. L'hypoxie interviendrait aussi dans la résistance à la chimiothérapie en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S des cellules tumorales. Or, il est connu que la plupart de ces agents ne sont efficaces que sur les cellules en prolifération [138].

Ainsi, l'adaptation de la tumeur à l'hypoxie est une étape critique dans la progression tumorale et repose sur la stimulation de l'angiogenèse tumorale.

Un microenvironnement hypoxique va également induire l'expression de gènes impliqués dans la survie, la migration, la prolifération et l'immortalisation cellulaires, l'apoptose, l'angiogenèse, le métabolisme et la régulation du pH des cellules cancéreuses en privilégiant la glycolyse. L'expression de ces gènes est activée essentiellement par les facteurs de transcription HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), qui s'accumulent en hypoxie.

2.3. HIF1 : Un facteur de transcription induit par l'hypoxie.

Le facteur HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor*) a été mis en évidence par Semenza et Wang en 1992 et 1995 en analysant les séquences activatrices en *cis* de la transcription du gène *EPO* (Erythropoïétine) en condition d'hypoxie [140].

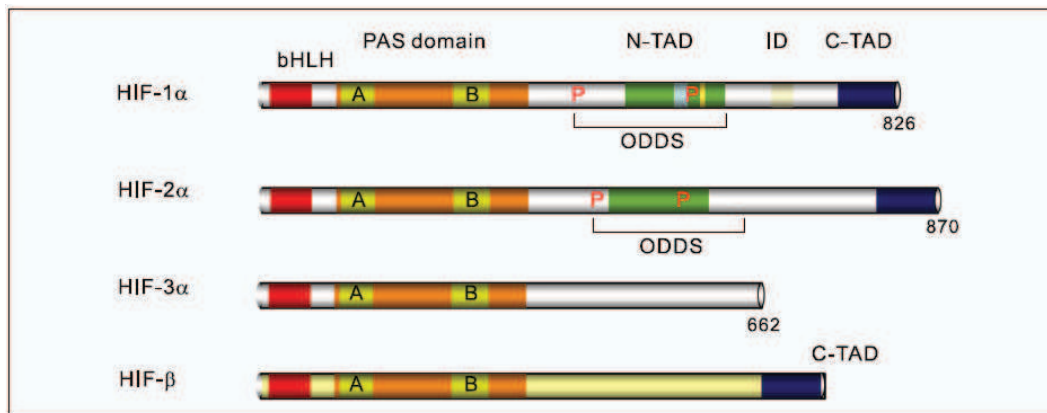


Figure 18 : Les sous-unités HIF α et la sous-unité HIF1 β . Les quatre sous-unités présentent une région N-terminales similaires. De plus, les sous-unités HIF1 α et HIF2 α présentent également une région C-terminale similaires du point de vue de la structure.

bHLH : motif hélice-boucle-hélice basique ; PAS : Per-ARNT-SIM ; N-TAD : Domaine de transactivation en N-Terminal ; C-TAD : Domaine de transactivation en C-Terminal ; ID : Domaine inhibiteur ; ODDS : domaine de dégradation dépendant de l'oxygène. [D'après Chen et al, 2009, [8]

2.3.1. Caractéristiques structurales de la sous-unité HIF1 α .

Le facteur de transcription HIF est un hétérodimère constitué [Figure 18]:

- d'une sous-unité α dont la stabilité est régulée par l'oxygène. Deux autres sous-unités α ont été mises en évidence : HIF2 α et HIF3 α .
- d'une sous-unité β , également appelée sous-unité ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), insensible aux variations de la pression en oxygène.

Ces deux sous-unités sont des protéines basiques hélice-boucle-hélice (bHLH) à domaine PAS (Per/ARNT/Sim) [8, 141]. Le motif bHLH est responsable de la dimérisation des sous-unités α et β . Le domaine PAS intervient dans la fixation à l'ADN [142].

Le facteur HIF1 est composé de la sous-unité HIF1 α et de la sous-unité HIF1 β .

HIF1 α :

Le gène *HIF1 α* est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire. Cependant, la protéine HIF1 α n'est stabilisée qu'en hypoxie, grâce à des mécanismes de régulation post-traductionnelle, qui seront détaillés dans la suite du chapitre. HIF1 α est considéré comme le régulateur majeur de la réponse à l'hypoxie.

HIF1 α comporte deux domaines de transactivation dans la partie carboxy-terminale (C-ter) : le N-TAD (*N-TransActivation Domain*) et le C-TAD (*C-TransActivation Domain*), impliqués dans la stimulation et dans la régulation de la transcription. La protéine HIF1 α comporte également un domaine ODD (*Oxygen Dependent Degradation Domain*) en amont du domaine N-TAD. Ce domaine joue un rôle majeur dans l'instabilité de la sous-unité HIF1 α en normoxie. Par conséquent, ce domaine est un acteur essentiel dans la régulation de HIF1 et est responsable de la dégradation de HIF1 α par le protéasome en condition de normoxie [143].

2.3.2. Les autres sous-unités α : HIF2 α et HIF3 α .

HIF2 α :

Comme pour HIF1 α , le gène est transcrit de manière constitutive, mais la protéine ne s'accumule qu'en hypoxie. L'expression protéique de HIF2 α n'est pas ubiquitaire, elle n'est exprimée qu'au niveau de l'endothélium vasculaire chez l'Homme [144], et au niveau du foie, du rein, du duodénum, du cœur et du cerveau chez le rat placé en chambre hypoxique [145]. Les caractéristiques structurales et la régulation protéique en normoxie et en hypoxie sont similaires à celles de HIF1 α [Figure 18].

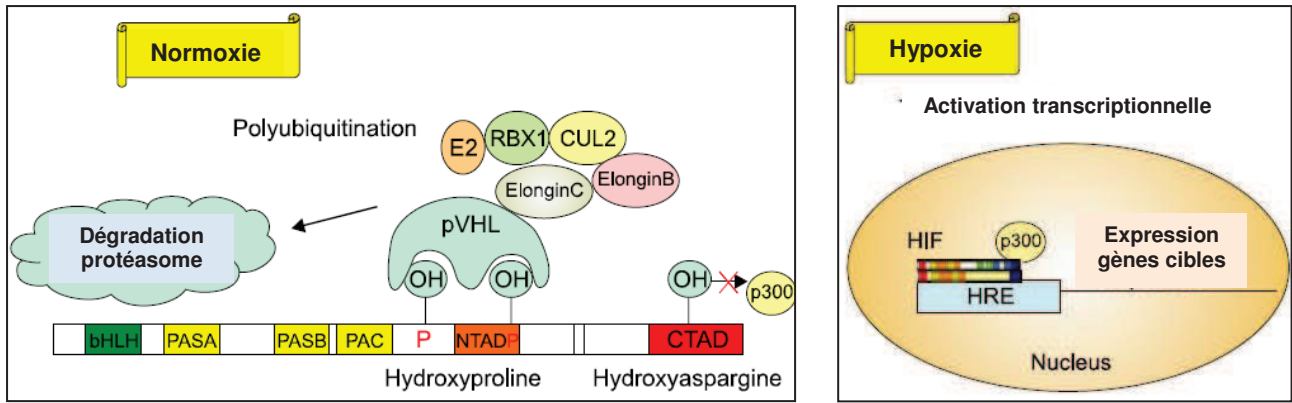


Figure 19 : Régulation de HIF1 α en normoxie et en hypoxie. En normoxie, les prolines 402 et 564 sont hydroxylés et reconnus par pVHL. pVHL fait partie d'un complexe qui comprend l'elongine B et l'elongine C, CUL2, RBX1, et un enzyme E3 ubiquitine ligase. Ce complexe induit l'ubiquitination de HIF1 α et sa dégradation. Le résidu asparagine dans le domaine C-TAD de HIF1 α est régulé par hydroxylation et est dépendant de l'oxygène. Ce résidu permet la liaison de p300 dans son état non hydroxylé. En hypoxie, les PHDs ne peuvent plus modifier HIF1 α , qui reste stable. La protéine stabilisée transloque dans le noyau, ou elle interagit avec HIF1 β et p300, autorisant la transcription des gènes cibles liés à la réponse à l'hypoxie, tels que VEGF, GLUT1, NOS, EPO, etc. [Adapté de Chen et al, 2009, [8]].

HIF3 α :

HIF3 α présente de nombreux isoformes générés par épissage alternatif, dont l'isoforme le plus connu est la protéine à domaine inhibiteur de PAS (IPAS). Contrairement aux deux autres sous-unités α , l'isoforme IPAS agirait comme un régulateur dominant négatif des complexes HIF α , en dimérisant avec les sous-unités α . Ceci empêche la liaison des complexes HIF avec l'ADN [146].

2.3.3. La sous-unité HIF1 β .

HIF1 β est exprimé de façon constitutive dans les cellules tant au niveau de son messenger qu'au niveau de la protéine et n'est pas contrôlé par les concentrations cellulaires en dioxygène.

2.4. La régulation du facteur de transcription HIF1 α .

L'activation de HIF1 est un processus multi-étapes, qui implique la stabilisation protéique de HIF1 α , sa translocation dans le noyau, son hétérodimérisation avec HIF1 β et son interaction avec les promoteurs des gènes cibles [147].

2.4.1. Régulation de la stabilité protéique de HIF1 α par les prolyl hydroxylases (PHD).

2.4.1.1 Régulation de la protéine HIF1 α par les PHDs

La régulation de la protéine HIF1 α s'effectue par le biais des dioxygénases, les PHDs, qui sont sensibles aux concentrations en dioxygène dans les tissus [Figure 19] [8, 148]. Les trois isoformes des PHDs (PHD1, PHD2, PHD3) utilisent l'oxygène comme substrat et catalysent une réaction d'hydroxylation d'HIF1 α . Cette réaction d'hydroxylation consiste en l'ajout d'un atome d'oxygène sur deux résidus prolines en position 402 et 564 dans le domaine ODD dans la région C-terminale de HIF1 α [147]. L'hydroxylation de HIF1 α est un pré-requis nécessaire pour son interaction avec le domaine β de la protéine VHL (Von Hippel Lindau). Cette protéine est une E3 ubiquitine ligase qui catalyse la polyubiquitination de la protéine HIF1 α , qui est alors dégradée par le protéasome.

En hypoxie, les PHDs ne sont plus capables d'hydroxyler HIF1 α , du fait d'une diminution du dioxygène présent dans les cellules [Figure 19]. Ainsi, la sous-unité HIF1 α se stabilise, s'accumule et transloque dans le noyau afin de former un hétérodimère avec la sous-unité HIF1 β . Les facteurs

HIF lient des séquences spécifiques (5'- G/ACGTG-3'), appelées élément de réponse à l'hypoxie (HRE), présentes dans les régions promotrices ou dans les séquences « *enhancers* » des gènes cibles de HIF. La liaison de HIF1 α sur ces éléments HRE permet de réguler l'activité

transcriptionnelle de ces gènes en réponse à une hypoxie. Certains des gènes cibles de HIF1, comportant une telle séquence, sont par exemple le gène codant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFA) et son récepteur (VEGFR1) et le gène codant l'érythropoïétine (EPO) [131, 139].

2.4.1.2 Les PHDs

Les PHDs emploient l'oxygène et le 2-oxoglutarate comme substrats et le fer (Fe^{2+}) et l'ascorbate (vitamine C) comme co-facteurs [148]. Pour la réaction d'hydroxylation, l'atome d'oxygène est obtenu par le dioxygène, tandis que les électrons nécessaires à la réaction sont donnés par la décarboxylation du 2-Oxoglutarate (un intermédiaire produit au cours du cycle de Krebs) en succinate [149]. L'activité catalytique des PHDs nécessite la présence de Fe^{2+} dans le cœur catalytique de la protéine.

Les PHDs sont exprimés dans tous les types cellulaires, mais à des niveaux d'expression différents. Cependant, leur localisation diffère : PHD1 est exclusivement nucléaire, PHD2 est principalement localisé dans le cytoplasme, mais il est capable de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau et PHD3 est distribué de façon homogène entre le noyau et le cytoplasme [147]. La contribution de chaque PHD dans la régulation de HIF1 α est directement liée à son abondance dans le type cellulaire étudié [150]. Il apparaît que PHD2 est le régulateur majeur de HIF1 α en normoxie dans plusieurs lignées cellulaires humaines [151]. De plus, la suppression de PHD2 est létale chez la souris, alors que la suppression de PHD1 et PHD3 n'a pas d'effet [151].

L'expression des PHDs est contrôlée aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique. En effet, les niveaux d'expression des gènes *PHD2* et *3* sont augmentés au cours d'une hypoxie de manière HIF1 α dépendante : les *PHD2* et *3* sont des gènes cibles de HIF1 α en hypoxie. Ainsi, l'activité de HIF1 α est nécessaire à l'induction des deux PHDs en hypoxie dans des lignées cellulaires [152]. La surexpression de *PHD2* en hypoxie sous l'influence de HIF1 α permet la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négatif sur HIF1 α en permettant de rapidement stopper la réponse à l'hypoxie, une fois les cellules réoxygénées [153].

Les PHD1 et 3 sont également régulés au niveau protéique, au cours de l'hypoxie, par polyubiquitination par deux membres de la famille des E3 ubiquitines ligases, Siah1 et 2 (*Seven in absentia human homolog*). PHD1 et 3 polyubiquitinés sont dégradés par le protéasome [154].

2.4.2. La régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α .

La stabilisation seule de HIF1 α n'est pas suffisante pour permettre l'activation transcriptionnelle complète du complexe HIF1 en hypoxie. En effet, l'activité transcriptionnelle de HIF1 α doit être activée par des co-facteurs. [155].

2.4.2.1. Le rôle du complexe CBP/p300.

La protéine p300 (*E1A binding protein p300*) et la protéine CBP (*cAMP response element-binding (CREB) binding protein*) agissent comme des co-activateurs de la transcription.

La régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α est réalisée par le complexe CBP/p300, qui joue un rôle essentiel dans l'induction et dans la réponse transcriptionnelles en hypoxie. Ainsi, le facteur de transcription HIF1 lié à l'ADN est retrouvé associé au complexe CBP/p300 *in vivo* en hypoxie [156]. La formation de ce complexe ternaire (HIF1 α /p300/CBP) serait nécessaire à la transcription des gènes de l'*EPO* et du *VEGF* [156]. En fait, l'activation du C-TAD de HIF1 α est obtenue par des modifications post-traductionnelles augmentant ainsi spécifiquement son interaction avec p300 et CBP [155, 156].

2.4.2.2. Le rôle des facteurs inhibant HIF1 (FIH).

Les facteurs inhibant les facteurs HIF (FIH) sont des dioxygénases sensibles aux fluctuations d'oxygène dans la cellule. Ainsi, les FIH ne fonctionnent qu'en normoxie. Les FIH modulent l'activité transcriptionnelle de HIF1 α en hydroxylant le résidu asparagine en position 803 (Asn803) situé dans le domaine C-TAD de HIF1 α . Cette hydroxylation empêche le complexe co-activateur CBP/p300 de lier le domaine C-TAD de HIF1 α [157]. Les FIH ont un effet négatif sur l'activité transcriptionnelle de HIF1 α en normoxie.

2.5. Implication de l'hypoxie dans les tumeurs.

2.5.1. HIF1 α : régulateur majeur de l'expression de gènes en hypoxie.

Près d'une centaine de gènes ont été identifiés comme étant directement activés par HIF1 α en hypoxie [Figure 20]. En effet, l'expression d'une centaine d'ARNm est induite lorsque les cellules sont exposées à l'hypoxie ou lorsque les cellules expriment la protéine HIF1 α constitutivement active [158]. De plus, des expériences ont démontré que [10, 158] :

- la majorité de ces gènes activés par HIF1 α présente un élément HRE dans leur région promotrice.
- la perte de l'expression de HIF1 α induit la perte de l'expression de gènes activés par l'hypoxie.

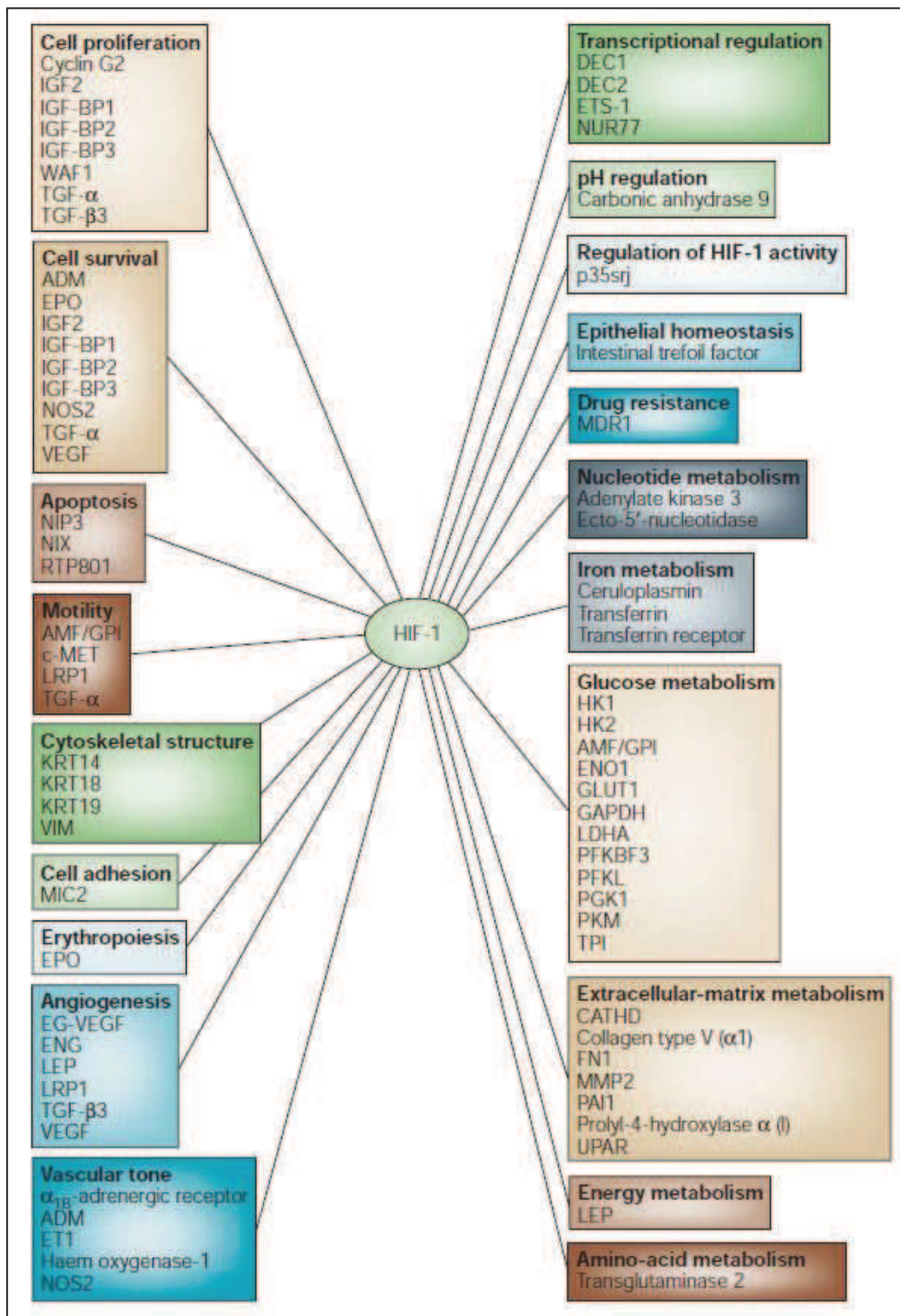


Figure 20 : Induction de gènes cibles par HIF1 α au cours de l'hypoxie. [D'après Semenza et al, 2003 [10]].

- la surexpression de HIF1 α induit une augmentation du niveau d'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie.

De nombreuses études basées sur l'analyse globale de la quantification de transcrits sur puce ont également permis de découvrir de nombreux gènes régulés par HIF1 α en hypoxie [159]. Cependant, ces études ne permettent pas de déterminer si ces gènes sont activés directement ou indirectement par HIF1 α [10].

Ces gènes sont notamment impliqués dans [Figure 20] :

- **dans l'angiogenèse** : le gène *VEGFA* est le principal acteur de l'angiogenèse tumorale. La liaison de VEGF au récepteur VEGFR2 induit la prolifération, la différenciation et la migration de cellules endothéliales vasculaires.

- **dans le métabolisme du glucose** tel que les gènes codant les transporteurs de glucose GLUT1 et 3, et les enzymes de la glycolyse : aldolase (ALDOC), énoïase (ENO), hexokinase 1 et 2 (HK1 & HK2), phosphoglycérate kinase 1 (PGK1), lactate déshydrogénase (LDHA), etc. (voir paragraphe 2.5.3.1)

- **dans la régulation du pH** : la glycolyse induit une importante acidification du milieu intracellulaire. Ainsi, HIF1 α active l'expression de l'anhydrase carbonique 9 (*CA IX*), une métallo-enzyme transmembranaire qui catalyse l'hydratation du dioxyde de carbone ($H_2O + CO_2 = H^+ + HCO_3^-$) au niveau cytosolique. Cette réaction permet de préserver un pH alcalin dans le milieu intracellulaire en évacuant les ions H⁺ dans le milieu extracellulaire.

- **dans la carcinogenèse** : l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) induit une diminution de la production de plasmine. En effet, la plasmine est produite à partir d'un précurseur, le plasminogène, grâce à l'action de l'u-PA (*urokinase plasminogen activator*) et du t-PA (activateur tissulaire du plasminogène). Le PAI-1 s'oppose à la formation de plasmine en inhibant u-Pa et t-Pa, et inhibe ainsi la fibrinolyse et le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Par ailleurs, PAI-1 semble aussi favoriser la migration cellulaire en entrant en compétition avec le récepteur cellulaire de l'u-PA (u-PAR) dans sa liaison à la vitronectine, empêchant ainsi l'adhérence de la cellule à la MEC [Figure 24]. De plus, de fortes quantités de PAI-1 induisent le détachement des cellules ancrées à la vitronectine [160]. La protéine PAI-1 est impliquée dans la migration cellulaire, le remodelage de la MEC, l'invasion tumorale et le développement des métastases.

- **dans l'apoptose** tel que *Bcl2* (*B-cell leukemia/lymphoma 2*), *BNIP3* (*Bcl-2 nineteen kilodalton interacting protein 3*), etc. (voir paragraphe 2.5.2.3).

Il a également été mis en évidence que les niveaux d'expression de gènes induits par l'hypoxie varient d'un type cellulaire à un autre [159]. Il est donc observé une hétérogénéité dans l'expression des gènes cibles en réponse à l'hypoxie parmi les différentes lignées cellulaires [10].

En conclusion, l'induction de ces gènes par HIF1 α permet ainsi d'apporter aux cellules une réponse adaptative à l'hypoxie, dont la protéine HIF1 α est la clé de voûte de la réponse à l'hypoxie [10, 158]

2.5.2. L'hypoxie et la protéine p53.

2.5.2.1. Stabilisation et fonction de la protéine p53 en hypoxie.

En condition d'hypoxie sévère ou prolongée, la protéine p53 est stabilisée par phosphorylation [161], suite à l'activation des voies ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM- and RAD3-related*). La protéine p53 phosphorylée n'interagit plus avec Mdm2 (*Murine Double Mutant 2*) (régulateur négatif de p53), autorisant ainsi son accumulation [161, 162]. D'autres hypothèses suggèrent que les protéines p53 et HIF1 α interagiraient physiquement par l'intermédiaire du domaine ODD de HIF1 α et du domaine de liaison à l'ADN de p53, induisant la stabilisation de p53 [163].

L'hypoxie n'induit aucune augmentation du niveau d'expression de *TP53*. Ainsi, l'accumulation de la protéine p53 est seulement due à des modifications post-traductionnelles.

Il a été démontré que l'hypoxie induirait une accumulation de p53 au niveau nucléaire et que p53 serait lié au promoteur de ses gènes cibles, mais que p53 serait incapable d'induire la transcription de ses gènes cibles, tels que *p21*, *gadd45*, *Noxa*, *Puma* et *Bax* [161, 164]. En réalité, p53 aurait un rôle de transrépression de la transcription en condition hypoxique. En effet, p53 interagirait préférentiellement avec des co-répresseurs de la transcription, tels que mSin3A, plutôt qu'avec des co-activateurs de la transcription, tels que CBP/p300 en hypoxie [161, 164].

2.5.2.2. Induction de l'apoptose par p53 en hypoxie.

La protéine p53 a été décrite comme étant capable d'induire l'apoptose :

- en activant l'expression de gènes cibles (*Bak*, *Bax*, *Puma*, *Noxa*, etc) impliqués dans la voie intrinsèque (voie mitochondriale) de l'apoptose.
- indépendamment de son activité transcriptionnelle. En effet, une fraction protéique de p53 est localisée dans le cytoplasme ou dans la mitochondrie. La protéine p53 contient dans son domaine central un site de liaison aux protéines Bcl2. Ainsi, p53 peut s'associer avec des membres de la famille protéique Bcl2, tels que des protéines anti-apoptotiques (Bcl_{xL}) ou des protéines pro-apoptotiques (*Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bid*, *Noxa*, *Puma*) [165]. Ces protéines sont les composants clés dans la voie intrinsèque de l'apoptose. Actuellement, deux modèles sont proposés pour expliquer la fonction de p53 dans l'induction de l'apoptose [165] :

Modèle 1 : p53 agit comme un « sensibilisateur » en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques (Bcl_{xL}), permettant ainsi de libérer les protéines pro-apoptotiques qui leurs sont liées telles que *Bax*, *Bak* ou *Bid*. La protéine p53 inhibe donc les protéines anti-apoptotiques.

Modèle 2 : p53 agit comme un « activateur » en liant directement les protéines *Bax* ou *Bak*.

Ainsi, en hypoxie, p53 serait capable d'induire l'apoptose en activant la voie mitochondriale via ses fonctions cytoplasmiques. En effet, l'accumulation de p53 induit sa translocation à la mitochondrie et l'apoptose. De plus, lors de l'accumulation massive de p53 en hypoxie sévère, la protéine pourra se lier au complexe CBP/p300 et activer finalement la transcription des gènes impliqués dans l'apoptose (*Noxa*, *Puma*, *Bax*, *Bak*), afin d'amplifier la mort cellulaire.

2.5.2.3. Sélection de cellules « p53 mutante » par l'hypoxie.

Dans les tumeurs, l'hypoxie contribue à sélectionner des cellules ayant une diminution dans leur potentiel apoptotique. Ceci serait dû à la sélection de cellules exprimant une version mutée de la protéine p53. En effet, les régions tumorales à fort potentiel apoptotique seraient corrélées aux régions tumorales hypoxiques exprimant une version sauvage de p53, tandis que les régions tumorales à faible potentiel apoptotique seraient corrélées aux régions tumorales hypoxiques exprimant une version mutante de p53 [166]. De plus, les cellules transformées exprimant une protéine p53 inactive survivent mieux en hypoxie que les cellules exprimant une protéine p53 sauvage. Ainsi, la sélection de cellules ayant un potentiel apoptotique diminué serait médiée par l'hypoxie [166].

2.5.2.4. La protéine p53 et HIF1 α en hypoxie.

Le facteur de transcription HIF1 stimule l'angiogenèse et régule les adaptations cellulaires en hypoxie, tandis que la protéine p53 promeut l'apoptose en hypoxie.

Une autre hypothèse pour expliquer le fait que p53 n'active pas la transcription de ses gènes cibles en hypoxie serait que la protéine p53 entre en compétition avec HIF1 α pour lier CBP/p300 [167]. En effet, en 2004, Schmid propose un modèle de régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α et de p53 en réponse à une hypoxie [168]. En hypoxie, HIF1 α active rapidement la transcription de ses gènes cibles. Lorsque l'hypoxie se prolonge, l'activité transcriptionnelle de HIF1 α diminue progressivement, tandis que la protéine p53 se stabilise et s'accumule. En hypoxie sévère ou prolongée, HIF1 α et p53 entrent en compétition pour la liaison avec p300. Une forte concentration protéique de p53, en hypoxie, entraîne un déplacement du complexe co-activateur CBP/p300 vers p53 et induit par conséquent une diminution de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α .

Ainsi, en hypoxie, p53 est incapable d'induire la transcription de ces gènes cibles, du fait :

- de l'interaction de p53 avec des co-répresseurs de la transcription.
- de l'échec de l'interaction entre p300 et p53, en hypoxie modérée, menant à la répression de la transcription [161, 162].

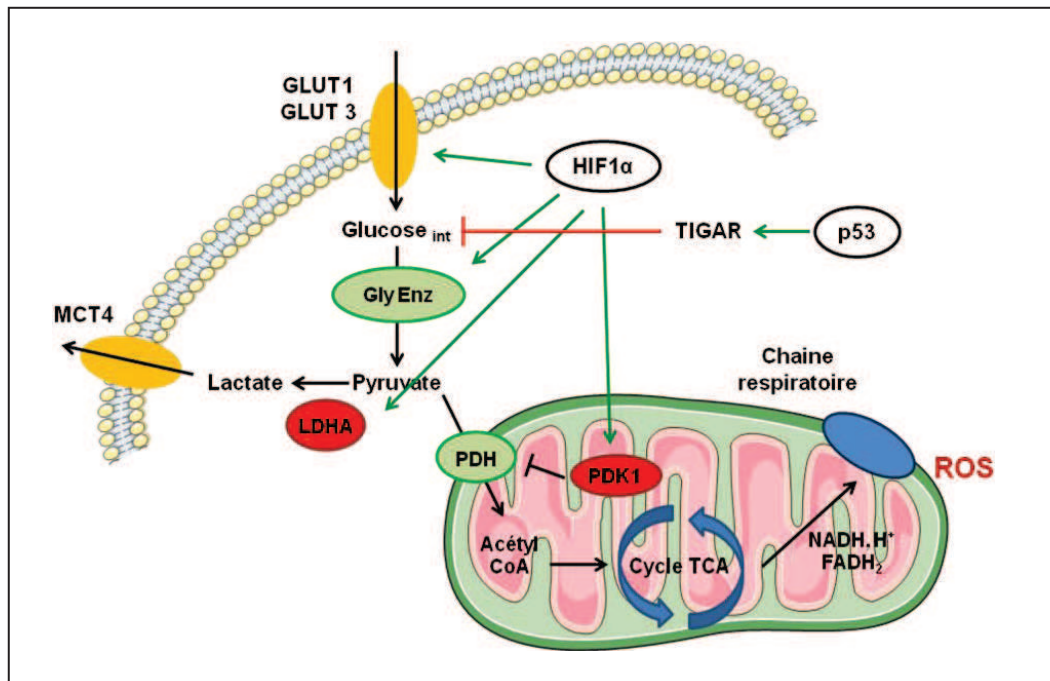


Figure 21 : Modèle de régulation de la voie métabolique du glucose par HIF1 α et p53 en hypoxie. Les activations sont représentées par des flèches vertes, les inhibitions par des barres rouges.

GLUT1 et GLUT3 : transporteurs du glucose 1 et 3 ; Gly Enz : enzymes de la glycolyse ; MCT4 : Transporteur monocarboxylate 4 ; LDHA : Lactate Déshydrogénase ; PDH : Pyruvate Déshydrogénase ; PDK1 : Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 ; ROS : Reactive Oxygen Species ; Cycle TCA : cycle d'acide tricarboxylique ; TIGAR : TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator

2.5.3. Hypoxie et métabolisme cellulaire.

Le métabolisme énergétique des cellules tumorales est significativement différent des cellules non tumorales. En effet, les cellules normales produisent 10% de leur énergie, sous forme d'ATP, à partir de la glycolyse et 90% à partir de la phosphorylation oxydative. Dans les cellules tumorales, plus de 50% de cette énergie cellulaire est produite par la glycolyse, même en présence suffisante d'oxygène au sein de la tumeur (effet Warburg). Ainsi, le taux de glycolyse est 200 fois plus important dans les cellules tumorales que dans les cellules normales [169]. La faible efficacité de production d'ATP à partir de la glycolyse, dans les cellules tumorales, induit une consommation accrue de glucose [170]. En hypoxie, l'activation du facteur HIF1 permet « un *switch* métabolique », en privilégiant la production d'énergie par la glycolyse et non plus par la phosphorylation oxydative [169, 170]

2.5.3.1. La glycolyse et HIF1 en hypoxie.

L'activation de HIF1 a deux effets principaux sur le métabolisme [Figure 21] [170, 171] :

1) HIF1 stimule la production d'énergie par la glycolyse en activant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, tels que les transporteurs du glucose permettant l'entrée du glucose dans la cellule et les enzymes de la glycolyse. HIF1 régule ainsi 12 enzymes qui permettent la conversion du glucose en pyruvate.

2) HIF1 inhibe la phosphorylation oxydative en activant l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) qui inhibe par phosphorylation la pyruvate déshydrogénase (PDH), impliquée dans l'oxydation du pyruvate en acétyl CoA. Par conséquent, le pyruvate n'entre pas dans le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative est diminuée. Ceci mène à une réduction de la consommation en dioxygène, à une diminution de la production de composés réduits (NADH et FADH₂) et à une diminution de la production de ROS. HIF1 active parallèlement l'expression de la lactate déshydrogénase A (LDHA) qui convertit le pyruvate en lactate. HIF1 active également l'expression du transporteur monocarboxylate 4 (MCT4) impliqué dans l'élimination intracellulaire du lactate.

Le facteur HIF1 permet ainsi une réponse adaptative du métabolisme à l'hypoxie.

2.5.3.2. La protéine p53 et contrôle du métabolisme cellulaire.

La protéine p53 régulerait négativement les étapes de la glycolyse via la régulation transcriptionnelle de *TIGAR* (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) [Figure 21]. Cette protéine régule la glycolyse et protège des stress oxydatifs en induisant l'apoptose [172].

La protéine TIGAR semble fonctionner de manière similaire à l'enzyme fructose 2,6 biphosphatase (FBPase 2). Cette enzyme régule la dégradation du fructose 2,6 biphosphate (Fru-2,6-P₂), un activateur allostérique de l'enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK1), qui stimule la

glycolyse. Ainsi, la fonction de la FBPase 2 (par conséquent de TIGAR) est de dégrader le Fru-2,6-P₂, ce qui conduit à une diminution de l'activité de PFK1 et donc à une inhibition de la glycolyse.

Par conséquent, la protéine p53 a des effets antagonistes à HIF1 α sur le métabolisme cellulaire.

2.5.4. Hypoxie et tumeurs HPV positives.

2.5.4.1. Statut hypoxique et tumeurs des VADS.

Récemment, une signature hypoxique de 15 gènes a été développée pour les tumeurs des VADS, afin d'identifier les patients ayant une tumeur hypoxique [173]. Cette signature permet de classer les tumeurs en deux groupes : les tumeurs très hypoxiques et les tumeurs faiblement hypoxiques. Les patients avec une tumeur faiblement hypoxique présentent un meilleur contrôle loco-régional comparés aux patients avec une tumeur fortement hypoxique. L'ajout de nimorazole (une molécule radiosensibilisatrice spécifique des régions hypoxiques) à la radiothérapie améliore nettement le contrôle loco-régional des tumeurs hypoxiques comparés aux tumeurs hypoxiques traitées par placebo. Cet ajout n'apporte pas de bénéfice chez les patients avec une tumeur faiblement hypoxique. Ainsi, les tumeurs des VADS peuvent être classées selon leur statut hypoxique et les tumeurs les plus hypoxiques répondent moins bien à la radiothérapie.

Cependant, l'hypoxie et la radiorésistance associée à l'hypoxie ne sont pas uniformes dans les tumeurs des VADS. Des observations cliniques suggèrent que les tumeurs HPV positives seraient moins hypoxiques que les tumeurs HPV négatives [7]. En effet, l'ajout de nimorazole à la radiothérapie ne semble bénéficier qu'aux patients ayant une tumeur des VADS HPV négative comparés aux patients ayant une tumeur des VADS HPV positives. Cet ajout permet une amélioration du contrôle loco-régional de la maladie et de la survie spécifique chez les patients HPV négatifs.

2.5.4.2. HPV et la protéine p53.

L'oncoprotéine virale E6 d'HPV est capable de lier et de dégrader la protéine p53 via le protéasome en normoxie. Cependant, en hypoxie, dans des lignées cellulaires de cancers du col de l'utérus et du côlon HPV positives, la protéine p53 s'accumulerait et induirait l'apoptose [174]. Ces résultats suggèrent que le complexe E6-E6AP d'HPV devient incapable de lier p53 en hypoxie [174, 175]. Il a été démontré que les niveaux protéiques de E6 et E6AP sont similaires en normoxie et en hypoxie. Les mécanismes précis de l'accumulation de p53 en hypoxie ne sont, actuellement, pas définis. De plus, l'hypoxie permettrait de sélectionner une sous-population de cellules HPV positives et p53 sauvages moins sensibles à l'apoptose. En effet, après plusieurs cycles successifs d'oxygénation et d'hypoxie, les cellules perdent leur potentiel apoptotique et survivent malgré la présence d'une protéine p53 sauvage. Ceci peut s'expliquer par une surexpression de gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl2, induits par l'hypoxie [167].

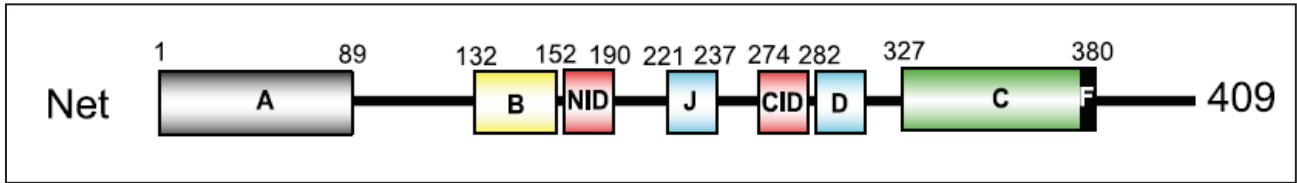


Figure 22 : Structure du facteur de transcription Net. Net appartient à la famille des facteurs de transcription Ets, qui sont caractérisés par un domaine A de liaison à l'ADN. Le domaine B est le domaine d'interaction avec un dimère SRF. Le domaine C est responsable de l'activation transcriptionnelle et contient des sites de phosphorylation par les MAPK. Le domaine D est un site de phosphorylation supplémentaire par les MAPK. Le domaine J est un site de phosphorylation par les JNK kinases. Les domaines CID et NID sont les domaines de répression de la transcription. [D'après Buchwalter et al, 2004, [176]].

2.5.4.3. HPV et la protéine HIF1 α

Dans des lignées de kératinocytes transfectées de manière stable avec le génome d'HPV31, le niveau protéique de HIF1 α est significativement augmenté en hypoxie comparé aux cellules non transfectées [177]. Cette induction augmentée de HIF1 α par HPV31 serait due à une augmentation de la stabilité protéique de HIF1 α . De plus, HIF1 α n'activerait l'expression que d'un certain nombre de gènes cibles en hypoxie en présence d'HPV. Les HPV de bas risque oncogène (HPV11) sont aussi capables d'induire une augmentation de HIF1 α en hypoxie [177]. L'oncoprotéine E7 interagirait directement avec HIF1 α et serait responsable de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF1 α , en déplaçant l'interaction des HDAC1/4/7 (Histone déacétylase) de HIF1 α vers E7. Ainsi, E7 lierait les HDACs et diminuerait par conséquent l'effet inhibiteur des HDACs sur la transcription médiée par HIF1 α en hypoxie [178].

Les tumeurs des VADS HPV positives présenteraient une expression protéique de HIF1 α plus élevée comparées aux tumeurs des VADS HPV négatives [179].

2.5.5. L'hypoxie et le facteur de transcription Net.

2.5.5.1. Le facteur de transcription Net

Net est un facteur de transcription également impliqué dans la réponse à l'hypoxie. Le facteur Net appartient à la famille des facteurs de transcription Ets, caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, le domaine Ets [Figure 22] [176]. Net forme avec deux autres membres, Elk1 et Sap1, la sous-famille des TCF (*Ternary Complex Factor*).

Net est caractérisé par un domaine d'interaction avec un dimère de SRF (*Serum Response Factor*) rendant possible la formation d'un complexe nucléoprotéique ternaire qui se fixe au niveau d'un élément de réponse au sérum (SRE) situé dans la région promotrice des gènes cibles (*c-Fos*, *VEGF*, *PAI-1*).

De plus, Net possède deux domaines de répression de la transcription, les domaines NID et CID. Net est donc un puissant répresseur basal de la transcription connu en particulier pour réprimer l'expression de l'oncogène *c-Fos*. Net peut être converti en activateur de la transcription, lorsque le domaine C d'interaction de la transcription est phosphorylé par les MAPK.

L'activité transcriptionnelle de Net est inhibée par la protéine p53, qui inhibe la phosphorylation de Net par les MAPK. Or p53 est muté dans une majorité de tumeurs humaines. De ce fait, on peut observer une surexpression de la forme phosphorylée du facteur Net et donc une activation transcriptionnelle intense des gènes contrôlés par Net [176].

2.5.5.2. Régulation des gènes cibles par Net

Le facteur de transcription Net régule un certain nombre de gènes impliqués, entre autres, dans la prolifération cellulaire (*c-Fos*), la migration cellulaire (*PAI-1*), et l'angiogenèse (*VEGF*).

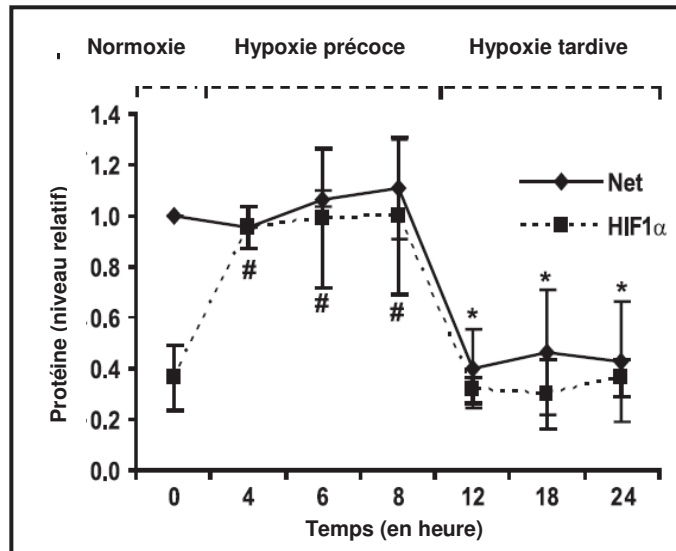


Figure 23: Quantifications des niveaux protéiques moyens relatifs des deux facteurs de transcription *Net* et *HIF1α* normalisée par TBP (*TATA box binding protein*) au cours d'une cinétique d'hypoxie. Trois phases distinctes sont mises en évidence : la normoxie, l'hypoxie précoce et l'hypoxie tardive [Adapté de Serchov et al, 2010, [180]].

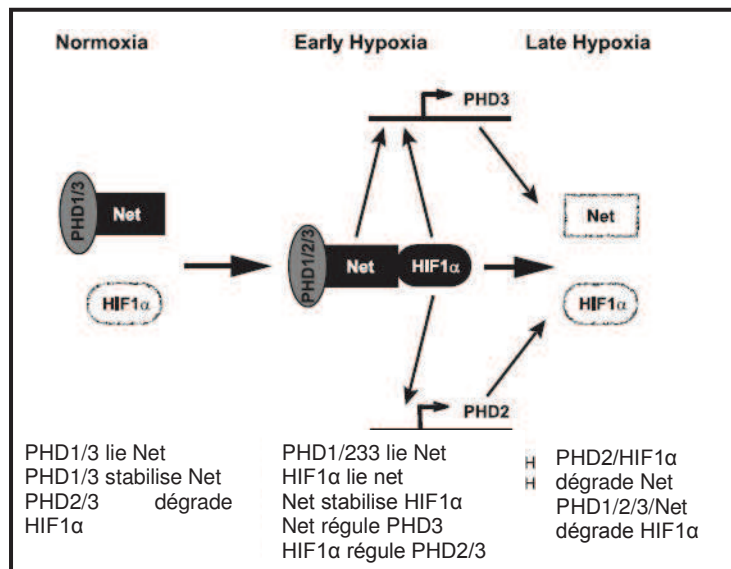


Figure 24 : Modèle de régulation de la réponse à l'hypoxie impliquant *Net* et *HIF1α* pour les cellules 444 (Modèle de Serchov). [Adapté de Serchov et al, 2010, [180]].

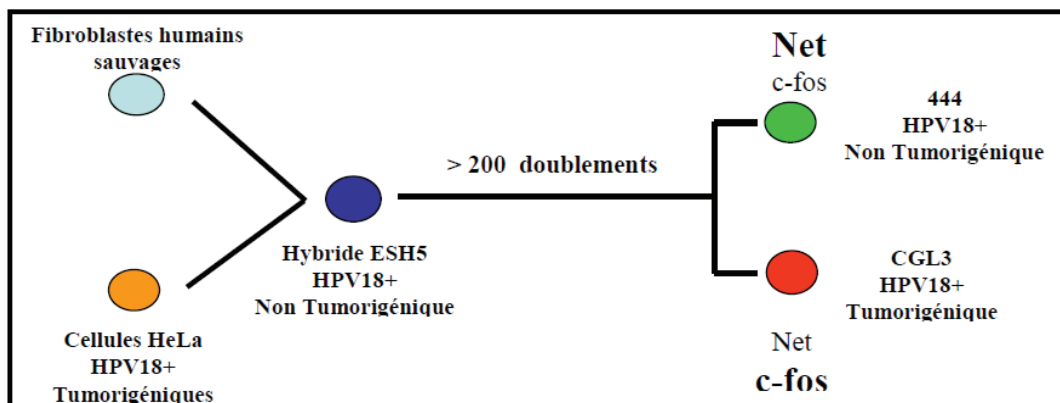


Figure 25 : Modèle mettant en évidence la relation entre les niveaux relatifs de *Net* et de *c-Fos* et la tumorigenèse dans le modèle cellulaire de Stanbridge.

Les gènes *PAI-1* et *c-Fos*, sont des gènes réprimés par Net en normoxie. L'hypoxie lève l'inhibition transcriptionnelle de Net, permettant l'induction de l'expression des deux gènes en condition hypoxique [181].

Net et c-Fos : Le facteur de transcription c-Fos forme, avec un des membres de la famille Jun, le complexe hétérodimérique transcriptionnel AP-1 qui est impliqué dans la différenciation, la prolifération et la transformation cellulaires. Il est avéré que dans les lignées cellulaires des cancers du col de l'utérus infectées par HPV, la perte de Net comme répresseur de c-Fos induit une surexpression de ce gène [182]. Les lignées cellulaires non tumorigéniques (non infectées par HPV) sont caractérisées par un fort niveau d'expression de Net et un faible niveau d'expression de c-Fos. Ainsi, Net est un puissant répresseur de l'oncogène c-Fos.

Net et PAI-1 : Net régule directement le promoteur de *PAI-1* [183]. La région promotrice de *PAI-1* possède trois sites de liaison à l'ETS (EBS) suffisants pour recruter Net de façon autonome. Ainsi, Net est également un puissant répresseur de *PAI-1* et est par conséquent impliqué dans la migration cellulaire.

Net et VEGF : Net n'affecte pas le niveau d'expression du gène *VEGF* en hypoxie, mais Net est un activateur de *VEGF* en normoxie dans les cellules SEND (cellules endothéliales) [181]. Le mécanisme d'activation de *VEGF* par Net n'est pas connu.

2.5.5.3. Implication des facteurs de transcription Net et HIF1 α dans la régulation de la réponse à l'hypoxie.

Au cours de la réponse à l'hypoxie, un grand nombre de gènes sont induits et sont régulés par Net et HIF1 α [159]. Les facteurs de transcription HIF1 α et Net co-régulent l'expression de nombreux gènes cibles en hypoxie [159].

De plus, il a été montré que les niveaux protéiques de Net et HIF1 α sont modifiés au cours de l'hypoxie dans la lignée cellulaire 444 (lignée cellulaire hydride d'origine épithéliale ; voir ci-dessous dans le paragraphe) [180]. Les niveaux protéiques de ces deux facteurs de transcription ont été analysés par Western Blot à partir d'extraits nucléaires de cellules 444 placés en condition hypoxique [180].

Cette expérience a permis de mettre en évidence trois phases distinctes [Figure 23] :

- la normoxie caractérisée par un faible niveau protéique de HIF1 α et par un niveau protéique élevé de Net.
- l'hypoxie précoce (de 4h à 8h à 1% d'O₂) caractérisée par une augmentation du niveau protéique de HIF1 α et une stabilité du niveau protéique de Net.
- l'hypoxie tardive (de 12h à 24h à 1% d'O₂) caractérisée par la dégradation des protéines HIF1 α et Net.

Les PHDs sont impliqués dans la régulation de Net en normoxie et en hypoxie dans différentes lignées cellulaires, telles que les cellules 444 [180].

Un modèle de régulation de la réponse à l'hypoxie (**modèle de Serchov**) reposant sur la formation du complexe Net/HIF1 α /PHDs a été proposé pour les cellules 444, afin d'expliquer la cinétique de stabilisation puis de dégradation de Net et HIF1 α en normoxie, en hypoxie précoce et en hypoxie tardive [Figure 24] [180]. En normoxie, Net interagirait avec les PHD1 et PHD3, qui contribuerait à sa stabilité. PHD2 et PHD3 réguleraient la dégradation de HIF1 α . Serchov et al ont mis en évidence une interaction entre les PHDs et Net au cours de l'hypoxie précoce, ainsi qu'une interaction directe entre HIF1 α et Net [180]. Cette interaction entre les deux facteurs de transcription permet à Net de stabiliser HIF1 α . Ainsi, l'hypoxie précoce se caractériserait par la formation du complexe Net/HIF1 α /PHDs. Les deux facteurs de transcription stabilisés pourront alors réguler le niveau transcriptionnel de PHD3. De plus, HIF1 α régulera le niveau d'expression de PHD2. En hypoxie tardive, le complexe PHD2/HIF1 α dégraderait Net, PHD2 étant l'acteur principal de cette dégradation. Le complexe PHD1/2/3/Net dégraderait HIF1 α , PHD3 étant l'acteur principal de cette dégradation.

La diminution des niveaux de Net induit la transformation maligne des cellules. Les gènes cibles ne sont plus réprimés et sont, par conséquent, surexprimés dans différents cancers. Ainsi, il a été démontré qu'un mécanisme de l'induction de c-Fos, au cours de la carcinogenèse, repose sur la perte de Net, due à sa dégradation en hypoxie [181].

La diminution de l'expression de Net caractérise, également, un modèle cellulaire de progression tumorale de cellules infectées par HPV crée par E. Stanbridge en 1984 [Figure 25]. **Le modèle de Stanbridge** repose sur quatre lignées cellulaires : les IMR90, les HeLa, les 444 et les CGL3 [Figure 25]. La fusion entre des fibroblastes humains sains et des cellules HeLa tumorigéniques HPV 18 positives aboutit à un clone hybride ESH5, caractérisé par la présence du papillomavirus humain (HPV), et par un niveau d'expression élevé de Net et faible de c-Fos. Ce clone est l'ancêtre par doublement de la lignée cellulaire 444. Cette lignée est non tumorigène dans les souris Nude malgré la présence d'HPV. Cette lignée se caractérise par un niveau protéique relativement élevé de Net et un niveau protéique relativement faible de c-Fos. Après plus de 200 doublements à partir du clone ESH5, il apparaît une sous-population d'hybride tumorigénique HPV18 positive, les cellules CGL3. Cette nouvelle lignée est caractérisée par un niveau protéique relativement faible de Net et par un niveau protéique relativement élevé de c-Fos [Figure 33]. Ainsi, il apparaît que la dérégulation de l'expression de Net et de c-Fos aboutit à la transformation maligne des cellules CGL3. Cette dérégulation serait liée à la présence d'HPV.

Ainsi, Net est un acteur important de la régulation de la réponse à l'hypoxie. Dans les cellules tumorales, Net est souvent trouvé sous la forme d'activateur de la transcription (forme

phosphorylée). Dans d'autres cas, c'est la perte de Net (dégradation) comme répresseur qui induit la transformation tumorale.

3. PROJET DE THESE.

La différence d'hypoxie entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives, suggérée par l'équipe de Lassen, n'a pas été caractérisée au niveau des acteurs moléculaires. Certaines études ont été menées, mais souvent sur des cohortes de patients de petites tailles et sur des tumeurs de différentes localisations des VADS.

Nous avons donc entrepris une caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale dans ces tumeurs, afin de vérifier si les observations cliniques sont corrélées, au niveau moléculaire, à l'expression de facteurs impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie. Au moyen d'échantillons tumoraux disponible au sein de la tumorothèque du Centre Paul Strauss, nous avons voulu déterminer s'il existait une différence d'hypoxie entre les tumeurs oropharyngées HPV négatives et HPV positives. Nous nous proposons donc d'étudier l'hypoxie intratumorale :

- en analysant les niveaux d'expression de gènes connus pour être impliqués dans la régulation et la réponse à l'hypoxie,
- en analysant la corrélation entre l'angiogenèse tumorale et la présence d'hypoxie intratumorale par immunohistochimie.

Nous avons également étudié l'adaptation à l'hypoxie de deux lignées cellulaires des VADS :

- la lignée cellulaire HPV négative SQ20B
- la lignée cellulaire HPV positive SCC90.

Une deuxième partie de ma thèse a également consisté à étudier les membres de la famille des facteurs de transcription TCF (Net/Elk1/Sap1) et les membres de la famille Fos (c-Fos/Fra-1/Fra-2/FosB). Nous avons cherché à déterminer si la relation inverse entre Net et c-Fos, observé dans les lignées 444 et CGL3, existe aussi dans les tumeurs oropharyngées humaines et dans les lignées cellulaires des VADS et si elle peut être mise en relation avec le statut HPV des tumeurs et leur statut hypoxique. Nous avons également étudié le modèle de Serchov en évaluant le complexe Net/HIF1 α /PHD dans nos lignées cellulaires SQ20B et SCC90.

PARTIE II : MATERIELS & METHODES.

1. ETUDE D'UNE COHORTE DE TUMEURS OROPHARYNGEES HUMAINES.

1.1. Sélection des tumeurs.

Cette étude a consisté en l'analyse des niveaux d'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie sur une série clinique de 88 patients opérés d'une tumeur oropharyngée entre 1990 et 2012. Ces patients ne sont pas métastatiques d'emblée et sont exempts de néoplasie antérieure. Les patients ont été sélectionnés quelle que soit la taille de la tumeur (T) et quel que soit l'envahissement ganglionnaire local (N). Ces patients ont bénéficié d'une radiochimiothérapie post-opératoire dans 27,3% des cas (24/88 cas), d'une radiochimiothérapie pré-opératoire dans 1,1% des cas (1/88 cas), d'une radiothérapie post-opératoire dans 62,5% des cas (55/88 cas). Au moment de la chirurgie d'exérèse, un échantillon tumoral a été prélevé dont une partie est immédiatement cryoconservée en azote liquide, ce qui autorise son exploitation en biologie moléculaire. L'autre partie de l'échantillon tumoral est fixé dans le formol tamponné à 4% puis inclus en paraffine par le service d'anatomo-pathologie du Centre Paul Strauss. Des coupes de tissus ont été marquées à l'hématoxyline-éosine afin de déterminer la cellularité tumorale par un examen histologique.

Ces échantillons sont conservés au sein de la tumorotheque labellisée INCa du Centre Paul Strauss et sont associés à une base de données pathologiques et cliniques. Les échantillons tumoraux ne sont conservés par le Centre qu'après consentement éclairé du patient. Les évolutions carcinologiques et la survie des patients sont renseignées. Cette cohorte comprend 34/88 tumeurs oropharyngées infectées par le papillomavirus humain (HPV). La détection des transcrits codant les oncoprotéines E6 et E7 a été réalisée par qRT-PCR. Les caractéristiques des patients sont présentées dans la table 1.

1.2. Analyse de l'expression des ARNm.

1.2.1. Extraction des ARN totaux.

L'extraction des ARNs totaux est réalisée par chromatographie par échange d'ions à l'aide du kit « RNeasy Mini kit » (Qiagen). L'extraction a été réalisée en suivant les instructions du fabricant à partir de 20 mg de tissu congelé et pilé à l'aide d'un broyeur à tissus dans un conteneur à azote liquide. Les ARN totaux ont été élués dans un volume final de 30µl d'eau RNase free. L'intégrité des ARNs est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% par dépôt de 100ng d'ARN. Les ARN totaux sont ensuite dosés par mesure de la densité optique à 260nm sur un spectrophotomètre de type Nanodrop D1000 (Thermo Scientific). Le rapport DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,6 et 1,8. La concentration finale des échantillons ARN est ramenée à 50ng/µL.

Amorces	Séquence 5' - 3'	Nbr de bases	Programme qRT-PCR
HIF1 α F	GAAAGCGCAAGTCCTCAAAG	20	1
HIF1 α R	TGGGTAGGAGATGGAGATGC	20	
PHD1 F	AGCCCCTAAGTCAGGCTCTC	20	
PHD1 R	AGTGGTAGAGGTGGCTGTGG	20	
PHD2 F	GAAAGCCATGGTTGCTTGTT	20	
PHD2 R	TTGGGTTCAATGTCAGCAA	20	
PHD3 F	AGATCGTAGGAACCCACACG	20	
PHD3 R	CAGATTTTCAGAGCACGGTCA	20	
PAI-1 F	GGAAGCCCCTAGAGAACCTG	20	
PAI-1 R	TGACAGCTGTGGATGAGGAG	20	
VEGFA F	GAGCCTCTCTACCCAGGTC	20	
VEGFA R	TCCTGAATCTTCCAGGCAGT	20	
c-Fos F	AGAATCCGAAGGGAAAGGAA	20	
c-Fos R	CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG	20	
HIF2 α F	CCAGTGCATCATGTGTGTCA	20	
HIF2 α R	GGCTCCTCCTTTAGCTTGGT	20	
Sap1 F	AGGAACCTCCCAGAACACCT	20	
Sap1 R	TGCCAGTTCTAACCCTTTGG	20	
Elk1 F	GGCTACGCAAGAACAAGACC	20	
Elk1 R	ATTTGGCATGGTGGAGGTAA	20	
Fra2 F	CTCCATGTCCAACCCATACC	20	
Fra2 R	GACGCTTCTCCTCCTTCA	20	
CD31 F	ATGATGCCAGTTTGAGGTC	20	
CD31 R	ACGTCTTCAGTGGGGTTGTC	20	
NET F	GACCTCGAACGATGGTGAAT	20	3
NET R	ACAAACTTCTGCCGATCAC	20	
GLUT1 F	AAGCTGCCCTGTGTTCA	20	
GLUT1 R	CCAAATCGGCATCTTTCAT	20	4
NDRG1 F	ACAACCCTGAGATGGTGGAG	20	
NDGR1 R	TGTGGACCACTTCCACGTTA	20	
ANKRD37 F	GGTGGATGGTCTGAAGCATT	20	
ANKRD37 R	AAACATCCTGCTGGTTGAGG	20	
GLUT3 F	QIAGEN		5
GLUT3 R			
PGK1 F	QIAGEN		
PGK1 R			
ENO F	QIAGEN		
ENO R			

Amorces	Séquence 5' - 3'	Nbr de bases	Programme qRT-PCR
Fra1 F	AGAAGTCAGGCCTGCAGAAG	20	6
Fra1 R	GGGCTCCTGTTTCACCACTA	20	
FosB F	ACCCTTTTCTGATCGTCTCG	20	7
FosB R	CTGCTCACACTCTCACACTC	20	
ALDOC F	QIAGEN		8
ALDOC R			
UBB F	GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT	20	9
UBB R	CGAAGATCTGCATTTTGACCT	21	
RPLP0 F	GAAGGCTGTGGTGCTGATGG	20	10
RPLP0 R	CCGGATATGAGGCAGCAGTT	20	

Tableau 9 : Séquence des amorces oligonucléotidiques pour la PCR quantitative en temps réel. F = Séquence oligonucléotidique sens (Forward) ; R = Séquence oligonucléotidique antisens (Reverse) .

Les conditions de la réaction consistent en :

Programme	Dénaturation	45 cycles amplification	Fusion	Refroidissement
qRT-PCR 1	1 cycle à 95°C pendant 5 min.	95°C pendant 12 sec, 57°C pendant 12 sec, 72°C pendant 12 sec	62°C pendant 1 min	40°C pendant 30 sec.
qRT-PCR 2		95°C pendant 15 sec, 58°C pendant 15 sec, 72°C pendant 15 sec	63°C pendant 1 min	
qRT-PCR 3		95°C pendant 12 sec, 56°C pendant 12 sec, 72°C pendant 12 sec	61°C pendant 1 min	
qRT-PCR 4		95°C pendant 12 sec, 59°C pendant 12 sec, 72°C pendant 12 sec	64°C pendant 1 min	
qRT-PCR 5		95°C pendant 10 sec, 62°C pendant 10 sec, 72°C pendant 10 sec	67°C pendant 1 min	
qRT-PCR 6		95°C pendant 10 sec, 60°C pendant 30 sec, 72°C pendant 10 sec	65°C pendant 1 min	
qRT-PCR 7		95°C pendant 25 sec, 55°C pendant 25 sec, 72°C pendant 25 sec	60°C pendant 1 min	
qRT-PCR 8		95°C pendant 15 sec, 55°C pendant 30 sec, 72°C pendant 30 sec	60°C pendant 1 min	
qRT-PCR 9		95°C pendant 20 sec, 60°C pendant 15 sec, 72°C pendant 15 sec	65°C pendant 1 min	
qRT-PCR 10		95°C pendant 20 sec, 62°C pendant 15 sec, 72°C pendant 15 sec	67°C pendant 1 min	

1.2.2. Reverse transcription et PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).

Une réaction de reverse transcription est réalisée à l'aide du kit « iScript cDNA Synthesis kit» (Bio-Rad) à partir de 50 ng d'ARN en suivant les indications du fabricant. La reverse transcription est effectuée sur un thermocycleur FlexCycler (Analyticjena) dans les conditions suivantes : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C, 5 min à 85°C et conservation à 4°C.

Les ADN complémentaires (ADNc) générés sont dilués au 1/25^{ème} et 1/100^{ème} par ajout d'eau RNase free et servent de matrice pour quantifier l'expression de différents gènes d'intérêt. La qRT-PCR est réalisée en utilisant le kit « SybrGreen I Master ® » (Roche) et un thermocycleur couplé à un système de lecture, le Light Cycler 480 (Roche) en suivant les instructions du fabricant. Tous les gènes d'intérêt testés ont été normalisés par deux gènes de référence (UBB et RPLP0). Les amorces pour les gènes de référence et les gènes d'intérêt sont synthétisés par Sigma ou Qiagen (voir table...). Toutes les amorces sont dessinées pour des gènes humains. Pour les amorces Sigma, la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) correspondant à chaque transcrit d'intérêt est obtenue à partir du site internet NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les amorces oligonucléotidiques sont dessinées à partir de cette séquence à l'aide du logiciel en ligne Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Ces amorces doivent permettre la synthèse d'un amplicon ayant une taille comprise entre 150 et 200 pb. Le protocole de PCR dépend du couple d'amorce utilisé.

1.2.3. Analyse statistique des résultats.

La différence des niveaux d'expression des gènes testés entre les échantillons tumoraux HPV positifs et HPV négatifs est ensuite analysée par un test statistique paramétrique de type Student ou par un test non paramétrique de type Mann-Whitney à l'aide du logiciel de statistiques médicales MedCalc (www.medcalc.org). Il existe une différence significative du niveau d'expression entre les tumeurs oropharyngées infectées ou non par HPV, si la valeur du p (p-Value) est inférieure à 0,05.

1.3. Analyse d'immunohistochimie.

Cette étude a consisté en l'analyse de l'hypoxie intratumorale et de l'angiogenèse tumorale sur une série de 53 tumeurs oropharyngées incluses en paraffine, dont 29 tumeurs sont HPV positives.

1.3.1. Marquage d'immunohistochimie.

Le marquage d'immunohistochimie des régions hypoxique tumorale a été réalisé sur des coupes de tumeurs de 4µm à l'aide de l'automate Ventana Benchmarck XT (Roche). Chaque étape de la technique, du déparaffinage au montage de la lame est effectuée automatiquement. Les lames sont incubées 32 minutes avec l'anticorps primaire. Le système de révélation utilisé est le kit « XT ultra view DAB v3 » (Roche). Les lames ont été prétraitées par le tampon CC1 court (Roche) pendant 30 minutes. La contre coloration des lames a été réalisée par l'hématoxyline II (Roche) pendant 12 minutes et au bluing reagent pendant 4 minutes (Roche). Les anticorps utilisés sont les suivants :

- Anticorps polyclonal de lapin anti-CAIX humain au 1/1 000^{ème} (Ab15086, Abcam).
- Anticorps secondaire biotynilé anti-IgG de lapin produit dans la souris

1.3.2. Analyse des marquages d'immunohistochimie.

Les 53 lames ont été lus par deux groupes de deux personnes indépendamment l'un de l'autre. L'observation de la lame entière a été réalisée aux grossissements 40 fois et 200 fois. Le pourcentage de cellules tumorales marquées au CA IV au niveau membranaire a été ensuite déterminé. Les lames qui présentaient une discordance dans les résultats entre les deux groupes d'observateur ont été relues simultanément par les deux groupes, afin de déterminer le pourcentage de cellules marquées.

2. ETUDE SUR DEUX LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES DES VADS.

2.1. Culture cellulaire.

2.1.1. Lignées cellulaires SQ20B et UPCI-SCC90.

Les caractéristiques des deux lignées cellulaires humaines utilisées au cours de mes travaux de thèse sont résumées dans le tableau suivant.

Lignées	SQ20B	SCC90
Site anatomique d'origine	Larynx	Oropharynx
Statut HPV	Négatif	HPV 16
Statut gène TP53	Muté Transition G->A dans le site accepteur d'épissage de l'intron 4 [13].	Wild type
Stade TNM	T2N0	T2N0
Sexe donneur	-	Masculin

2.1.2 Conditions de culture en normoxie et en hypoxie.

Les deux lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu DMEM Low Glucose 1g/L de glucose (Dominique Dutscher). Le milieu est supplémenté avec 1mM d'acides aminés non essentiel (Gibco), 1mM d'Hepes Buffer (Pan Biotech) et de 10% de sérum de veau fœtal (Pan Biotech). Les deux lignées cellulaires sont repiquées une fois par semaine. La lignée SQ20B est diluée au 1/10^{ème}, tandis que la lignée cellulaire SCC90 est diluée au 1/3^{ème} à chaque repiquage.

En condition de normoxie, les cellules sont maintenues dans un incubateur humide à 37°C, 21% d'O₂ et 5% de CO₂.

Pour les expériences d'hypoxie, les cellules sont placées, 24h après l'ensemencement ou la transfection, dans un incubateur à hypoxie (Incubator MCO-5M, Panasonic) à 37°C, 3% d'O₂ et 5% de CO₂ pendant 24h, afin d'adapter les cellules à un environnement hypoxique. Les cellules sont ensuite placées en condition d'hypoxie à 1% d'O₂ pour la durée de la cinétique d'hypoxie.

Pour les expériences de cinétiques d'hypoxie, les différents points de cinétiques réalisés sont :

- Après 24h à 21% d'O₂
- Après 24h à 3% d'O₂
- Après 4h, 6h, 8h, 12h, 24h et 30h à 1% d'O₂

Pour les expériences de transfection transitoires de plasmide, les différents points de cinétique réalisés sont :

- Après 24h à 21% d'O₂
- Après 24h à 3% d'O₂
- Après 8h, 12h, 24h à 1% d'O₂

Les cellules sont mises en culture la veille de la cinétique d'hypoxie dans leur milieu de culture DMEM Low glucose 1g/L dans des plaques 6 puits en plastique et ensemencées à :

- 150 000 cellules par puits pour la lignée SQ20B.
- 190 000 cellules par puits pour la lignée SCC90.

Les cellules SCC90 sont mises en culture la veille de la transfection dans leur milieu de culture DMEM Low glucose 1g/L sans SVF dans des plaques 6 puits en plastique et ensemencées à 190 000 cellules par puits.

2.2. Analyse de l'expression des ARNm.

2.2.1. Extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux sont extraits au moyen du kit « miRNeasy » (Qiagen), conformément aux instructions du fabricant. Les ARN sont élués avec 30µL d'eau RNase free et sont stockés à +4°C pour une utilisation immédiate ou à -20°C pour une utilisation ultérieure. Les ARN sont dosés par mesure de la densité optique à 260nm sur Nanodrop D1000. La concentration finale est ramenée à 50ng/µl. L'intégrité des ARN est vérifiée par migration de 100ng d'ARN extrait sur gel d'agarose 2%.

2.2.2. Reverse transcription et PCR quantitative en temps réel (qPCR).

La reverse transcription est réalisée avec le kit « GoScript » (Promega) à partir de 50ng d'ARN en suivant les recommandations du fabricant.

La qRT-PCR est réalisée dans un Light Cycler 480 avec le kit « SybrGreen I Master ® » (Roche) en suivant les instructions du fabricant.

Les gènes d'intérêts étudiés sont les mêmes que ceux utilisés pour l'étude sur la cohorte humaine. D'autres gènes d'intérêt ont été rajoutés pour cette étude sur les cellules. Les gènes d'intérêts testés sont normalisés par 3 gènes de référence (ARN18S, UBB, HPRT1).

2.2.3. Analyse statistique des résultats.

Les résultats de niveau d'expression des gènes d'intérêt au cours de la cinétique d'hypoxie sont analysés par un test statistique de type ANOVA à l'aide du logiciel MedCalc. Il existe une différence significative si la valeur du p (p-Value) est inférieure à 0,05.

Amorces	Séquence 5'- 3'	Nbr de bases	Programme qRT-PCR
Bid F	ACAGTGCAACACTGGTCTGC	20	1
Bid R	CCGTCAGTGCCCTTACTCAT	20	
PUMA F	ACGACCTCAACGCACAGTACGA	22	
PUMA R	GTAAGGGCAGGAGTCCCATGATG	23	
MDM2 F	GGTGGGAGTGATCAAAAGGA	20	2
MDM2 R	GTGGCGTTTTCTTTGTGCGTT	20	
BAX F	GACGGCCTCCTCTCCTACTT	20	
BAX R	CCTCCCAGAAAAATGCCATA	20	
Beclin F	AGGTTGAGAAAAGGCGAGACA	20	
Beclin R	AAATTGTGAGGACACCCAAGC	21	
DRAM1 F	AAATCATGTCCCCAGTGGAA	20	
DRAM1 R	AAAGGCCACTGTCCATTACAC	20	
p21 F	ATGAAATTCACCCCTTTCC	20	
p21 R	CCCTAGGCTGTGCTCACTTC	20	
NOXA F1	AAGAAGGCGCGCAAGAAC	18	
NOXA R1	TCCTGAGCAGAAGAGTTTGGGA	21	
p16 F	GCTGCCCAACGCACCGAATA	20	3
p16 R	ACCACCAGCGTGTCCAGGAA	20	
LDHA F	QIAGEN		4
LDHA R			
PDK1 F	QIAGEN		
PDK1 R			
ARN18S F	TGTGGTGTGAGGAAAGCAG	20	5
ARN18S R	TCCAGACCATTGGCTAGGAC	20	
HPRT1 F	TGCTCGAGATGTGATGAAGG	20	6
HPRT1 R	GTCCCCTGTTGACTGGTCATT	21	

La réaction consiste en :

Programme	Dénaturation	45 cycles amplification	Fusion	Refroidissement
qRT-PCR 1	1 cycle à 95°C pendant 5 min.	95°C pendant 10 sec, 60°C pendant 10 sec, 72°C pendant 10 sec	65°C pendant 1 min	40°C pendant 30 sec.
qRT-PCR 2		95°C pendant 10 sec, 62°C pendant 10 sec, 72°C pendant 10 sec	67°C pendant 1 min	
qRT-PCR 3		95°C pendant 10 sec, 66°C pendant 10 sec, 72°C pendant 10 sec	71°C pendant 1 min	
qRT-PCR 4		95°C pendant 12 sec, 58°C pendant 12 sec, 72°C pendant 12 sec	63°C pendant 1 min	
qRT-PCR 5		95°C pendant 10 sec, 58°C pendant 10 sec, 72°C pendant 10 sec	63°C pendant 1 min	
qRT-PCR 6		95°C pendant 10 sec, 62°C pendant 10 sec, 72°C pendant 10 sec	67°C pendant 1 min	

2.3. Analyse des protéines.

2.3.1. Extraction et dosage des protéines.

Les protéines sont extraites à l'aide de 110µL de tampon Laemli Buffer 1X (Tris-HCL 6.25mM, DTE 1.5mg/ml, 1% SDS, pH6.8) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma) et de phosphatases (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 et 3 Sigma). Les lysats sont incubés dans la glace pendant 15 minutes, puis les échantillons protéiques sont broyés par ultrasons à l'aide d'un sonicateur. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 13 000 rpm, afin de culotter les débris cellulaires. Les surnageants sont récupérés et sont conservés à -80°C avant le dosage et l'utilisation des protéines pour les westerns blot.

La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford, à l'aide du bleu de coomassie (Bradford Ultra, Expedeon). La lecture est réalisée à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque (Synergy HT, Biotec) et du logiciel Gene 5 contre une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma) de 0,5 µg/µl à 2 µg/µl.

2.3.2. Western Blot.

Les extraits protéiques sont ramenés à une concentration de 1µg/µL et sont dénaturés 5 minutes à 95°C. Pour chaque échantillon protéique, 20µg de protéines sont alors séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 9% pendant 1h30 à 130 volt dans du tampon de migration (25mM de Tris, 192mM de glycine, 0,1% de SDS [m/v]). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad). Le transfert s'effectue pendant une heure à 100 Volt dans du tampon contenant 25mM de Tris, 192mM de glycine, 20% de méthanol [v/v]). Les membranes sont ensuite bloquées pendant minimum 30 minutes dans un tampon de blocage (5% de lait écrémé lyophilisé, 0,1% de Tween 20 dans du TBS 1X (82mM de Tris, 132mM de NaCl, pH7,6)), afin de bloquer les sites aspécifiques. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C sous agitation lente en présence de l'anticorps primaire d'intérêt dilué dans du tampon de blocage TBST 1X 0,5% de lait. Les anticorps primaires utilisés sont :

- L'anticorps monoclonal de souris anti-HIF1α humaine clone 54/HIF1α au 1/1 000^{ème} (610959, BD Biosciences)
- L'anticorps monoclonal de souris anti-p53 humaine clone DO1 au 1/200^{ème} (sc126, Santa Cruz Biotechnology, Clinisciences).
- L'anticorps monoclonal de souris anti-actine B humaine clone 3G4-F9 au 1/15 000^{ème} (Abnova).

Les membranes sont ensuite rincées trois fois pendant 10 minutes dans du TBST 1X, puis incubées avec un anticorps secondaire anti-souris conjugués à une HRP (Horse raddish peroxydase), dilués dans du TBST 1X 0,5% de lait pendant 2h à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés sont :

- L'anticorps secondaire de souris anti-lapin au 1/10 000ème (Cell Signalling).

La révélation est réalisée par l'ajout du kit ECL RevelBlot Intense (Ozyme) selon les instructions du fabricant. Le signal chimioluminescent est détecté par une méthode manuelle par bains successifs dans un révélateur (Révélateur Kodak GBX, VWR), de l'eau et un fixateur (Fixateur Kodak GBX, VWR). L'analyse des blots est effectuée par le logiciel Image J 1.46r. Toutes les protéines d'intérêt ont été normalisées par l'actine.

2.4. Transfections transitoires de plasmides.

Cette expérience n'a été réalisée que sur la lignée cellulaire SCC90, portant un gène TP53 sauvage. Les plasmides utilisés sont :

- pG13 qui contient des éléments de liaison non mutés à la protéine p53 (p53 binding element).
- pG15 qui contient des éléments de liaison mutés à la protéine p53 (p53 binding element). Ce plasmide servira de contrôle négatif.

Sous la dépendance et en amont de ces éléments de liaison se trouve le gène rapporteur de la luciférase qui, une fois activée, assurera la réaction avec la luciférine. Ces deux plasmides contiennent également le gène de résistance à l'ampicilline.

- Lac Z qui code le gène pour la β -galactosidase et le gène de résistance à l'ampicilline.

Ce plasmide LacZ sert de contrôle interne pour vérifier si la transfection a fonctionné.

Transformation bactérienne :

100 μ L de bactéries compétentes *Escherichia coli DH5 α* sont transformées avec 50ng d'ADN plasmidiques (pG13 ou pG15 ou Lac Z) et sont incubées 10 minutes dans la glace. Elles subissent ensuite un choc thermique pendant 1 minute à 42°C. Les bactéries sont reprises dans 1 ml de milieu LB et sont incubées à 37°C pendant 45 minutes sous agitation dans l'incubateur ROSI 1000. 100 μ L de la culture est étalée sur une boîte de Pétri LB avec 100 μ g/ml d'ampicilline. Le lendemain, une colonie isolée est repiquée dans 50ml de milieu LB avec 500 μ l d'ampicilline pour les plasmides pG13 et pG15 et est incubée à 37°C toute la nuit sous agitation dans l'incubateur ROSI 1000. Pour le plasmide LAC Z, le milieu utilisé est le Terrific Broth (TB) avec 500 μ l d'ampicilline.

Extraction et dosage des plasmides :

Cette étape est réalisée à l'aide du kit « Plasmid Midi Kit » (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. L'ADN plasmidique est resuspendu dans 200µl de tampon Tris-EDTA pH8. Les ADN sont ensuite dosés par mesure de la densité optique à 260nm sur un spectrophotomètre de type Nanodrop D1000 (Thermo Scientific).

Transfection de cellules en culture :

La transfection est réalisée à l'aide du kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Pour chaque réaction de transfection, 2 µg de plasmide pG13 ou pG15 et 2 µg de plasmide LAC Z, soit 4 µg de plasmides, sont mélangés à 250µl de milieu Optimem (Gibco) et incubés 5 minutes à température ambiante. D'autre part, 10µl de Lipofectamine sont mélangés avec 250µl de milieu Optimem et incubés 5 minutes à température ambiante. Les solutions plasmides/Optimem et Lipofectamine/Optimem sont mélangés et incubés 20 minutes à température ambiante. 500µl de la solution de transfection est ajoutée à chaque puits de transfection. Les plaques sont incubées 4h à 37°C. Ensuite, le milieu de transfection est éliminé et du milieu frais DMEM Low glucose 1g/L avec 10% SVF est ajouté et les cellules sont incubées à 37°C.

Lyse et conservation des échantillons :

Les cellules sont rincées 2 fois au PBS 1X (Pan Biotech) et sont lysées par ajout de 150µl de tampon de lyse 1X (25mM de tampon Tris-Phosphate pH7.8, 2mM d'EDTA, 1mM de DTT, 10% de glycérol, 1% de Triton 100X). Les échantillons sont plongés dans l'azote liquide pendant 3 minutes, puis sont conservés à -80°C pour une mesure ultérieure. Le jour de la mesure, les échantillons sont incubés pendant 3 minutes à 42°C.

Test ONPG (plasmide Lac Z) :

Ce test sert à vérifier si la transfection a correctement fonctionné. L'ONPG (Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside) est un analogue du lactose. Une fois dégradée par la β-galactosidase, il produit de l'O-nitrophénol qui colore le milieu en jaune, signe que la transfection a fonctionné. Pour chaque échantillon, 125µl de Buffer Z (60mM de Na₂HPO₄ (12H₂O), 40mM de NaH₂PO₄ (H₂O), 10mM de KCL, et 1mM de MgSO₄, 0,33µl de β-mercaptoéthanol) et 25µL d'échantillon sont mélangés et incubés à 37°C pendant 4 heures. L'absorbance de l'ONPG est mesurée par lecture de la densité optique à 415nm par le lecteur de microplaque Synergy HT (Biotech) et à l'aide du logiciel Gene 5.

Test Luciférase :

Ce test consiste en l'émission d'un photon due à la dégradation de la luciférine via la luciférase (codée par les plasmides pG13 et pG15). Pour chaque échantillon, 50µl de tampon

essai (530mM d'ATP, 470mM de Luciférine, 270mM de Co-enzyme A, 50% de tampon luciférase 2X (40mM de Tris-Phosphate pH7.8, 2,14mM de MgCl₂, 5,4mM de MgSO₄, 0,2mM d'EDTA, 66,6mM de DTT)) et 50µL d'échantillon sont mélangés. La luminescence est mesurée avec le filtre d'émission 595/30 à l'aide du lecteur de microplaque Synergy HT (Biotech) et à l'aide du logiciel Gene 5.

Analyse des données :

Les résultats de luminescence obtenus pour les plasmides pG13 et pG15 sont normalisés par l'absorbance de l'ONPG (plasmide LacZ). Ensuite, les points de mesure sont normalisés par le point 21% de pG13 et pG15.

2.5. Survie cellulaire au cours de l'hypoxie.

La viabilité cellulaire est mesurée par la technique du bleu Trypan à l'aide du compteur de cellules automatique (Countess Automated Cell Counter). Les cellules sont scratchées du puits par 150µL de PBS 1X (Pan Biotech) et placées dans un tube Eppendorf de 1,5ml. 10µl du lysat cellulaire est mélangée à 10µl de Bleu trypan (Life Technologies) et incubées 5 minutes à température ambiante. Puis, 10µl de la solution est placée sur une lame de Malassez (InVitrogen) pour lecture.

3. REALISATION DE XENOGREFFES CHEZ LA SOURIS NUDE.

L'étude d'expérimentation animale a été approuvée par le comité d'éthique français. Les souris Nude athymiques nu/nu (Laboratoire Charles River, France) femelles sont maintenues dans des conditions aseptisées.

Les cellules SQ20B ou SCC90 sont injectées en présence de Matrigel, en proportion 1 :1, pour un volume final de 200µL, par voie sous-cutanée à raison de 500 000 cellules par flanc sur des souris Nude. La croissance tumorale sur les souris est observée quotidiennement. Un mois après l'implantation des cellules, les tumeurs ont atteint un volume de 500 mm³. Les souris sont sacrifiées et les tumeurs sont collectées et incluses en paraffine pour des analyses d'immunohistochimie.

PARTIE III : RESULTATS

1. ARTICLE SOUMIS

1.1. Avant propos

Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx have a lower tumour hypoxia signature.

Elodie Hanns, Sylvie Job, Pierre Coliat, Erwan Pencreach, Michael Herfs, Sonia Ledrappier, Christine Macabre, Joseph Abecassis, Bohdan Wasyluk, Alain C. Jung.

Soumis à “International Journal of Cancer”

Les tumeurs oropharyngées HPV positives présentent une sous-population clinique distincte comparées aux tumeurs oropharyngées non infectées par HPV. Plusieurs études cliniques ont démontré que, les patients HPV positifs ont une survie sans récurrence et une survie globale accrues. L'essai clinique randomisé danois DAHANCA 5 suggère que ce meilleur pronostic pourrait s'expliquer, en partie, par un statut hypoxique moindre des tumeurs HPV positives comparées aux tumeurs HPV négatives. Cependant, cette hypoxie différentielle entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives n'a pas été caractérisée au niveau moléculaire.

L'analyse de données transcriptomiques, générés antérieurement au laboratoire et qui comparent un groupe de tumeurs HPV négatives à un groupe de tumeurs HPV positives, indique que les tumeurs HPV positives expriment un plus faible niveau de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie par rapport aux tumeurs HPV négatives.

Les données de transcriptomique ont été obtenues par puce à ADN de type Affymetrix sur une cohorte de 98 tumeurs des VADS. Une analyse non supervisée de groupes (cluster) a permis d'identifier trois groupes de tumeurs ayant une signature hypoxique distincte. Pour valider cette analyse non supervisée, nous avons mesuré par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie sur une cohorte de 34 tumeurs oropharyngées HPV positives et 54 tumeurs oropharyngées HPV négatives. Les niveaux d'expression des gènes ont été comparés entre ces deux groupes de tumeurs. L'hypoxie intratumorale et l'angiogénèse tumorale ont été évaluées sur 29/34 tumeurs HPV positives et 24/54 tumeurs HPV négatives par immunohistochimie (IHC). L'étude de l'adaptation à l'hypoxie a été réalisée sur deux lignées cellulaires : une lignée HPV négative (SQ20B) et une lignée HPV positive (SCC90). Des modèles de xénogreffes ont été obtenus à partir de ces deux lignées cellulaires et analysées du point de vue de l'hypoxie intratumorale.

1.2. Article

Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature

Elodie Hanns¹, Sylvie Job², Pierre Coliat^{1, 3}, Erwan Pencreach^{3, 4}, Meggy Suarez-Carmona⁵, Michael Herfs⁵, Sonia Ledrappier¹, Christine Macabre¹, Joseph Abecassis¹, Bohdan Wasyluk⁶⁻⁸, Alain C. Jung^{1*}

¹ Laboratoire de Biologie Tumorale, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, EA3430 de l'Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

² Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France

³ EA3430 de l'Université de Strasbourg, Bâtiment U113, Strasbourg, France

⁴ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

⁵ Laboratoire de Pathologie Expérimentale, GIGA-Cancer, Université de Liège, Liège, Belgium.

⁶ Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France.

⁷ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France.

⁸ Université de Strasbourg, Illkirch, France.

* Corresponding author: Dr Alain C. Jung, Laboratoire de Biologie Tumorale, Centre régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, 3 Rue de La Porte de l'Hôpital, F. 67065 STRASOURG CEDEX, France ; Tel: +33 (0)3 88 25 24 43 ; Fax: +33 (0)3 88 25 85 00; Email address: AJung@strasbourg.unicancer.fr

Key Words: Head and Neck squamous Cell Carcinoma; HPV; hypoxia; transcriptome; gene expression; immunohistochemistry

Novelty and Impact of the work: Although tumour hypoxia is an important prognostic factor in HNSCC, the tumour hypoxia status of HPV-related OSCC has not been unequivocally established. We have performed an unsupervised clustering analysis of transcriptomic data, complemented with gene expression assay and immunohistochemistry. All the results support the hypothesis that HPV-related OSCC have increased tumour angiogenesis and reduced hypoxia. Interestingly, HPV status affects cellular response to hypoxia. Low tumour hypoxia could contribute to improved prognosis of HPV-related OSCC.

Word count: 4982

Figures and table count: 5 figures; 1 table

Reference count: 50

Abstract

Human Papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) defines a subgroup of head and neck cancer patients with improved prognosis. Tumour hypoxia is frequently observed in head and squamous cell carcinoma and correlates with adverse prognosis. In order to address whether HPV-positive OSCC display a distinct hypoxia status as compared to their HPV-negative counterpart, we performed an unsupervised clustering analysis of transcriptomic data for a cohort of 98 HNSCC. We identified 3 hypoxia-related clusters and found that HPV-related OSCC segregate among the less hypoxic tumour clusters. We have validated these observations on an independent cohort of patients by measuring the expression of hypoxia-responsive genes (*HIF-1 α* ; *PHD1*, 2, and 3; *Glut1* and *Glut3*; *CAIX*) using quantitative real-time RT-PCR and immunohistochemistry (IHC) staining. Strikingly, HPV-related samples had a 3-fold higher number of neo-blood vessels than HPV-negative samples. This differential hypoxia status was reproduced in mouse xenografts. Tumours derived from HPV-positive cells had few hypoxic areas compared to HPV-negative cell tumour. HPV-positive and negative cells also responded differently to hypoxic stress, in terms of induction of HIF-1 α and of its target genes. In addition, HPV-negative cells formed confluent cultures in hypoxia, whereas HPV-positive cell cultures responded by induction of p53 protein and transcriptional activity, and cell death. Altogether, our observations support the hypothesis that HPV-related and -unrelated cells have distinct intrinsic abilities to adapt to hypoxic conditions, and that HPV-related OSCC display lower tumour hypoxia.

Introduction

Human Papillomavirus (HPV)-related tumours of the oropharynx are a distinct clinical subgroup of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) ([1-3](#)). One major concern about these tumours is that their incidence is rapidly increasing: they have been predicted to become the most prevalent HPV-dependent tumour burden by the end of this decade ([4](#)). HPV-positive oropharyngeal SCC (OSCC) have clinical, pathological and molecular features that are different from their HPV-negative counterpart ([1-3](#)). Numerous studies based on retrospective consecutive series as well as on prospective cohorts included in clinical trials have demonstrated that patients with HPV-related OSCC have a prolonged disease-free survival and overall survival (for a comprehensive review, see [1](#)) and references therein). These tumours are therefore thought to be both more sensitive to chemo- and radiation- therapies ([5-8](#)).

Several molecular and cellular features of HPV-positive HNSCC have been proposed to account for their prognosis. HPV tumours have a lower rate of global chromosomal aberrations and point mutations ([9-14](#)), which argue in favour of higher genomic stability as compared to HPV-negative lesions. These observations are likely to explain the less aggressive tumour behaviour. Experiments performed on both HPV-negative and HPV-positive head and neck cell lines have shown that the later are more sensitive to ionising radiation ([15](#), [16](#)). The majority of HPV-positive

OSCC harbour wild type *TP53* (9, 11, 14, 17, 18). Indeed, HPV-driven carcinogenesis depends on the degradation of p53, which is triggered by the HPV E6 oncoprotein (for a comprehensive review, see (3) and references therein). Remaining non-degraded p53 could therefore be involved in the induction of apoptosis upon irradiation. However, results from the analysis of the response of HPV-negative and positive cell lines suggest that the HPV-dependent radiosensitivity could also be independent of p53 (16). Differences of both the abundance and the composition of the immune system that infiltrates the tumour microenvironment of HPV-related OSCC could also explain the longer survival of these patients. Results from other laboratories and ours have shown that HPV-positive head and neck tumours are characterized by increased infiltration of CD8 T lymphocytes (19-22). In addition, a higher number of T regulatory lymphocytes (23), as well as PD-1 expressing lymphocytes have been observed in the stroma of HPV-positive tumours (24, 25), as compared to HPV-negative lesions. In all cases, the increase of these immune cells have been shown to correlate with improved prognosis. Finally, a retrospective analysis of the outcome of patients who were included in the DAHANCA 5 trial has suggested that HPV-positive OSCC might display a lower tumour hypoxia than HPV-negative tumours (26). This could be consistent with patients' prolonged survival, since hypoxia is a well-known poor prognostic factor in many cancers (27), and is involved in radioresistance in HNSCC (28). However, the hypoxia status of HPV-related compared to unrelated HNSCC is not clearly established, and the published results are inconsistent and discrepant (29-33).

Here we report the results of an unsupervised clustering analysis of transcriptomic data that indicate that HPV-positive OSCC express lower levels of hypoxia-related genes. We confirmed these observations on an independent cohort by both quantitative real-time RT-PCR and immunohistochemistry approaches. Interestingly, we observed that HPV-related tumours are characterized by increased tumour vascularisation. Similar results were obtained in a xenograft model with HPV-negative and positive cell lines and in vitro data show that the HPV-positive cells adapt poorly to hypoxic growth conditions. These results show that HPV-related OSCC have an altered adaptation to hypoxia, which could influence the evolution of these tumours and should be taken into account when considering reasons for their better prognosis.

Material and methods

Patients

The Affymetrix GeneChip analysis was performed on cohort of 98 patients that is described elsewhere (34). In short, all tumour specimens were collected, stored and used with the patients' informed consent. Patients from the North-East region of France underwent initial surgical resection of their localized HNSCC between 1989 and 2002 at the St Barbe Clinic (Strasbourg, France), followed by post-operative radiotherapy (89/98 cases) or chemo-radiotherapy (9/98 cases) at the Paul Strauss Cancer Center (Strasbourg, France) or the Civil Hospitals of Colmar or

Mulhouse. Hematoxylin-eosin slides of paraffin-embedded tumour specimens were examined by two pathologists. All of the tumours were squamous cell carcinomas. The median age of the patients was 58 years (35-82 years). The inclusion criteria were: tumour localization (hypopharynx, oropharynx, oral cavity or tongue), any size (Tx), any lymph node status (Nx), no clinically-evident distant metastases (M0) by conventional clinical and diagnostic radiological examinations (computed tomography). The patients did not have any previous or synchronous neoplasia. HPV detection was performed on tumour genomic DNA with the Multiplex HPV Genotyping kit (Multimetrix, Heidelberg, Germany; see (20) for details). In addition, the expression of HPV E6/E7 was assessed by both standard qRT-PCR (for HPV16 E6/E7 transcripts), and by using the real-time multiplex NASBA NucliSENS EasyQ HPV kit [bioMérieux SA, Marcy L'Etoile, France; for 5 HR-HPV (HPV16, 18, 31, 33 and 45)]. Samples were considered to be HPV positive only in case of co-positivity at the DNA and RNA levels, for a given HPV genotype. Results obtained from the data mining analysis of the transcriptomic data set were confirmed on a cohort of 88 patients. The demographics of these patients are described in more detail in Table 1. Patients from the North-East region of France underwent initial surgical resection and post-operative chemo- or chemoradiation therapy of their localized oropharyngeal tumours between 1990 and 2012 at the same hospitals (see above). Hematoxylin-eosin slides of paraffin-embedded tumour specimens were examined by two pathologists. All of the tumours were squamous cell carcinomas. The inclusion criteria for this validation cohort were: oropharyngeal tumour localization, any size (Tx), any lymph node status (Nx), no clinically-evident distant metastases (M0) by conventional clinical and diagnostic radiological examinations (computed tomography). The patients did not have any previous or synchronous neoplasia. The median age of the cohort was 57 years old (35-82 years). 19/88 patients were treated with surgery followed by radiation therapy, 14/88 were treated with surgery followed by chemoradiation, and 1/88 by surgery only. 34/88 patients were found to be HPV-positive according to the approach described above. 13/88 tumours (4 HPV-negative and 9 HPV-positive samples) were common with the group of samples used for the Affymetrix GeneChip analysis.

Tumour samples

Tumour samples were collected at the time of surgery. A fragment was taken near the advancing edge of the primary tumour (avoiding its necrotic centre), immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. The rest of the tumour was fixed in 6% buffered formalin and embedded in paraffin for histopathological analysis. Examination of sections adjacent to each tumour fragment showed that the percentage of tumour cells was over 70%. The TNM system of the UICC was used for tumour-node-metastasis staging (35).

Unsupervised clustering and statistical analysis

For unsupervised class discovery, we used the R package ConsensusClusterPlus (36). ANOVA models were used to identify differentially expressed genes. Associations between the unsupervised partitioning of the samples and bioclinical factors were evaluated with chi-squared or Fisher-exact tests when required. Genes involved in the hypoxia pathways were selected from the following Biocarta and Gene Ontology (GO) pathways Biocarta 391 - "Hypoxia-inducible factor in the cardiovascular system"; Biocarta 417 - "VEGF, Hypoxia and Angiogenesis"; Biocarta 453 - "Hypoxia and p53 in the cardiovascular system"; GO:0001666 - "Response to hypoxia"; GO:0070483 - "Detection of hypoxia"; GO:0071456 - "Cellular response to hypoxia".

Statistical and survival analyses were performed using MedCalc statistical software (<http://www.medcalc.be/>). Gene expression levels, CD105 staining measures and p53 transcriptional activity were compared by drawing Box-and-Whisker plots. Differences between subgroups were evaluated using one-way ANOVA and pairwise comparison with a Student-Newman-Keuls test. Distribution of IHC categories (Cat.I; Cat.II; Cat.III) among HPV-related and unrelated samples was analyzed with a Chi-square test. Differences were considered to be significant if $p < 0.05$.

Cell culture and reagents

The human head and neck squamous cell carcinoma (hHNSCC) SQ20B cell line was a kind gift from Prof. Rodrigez-Lafrasse (37). The SQ20B cell line originates from a HPV-negative laryngeal SCC. The hHNSCC SCC90 cell line (38) was a kind gift from Prof. Susan Gollin (University of Pittsburgh). SCC90 originate from a HPV16-positive oropharyngeal tumor, and bear a wild-type *TP53* (38). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, PAN Biotech GmbH, Dominique Dutscher, Brumath, France). Human SQ20B and SCC90 cells were maintained at 37 °C in normoxic (20% O₂) and hypoxic (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) conditions in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum.

Animals and tumour xenografts

Female athymic nude mice (*nu/nu*), 6 to 8 weeks old, were purchased from Charles River and maintained under pathogen-free conditions. The animal study was approved by the French Ethical Committee (AL/86/93/02/13 12/11/29) and performed under the supervision of authorized investigators. 5×10^6 cells were mixed with Matrigel, in a 1:1 proportion, for a final volume of 200 μ l, and heterotypic xenografted tumours were obtained by injecting cell suspensions subcutaneously into the flank of mice. Mice were observed daily for tumour growth.

Gene expression assays

Gene expression analysis was performed as described in (20). In short, total RNAs were extracted from 20 mg of frozen tissues, or from 5×10^5 cells, using RNeasy kits (Qiagen, France), according

to the manufacturer's instructions. The integrity of extracted RNA was verified on an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). cDNA was synthesised from total RNA with the GoScript Reverse Transcription System (Promega, France), and SyberGreen dye-based real-time quantitative PCR was performed on a LightCycler 480 thermocycler (Roche, France). The primer pairs were: HIF-1 α (5'-GAAAGCGCAAGTCCTCAAAG-3' and 5'-TGGGTAGGAGATGGAGATGC-3'); PHD1 (5'-AGCCCCTAAGTCAGGCTCTC-3' and 5'-AGTGGTAGAGGTGGCTGTGG-3'); PHD2 (5'-GAAAGCCATGGTTGCTTGTT-3' and 5'-TTGGGTTCAATGTCAGCAAA-3'); PHD3 (5'-AGATCGTAGGAACCCACACG-3' and 5'-CAGATTTTCAGAGCACGGTCA-3'); VEGF-A (5'-GAGCCTCTCTACCCCAGGTC-3' and 5'-TCCTGAATCTTCCAGGCAGT-3'); GLUT-1 (5'-AAGCTGCCCTGTGTTCAATTT-3' and 5'-CCAAATCGGCATCTTCTCAT-3'); NDRG1 (5'-ACAACCCTGAGATGGTGGAG-3' and 5'-TGTGGACCACTTCCACGTTA-3'); ANKRD37 (5'-GGTGGATGGTCTGAAGCATT-3' and 5'-AAACATCCTGCTGGTTGAGG-3'); GLUT-3 (QuantiTect Primer Assay QT00047124; Qiagen, France); CAIX (QuantiTect Primer Assay QT00011697; Qiagen, France). qRT-PCR data were analysed using the LightCycler 480 software. The expression levels of each gene were evaluated by normalisation to the average Ct values of 2 reference genes: *Ribosomal Protein Long P0 (RPLP0)* and *Ubiquitin B (UBB)*.

Western Blot

1.5x10⁵ SQ20B cells and 1.9x10⁵ SCC90 cells were harvested in Laemli buffer (Tris-HCL 6.25mM, DTE 1.5mg/ml, 1% SDS, pH6.8) and proteins were analyzed by SDS-PAGE according to standard methods. Proteins were detected with the following antibody dilutions: monoclonal mouse anti-HIF-1 α (54/ HIF-1 α clone; Ref 610959, 1:1000; BD Biosciences, France), monoclonal mouse DO1 anti-p53 (sc126; 1:200; Santa Cruz Biotechnologies, CliniSciences, Montrouge, France), mouse monoclonal anti- β actin (3G4-F9 clone; 1:15 000; Abnova, Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France), ECL sheep anti-mouse IgG, HRP-conjugated antibody (1:10000; GE Healthcare, Saclay, France). Proteins were revealed with the ECL western blotting analysis system (GE Healthcare, Saclay, France) according to the manufacturer's instructions. Quantitation of the signals was performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) ([39](#), [40](#)).

Immunohistochemistry (IHC)

Human tumours: The expression of CAIX was evaluated by IHC using a Ventana Autostainer Automat (Ventana Medical Systems). Slides prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tumour specimens. Twenty-four HPV-negative and 29 HPV-positive paraffin-embedded specimens, corresponding to tumour samples that are adjacent to the samples used in the qRT-PCR analysis, were available. Slides were stained using a polyclonal rabbit anti-CAIX antibody (Ab15086, Abcam) according to the manufacturers' instructions. Signals were revealed with the ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems), according to the manufacturer's instructions. All images were acquired on a Nikon Eclipse 80i microscope with 20X

or 40X objectives. Contrast was uniformly adjusted on all images with Photoshop (Adobe) software. Immunohistochemical analysis of CD105 was performed on tissue specimens as previously described ([41](#)). In short, anti-CD105 antibodies (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-Podoplanin (Clone D2-40, Dako, Glostrup, Denmark) were used for the primary reaction. The density of blood (CD105+) vessels (expressed as number of vessels/mm²) in the tumour microenvironment was quantified by computerized counting (FSX 100 computerized image analysis system, Olympus, Hamburg, Germany), verified by manual counting and supervised by a pathologist.

Xenografts: xenografted tumours formed by each one of the cell lines were excised 1 month after implantation (tumour volume of almost 500 mm³). Tumour tissue was fixed a 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Paraffin embedded 4 µm tissue sections from xenografts were prepared. Sections were mounted on positively charged Superfrost Plus slides (Kindler), and dried overnight in an incubation chamber at 37°C. The sections were deparaffinized by xylene, rehydrated, immersed in citrate solution, and boiled for 10 minutes using microwaves. Paraffin embedded sections were washed in PBS triton (0.1% Triton X-100 in PBS) and incubated with 1% bovine serum albumin in PBS triton for 30 minutes, washed with PBS triton and incubated overnight at 4°C with anti-HIF-1 (H1alpha67 Novus), and anti-CAIX (ab15086 Abcam) antibodies. The sections were then incubated with the appropriate conjugated secondary antibody (Alexa 488, Cy3 1/500e) for 60 minutes at room temperature in the dark and with DAPI (1/30000) for 10 minutes. The slides were mounted using Aqua Polymount (Polysciences Inc.). Fluorescence images were captured using a fluorescence microscope axioimager Z2 (Zeiss industries). All images were obtained using the same variables (exposure time, contrast, and brightness). Entire images were further processed to clean the background with Adobe Photoshop software (Adobe Systems).

p53 transcriptional assay

Using the Lipofectamine 1000 transfection system, 1.9×10^5 SCC90 cells were transfected with 2 µg of pG13-luc plasmid (kind gift of Dr. Arnold Levine) or pG15-Luc plasmid, an 2 µg of RSV-LacZ vector (used as a transfection efficiency control; ([42](#))). Cells were harvested in lysis buffer (25 mM Tris-Phosphate pH 7.8; 2 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% Glycerol; 1% Triton X-100), and luciferase activity was measured by mixing 50 µl of protein extract with Luciferase Assay Buffer (265 µM ATP; 235 µM Luciferin; 135 µM Coenzyme A; 20 mM Tricine ; 1.07 mM MgCl₂; 2.70 mM MgSO₄; 0.1 mM EDTA; 33.3 mM DTT) using a Synergy HT microplate reader (Biotech) and the Gene5 software, according to the manufacturer instructions. The luminescence levels were normalized to the β-galactosidase activity from the RSV-LacZ control plasmid that was measured with an ONPG colorimetric reaction as described in ([43](#)).

Results

An unsupervised analysis of HNSCC transcriptomic data reveals that HPV-positive tumours express lower levels of hypoxia-related genes.

We previously performed a comprehensive genome-wide analysis of mRNA expression of a cohort of 98 HNSCC using an Affymetrix GeneChip approach (34). This cohort was composed of 90 HPV-negative and 8 HPV-related HNSCC. To determine whether there are subgroups related to hypoxia, a consensus-unsupervised analysis was performed on these 98 HNSCC using the 210 genes of the GeneChip involved in hypoxia pathways (Biocarta and Gene Ontology databases). Three robust subgroups were identified, as seen on the co-classification matrix [Figure 1A; Cluster.1 (N=43); Cluster.2 (N=22); Cluster.3 (N=33)]. There are distinct hypoxia signatures in the three subgroups (Figure 1B). The majority of the hypoxia-related genes are upregulated in Cluster.1, whereas the same set of genes is downregulated in Cluster.2. Cluster.3 has an intermediate hypoxia signature. These results suggest that Cluster.1 is composed of hypoxic tumours, in contrast to Cluster.2. Interestingly, there are no HPV-related HNSCC in the hypoxia Cluster.1 (Fisher-exact p-value = 8.65e-03, Figure 1C). HPV-positive tumours were found in Cluster.2 (4/8) and Cluster.3 (4/8). Altogether these results suggest that HPV-related HNSCCs are less hypoxic than the HPV-negative tumours.

HPV-related oropharyngeal lesions express lower level of hypoxia-responsive genes and have increased tumour neo-angiogenesis.

In order to validate the unsupervised analysis, we measured expression of hypoxia-responsive genes by quantitative real-time RT-PCR on a newly composed cohort of 88 fresh-frozen HNSCC samples. The demographics of these patients are listed in Table 1. The cohort is composed of 54 HPV-unrelated and 34 HPV-related OSCC (tonsils and base of tongue). The majority of these tumours were not previously analysed (only 4/54 HPV-negative and 8/34 HPV-related samples were in the Affymetrix GeneChip group). The samples were harvested at the time of surgery, prior to post-operative radio- or chemo-radiotherapy. The expression at the RNA level of several hypoxia related genes (*Hypoxia Inducible Factor-1 α* (*HIF-1 α*), *Prolyl Hydroxylases 1, 2 and 3* (*PHD1, 2 and 3*), *Glucose Transporters 1 and 3* (*Glut1 and 3*), and *Vascular Endothelium Growth Factor-A* (*VEGF-A*)) was assessed by qRT-PCR. HPV-positive tumours were found to express lower levels of *HIF-1 α* (p=0.002), *PHD3* (p=0.002), *Glut1* (p<0.001) and *Glut3* (p=0.023) (Figure 2A).

The hypoxia status was also assessed by immunohistostaining for Carbonic Anhydrase IX (CAIX) of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumour specimens from the cohort of 88 patients (24/54 HPV-negative vs. 29/34 HPV-positive HNSCC). CAIX staining was consistently observed at the plasma membranes of a highly variable proportion of carcinoma cells (Figure 2B, a-c; d-f show magnified views of the insets). CAIX expression was quantified by evaluating the proportion of carcinoma cells that were stained. Three different categories were established: weak staining

[<20% of CAIX-positive carcinoma cells (IHC Category I; N=34)]; intermediate staining [20%-30% positive (IHC Category II; N=8)]; and strong staining [>30% positive (IHC Category III; N=11)]. In order to validate this approach, *CAIX* gene expression was measured by qRT-PCR of RNA from the same samples and stratified according to the IHC categories. *CAIX* RNA expression was found to progressively increase from IHC Categories I to III in a statistically significant manner ($p < 0.05$; Suppl. Figure 1). We then analysed the distribution of HPV-related and unrelated OSCC amongst the IHC categories. A higher proportion of the HPV-positive OSCCs were found in the weaker staining categories (19/29 in I, 7/24 II, 3/29 III) compared to the unrelated OSCC (15/24 in I, 1/24 II, 8/24 III). The difference is statistically significant (chi-square p -value=0.032), showing that HPV-related OSCC are “less hypoxic” than their HPV-negative counterparts.

To evaluate the impact of vascular density on hypoxic status of tumours, angiogenesis was assessed by CD105 staining of HPV-positive (N=27) and HPV-negative (N=22) FFPE tumour specimens (brown staining; Figure 2D). The number of blood vessels per surface area (mm^2) was evaluated by automated measurement of CD105 staining. There is a 3-fold higher mean number of vessels in the HPV-related ($34 \text{ vessels}/\text{mm}^2$) as compared to HPV-negative ($10 \text{ vessels}/\text{mm}^2$) OSCC (Figure 2E). This difference is statistically significant (ANOVA p -value <0.05).

HPV-related HNSCC xenograft models show reduced hypoxia status.

Tumour-derived HPV-positive and -negative cell lines might be expected to reflect the hypoxia-related properties of tumour cells in human cancers and be useful to dissect the molecular mechanism involved. In order to identify suitable cancer cell line models to study HNSCC tumour hypoxia, the HPV-negative SQ20B and the HPV-positive SCC90 cell lines were heterotopically xenografted into the flank of nude mice. Tumours were harvested 60 days after implantation, fixed and embedded in paraffin, and the expression of both *CAIX* and *HIF-1 α* was assessed by fluorescent immunohistochemistry. Representative examples are shown in Figure 3. Remarkable differences were observed between SQ20B and SCC90 derived tumours. SQ20B tumours were strongly and extensively stained for *CAIX* (Figure 3A). The majority of the carcinoma cells were *CAIX*-positive, and *HIF-1 α* expression could be observed in some nuclei (Figure 3A). In contrast, SCC90 tumours were weakly stained for *CAIX*, in some rare small groups of cells, and *HIF-1 α* expression was not observed (Figure 3B). These observations suggest that SQ20B and SCC90 cell lines mimic the adaptation to hypoxia of HPV-negative and HPV-related human OSCC, respectively.

SQ20B and SCC90 display a different intrinsic ability to adapt to hypoxia.

Based on these observations, we decided to study how SCC90 and SQ20B cells adapt to hypoxic growth conditions. They were initially adapted to hypoxic growth conditions by incubation in 3% oxygen for 24h, and then incubated in 1% oxygen. Cells were harvested at different times (4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 30h) and protein extracts and total RNA were prepared. Normoxic conditions (21%

oxygen) were used for the negative control. HIF-1 α expression was evaluated by a western blot analysis of whole protein extracts. Actin was used as a loading control (Figure 4, representative western blots are shown in A, and quantification of up to 4 independent experiments in B). HIF-1 α was barely detectable in normoxia, but was induced differently in the two cell lines in hypoxia. In SQ20B, HIF-1 α levels increased strongly (~6-fold) in 3% oxygen, and continued to increase (12-14 fold) in 1% oxygen up to 8 hours, and then progressively decreased from 12h to 30h. In contrast, in SCC90 cells, HIF-1 α increased modestly (~1-fold) in 3% oxygen, attained a maximum (~8-fold) after 4h in 1% oxygen, and thereafter progressively decreased. Expression of hypoxia-inducible genes was measured at the RNA level by qRT-PCR. This included key *HIF-1 α* target genes (*PHD-2*, *PHD-3*, *GLUT-1* and *VEGF-A*) and others that are induced by hypoxia in head and neck tumours (*N-myc downstream regulated 1 (NDRG1)* and *ankyrin repeat domain 37 (ANKRD37)*). Gene expression was measured in 3 independent experiments, and normalized to levels in normoxia. The induction profiles of the HIF-1 α target genes (*PHD-2*, *PHD-3*, *GLUT-1* and *VEGF-A*) and the other hypoxia-regulated genes (*NDRG* and *ANKRD37*) were different in the two cell lines (Figure 4C). In general, the HIF-1 α target genes were less induced and plateaued earlier in SQ20B than in SCC90. *NDRG1* and *ANKRD37* were also less induced at the early time points in SQ20B. These results indicate that the hypoxia response pathways are different in the HPV-positive and negative cell lines.

When grown in hypoxic conditions, SCC90 cultures undergo important cell death, whereas SQ20B cell culture reach confluency (data not shown). *TP53* could account for the differential response of the two cell lines to hypoxia, since *TP53* is wild type in SCC90 and its activity is expected to be sensitive to hypoxia. p53 transcriptional activity was assessed by transfecting SCC90 cells with the pG13-Luc reporter (which has the luciferase reporter gene under the control of p53-responsive elements). Cells were cultured in hypoxia, harvested at time points similar to the previous experiments (see above), and luciferase activity was measured. pG15-Luc (which has mutated p53-response elements) was used as a negative control. The results were normalized to pG13-Luc activity transfected in SCC90 and grown in normoxia. pG13-Luc reporter activity increased about 4-fold after 8 hours in 1% oxygen (Figure 5A). Control pG15-Luc reporter activity was weak and hypoxia-independent under the same conditions. p53 protein levels paralleled the increase in activity (Figure 5B). These results show that p53 activity and protein levels are sensitive to hypoxia in the HPV-positive cell line.

Discussion

We have shown that HPV-relevant OSCCs differs from HPV negative OSCCs in their hypoxic signature, and that these differences are reflected in corresponding cell lines. These results contribute to distinguishing these two groups of tumours, may help account for their different prognosis and could be useful clinically in the future.

Others and we have compared HPV-relevant and HPV-negative OSCC. We have reported that HPV-related OSCC (HPV DNA and RNA-positive tumours), have a distinct gene expression profile as compared to their HPV-negative and HPV DNA-positive RNA-negative counterpart ([12](#), [34](#)). Analysis of signalling pathways that are differentially activated in HPV-related tumours led us to show that the microenvironment of HPV-positive tumours is heavily infiltrated with CD8+ T lymphocytes, which is likely to be involved in the improved prognosis of these patients ([20](#)). We now report that HPV-related tumours display a distinct expression profile of hypoxia-related genes. Unsupervised clustering analysis of the original core dataset ([34](#)) uncovered 3 distinct clusters of patients. Hypoxia-responsive genes are upregulated in Cluster.1 and downregulated in Cluster.2. Cluster.3 is less clearly defined. Importantly, none of the 8 HPV-positive OSCCs are found in hypoxic Cluster.1, suggesting that oxygen delivery is increased in HPV-related head and neck tumours. We validated these observations by measuring the expression of hypoxia-responsive genes in an independent and larger cohort. *HIF-1 α* and some of its target genes, *PHD3*, *Glut1* and *Glut3*, are weakly expressed in HPV-positive OSCC. Differential expression of the *HIF-1 α* gene may contribute to the upregulation of its target genes, although the hypoxia response is thought to mainly involve HIF-1 α protein stabilisation.

Results from other studies contrast and complement ours. Jo and collaborators ([31](#)) reported an increase of *VEGF-A* expression and no change in *HIF-1 α* , in HPV-related tumours, whereas we found no change in *VEGF-A* and a decrease in *HIF1 α* . The discrepancies may arise from their: i) use of viral DNA to determine HPV status, rather than both viral DNA and RNA; ii) comparison of HPV-positive OSCC with HPV-negative non-oropharyngeal tumours; iii) use of a limited number of patients (14 HPV-positive vs. 10 HPV-negative samples). In agreement with our results, two other studies did not detect changes in VEGF-A, at the protein level by IHC, between HPV-positive and HPV-negative tumours ([30](#), [33](#)). However, these 2 studies included HNSCC of various localisations, and in both cases HPV-related lesions were found to be more frequent in the oropharynx. Brockton et al ([29](#)) measured stromal CAIX expression by quantitative fluorescent IHC in order to monitor hypoxia in a cohort of 22 head and neck tumours. They found that high CAIX expression correlated with poor prognosis, however, the HPV status of the patients was not reported.

Various mechanisms could account for the differences in expression of hypoxia related genes in HPV-related and -unrelated OSCC. The differences could reflect the levels and availability of oxygen in the tumours, but also the way the tumour cells respond to ambient conditions. Mortensen et al ([32](#)) measured hypoxia levels with a tracer (¹⁸F-fluoroazomycin arabinoside, FAZA) and positron emission topography/computed tomography (PET/CT) in 12 p16-positive (presumably HPV-related) and 13 p16-negative (presumably HPV-negative) patients. They found no significant difference in FAZA uptake between these two groups of tumours. In contrast, we

observed differences in expression of hypoxia related genes and blood vessel density. This could reflect how HPV-relevant and HPV negative tumour cells respond to oxygen levels (see below), and/or differences in oxygen levels in these two categories of tumours. However, other parameters could contribute to the observations, such as the cohort sizes [N=25 ([32](#)) vs. N=53 (our study)], and the way HPV-positivity is determined [p16 IHC ([32](#)) vs. HPV DNA and RNA detection (our study)]. HPV testing by p16 IHC alone is sensitive but lacks specificity ([44](#)).

Decreased expression of hypoxia inducible genes in HPV-related OSCC could reflect better tissue oxygenation. The 3-fold increase of CD105 staining in HPV-positive tumours favours this hypothesis. However, the vessels in tumours are usually tortuous, abnormal and non-functional. A more detailed analysis of the structure of the neo blood vessels the HPV-positive OSCC is required to address this possibility. HPV oncoproteins have been shown to enhance HIF-1 α protein accumulation and HIF-1 α -mediated transcription, resulting in increased VEGF expression and tumour angiogenesis in cervical cancer models ([45](#), [46](#)). The increased tumour vascularisation we observe in HPV-related OSCC is consistent with these reports. Intriguingly, we and others show that VEGF-A is expressed at similar levels in HPV-negative and -positive HNSCC. Further studies are required to elucidate the molecular mechanisms that promote increased neo-vascularisation in HPV-driven pathogenesis. An intriguing possibility is that the different mechanisms of transformation in HPV-relevant and negative OSCC affect how the tumours adapt to limiting oxygen supplies and evolve to the different “hypoxic states” that we detect in patient samples.

Our cell line studies suggest that cell intrinsic properties may also contribute to the different hypoxia signatures of HPV-relevant and negative OSCC. We initially showed that these lines could be relevant models for OSCC, since tumours produced in nude mouse xenografted with HPV-positive SCC90 expressed lower levels of CAIX and HIF1 α than SQ20B, similar to HPV-related and HPV-negative OSCC. The two cell-lines responded differently to reduced oxygen tension. HIF-1 α was more highly and robustly induced in HPV-negative SQ20B genes, in contrast to the of HIF-1 target genes. The differences were particularly striking for late times for PHD3 and GLUT1, which are most different in the human tumours. All of the hypoxia related genes we tested were more highly induced at early time points in the HPV-positive cell line. We interpret these results in the sense that the hypoxia-signalling pathway is more dynamic and adaptable (*i.e.* normal) in the HPV-positive cellular background. HIF-1 α is induced to lower levels in the HPV-positive cells, as would be expected from the more robust induction of its negative regulator PHD3. The difference could be due, in part, to p53, which is responsive to hypoxia. SCC90 express wild type p53 that can be stabilised and activated by hypoxia (as might be expected from other studies ([47](#), [48](#))). However, p53 target genes known to be involved in cell cycle arrest (p21), in the regulation of apoptosis (Bax, PUMA, NOXA) or of autophagy [DNA-damage regulated autophagy modulator 1 (DRAM1)], were not upregulated under these conditions (data not shown). The precise nature of the cell death

we observe (data not shown), as well as the molecular mechanisms that govern it remain to be elucidated. We believe that SCC90 and SQ20B cell lines are suitable models to further investigate the respective role of HPV, HIF-1 α and p53 in the adaptation to hypoxic conditions. Interestingly, p53 has been implicated in the negative regulation of glycolysis through TIGAR gene induction (49), therefore differences in *TP53* gene status between HPV-positive and HPV-negative tumours may account for impaired metabolic adaptation of HPV-positive tumor cells. It will be of high interest to determine how differential cell behavior contributes to the differential expression of hypoxia-related genes in HPV-related OSCC.

One key question is the importance of “hypoxia status” to the better prognosis of HPV-relevant OSCC. Increased vascularisation of HPV-relevant OSCC is consistent with clinical evidence that shows that HPV-positive OSCC is more radio-chemosensitive (5, 7, 8). Ionising-radiation efficacy and access of chemotherapeutic drugs to carcinoma cells depend on tissue oxygen concentration and tumour vascularisation, respectively. Increased vascularisation of HPV-related HNSCC is also consistent with the clinical observation that these patients do not seem to benefit from the concomitant administration of conventional fractionated radiotherapy and nimorazole, which is a hypoxic-specific radiosensitizer (50). In this clinical trial, it was shown that nimorazole procures an 18% gain of loco-regional control to HPV-negative patient concomitantly treated with ionising radiations with respect to the placebo, whereas no differences are observed between the 2 arms of treatment in the HPV-related population.

Our study adds a new dimension to understanding the difference in prognosis of HPV-related and negative OSCC, and underscores the necessity to better understand how different mechanisms of transformation alter the hypoxic response.

Acknowledgments

This work is part of the Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT) program from the Ligue Nationale Contre le Cancer. We are grateful to Dr. Aurélien de Reynies, Pr. Jacqueline Godet and Pr. Jacqueline Metral for their invaluable contribution to this project. Tumor samples were provided by Dr. Guy Bronner. Financial support for this study was provided by the Institut National du Cancer (INCa grant PLBio2011), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Strasbourg. The authors disclose no conflict of interest.

References

1. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, Castellsague X. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F34-54.
2. Kostareli E, Holzinger D, Hess J. New Concepts for Translational Head and Neck Oncology: Lessons from HPV-Related Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Frontiers in oncology*. 2012;2:36.
3. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews*. 2011 Jan;11(1):9-22.
4. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 10;29(32):4294-4301.
5. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2010 Jul 1;363(1):24-35.
6. Chen AM, Li J, Beckett LA, Zhara T, Farwell G, Lau DH, Gandour-Edwards R, Vaughan AT, Purdy JA. Differential response rates to irradiation among patients with human papillomavirus positive and negative oropharyngeal cancer. *The Laryngoscope*. 2012 Jan;123(1):152-157.
7. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008 Feb 20;100(4):261-269.
8. Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, Urba SG, Eisbruch A, Teknos TN, Chepeha DB, Prince ME, Tsien CI, et al. Chemosselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 1;26(19):3138-3146.
9. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, Fakhry C, Xie TX, Zhang J, Wang J, Zhang N, El-Naggar AK, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science (New York, NY)*. 2011 Aug 26;333(6046):1154-1157.
10. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Jul 7;96(13):998-1006.
11. Gaykalova DA, Mambo E, Choudhary A, Houghton J, Buddavarapu K, Sanford T, Darden W, Adai A, Hadd A, Latham G, Danilova LV, Bishop J, et al. Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS one*. 2014;9(3):e93102.
12. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reynies A, Rickman D, Thomas E, Abecassis J, Clavel C, Wasylyk B. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV)

infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*. 2010 Apr 15 2010;126(8):1882-1894.

13. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SM, Stenner M, Huebbers CU, Weissenborn SJ, Wedemeyer I, Preuss SF, Straetmans JM, Manni JJ, Hopman AH, et al. Genetic Signatures of HPV-related and Unrelated Oropharyngeal Carcinoma and Their Prognostic Implications. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 1;15(5):1779-1786.

14. Rizzo G, Black M, Mymryk J, Barrett J, Nichols A. Defining the genomic landscape of head and neck cancers through next-generation sequencing. *Oral diseases*. 2014 Apr 12.

15. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelutz AJ, Lambert PF, Harari PM. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer research*. 2013 Aug 1;73(15):4791-4800.

16. Rieckmann T, Tribius S, Grob TJ, Meyer F, Busch CJ, Petersen C, Dikomey E, Kriegs M. HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiother Oncol*. 2013 May;107(2):242-246.

17. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5630-5636.

18. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 15;14(2):366-369.

19. Balermipas P, Rodel F, Weiss C, Rodel C, Fokas E. Tumor-infiltrating lymphocytes favor the response to chemoradiotherapy of head and neck cancer. *Oncoimmunology*. 2014 Jan 1;3(1):e27403.

20. Jung AC, Guihard S, Krugell S, Ledrappier S, Brochot A, Dalstein V, Job S, de Reynies A, Noel G, Wasylyk B, Clavel C, Abecassis J. CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis. *International journal of cancer*. 2013 Jan 15;132(2):E26-36.

21. Wansom D, Light E, Thomas D, Worden F, Prince M, Urba S, Chepeha D, Kumar B, Cordell K, Eisbruch A, Taylor J, Moyer J, et al. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16-associated oropharyngeal cancer. *The Laryngoscope*. 2012 Jan;122(1):121-127.

22. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, Webb A, Hampton C, Patel NN, Randall CJ, Cox HJ, Jogai S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British journal of cancer*. 2014 Jan 21;110(2):489-500.

23. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreya O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):465-472.

24. Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, Levionnois E, Nizard M, Si-Mohamed A, Besnier N, Gey A, Rotem-Yehudar R, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer research*. 2013 Jan 1;73(1):128-138.
25. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B, Bruno TC, Richmon JD, Wang H, Bishop JA, Chen L, Drake CG, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2013 Mar 15;73(6):1733-1741.
26. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. HPV-associated p16-expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol*. 2010 Jan;94(1):30-35.
27. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Seminars in oncology*. 2001 Apr;28(2 Suppl 8):29-35.
28. Nordmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol*. 2005 Oct;77(1):18-24.
29. Brockton N, Dort J, Lau H, Hao D, Brar S, Klimowicz A, Petrillo S, Diaz R, Doll C, Magliocco A. High stromal carbonic anhydrase IX expression is associated with decreased survival in P16-negative head-and-neck tumors. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011 May 1;80(1):249-257.
30. Choi HG, Kim JS, Kim KH, Kim KH, Sung MW, Choe JY, Kim JE, Jung YH. Expression of hypoxic signaling markers in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2014 Mar 14.
31. Jo S, Juhasz A, Zhang K, Ruel C, Loera S, Wilczynski SP, Yen Y, Liu X, Ellenhorn J, Lim D, Paz B, Somlo G, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinomas treated in a prospective phase II clinical trial. *Anticancer Res*. 2009 May;29(5):1467-1474.
32. Mortensen LS, Johansen J, Kallehauge J, Primdahl H, Busk M, Lassen P, Alsner J, Sorensen BS, Toustrup K, Jakobsen S, Petersen J, Petersen H, et al. FAZA PET/CT hypoxia imaging in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy: results from the DAHANCA 24 trial. *Radiother Oncol*. 2012 Oct;105(1):14-20.
33. Troy JD, Weissfeld JL, Youk AO, Thomas S, Wang L, Grandis JR. Expression of EGFR, VEGF, and NOTCH1 suggest differences in tumor angiogenesis in HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Head and neck pathology*. 2013 Dec;7(4):344-355.

34. Rickman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasylyk C, Muller D, Abecassis J, Wasylyk B. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene*. 2008 Nov 20;27(51):6607-6622.
35. Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 1997 Nov 1;80(9):1803-1804.
36. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, Wu B, Pasqualucci L, Neuberg D, Aguiar RC, Dal Cin P, Ladd C, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1851-1861.
37. Maalouf M, Alphonse G, Coliaux A, Beuve M, Trajkovic-Bodennec S, Battiston-Montagne P, Testard I, Chapet O, Bajard M, Taucher-Scholz G, Fournier C, Rodriguez-Lafrasse C. Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009 May 1;74(1):200-209.
38. Ragin CC, Reshmi SC, Gollin SM. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *International journal of cancer*. 2004 Jul 10;110(5):701-709.
39. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 2004;11(7):36-42
40. Rasband WS. ImageJ. Bethesda, Bethesda, Maryland, USA, : National Institutes of Health; 1997-2008.
41. Suarez-Carmona M, Hubert P, Gonzalez A, Duray A, Roncarati P, Ercicum C, Boniver J, Castronovo V, Noel A, Saussez S, Peulen O, Delvenne P, et al. DeltaNp63 isoform-mediated beta-defensin family up-regulation is associated with (lymph)angiogenesis and poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Apr 15;5(7):1856-1868.
42. Kozarsky KF, McKinley DR, Austin LL, Raper SE, Stratford-Perricaudet LD, Wilson JM. In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenoviruses. *The Journal of biological chemistry*. 1994 May 6;269(18):13695-13702.
43. Guihard S, Ramolu L, Macabre C, Wasylyk B, Noel G, Abecassis J, Jung AC. The NEDD8 conjugation pathway regulates p53 transcriptional activity and head and neck cancer cell sensitivity to ionizing radiation. *International journal of oncology*. 2012 Aug 7.
44. Wasylyk B, Abecassis J, Jung AC. Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust? *Oral oncology*. 2013 Oct;49(10):e33-37.
45. Bodily JM, Mehta KP, Laimins LA. Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. *Cancer research*. 2011 Feb 1;71(3):1187-1195. PubMed PMID: 21148070.

46. Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2007 May 1;13(9):2568-2576.
47. Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer research.* 1999 Dec 15;59(24):6046-6051.
48. Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M, Giaccia A. Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Molecular and cellular biology.* 2001 Feb;21(4):1297-1310.
49. Madan E, Gogna R, Bhatt M, Pati U, Kuppusamy P, Mahdi AA. Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget.* 2011 Dec;2(12):948-957.
50. Lassen P, Eriksen JG, Krogdahl A, Therkildsen MH, Ulhøi BP, Overgaard M, Specht L, Andersen E, Johansen J, Andersen LJ, Grau C, Overgaard J. The influence of HPV-associated p16-expression on accelerated fractionated radiotherapy in head and neck cancer: evaluation of the randomised DAHANCA 6&7 trial. *Radiother Oncol.* 2011 Jul;100(1):49-55.

Tables

Table 1: Detailed demographics and clinical features of a cohort of 88 squamous cell carcinoma of the oropharynx. This cohort is constituted of 34 HPV-positive and 54 HPV-negative OSCC.

Figure legends

Figure 1: A. Consensus unsupervised analysis of 98 HNSCC (90 HPV-negative and 8 HPV-positive) samples based on the expression of 210 hypoxia-related genes. Three distinct clusters of patients are uncovered by this analysis. B. Heatmap of the expression of hypoxia-related genes in the 3 clusters: 3 distinct hypoxia signatures are found, with the majority of the hypoxia-related genes being upregulated in Cluster.1, and the majority of the same genes being downregulated in Cluster.2. C. Graphical representation and statistical analysis of the distribution of HPV-related and unrelated samples amongst the 3 clusters. No HPV-positive samples are found in hypoxic Cluster.1 (Chi-square; $p=8.65e-03$).

Figure 2: A. Graphical representation and statistical analysis of the expression of the *HIF-1 α* , *PHD1*, *PHD2*, *PHD3*, *Glut1*, *Glut3* and *VEGF-A* genes in 54 HPV-negative and 34 HPV-positive tumours of the oropharynx. The expression levels of *HIF-1 α* (one-way ANOVA, $p=0.002$), *PHD3* (one-way ANOVA, $p=0.002$), *Glut1* (one-way ANOVA, $p<0.001$) and *Glut3* (one-way ANOVA, $p=0.023$) were found to be significantly lower in HPV-related tumours. B. Micrographs of

immunohistochemistry (IHC) staining of CAIX protein expression in formalin-fixed paraffin-embedded HNSCC tumour specimens. Representative examples are shown of IHC category I (a; <20% of CAIX-positive carcinoma cells), IHC category II (b; 20%-30% of CAIX-positive carcinoma cells) and IHC category III (c; >30% of CAIX-positive carcinoma cells). Magnifications of insets of a, b and c are shown in d, e and f respectively. C. Graphical representation and statistical analysis of the distribution of HPV-related (N=29) and HPV-unrelated (N=24) among IHC categories I, II and III. These differences were statistically significant (Chi-square; $p=0.032$). D. Micrographs of IHC staining of the CD105 protein. Two examples of HPV-negative (upper panels) and HPV-positive panels (lower panels) are shown. Quantification of the number of CD105-positive vessels is indicated in each case. E. Graphical representation and statistical analysis of the CD105-positive vessels quantification in HPV-negative (N=22) and HPV-positive (N=27) tumours of the oropharynx. HPV-related OSCC have increased tumour neovascularisation (one-way ANOVA; $p<0.05$).

Figure 3: Micrographs of fluorescent IHC staining of heterotopic xenografts obtained after injection of SQ20B (HPV-negative laryngeal cell line; A) and SCC90 (HPV-positive oropharyngeal cell line; B) into the flank of immunocompromised athymic nude mice. IHC staining of CAIX (upper left panel), HIF-1 α (upper right panel), DAPI staining (lower left panel) and a merge of the 3 (lower right panel) are shown for each cell line.

Figure 4: A. Western blot analysis of the expression of HIF-1 α in SQ20B (upper panels) and SCC90 (lower panels) cell lines grown in normoxic (20% O₂) and hypoxic (3% and 1% O₂) conditions. Total protein extracts were prepared 4h, 6h, 8h, 12h, 24h and 30h after the onset of hypoxia. Blots were probed with an anti-actin antibody as a loading control. B. Graphical representation of HIF-1 α western blot quantification. Mean signals were calculated from 4 independent experiments. SQ20B cells show higher and prolonged HIF-1 α expression during hypoxia as compared to SCC90 cells. C. Graphical representation and statistical analysis of the expression the *PHD2*, *PHD3*, *GLUT1*, *VEGF-A*, *NDRG1* and *ANKRD37* genes during hypoxia. Mean gene expression levels were calculated from 3 independent experiments and normalized to gene expression levels observed in normoxic conditions, which were set to a value of 1. Gene expression levels in hypoxia that are significantly different from those in normoxia are indicated with an asterisk (Student-Newman-Keuls p -value<0.05).

Figure 5: A. Graphical representation and statistical analysis of p53 transcriptional activity in SCC90 cells. SCC90 cells were transfected with the pG13-Luc reporter construct, protein extracts were harvested at different time points (4h, 6h, 12h, 24h, 30h) in hypoxia, and p53 transcriptional activity was evaluated with a Luciferase assay. Mean p53 transcriptional activity was calculated from 3 independent experiments. Results that were found to be statistically different in a paired-

wise comparison are shown with an asterisk (Student-Newman-Keuls p -value <0.05). B. Western blot analysis of the expression of p53 in SCC90 cells grown in normoxic (21% O₂) and hypoxic conditions (3% and 1% O₂). Whole protein extracts were harvested 4h, 6h, 8h, 12h, 24h and 30h after the onset of hypoxia. Blots were probed with an anti-actin antibody as a loading control.

Table 1

	HPV-positive patients N=34	HPV-negative patients N=54
<u>Gender :</u>		
Male	22	46
Female	12	8
<u>Age :</u>		
<57 years old	15	24
≥57 years old	19	30
<u>Tobacco smoking:</u>		
No	9	4
Yes	23	39
NA	2	11
<u>Alcohol drinking:</u>		
No	9	5
Yes	23	39
NA	2	10
<u>Pathological lymph node staging (pN):</u>		
N0	5	9
N1	7	6
N2	20	31
N3	2	5
NA	/	3
<u>Pathological tumour size staging (pT):</u>		
T0	4	3
T1	16	28
T2	13	19
T3	1	3
NA	/	1
<u>Tumour stage</u>		
Stage I	0	2
Stage II	1	6
Stage III	11	11
Stage IV	22	33
NA	/	2
<u>Tumour histology:</u>		
Well differentiated	0	10
Moderately differentiated	18	32
Poorly differentiated	15	9
Non differentiated	1	0
NA	/	3
<u>Treatment:</u>		
Surgery	1	7
Surgery + Radiotherapy	19	37
Surgery + Chemoradiotherapy	14	10

Figure 1

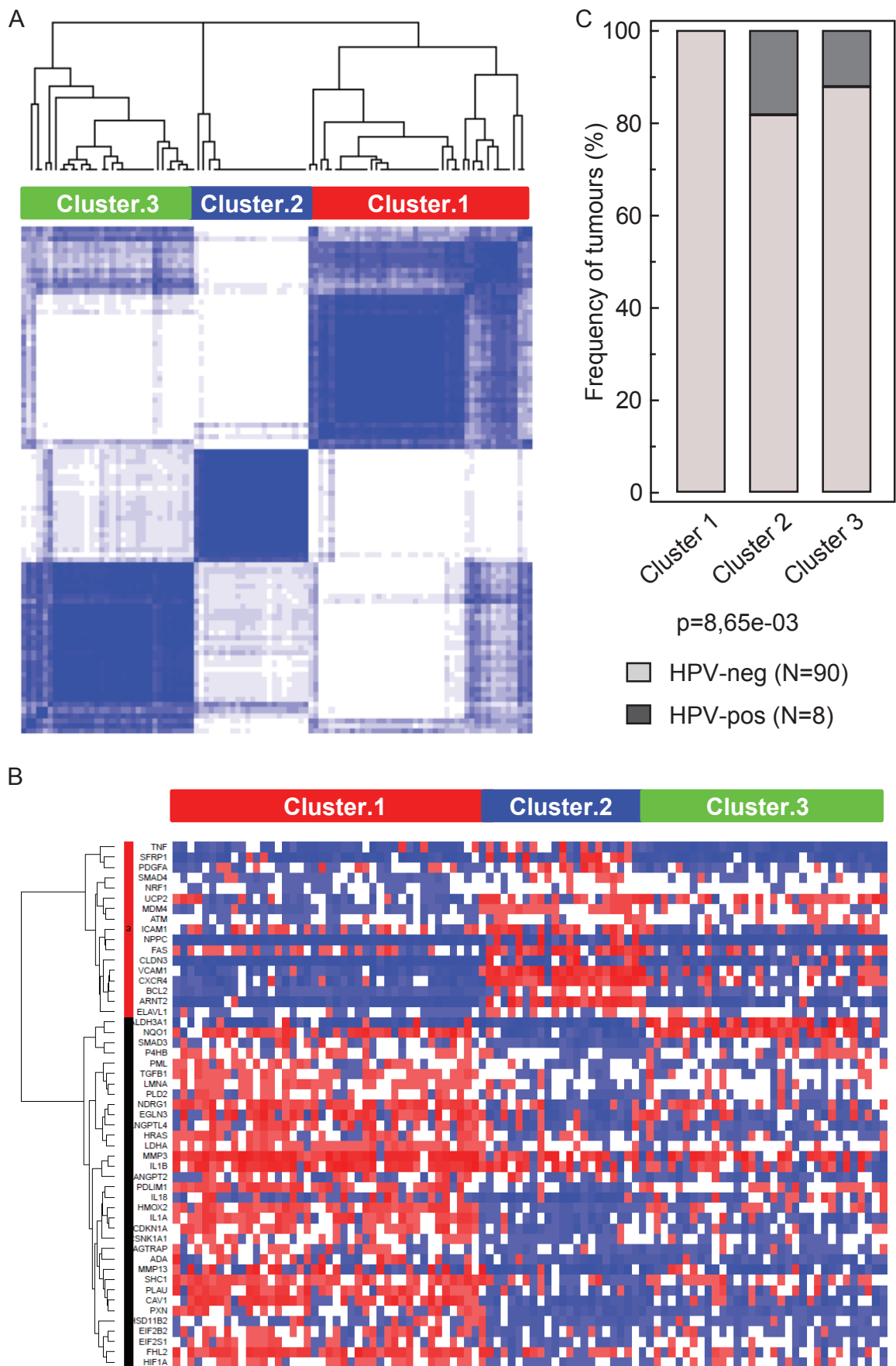
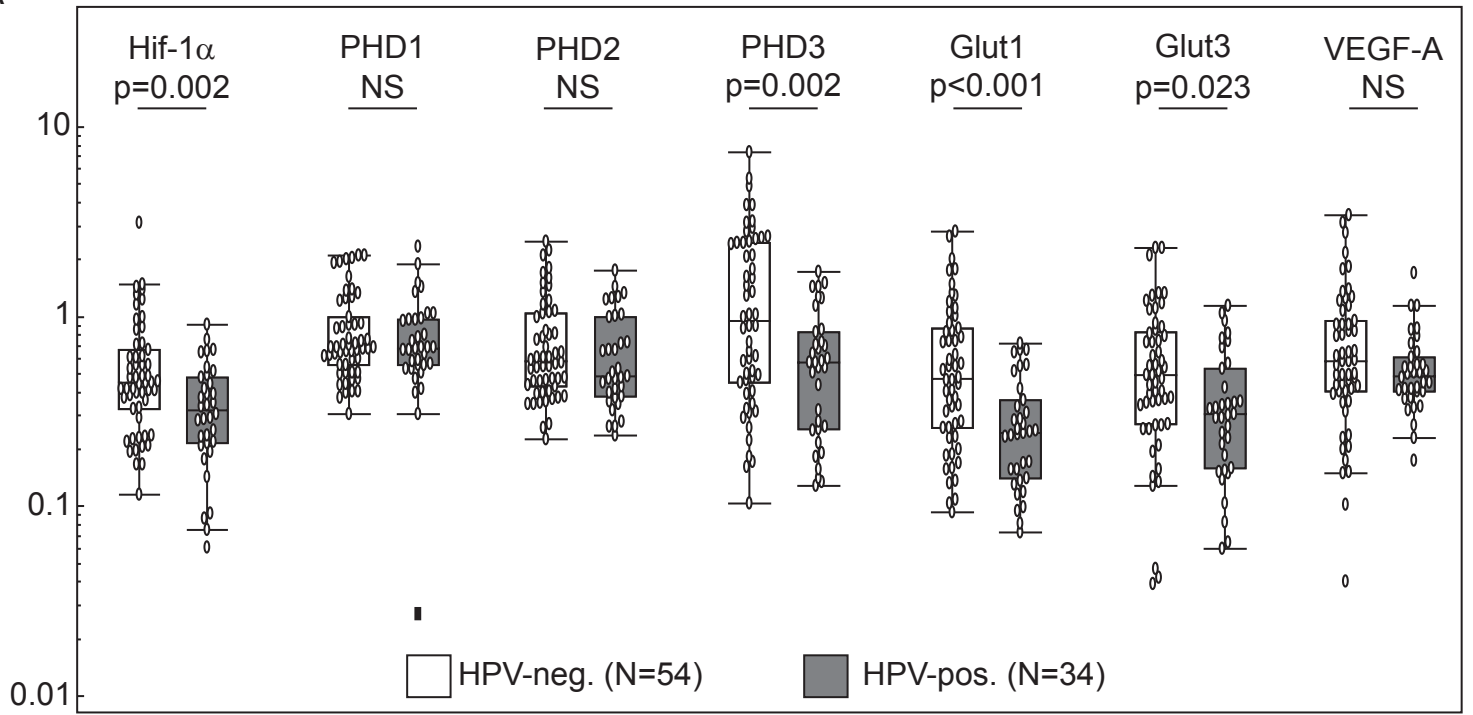
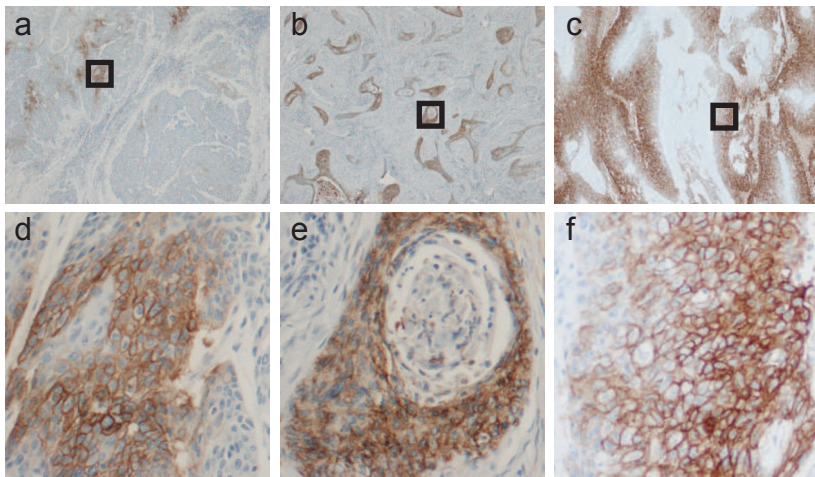


Figure 2

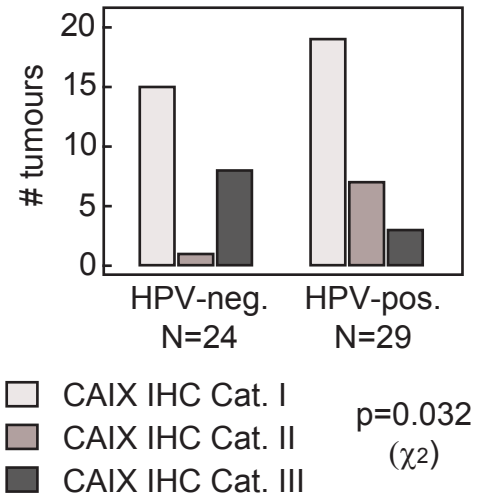
A



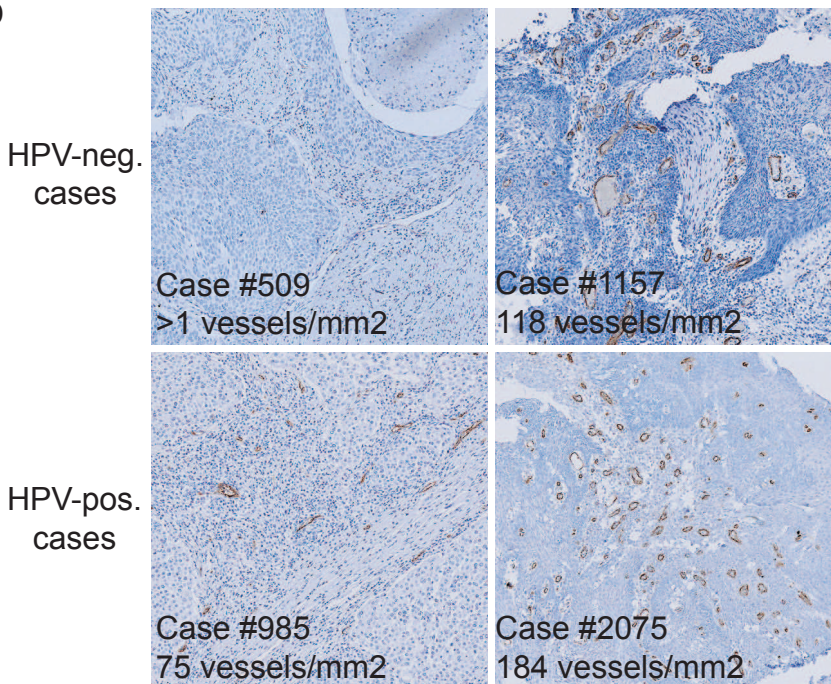
B



C



D



E

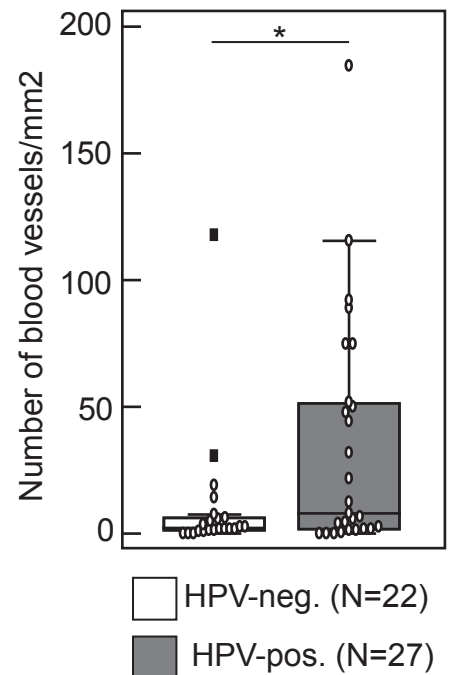
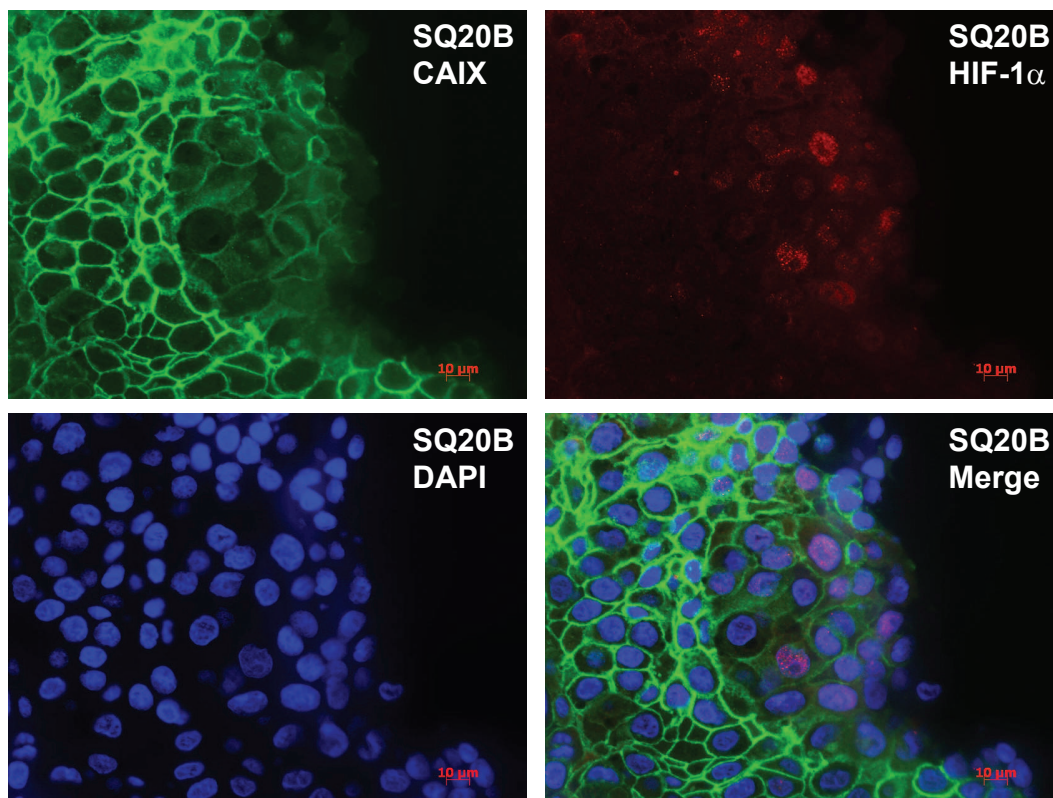


Figure 3

A



B

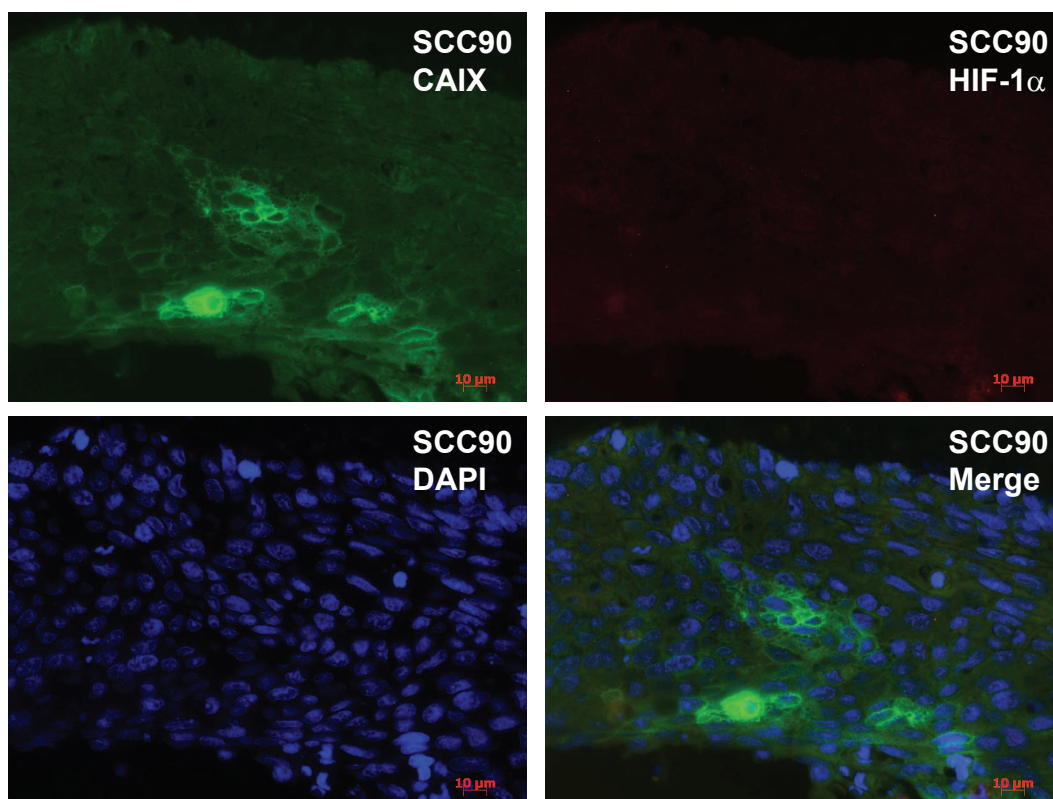


Figure 4

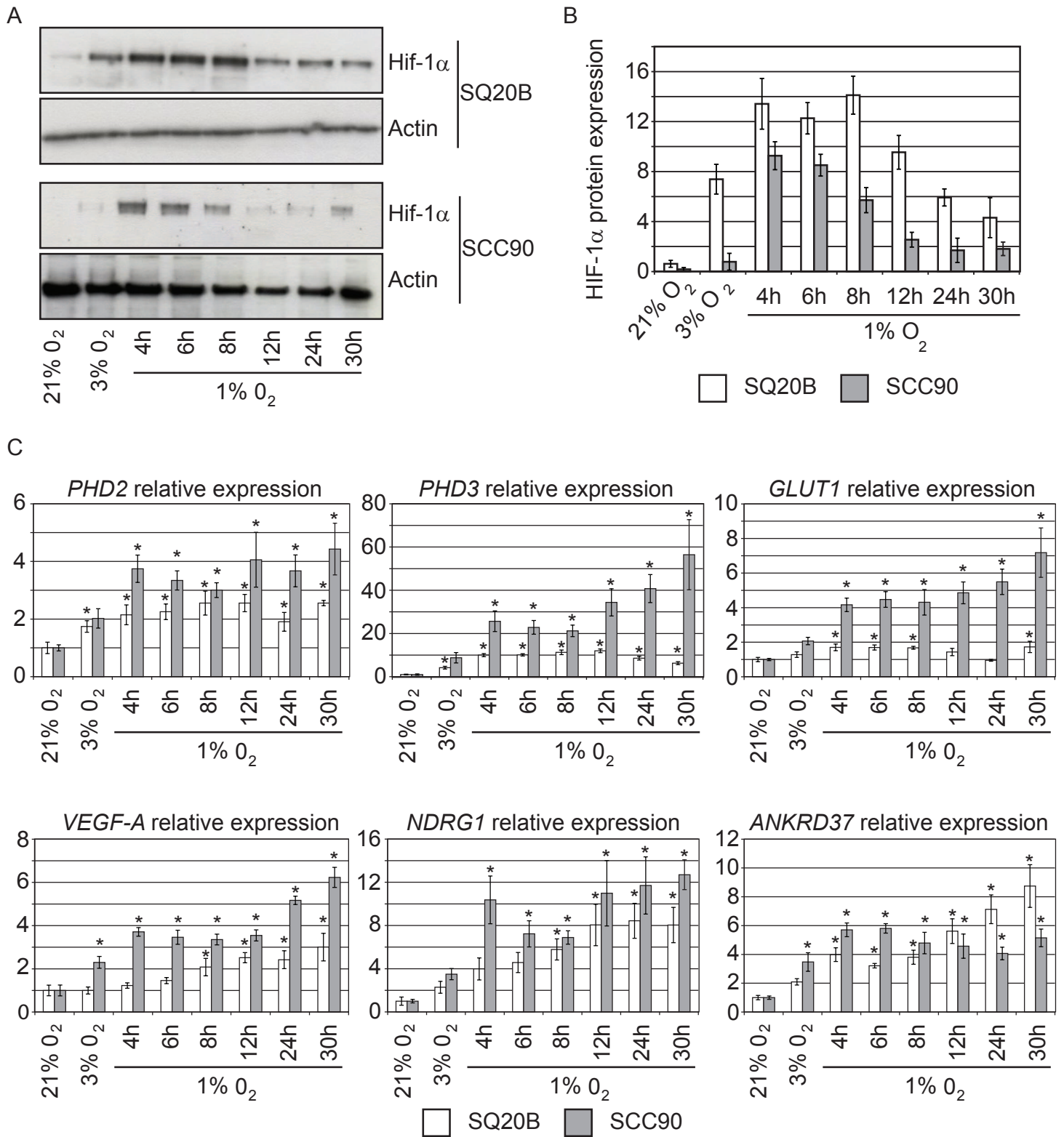
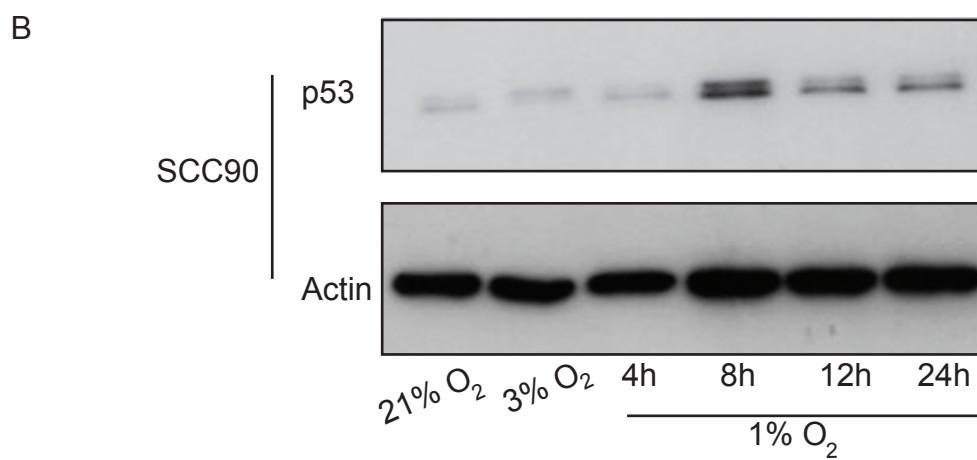
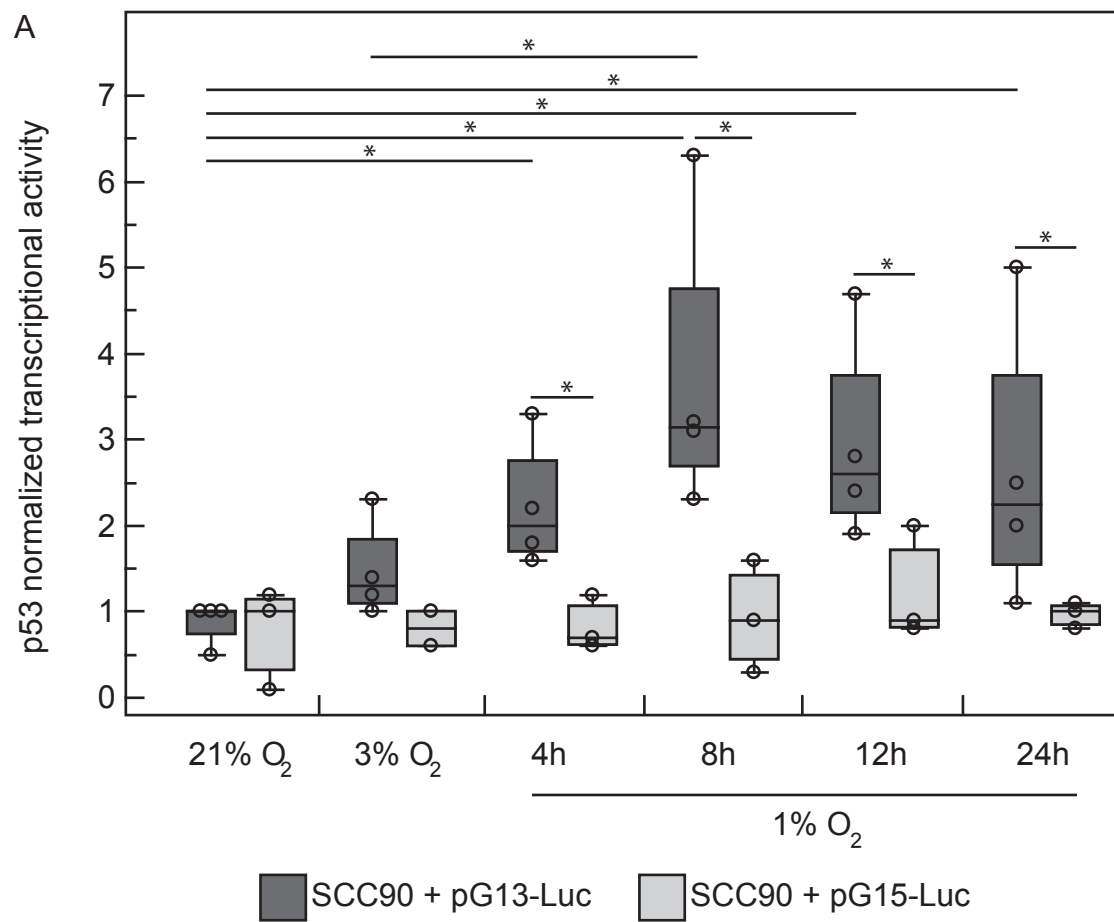
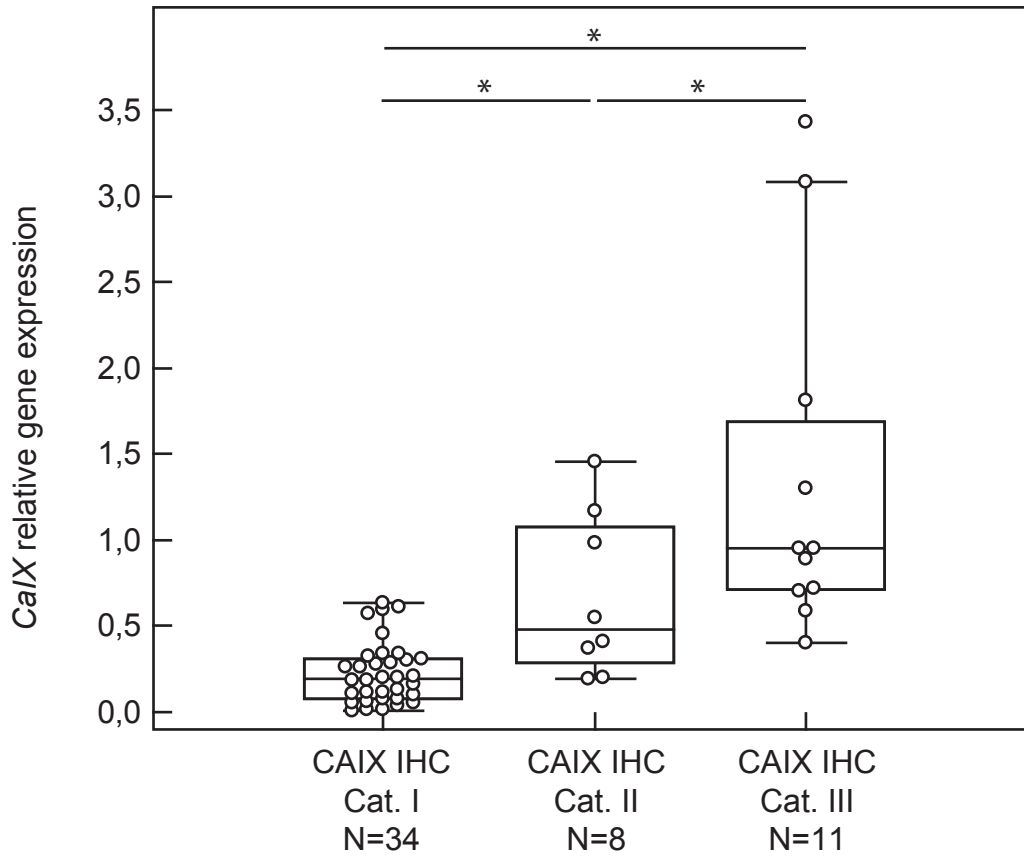


Figure 5





1.3. Conclusion

L'analyse non supervisée de groupe a permis de mettre en évidence trois groupes de tumeurs caractérisées par des signatures hypoxiques distinctes. La majorité des gènes liés à l'hypoxie sont surexprimés dans le cluster 1, alors que les niveaux d'expression de ces gènes sont plus faibles dans le cluster 2. Le cluster 3 présente une signature hypoxique intermédiaire. Le cluster 1 ne regroupe que des tumeurs HPV négatives, tandis que les tumeurs HPV positives se répartissent dans le cluster 2 et le cluster 3.

Les tumeurs HPV positives expriment des niveaux plus faibles d'ARNm de *HIF1α*, *PHD3*, *GLUT1* et *GLUT3* comparées aux tumeurs non infectées par HPV. De plus, les tumeurs HPV positives sont caractérisées par une abondante vascularisation tumorale (CD105) et par un faible pourcentage de cellules tumorales marquées par l'anticorps anti-CAIX, ce qui suggère un statut hypoxique moindre comparé aux tumeurs HPV négatives.

Les xénogreffes obtenus à partir de la lignée SCC90 montre également un statut hypoxique réduit, sur la base de marquage immunohistochimique anti-HIF1α, comparées aux tumeurs dérivant de la lignée SQ20B.

Il apparaît également que les deux lignées cellulaires s'adaptent différemment en hypoxie *in vitro*. En effet, ces deux lignées n'ont pas les mêmes profils d'induction de la protéine HIF1α en hypoxie et n'ont pas les mêmes profils d'induction de gènes cibles de HIF1α, tels que *PHD2*, *PHD3*, *GLUT1*, *VEGFA* ou de gènes induits en hypoxie dans les cancers des VADS tels que *NDRG1* et *ANKRD37*.

Dans la lignée SCC90, l'activité transcriptionnelle de p53 augmente au cours de l'hypoxie, ainsi que le niveau protéique de p53. La protéine p53 serait sensible à l'hypoxie. Ainsi, la réponse à l'hypoxie dans ces deux lignées cellulaires serait différente.

Au vu de ces résultats, les tumeurs oropharyngées HPV positives semblent avoir un statut hypoxique moindre qui diffère des tumeurs oropharyngées HPV négatives. Ces différences s'observent également dans des lignées cellulaires des VADS en fonction de leur statut HPV. Ces données conduisent à distinguer ces deux groupes de tumeurs en termes de statut hypoxique.

2. DONNEES COMPLEMENTAIRES A L'ETUDE.

Les données dans ce paragraphe complètes celles qui font l'objet de l'article soumis pour publication dans la revue « *International Journal of Cancer* ».

2.1. Un statut hypoxique moindre dans les tumeurs HPV positives comparées aux tumeurs HPV négatives.

2.1.1. Mesure de l'expression de gènes cibles de HIF1 α ou lié à l'hypoxie.

Dans cette étude, nous avons également mesuré le niveau d'expression de *PAI-1*, un autre gène cible induit par HIF1 α en hypoxie. Ce gène est connu pour être surexprimé dans les régions tumorales hypoxiques. Nous avons également évalué les niveaux d'expression de deux autres gènes, *NDRG1* et *ANKRD37*. Ces deux gènes font partie de la signature hypoxique de 15 gènes de Toustrup [173] et sont surexprimés dans les tumeurs en hypoxie [173]. Nous avons donc voulu déterminer si ces gènes sont différentiellement exprimés entre les tumeurs HPV positives et HPV négatives.

Méthodologie :

Les niveaux d'expressions des gènes ont été analysés par qRT-PCR dans 34 tumeurs oropharyngées HPV positives et 54 tumeurs oropharyngées HPV négatives. Les niveaux d'expression sont relatifs, c'est-à-dire qu'ils ont été rapportés à deux gènes de référence, les gènes *UBB* et *RPLP0*.

Les différences des niveaux d'expression des différents gènes entre les deux types de tumeurs oropharyngées sont évaluées par un test statistique de type Student ou Mann-Whitney. Le résultat du test est considéré comme statistiquement significatif lorsque la p-valeur est inférieure à 0,05 ($p < 0,05$).

Résultats :

Le gène *PAI-1* est exprimé différentiellement entre les tumeurs HPV positives et les tumeurs HPV négatives ($p < 0,001$). Ainsi, le taux d'ARNm de *PAI-1* est plus élevé dans les tumeurs non infectées par HPV [Figure 26]. Ce résultat est en corrélation avec les résultats obtenus pour les autres gènes cibles de HIF1 α , à savoir *PHD3*, *GLUT1* et *GLUT3*.

Nous observons que le niveau d'ARNm de *NDRG1* est significativement différent entre les deux types de tumeurs oropharyngées ($p = 0,004$). Ainsi, le gène *NDRG1* semble avoir un niveau d'expression plus élevé dans les tumeurs HPV négatives par rapport aux tumeurs HPV positives [Figure 26].

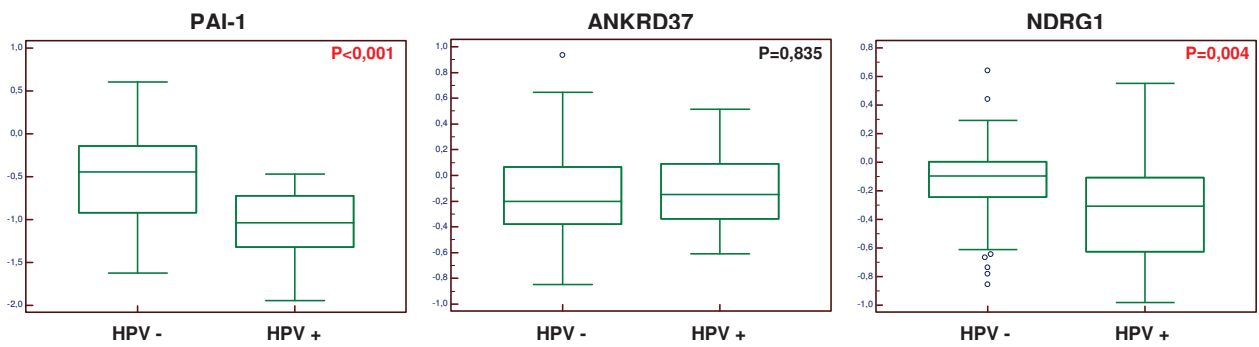


Figure 26 : Analyse des niveaux d'expression des gènes PAI-1, NDRG1 et ANKRD37 dans 34 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 54 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.

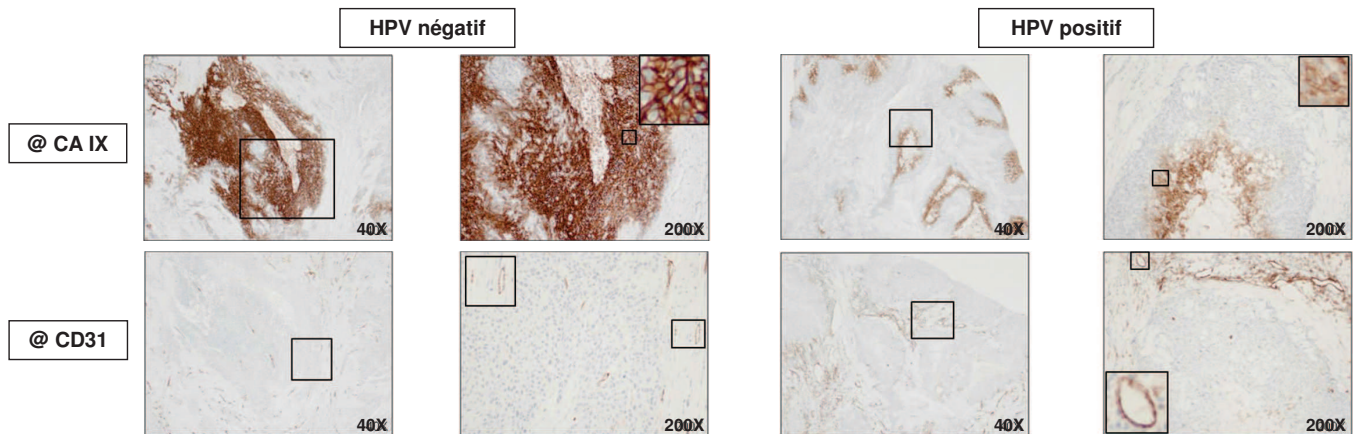


Figure 27 : Analyse de l'hypoxie intratumorale (CA IX) et de la vascularisation tumorale (CD31) dans 34 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 54 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.

Concernant le gène *ANKRD37*, il n'apparaît pas de différence significative d'expression entre les deux types de tumeurs oropharyngées. La valeur du p est égale à 0,835. Ce gène ne semble pas être régulé différenciellement au niveau transcriptionnel entre les tumeurs oropharyngées HPV négatives et HPV positives [Figure 26].

Ainsi, les tumeurs HPV positives expriment des niveaux plus faibles de *PAI-1* et *NDRG1* comparées aux tumeurs HPV négatives. Ces données sont cohérentes avec les résultats obtenus pour les gènes présentés dans l'article et suggère un statut hypoxique moindre pour les tumeurs oropharyngées HPV positives par rapport aux tumeurs non infectées par HPV.

2.1.2. Analyse de l'angiogenèse intratumorale et de l'hypoxie intratumorale.

Au vu des résultats de qPCR, nous avons évalué l'hypoxie intratumorale et la vascularisation stromale et tumorale par immunohistochimie sur 29 tumeurs HPV positives et 24 tumeurs HPV négatives. En effet, nous avons voulu déterminer s'il existe une corrélation entre l'hypoxie intratumorale et la quantité de vaisseaux sanguins au sein des tumeurs. Les régions tumorales hypoxiques ont été marquées par un anticorps anti-CAIX et l'endothélium vasculaire par un anticorps anti-CD31.

Résultat :

Les tumeurs HPV négatives sont caractérisées par la présence de régions tumorales hypoxiques de taille variable comprenant de 0 à 100% de cellules carcinomateuses CAIX positives et par une faible vascularisation stromale et intratumorale. Des coupes de tumeurs marquées au moyen d'un anticorps anti-CD31 à fort grossissement montre la présence de vaisseaux sanguins de faible diamètre et d'aspect tortueux. De plus, ces vaisseaux sanguins sont souvent éloignés des zones hypoxiques [Figure 27].

Les tumeurs HPV positives présentent également des régions hypoxiques. Mais dans 90% des cas, un maximum de 20% des cellules tumorales sont CAIX positives. De plus, ces régions hypoxiques sont éloignées des vaisseaux sanguins qui présentent un aspect moins aberrant (architecture vasculaire) et des vaisseaux sanguins de plus gros diamètres que les vaisseaux présents dans les tumeurs HPV négatives. Ainsi, les cellules tumorales à proximité des vaisseaux sanguins ne sont pas hypoxiques, tandis que les cellules tumorales distantes des vaisseaux sont hypoxiques. Les cellules, au centre de la tumeur, sont nécrosées [Figure 27].

Globalement, les tumeurs HPV positives semblent moins hypoxiques. La vascularisation tumorale des tumeurs HPV positives pourrait donc être plus efficace. Cependant, la quantification des vaisseaux sanguins par l'utilisation d'un anticorps anti-CD31 n'est pas appropriée pour l'évaluation de l'angiogenèse tumorale. En effet, l'antigène CD31 n'est pas spécifique des néovaisseaux et marque tous les vaisseaux sanguins présents dans l'échantillon. De plus, nous avons régulièrement observé un marquage aspécifique (cellules individuelles marquées par

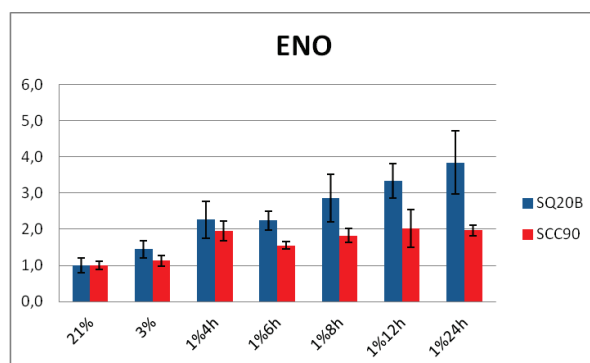
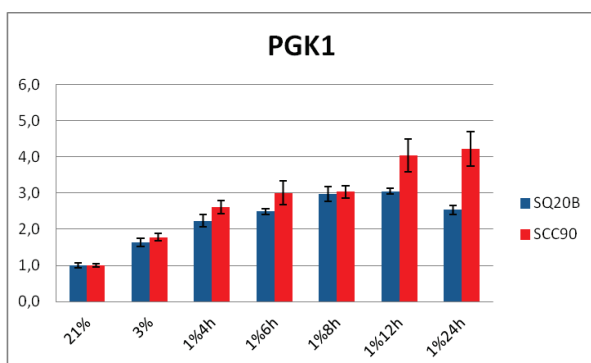
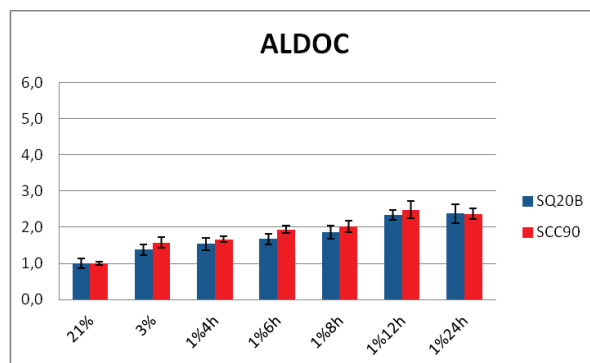
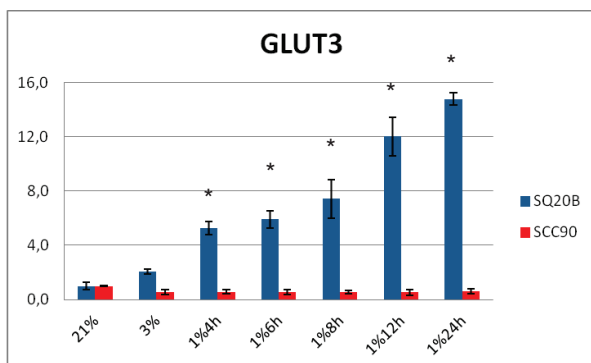


Figure 28 : Analyse des niveaux d'expression de gènes codant des enzymes de la glycolyse au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

l'anticorps anti-CD31 en dehors des vaisseaux sanguins) rendant peu fiable toutes tentatives de quantifications.

Nous avons donc choisi de quantifier les vaisseaux sanguins en utilisant un anticorps anti-CD105, reconnu comme marqueur de l'angiogenèse tumorale (voir article soumis).

2.2. Mesure de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose

2.2.1. Dans les lignées SQ20B et SCC90 au cours d'une cinétique d'hypoxie.

Au cours de ces expériences de cinétique d'hypoxie, nous avons observé que les deux lignées cellulaires ont deux adaptations différentes à l'hypoxie. La lignée SQ20B semble très bien s'adapter, tandis que la lignée SCC90 croît difficilement. A partir de 24h d'hypoxie à 1% d'oxygène, un fort taux de mort cellulaire est observé pour les cellules SCC90.

Nous avons émis l'hypothèse que la meilleure adaptation des cellules SQ20B par rapport aux cellules SCC90 à un environnement hypoxique pourrait s'expliquer par des différences dans l'activité métabolique. En effet, il est connu que le facteur HIF1 α stimule la glycolyse en hypoxie.

Nous avons donc étendu notre étude sur les lignées cellulaires en analysant les niveaux d'expression des gènes *GLUT3*, *ALDOC*, *PGK1*, *ENO*, *PDK1* et *LDHA*.

Méthodologie :

Les cellules SQ20B (HPV négatives) et SCC90 (HPV positives) ont été cultivées en normoxie (21% d'oxygène) pendant 24h, puis en hypoxie à 3% d'oxygène pendant 24h pour adapter les cellules à un environnement pauvre en oxygène, puis en hypoxie à 1% d'oxygène. Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt ont été analysés par qRT-PCR dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90 après 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 30h de culture en hypoxie à 1% d'oxygène. Les expressions de gènes ont été mesurées dans trois expériences indépendantes en duplicat. Les niveaux d'expression sont relatifs, c'est-à-dire qu'ils ont été rapportés à trois gènes de référence, les gènes *UBB*, *HPRT1* et *ARN18S*. Les résultats ont été normalisés par rapport au point obtenu en normoxie qui sert de contrôle négatif.

Les différences des niveaux d'expression des gènes entre les différents points de cinétique de l'hypoxie et le contrôle négatif sont évaluées par un test statistique de type ANOVA. Pour la lignée SQ20B, l'astérisque, présent sur les graphes, signifie que le point de cinétique d'hypoxie concerné est statistiquement différent en comparaison au contrôle négatif ($p < 0,05$). Dans la lignée SCC90, cette différence est représentée par le sigle (#).

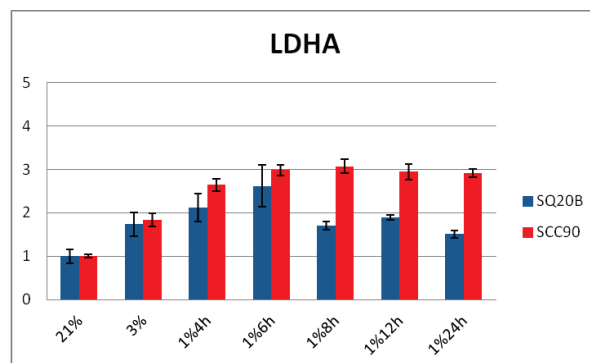
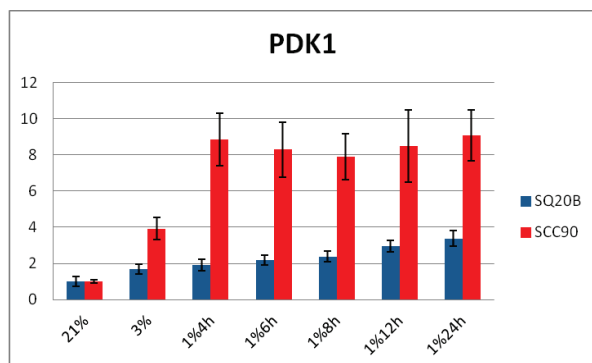


Figure 29 : Analyse des niveaux d'expression de gènes codant des enzymes de la glycolyse au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

Dans la lignée SQ20B : Le niveau d'expression de *GLUT3* augmente très rapidement en hypoxie. En effet, dès 4h d'hypoxie à 1% d'oxygène, le taux d'ARNm a augmenté de 5 fois par rapport à la normoxie. Puis en hypoxie tardive (12h à 1% d'O₂), le niveau d'expression est encore augmenté de plus de 2,3 fois par rapport au point 4h à 1% d'O₂. Le taux d'ARNm de *GLUT3* augmente jusqu'à 30h d'hypoxie à 1% d'oxygène [Figure 28].

Les niveaux d'expression des autres gènes de la glycolyse augmentent également au cours de l'hypoxie, mais de façon plus modérée. En effet, en hypoxie tardive, les taux d'ARNm des gènes *PGK1*, *ENO* et *PDK1* ont augmenté d'un facteur 3 et les taux d'ARNm des gènes *LDHA* et *ALDOC* d'un facteur 2 environ [Figures 28 et 29].

Dans la lignée SCC90 : Nous observons une augmentation statistiquement significative du niveau d'expression des gènes *ALDOC*, *PGK1*, *PDK1* et *LDHA* en hypoxie par rapport à la normoxie. D'après les tests statistiques ANOVA, les gènes *ENO* et *GLUT3* ne présentent pas de différence du niveau d'expression au cours de la cinétique d'hypoxie comparé au point 21% d'oxygène. Cependant, nous pouvons observer une tendance à une légère augmentation pour le taux d'ARNm de *ENO* au cours de l'hypoxie comparé à la normoxie. D'après ces résultats, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la glycolyse sont augmentés au cours d'une hypoxie [Figures 28 et 29].

	<i>GLUT3</i>	<i>ALDOC</i>	<i>PGK1</i>	<i>ENO</i>	<i>PDK1</i>	<i>LDHA</i>
SQ20B	> 13X	> 2X	> 2,7X	> 3,5X	> 3X	≈ 2X
SCC90	-	≈ 2,5X	> 4X	≈ 2X (NS)	> 8,5X	≈ 3X

Tableau 10 : Augmentation des niveaux d'expression en hypoxie tardive (12h-24h à 1% d'O₂) de gènes liés au métabolisme du glucose dans les lignées SQ20B et SCC90. NS : non significatif statistiquement.

En conclusion, dans les deux lignées cellulaires, nous observons une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le transport du glucose (*GLUT3* et/ou *GLUT1* (voir article soumis)) et dans la voie de la glycolyse. Nous observons également une augmentation de l'induction des gènes *PDK1* et *LDHA*. En hypoxie, le facteur HIF1 α régule l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. En effet, HIF1 α contrôle indirectement la pyruvate déshydrogénase (*PDH*) en activant l'expression du gène *PDK1* qui inhibe la PDH. De plus, HIF1 α active parallèlement le gène lactate déshydrogénase (*LDHA*) qui code une enzyme responsable de la conversion du pyruvate en lactate. Ces résultats suggèrent que la lignée SCC90 serait également capable d'adapter son métabolisme cellulaire en condition d'hypoxie. Ces données ne permettent donc pas d'expliquer le fort taux de mort cellulaire des SCC90 durant la cinétique d'hypoxie.

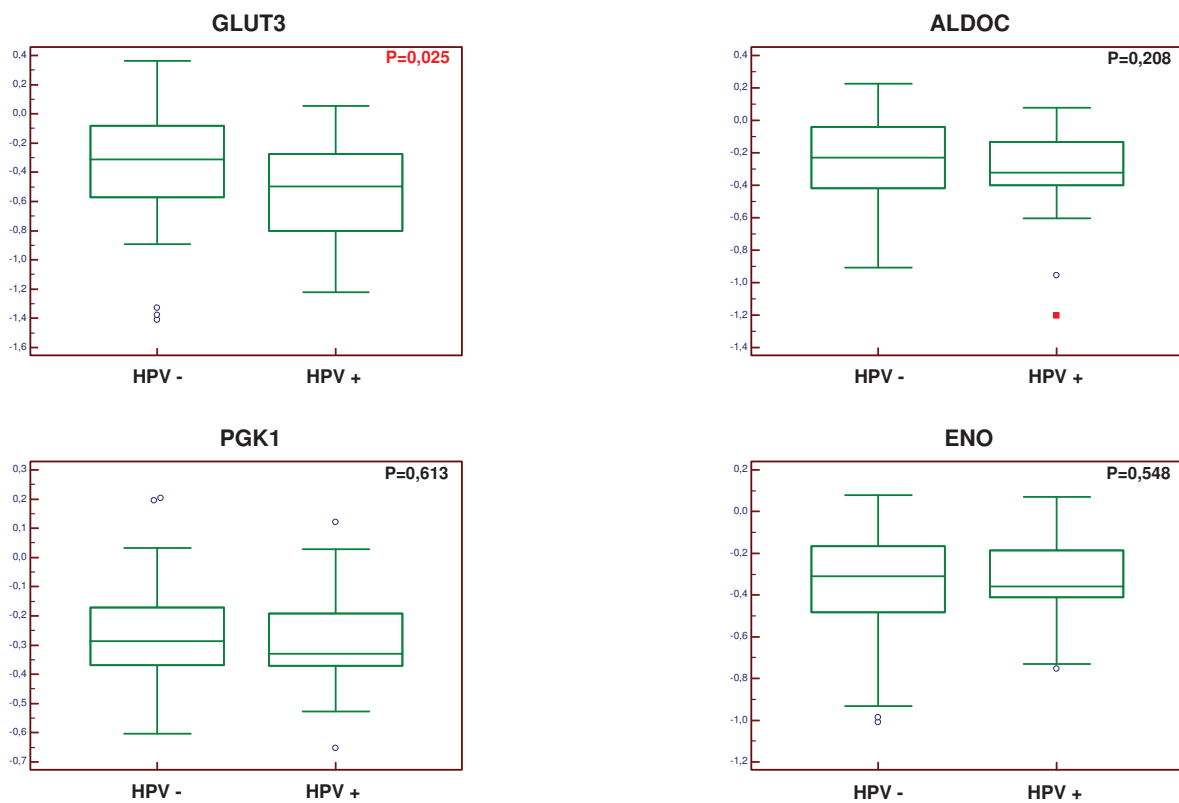


Figure 30 : Analyse des niveaux d'expression de gènes cibles de HIF1 α codant des enzymes de la glycolyse : GLUT3, ALDOC, PGK1, ENO dans 34 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 54 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.

2.2.2. Dans la cohorte de tumeurs HPV positives et HPV négatives.

Nous avons analysé les niveaux d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire dans les lignées SQ20B et SCC90 et avons observé que les deux lignées sont capables d'induire l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme au cours de l'hypoxie. Nous avons souhaité réaliser une analyse similaire au sein des échantillons inclus dans la cohorte de tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.

Méthodologie :

Les niveaux d'expressions des gènes ont été analysés par qRT-PCR dans 34 tumeurs oropharyngées HPV positives et 54 tumeurs oropharyngées HPV négatives. Les niveaux d'expression sont relatifs, c'est-à-dire qu'ils ont été rapportés à deux gènes de référence, les gènes *UBB* et *RPLP0*.

Les différences des niveaux d'expression des différents gènes entre les deux types de tumeurs oropharyngées sont évaluées par un test statistique de type Student ou Mann-Whitney. Le résultat du test est considéré comme statistiquement significatif lorsque la p-valeur est inférieure à 0,05 ($p < 0,05$).

Résultats :

Le gène codant le transporteur de glucose 3 (*GLUT3*) est exprimé différemment entre les tumeurs HPV négatives et les tumeurs HPV positives ($p=0,025$) [Figure 30]. En effet, le taux d'ARNm de *GLUT3* est plus élevé dans le groupe de tumeurs HPV négatives comparées aux tumeurs HPV positives. Ce gène est connu pour être un marqueur d'agressivité dans les tumeurs cérébrales [128]. En conclusion, nous observons une différence du niveau d'expression des gènes codant les transporteurs du glucose GLUT1 ($p < 0,001$) (voir article) et GLUT3 ($p=0,025$) entre les deux types de tumeurs étudiées.

Les niveaux d'expression des gènes codant les enzymes glycolytiques *ALDOC*, *PGK1* et *ENO* sont similaires dans les deux catégories de tumeurs oropharyngées étudiées [Figure 30]. Il n'y aurait donc pas de différence d'expression des gènes codant les enzymes de la glycolyse entre ces deux groupes de tumeurs. Ce résultat suggère qu'il n'y aurait pas de différence dans la régulation de la voie de la glycolyse entre les tumeurs HPV positives et les tumeurs HPV négatives.

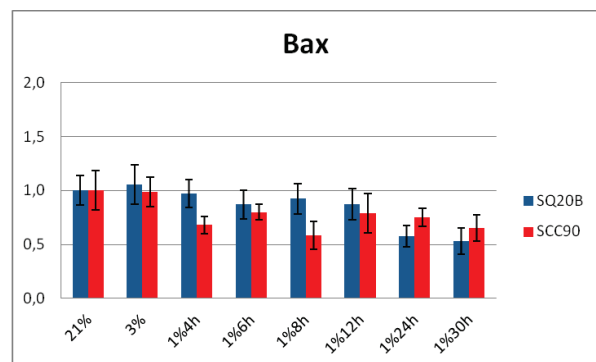
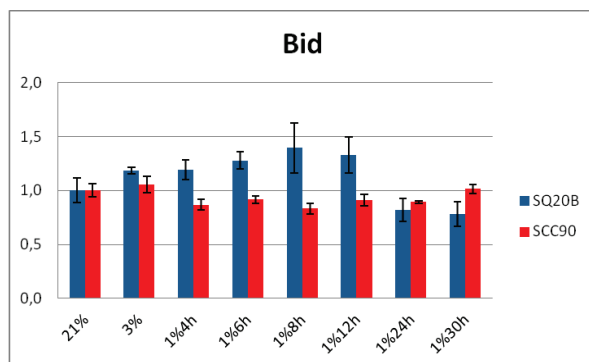
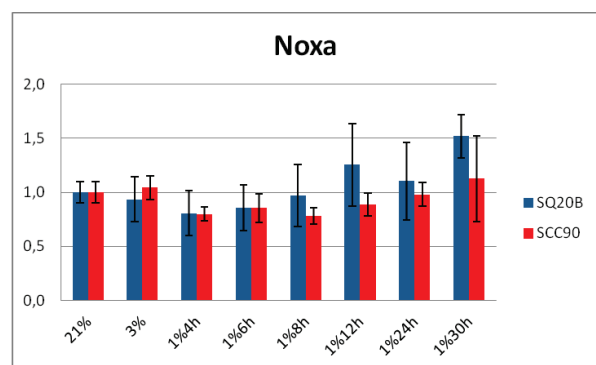
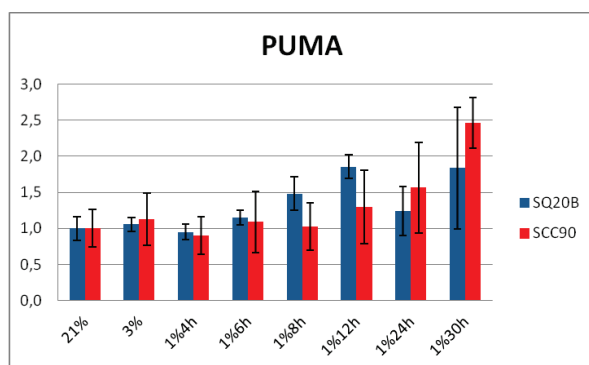


Figure 31 : Analyse des niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'apoptose au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

2.3. Mesure de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et dans l'autophagie au cours de l'hypoxie dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90.

Certaines études tendent à démontrer qu'en condition d'hypoxie, l'oncoprotéine E6 d'HPV n'est plus capable de lier et de polyubiquitiner la protéine p53, qui n'est alors plus dégradée par le protéasome. La protéine p53 pourrait alors s'accumuler et induire la mort cellulaire soit par apoptose, soit par autophagie en activant l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que *PUMA*, *Noxa*, *Bid* et *Bax* ou pro-autophagique tels que *DRAM-1* ou *Beclin-1* dans la lignée SCC90. Nous avons donc analysé les niveaux d'expression de ces gènes au cours de l'hypoxie dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90. De plus, nous avons mesuré les niveaux d'expression de deux gènes cibles de p53 : *p21* (gène impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1) et *Mdm2* (gène qui code une E3 ubiquitine ligase responsable de la régulation négative de p53).

Méthodologie : similaire à l'étude sur le métabolisme du glucose.

Résultats :

Apoptose [Figure 31] : nous pouvons constater que l'expression des ARNm de *PUMA*, *Bax*, *Noxa* et *Bid* ne varie pas au cours de l'hypoxie, dans les deux lignées cellulaires.

Autophagie [Figure 32] : de façon similaire, nous observons que les niveaux d'expression des gènes *DRAM-1* et *Beclin-1* ne varient pas au cours de la cinétique d'hypoxie dans les lignées SCC90 et SQ20B. Nous n'observons pas d'augmentation de l'induction de ces gènes connus pour être activés par p53 [144].

Gènes cibles de p53 : les gènes codant p21 et Mdm2 : [Figure 33] : les taux d'ARNm de ces deux gènes n'augmentent pas au cours de la cinétique d'hypoxie dans les deux lignées cellulaires.

Ces résultats d'expression de gènes (apoptose, autophagie, p21 et Mdm2) sont cohérents pour la lignée SQ20B qui se caractérise par un gène *TP53* muté non fonctionnel, ne permettant donc pas l'induction de gènes cibles par p53.

Dans la lignée SCC90, caractérisée par une version sauvage du gène *TP53*, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et l'autophagie n'augmentent pas en hypoxie. Ces résultats suggèrent que p53 en hypoxie n'induit pas une augmentation de l'expression de ces gènes cibles testés. En hypoxie, dans la lignée SCC90, p53 n'induirait pas la mort cellulaire via l'induction de l'expression de ces gènes.

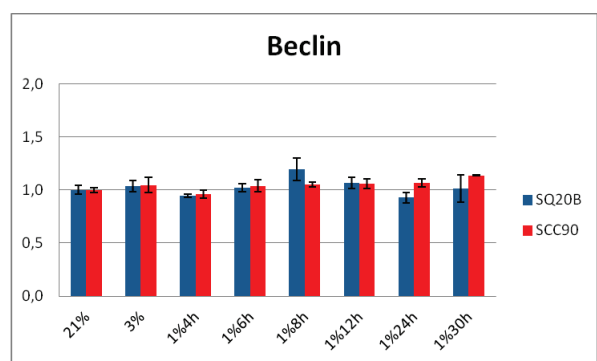
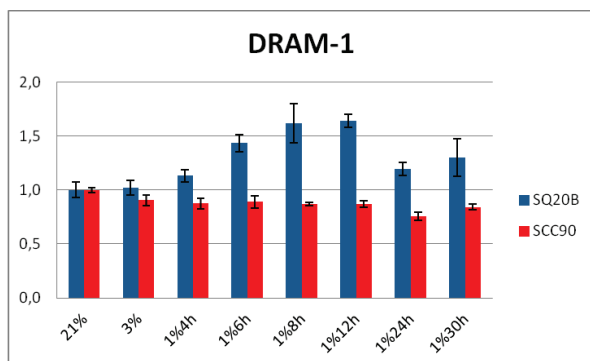


Figure 32 : Analyse des niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'autophagie au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

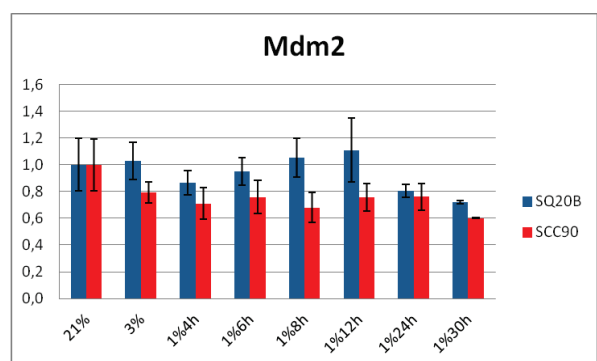
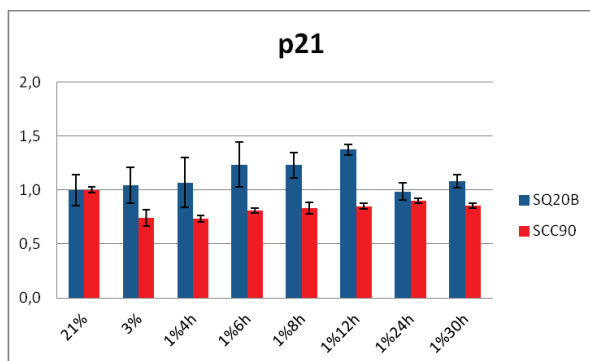


Figure 33 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les protéines p21 et Mdm2 au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

Cependant, ces résultats sont contradictoires avec les données obtenues par les tests luciférase qui montrent une augmentation de 4 fois de l'activité transcriptionnelle de p53 après 8h d'hypoxie à 1% d'oxygène. De plus, la protéine p53 semble s'accumuler au cours de l'hypoxie (voir résultat de western blot de l'article soumis).

2.4. Etude des facteurs de transcription TCF et des membres de la famille Fos

Nous voulons évaluer la dérégulation de l'expression de Net et c-Fos (**modèle de Stanbridge**) dans la cohorte de tumeurs oropharyngées humaines. En effet, la lignée cellulaire 444, HPV18 positive et non tumorigénique, se caractérise par un niveau protéique élevé de Net et un niveau protéique faible de c-Fos. Après plus de 200 doublements du clone ESH5 (ancêtre des 444), il apparaît une sous-population d'hybride HPV18 positive et tumorigénique, les cellules CGL3 caractérisées par un niveau protéique faible de Net et par un niveau protéique élevé de c-Fos. Ainsi, la dérégulation progressive de l'expression de Net et de c-Fos aboutit à la transformation maligne des cellules CGL3. Cette dérégulation serait liée à la présence d'HPV.

Nous cherchons donc à vérifier si cette relation inverse entre Net et c-Fos existe aussi dans la cohorte de tumeurs oropharyngées humaines et dans les deux lignées cellulaires SQ20B (HPV négative) et SCC90 (HPV positive). Nous cherchons également à vérifier si ce **modèle de Stanbridge** peut être mis en relation avec le statut HPV des tumeurs et leur statut hypoxique.

De plus, nous avons souhaité évaluer le **modèle de Serchov** dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90. Ce modèle se caractérise par une modification des niveaux protéiques de Net et HIF1 α au cours de la cinétique d'hypoxie. Ainsi, un modèle de régulation de la réponse à l'hypoxie reposant sur la formation du complexe Net/HIF1 α /PHDs a été proposé pour les cellules 444, afin d'expliquer la cinétique de stabilisation puis de dégradation de Net et HIF1 α en normoxie, en hypoxie précoce et en hypoxie tardive.

2.4.1. Etude sur les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.

Méthodologie :

Les niveaux d'expression des gènes ont été analysés par qRT-PCR dans 31 tumeurs oropharyngées HPV positives et 43 tumeurs oropharyngées HPV négatives. Les niveaux d'expression sont relatifs, c'est-à-dire qu'ils ont été rapportés à deux gènes de référence, les gènes *UBB* et *RPLP0*.

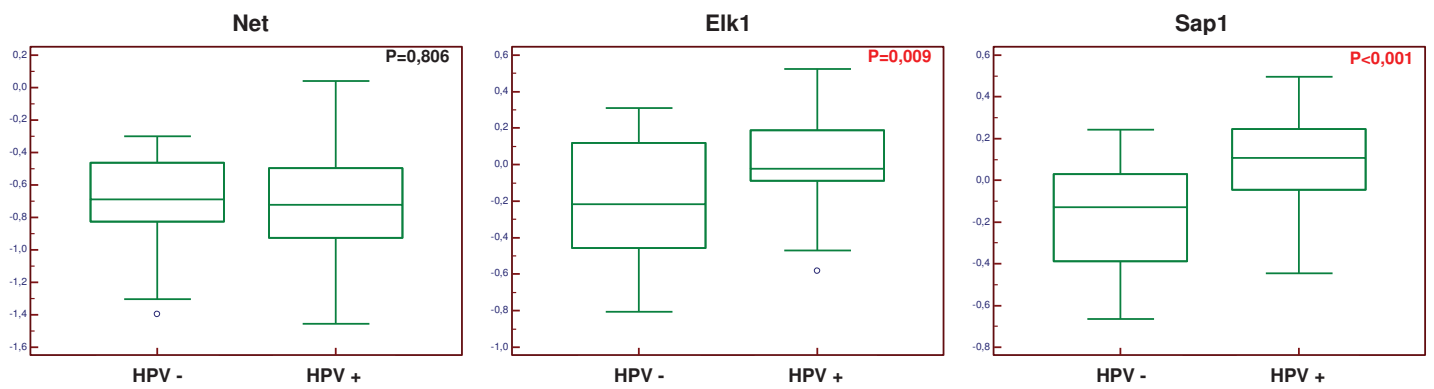


Figure 34 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les facteurs de transcription de la sous-famille des TCF : Net, Elk1 et Sap1 dans 31 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 43 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.

Les différences des niveaux d'expression des différents gènes entre les deux types de tumeurs oropharyngées sont évaluées par un test statistique de type Student ou Mann-Whitney. Le résultat du test est considéré comme statistiquement significatif lorsque $p < 0,05$.

2.4.1.1. Analyse des niveaux d'expression du facteur de transcription Net et c-Fos dans les tumeurs oropharyngées.

Nous observons que le gène *Net* n'est pas exprimé de manière significativement différente entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives ($p=0,806$). Ainsi, la présence d'HPV ne semble pas avoir d'influence significative sur la régulation de l'expression du facteur de transcription Net dans les tumeurs oropharyngées [Figure 34].

Le gène codant *c-Fos* n'est pas exprimé de façon significativement différente entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives ($p=0,195$) [Figure 34]. Ce gène ne semble donc pas être régulé différenciellement au niveau transcriptionnel entre ces deux catégories de tumeurs oropharyngées. Le gène *c-Fos* est connu pour être impliqué dans la carcinogenèse de lignées cellulaires HPV positives du cancer du col de l'utérus [122-125]. Ces résultats préliminaires ne sont pas en faveur d'une implication du gène *c-Fos* dans la carcinogenèse dans les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.

2.4.1.2. Analyse des niveaux d'expression de *Elk1/Sap1* et de *Fra-1/Fra-2/FosB*.

Au vu des résultats de qPCR obtenus pour le gène *Net* et le gène *c-Fos*, nous avons décidé d'évaluer les niveaux d'expression des autres membres de la famille des TCF, à savoir *Elk1* et *Sap1*, ainsi que les autres membres de la famille Fos, à savoir *Fra-1*, *Fra-2* et *FosB*.

Nous observons que les gènes *Elk1* et *Sap1* sont exprimés différenciellement entre les deux types de tumeurs étudiés (respectivement $p=0,009$ et $p < 0,001$) [Figure 35]. Ainsi, les taux d'ARNm de *Elk1* et *Sap1* sont plus élevés dans les tumeurs HPV positives comparées aux tumeurs HPV négatives.

Les gènes *Fra-2* et *FosB* n'apparaissent pas, au vu des tests statistiques, être exprimés de façon significativement différente entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives [Figure 35]. Ces deux gènes ne semblent donc pas être régulés au niveau transcriptionnel de manière différencielle entre les deux types de tumeurs étudiés. Cependant, l'analyse du niveau d'expression de *Fra-1* entre les deux types de tumeurs oropharyngées indique qu'il existerait une différence d'expression significative entre les tumeurs HPV positives et HPV négatives. En effet, le test de Student donne une p-valeur inférieure à 0,001. Ainsi, le taux d'ARNm de *Fra-1* est plus élevé dans le groupe des tumeurs oropharyngées HPV négatives. Les tumeurs

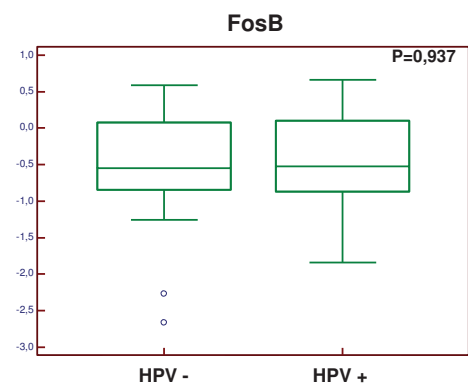
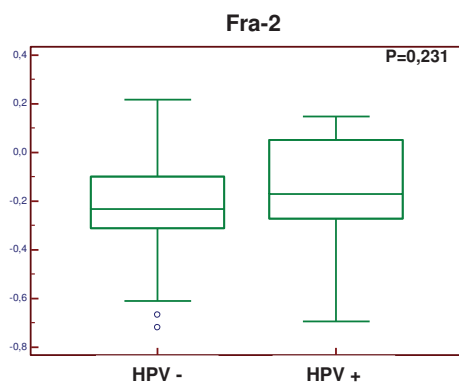
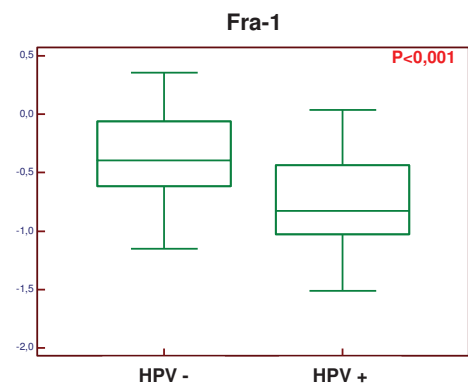
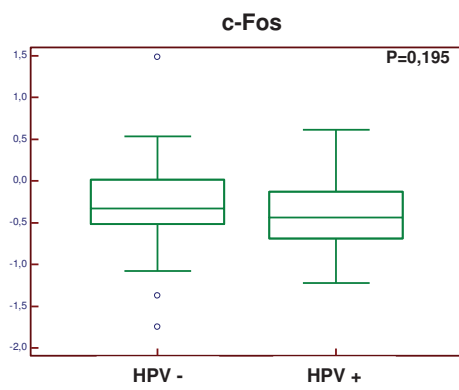


Figure 35 : Analyse des niveaux d'expression des gènes appartenant à la famille Fos : c-Fos, fra-1, Fra-2, FosB dans 31 tumeurs oropharyngées infectées par HPV et dans 43 tumeurs oropharyngées non infectées par HPV.

HPV positives oropharyngées se caractérisent par un fort niveau d'expression de *Elk1* et *Sap1* et un faible niveau d'expression de *Fra-1* [Tableau 11].

D'après les résultats obtenus pour les facteurs TCF et les membres de la famille Fos, il pourrait exister, dans les tumeurs oropharyngées HPV positives, une relation inverse entre Elk1 et Sap1 d'une part, et Fra-1 d'autre part.

	Facteur TCF	Famille Fos
444 (HPV+ non tumorigénique)	Net : +++	c-Fos : +
CGL3 (HPV+ tumorigénique)	Net : +	c-Fos : +++
Tumeurs oropharyngées HPV+	Elk1/Sap1 : +++	Fra-1 : +
Tumeurs oropharyngées HPV-	Elk1/Sap1 : +	Fra-1 : +++

Tableau 11 : Relation inverse entre facteurs TCF et les membres Fos dans les lignées CGL3 et 444 et les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.

2.4.2. Etude sur deux lignées cellulaires des VADS : SQ20B ET SCC90.

Au vu des résultats sur les tumeurs, nous avons décidé d'analyser les niveaux d'expression des trois facteurs de transcription TCF et des quatre membres de la famille Fos. Le gène FosB n'a pas donné de résultats satisfaisants dans les deux lignées cellulaires. En effet, le signal de fluorescence, émis par le SybrGreen et dépassant le seuil du bruit de fond, n'est détecté qu'à partir du 35^{ème} cycle d'amplification de PCR (Cp=35) par le système de lecture optique. Nous supposons donc que ce gène est faiblement exprimé dans les deux lignées cellulaires. Nous ne présentons donc pas le gène *FosB* ci-dessous.

Méthodologie : similaire à l'étude sur le métabolisme du glucose et à l'étude sur l'analyse de la mort cellulaire.

2.4.2.1. Analyse de l'expression des gènes codant les facteurs de transcription TCF et les membres de la famille Fos dans les lignées SQ20B et SCC90 en hypoxie.

Dans la lignée SQ20B : d'après le test statistique ANOVA, les trois facteurs de transcription *Net*, *Elk1* et *Sap1* sont régulés négativement au cours de l'hypoxie [Figures 36]. En effet, nous pouvons observer que les niveaux d'expression des transcrits codant les trois facteurs sont diminués dès 3% d'oxygène et tout au long de la cinétique d'hypoxie à 1% d'O₂ par rapport au contrôle négatif.

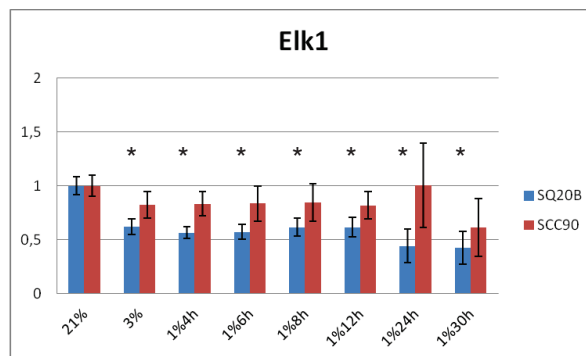
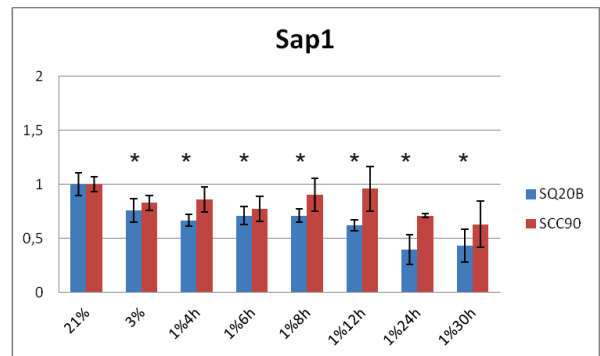
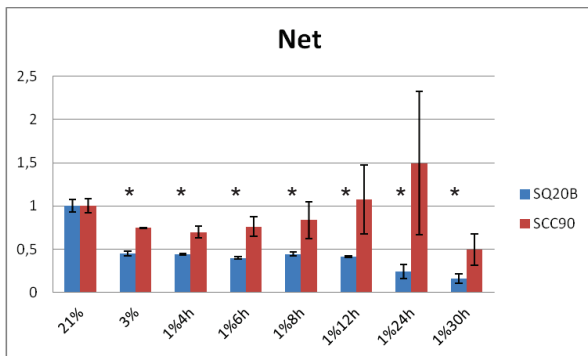


Figure 36 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les facteurs de transcription TCF (Net, Elk1, Sap1) au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

De plus, au vu des résultats, le gène *Net* semble être le facteur le plus sensible des trois à une baisse de la concentration en oxygène. En effet, après 24h d'hypoxie à 1% d'O₂, le niveau relatif d'expression du gène *Net* est de 0.21 par rapport à l'expression observée en normoxie, soit une diminution du niveau de l'expression d'un facteur 5 comparée à la normoxie. Les facteurs *Elk1* et *Sap1* n'enregistrent qu'une diminution de 2,2 fois comparée au contrôle négatif.

Les membres de la famille Fos semblent être régulés différemment au niveau transcriptionnel en hypoxie dans la lignée SQ20B [Figure 37]. Les taux d'ARNm de *c-Fos* et *Fra-2* augmentent progressivement en hypoxie pour atteindre un pic d'expression maximale en hypoxie tardive (24h pour *c-Fos* et 12-24h pour *Fra-2*). Ainsi, les taux d'expression des transcrits ont augmenté de plus de 4 fois en hypoxie tardive. Au bout de 30h d'hypoxie à 1% d'O₂, les niveaux d'expression semblent diminuer à nouveau. Concernant, le gène *Fra-1*, une diminution des niveaux d'expression du transcrit est observée dès 3% d'O₂. En hypoxie tardive, à partir de 12h d'hypoxie à 1% d'oxygène, le taux d'ARNm de *Fra-1* a diminué d'un facteur 4 par rapport à la normoxie.

En conclusion, dans la lignée SQ20B, l'interprétation des résultats semble complexe.

Dans la lignée SCC90 : Nous pouvons observer que les trois facteurs de transcription TCF, ainsi que *c-Fos* et *Fra-2* ne semblent pas être régulés au niveau transcriptionnel au cours de l'hypoxie. En effet, aucun point de la cinétique d'hypoxie n'est statistiquement différent comparés au contrôle négatif [Figures 36-37].

Malgré tout, nous observons une tendance à l'augmentation du niveau d'expression de *c-Fos* (p=0,080) et *Fra-2* en hypoxie précoce, pour atteindre un pic maximum après 6h d'hypoxie à 1% d'oxygène. Les taux d'ARNm diminuent ensuite rapidement en hypoxie tardive.

Cependant, le gène *Fra-1* semble être régulé négativement au cours de l'hypoxie comparé à la normoxie [Figure 37].

	TCF	Fos
SCC90	<i>Net</i> stable	<i>c-Fos</i> ↗ (1%6h) puis ↘ (à partir de 1%8h) Test non significatif
	<i>Elk1</i> stable	<i>Fra-1</i> ↘
	<i>Sap1</i> stable	<i>Fra-2</i> ↗ (1%6h) puis ↘ (à partir de 1%8h) Test non significatif
SQ20B	<i>Net</i> ↘	<i>c-Fos</i> ↗
	<i>Elk1</i> ↘	<i>Fra-1</i> ↘
	<i>Sap1</i> ↘	<i>Fra-2</i> ↗

Tableau 12 : Niveaux d'expression des facteurs TCF et des membres de la famille Fos sur les lignées cellulaires SQ20B et SCC90. Les flèches ↗ représentent une augmentation des niveaux d'expression des gènes en hypoxie. Les flèches ↘ représentent une diminution des niveaux d'expression des gènes en hypoxie.

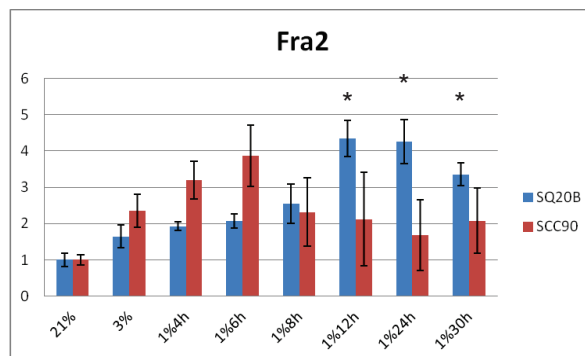
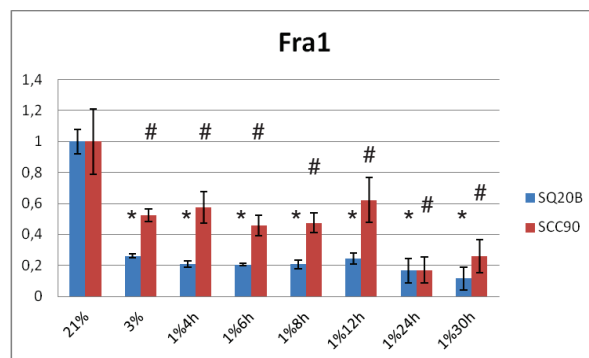
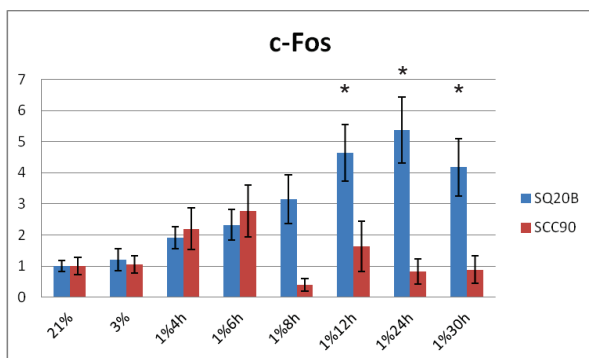


Figure 37 : Analyse des niveaux d'expression des gènes codant les membres de la famille Fos (c-Fos, Fra-1 et Fra-2) au cours d'une cinétique d'hypoxie dans les lignées SQ20B et SCC90.

2.4.2.2. Analyse de l'expression protéique des facteurs de transcription TCF.

Nous avons, dans un second temps, tenté d'évaluer les niveaux protéiques de Net, Elk1 et Sap1 dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90 en hypoxie. Les anticorps polyclonaux anti-Net, anti-Elk1 et anti-Sap1 utilisés pour les westerns blot ont été produits dans le lapin. Les purifications de ces anticorps ont été réalisées par le laboratoire du docteur Bohdan Wasylyk de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch.

Méthodologie :

Les cellules ont été cultivées en normoxie (21% d'oxygène) pendant 24h, puis en hypoxie à 3% d'oxygène pendant 24h pour adapter les cellules à un environnement pauvre en oxygène, puis en hypoxie à 1% d'oxygène pendant 4h, 6h, 8h, 12h, 24h, 30h. Les expériences de cinétique d'hypoxie ont été réalisées au sein du laboratoire du Docteur Bohdan WASYLYK à l'IGBMC. Les cellules sont lysées par ajout de tampon Laemli et sont congelées à -80°C. La suite de l'extraction est réalisée dans notre laboratoire. Les protéines sont analysées par western blot.

Résultat :

Les résultats de Western Blot font apparaitre que certains échantillons protéiques sont dégradés [Figures 38]. D'autre part, nous pouvons observer plusieurs bandes sur nos western blot pour Net, Elk1 et Sap1, nous empêchant de déterminer quelle bande correspond à notre protéine d'intérêt. Nous n'avons pas pu réaliser de quantification et de normalisation à partir de ces blots. Les autres tentatives de western blots n'ont pas été concluantes, du fait de la dégradation des protéines et d'un bruit de fond élevé au moment de la révélation des westerns blots.

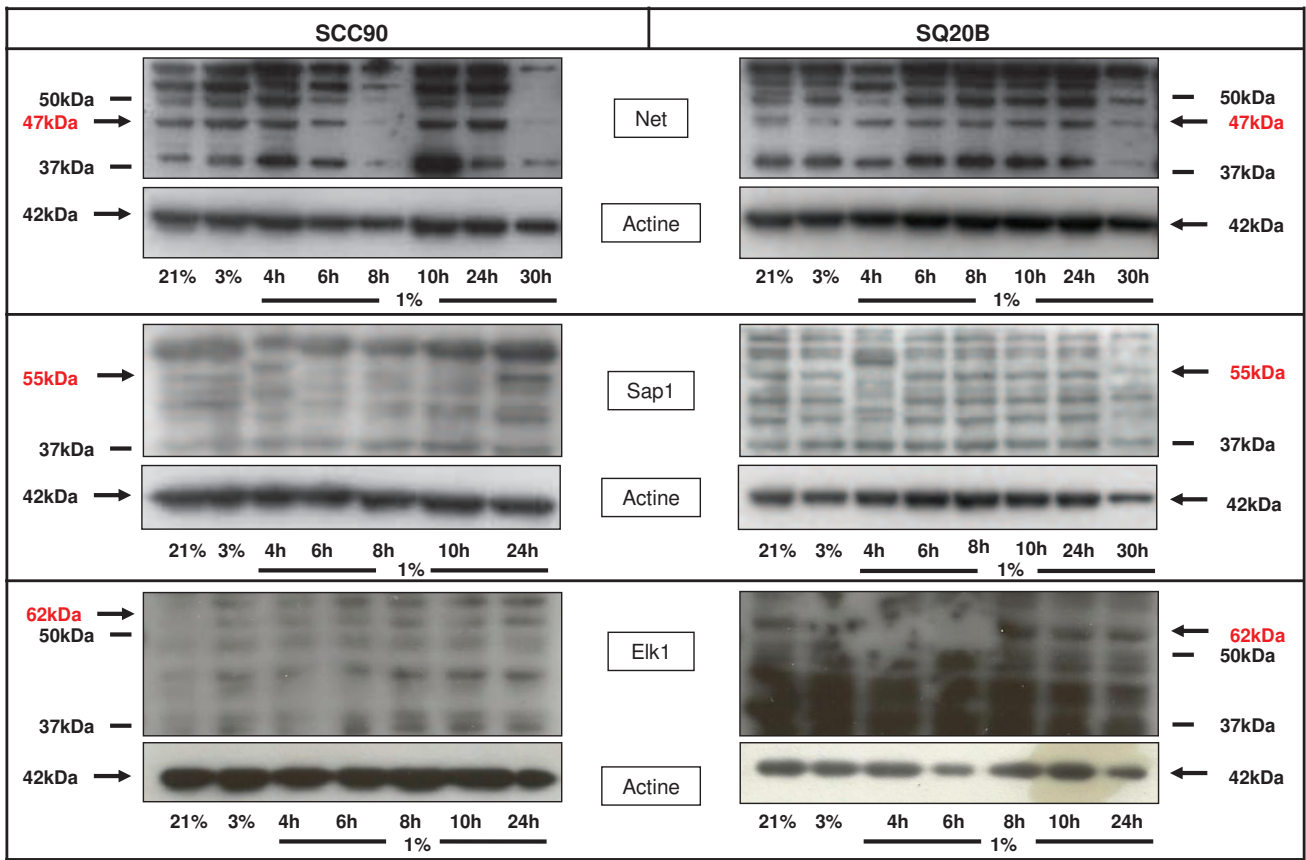


Figure 38 : Expression protéique de Net, Elk1 et Sap1 au cours d'une cinétique d'hypoxie.

PARTIE IV : DISCUSSION.

Les tumeurs oropharyngées HPV positives définissent un sous-groupe distinct de tumeurs ayant des caractéristiques cliniques, pathologiques et moléculaires différentes par rapport aux tumeurs oropharyngées HPV négatives [22, 24, 66, 184, 185].

Notre travail a concerné la caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale dans les tumeurs oropharyngées. Nous avons entrepris de déterminer, au moyen de marqueurs moléculaires, s'il existait une hypoxie différentielle entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives. Cette étude a également cherché à évaluer les capacités d'adaptation de lignées cellulaires des VADS HPV positives et HPV négatives à des conditions de culture hypoxique.

Nous avons ainsi montré que les tumeurs oropharyngées HPV positives présentent une signature moléculaire relative à l'hypoxie différente comparées aux tumeurs oropharyngées HPV négatives. **En effet, les tumeurs oropharyngées HPV positives se caractérisent par un profil d'expression de gènes liés à l'hypoxie distinct comparées aux tumeurs HPV négatives.** La recherche non supervisée de groupe basée sur l'analyse de données de transcriptomique a permis de répartir les tumeurs HPV positives dans les cluster 2 (faible hypoxie) et 3 (hypoxie intermédiaire). Le cluster 1 (forte hypoxie) regroupe uniquement des tumeurs oropharyngées HPV négatives. Ces résultats de transcriptomique ont ensuite été validés en mesurant les niveaux d'expression du gène *HIF1 α* et de certains de ses gènes cibles sur une large cohorte indépendante de tumeurs oropharyngées. Les gènes *HIF1 α* , *PHD3*, *GLUT1*, *GLUT3*, *PAI-1* et *NDRG1* sont plus faiblement exprimés dans les tumeurs HPV positives comparées aux tumeurs HPV négatives. L'expression différentielle du gène *HIF1 α* pourrait expliquer la surexpression de ses gènes cibles, bien que ce soit la stabilisation protéique du facteur HIF1 α qui est responsable de la régulation de ses gènes cibles (plus que l'expression du transcrit). L'expression du gène *VEGFA* est similaire entre les deux groupes de tumeurs. Les tumeurs HPV positives présentent également un plus faible pourcentage de cellules tumorales hypoxiques identifiées au moyen d'un marquage anti-CAIX. Ces différences sont retrouvées entre la lignée cellulaire HPV positive SCC90 et la lignée cellulaire HPV négative SQ20B.

Le fait que les tumeurs des VADS HPV positives se caractérisent par une plus faible hypoxie intratumorale demeure discuté dans d'autres études :

- la protéine HIF1 α est surexprimée dans les tumeurs de l'oropharynx [184, 185]. Cependant, la comparaison entre les tumeurs des VADS HPV positives et HPV négatives montre un niveau d'expression similaire du gène *HIF1 α* [89] et de la protéine HIF1 α [186, 187]. Ces données de la littérature sont cohérentes avec les résultats de l'équipe de Toustrup [188], qui indique que la fréquence de tumeurs très hypoxiques et faiblement hypoxiques est similaire entre les tumeurs des VADS HPV positives et HPV négatives. De plus, l'évaluation de l'hypoxie

intratumorale en utilisant un traceur spécifique de l'hypoxie, l'azomycine arabinoside marqué au ^{18}F (FAZA), en tomographie par émission de positons (TEP) dans des tumeurs des VADS en fonction de leur statut HPV, indique des volumes tumoraux hypoxiques similaires [189]. Ces résultats pourraient refléter le type de réponse des cellules tumorales à l'hypoxie.

- l'équipe de Jo montre une augmentation du niveau d'expression du gène *VEGFA* dans les tumeurs HPV positives par rapport aux tumeurs HPV négatives [89].

Ces divergences de résultats entre ces études publiées par d'autres groupes et nos résultats peuvent s'expliquer en partie par :

- la méthode de détermination du statut HPV : toutes les études citées se basent sur la détection d'ADN viral HPV et/ou sur l'expression de la protéine p16 pour confirmer le statut HPV, plutôt que sur la détection d'ADN viral HPV et sur l'expression des transcrits de E6 et E7 d'HPV. La méthode de détection par p16 n'est pas suffisamment spécifique. Environ 15 à 30% des tumeurs p16 positives sont HPV négatives [120].

- la comparaison entre des tumeurs des VADS (toutes localisations confondues) HPV positives et HPV négatives, plutôt que sur la comparaison entre des tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives.

- des cohortes de petites tailles pour certaines études (moins de 40 échantillons), tandis que la cohorte utilisée pour notre étude comporte 84 échantillons tumoraux.

- l'utilisation de différents marqueurs de l'hypoxie. Les régions hypoxiques sont marquées par un anticorps anti-HIF1 α dans certaines études. Plusieurs marqueurs endogènes de l'hypoxie ont été étudiés, dont les mieux caractérisés sont HIF1 α , CAIX et GLUT1 [190]. Dans les tumeurs des VADS, le marqueur endogène de l'hypoxie le plus sensible serait CAIX [191].

D'autres études sont cohérentes avec nos résultats :

- dans les tumeurs des VADS, les gènes *PHD3*, *GLUT1*, *PAI-1* et *NDRG1* sont surexprimés dans les tumeurs hypoxiques comparées aux tumeurs non hypoxiques, bien que le statut HPV n'ait pas été déterminé dans ces études [173, 192, 193]. Actuellement, aucune étude ne démontre que ces gènes sont régulés différenciellement entre des tumeurs des VADS HPV positives et HPV négatives.

- l'étude de Chernock et al n'observe pas de différence d'expression de *VEGFA*, au niveau protéique, entre les deux types de tumeurs [90]. Ces résultats d'expression protéique de VEGF sont similaires avec ceux obtenus par l'équipe de Fei, de Troy et de Choi [95, 186, 194]. Il n'existerait pas d'association entre le statut HPV et le niveau d'expression protéique de *VEGFA* dans les tumeurs des VADS.

- Brockton et al ont démontré, par immunofluorescence quantitative, qu'une forte expression de CAIX est corrélée à un mauvais pronostic dans une cohorte de 22 tumeurs des VADS [191]. Cependant, le statut HPV des patients était indéterminé.

L'hypoxie différentielle observée entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives pourrait refléter une différence d'oxygénation. En effet, les tumeurs HPV positives se caractérisent par une abondante vascularisation tumorale (marquage anti-CD105), suggérant une meilleure oxygénation de ces tumeurs comparées aux tumeurs HPV négatives. **Cette importante vascularisation tumorale pourrait, par conséquent, expliquer en partie l'hypoxie tumorale moindre.**

Dans un premier temps, nous avons étudié la relation entre l'hypoxie intratumorale et l'angiogenèse stromale et tumorale sur des coupes de tumeurs HPV positives et HPV négatives grâce à l'utilisation d'anticorps anti-CAIX et anti-CD31, respectivement. Nous avons pu observer que les tumeurs HPV positives se caractérisent, d'une part par de rares régions hypoxiques, et d'autre part par une vascularisation plus abondante comparées aux tumeurs HPV négatives. Cependant, nous n'avons pas pu quantifier les vaisseaux sanguins du fait de marquages aspécifiques. En effet, l'antigène CD31 (ou PECAM1) peut être exprimé à la surface de différents types cellulaires, tels que les plaquettes, les monocytes, les granulocytes et les lymphocytes B. Il était également difficile de discriminer la vascularisation physiologique du tissu d'origine de la néoangiogenèse tumorale. Ainsi, le marquage CD31 nous a uniquement permis d'appréhender la taille des vaisseaux sanguins (diamètre) et de leur localisation par rapport aux régions tumorales hypoxiques. Dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur Michael HERFS, du laboratoire de pathologie expérimentale de Liège (Belgique), une quantification automatique de la vascularisation a été réalisée au moyen d'un marquage anti-CD105. L'antigène CD105, aussi appelé endoglin, est, quant à lui, un marqueur spécifique de l'angiogenèse tumorale, contrairement à l'antigène CD31 [195]. Nous avons ainsi pu évaluer le nombre de vaisseaux sanguins présents sur chaque coupe tumorale et nous avons pu montrer que les tumeurs HPV positives ont en moyenne 34 vaisseaux par mm² (millimètre carré), tandis que les tumeurs HPV négatives n'en ont, en moyenne, que 10 par mm². Les résultats des marquages anti-CD105 sont cohérents avec les marquages anti-CAIX. Par conséquent, l'utilisation d'un anticorps anti-CD105 permet une évaluation précise et fiable de l'angiogenèse tumorale dans les tumeurs oropharyngées. Cependant, le marquage CD105 ne permet pas d'étudier la structure et la fonctionnalité de ces vaisseaux sanguins dans les deux groupes de tumeurs.

Certaines études contrastent avec nos résultats. Une corrélation positive existerait entre l'expression protéique de VEGFA et la densité microvasculaire [95]. Or, comme indiqué plus haut, les tumeurs HPV positives et HPV négatives expriment des niveaux transcriptionnels et protéiques de VEGFA similaires [95, 186, 194]. Par conséquent, les tumeurs HPV positives et les tumeurs HPV négatives ne se caractériseraient pas par une vascularisation plus abondante par rapport aux tumeurs HPV négatives.

En revanche, d'autres études émettent l'hypothèse que l'oncoprotéine virale E7 d'HPV induit l'accumulation et la stabilisation de la protéine HIF1 α , résultant en une augmentation de l'expression protéique de VEGFA dans des lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus [177, 178]. Cette donnée de la littérature est cohérente avec la vascularisation abondante observée dans les tumeurs HPV positives.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour élucider le mécanisme moléculaire à l'origine de cette vascularisation tumorale plus importante dans les tumeurs HPV positives, bien que le niveau d'expression du gène *VEGFA* soit similaire entre les tumeurs HPV positives et HPV négatives.

Les lignées cellulaires SQ20B et SCC90 ont été utilisées afin d'obtenir des xénogreffes tumorales sur souris Nude. La caractérisation de l'hypoxie par immunofluorescence (marquage anti-HIF1 α) démontre que la xénogreffe HPV positive (SCC90) présente un faible nombre de cellules marquées par anticorps anti-HIF1 α , tandis que la xénogreffe HPV négative (SQ20B) présente un grand nombre de cellules marquées par anticorps anti-HIF1 α . Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par immunohistochimie avec les tumeurs oropharyngées. Nous n'avons pas entrepris de quantification de l'angiogenèse tumorale sur ces xénogreffes. Cependant, l'examen histologique de coupes de xénogreffes (coloration Hématoxyline/Eosine) indique que les cellules SQ20B semblent former des xénogreffes faiblement vascularisées. Au contraire, les cellules SCC90 donnent lieu à des xénogreffes qui montrent une abondante vascularisation (données non publiées). Par conséquent, les xénogreffes SCC90 semblent faiblement hypoxiques et seraient fortement vascularisées comparées aux xénogreffes SQ20B.

Tous ces arguments sont en faveur d'une angiogenèse tumorale différentielle entre les deux types de tumeurs oropharyngées à l'origine de l'hypoxie intratumorale moindre dans les tumeurs HPV positives.

L'hypoxie différentielle observée entre les tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives pourrait également refléter une adaptabilité différente à un environnement pauvre en oxygène. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons évalué l'adaptabilité de cellules HPV positives (SCC90) et HPV négatives (SQ20B) à des conditions de culture hypoxique.

Ces deux lignées cellulaires répondent différemment à un environnement pauvre en oxygène.

Dans la lignée SQ20B, la protéine HIF1 α est rapidement induite et accumulée en hypoxie. L'induction des gènes cibles de HIF1 α est moins importante dans la lignée SQ20B comparée à la lignée SCC90, mais suit le profil d'induction protéique de HIF1 α . Dans les cellules SCC90, HIF1 α est induite plus tardivement et de manière moins prononcée que dans les cellules SQ20B, la

protéine est ensuite rapidement dégradée. Les niveaux d'expression des gènes liés à l'hypoxie sont fortement induits au cours de l'hypoxie par rapport aux cellules SQ20B. Nous supposons que la réponse à l'hypoxie dans la lignée SCC90 est plus dynamique. Les cellules SCC90 tentent de s'adapter et de répondre à cet environnement hypoxique en induisant de forts niveaux d'expression de gènes. Les profils d'induction des gènes en hypoxie tardive (12-24h à 1% d'oxygène) ne suivent pas le profil d'expression protéique de HIF1 α . Ces résultats suggèrent une régulation supplémentaire par un autre facteur indépendamment de HIF1 α en hypoxie tardive.

Dans la lignée SQ20B, les trois facteurs TCF semblent être régulés négativement en hypoxie. Parallèlement, il est observé une augmentation progressive et importante de c-Fos et de Fra-2 au cours de la cinétique d'hypoxie. Dans la lignée SCC90, les trois facteurs TCF et les facteurs c-Fos et fra-2 ne semblent pas être régulés au niveau transcriptionnel au cours de l'hypoxie. Le niveau d'expression du gène *Fra-1* est diminué en hypoxie dans les cellules SQ20B et SCC90. Ainsi, les résultats d'expression de gènes obtenus pour les trois facteurs TCF et les membres de la famille Fos sont nettement différents entre la lignée SQ20B et la lignée SCC90. D'autre part, les tumeurs oropharyngées HPV positives expriment un niveau plus élevé de *Elk1* et *Sap1* et un niveau faible de *Fra-1* comparées aux tumeurs oropharyngées HPV négatives, suggérant qu'il pourrait exister une relation inverse entre, d'une part, l'expression de l'ARNm de *Elk1* ou *Sap1*, et d'autre part, *Fra-1*. Le gène *Fra-1* et la protéine qu'il code sont surexprimés dans les tumeurs des VADS comparés aux tissus sains adjacents, tandis que les autres membres de la famille Fos ne seraient pas différentiellement exprimés entre les tumeurs des VADS et les tissus sains [196, 197]. Ceci est cohérent avec les niveaux d'expression de *Fra-1* obtenus dans notre cohorte de tumeurs oropharyngées. De plus, la région promotrice du gène *Fra-1* est caractérisée par un domaine de liaison d'un facteur de la famille ETS. Ainsi, Elk1 pourrait réguler l'expression de *Fra-1* dans les tumeurs oropharyngées [176, 198]. Au vu des résultats préliminaires obtenus à ce jour dans les deux lignées cellulaires des VADS et dans les tumeurs oropharyngées, il apparaît que la régulation des facteurs TCF et des membres de la famille Fos en hypoxie ne semble pas superposable à celle décrite dans les modèles de Serchov et de Stanbridge dans le cas des tumeurs oropharyngées.

De plus, parallèlement à la dégradation de HIF1 α , la protéine p53 se stabilise et s'accumule en hypoxie dans la lignée HPV positive SCC90. Cette lignée se caractérise par l'expression d'une protéine p53 sauvage, contrairement aux cellules SQ20B qui expriment une protéine mutée et non fonctionnelle. D'après le modèle de Schmid, la protéine HIF1 α est rapidement stabilisée en hypoxie précoce, contrairement à la protéine p53. En hypoxie sévère ou prolongée, HIF1 α et p53 entrent en compétition pour la liaison avec le complexe co-activateur CBP/p300. Par conséquent, l'activité de HIF1 α est diminuée et la protéine p53 se stabilise et s'accumule [168]. Ce résultat pourrait expliquer la rapide dégradation de HIF1 α après 8h d'hypoxie à 1% d'oxygène et l'accumulation de p53 après 8h d'hypoxie à 1% d'oxygène dans les cellules SCC90.

La protéine p53 induit l'apoptose, soit par son activité transcriptionnelle (induction de l'expression de gènes pro-apoptotiques), soit indépendamment de celle-ci en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques afin de libérer les protéines pro-apoptotiques, ou en interagissant directement avec ces protéines pro-apoptotiques. Certaines études ont démontré qu'en hypoxie la protéine p53 peut s'accumuler et induire l'apoptose même en présence d'HPV [174, 175]. Cependant, nous n'avons pas observé, pour les deux lignées cellulaires, d'induction de l'expression de gènes cibles de p53 impliqués dans la mort cellulaire par apoptose ou par autophagie [199]. Nos résultats d'expression de gènes sont cohérents pour la lignée SQ20B qui présente une protéine p53 mutée. Cependant, dans la lignée SCC90, p53 n'induirait pas l'expression de gènes de l'apoptose ou de l'autophagie. De même, nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau de l'expression d'autres gènes cibles de p53, tels que *p21* ou *Mdm2* dans cette lignée. Certaines études ont montré qu'en hypoxie, p53 interagirait avec des co-répresseurs de la transcription tels que mSin3A, plutôt qu'avec des co-activateurs de la transcription tels que CBP/p300 [161, 164]. Par conséquent, il est observé une accumulation et une stabilisation de la protéine p53 au niveau nucléaire, mais pas d'induction de l'expression des gènes cibles de p53 dans des lignées cellulaires de cancers du col de l'utérus et du côlon [161]. Ces données de la littérature pourraient expliquer nos résultats pour la lignée SCC90.

Cependant, ces résultats d'expression de gènes sont contradictoires avec les données obtenues par les tests luciférase, qui montrent une augmentation d'un facteur 4 de l'activité transcriptionnelle de p53 au cours d'une cinétique d'hypoxie. Or, il est connu que les transfections sur les lignées cellulaires peuvent produire un stress cellulaire important, lié notamment à la cytotoxicité des agents de transfection, et induire l'expression de gènes impliqués dans la réponse à ce stress, notamment le gène *TP53*. Il est possible que la transfection pour le test luciférase suivie de la cinétique d'hypoxie induise un stress cellulaire très important sur les cellules SCC90. La protéine p53 pourrait alors plutôt interagir avec des co-activateurs de la transcription. Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 dans le cas de ces expériences de transfection.

Le mécanisme de mort cellulaire observé dans les cellules SCC90 au cours de la cinétique d'hypoxie reste à être déterminé, ainsi que les mécanismes moléculaires. Dans la lignée SCC90, l'adaptation à l'hypoxie pourrait impliquer la présence d'HPV et l'expression de HIF1 α et p53. Ainsi, les lignées cellulaires SQ20B et SCC90 semblent être des modèles appropriés pour étudier le rôle respectif d'HPV, HIF1 α et p53 dans l'adaptation à un environnement hypoxique.

De façon intéressante, la protéine p53 est impliquée dans la régulation négative du métabolisme du glucose via l'induction du gène *TIGAR* [172]. Par conséquent, la différence dans le statut *TP53* dans les deux lignées cellulaires pourrait supposer une adaptation métabolique différente en hypoxie. La protéine HIF1 α est quant à elle impliquée dans la régulation positive du

métabolisme du glucose [170, 171]. Les protéines p53 et HIF1 α ont donc des effets antagonistes sur le métabolisme cellulaire.

Dans les deux lignées cellulaires, nous avons observé une augmentation des niveaux d'expression des gènes *GLUT1*, *ALDOC*, *PGK1*, *ENO*, *PDK1* et *LDHA*. Ainsi, en condition d'hypoxie, la production d'énergie se tournerait vers la glycolyse, et la phosphorylation oxydative serait inhibée via PDK1 dans les lignées cellulaires SQ20B et SCC90. Par conséquent, les cellules SQ20B et SCC90 seraient capables d'adapter leur métabolisme cellulaire en réponse à une hypoxie. Ces résultats d'expression de gènes restent à être confirmés en évaluant les niveaux d'expression de ces protéines. Nous pouvons également observer que le profil d'induction de ces gènes ne suit pas le profil d'induction protéique de HIF1 α au cours de la cinétique d'hypoxie dans les deux lignées cellulaires. Ces résultats suggèrent que l'induction des gènes codant les enzymes de la glycolyse serait sous la dépendance d'autres facteurs de transcription. La meilleure adaptation de la lignée SQ20B, par rapport à la lignée SCC90, ne semble donc pas s'expliquer par une meilleure adaptation du métabolisme cellulaire en hypoxie.

En conclusion, les deux lignées cellulaires sont capables de s'adapter de manière différente aux conditions de culture en hypoxie. Il reste à déterminer le rôle de chacun des deux facteurs p53 et HIF1 α dans cette adaptabilité à la réponse à l'hypoxie et leur part de régulation dans le métabolisme du glucose dans les deux lignées cellulaires SQ20B et SCC90.

D'autre part, les tumeurs HPV négatives expriment un taux d'ARNm de *GLUT1* et *GLUT3* plus élevé par rapport aux tumeurs HPV positives, ce qui est cohérent avec la surexpression du gène *HIF1 α* . Cependant, contrairement à ce l'on aurait pu attendre, nous observons que les niveaux d'expression des gènes *ALDOC*, *ENO* et *PGK1* sont similaires dans les deux groupes de tumeurs étudiés. Ainsi, les résultats obtenus ne permettent pas de faire une conclusion quant au métabolisme des tumeurs oropharyngées HPV positives et HPV négatives. Les données obtenues suggèrent également que le facteur HIF1 α ne serait pas le seul facteur responsable de la régulation des niveaux d'expression des gènes codant les enzymes de la glycolyse. Un autre mécanisme, qui reste à être déterminé, serait impliqué dans cette régulation glycolytique et dans ce switch métabolique.

Les cellules normales utilisent la glycolyse pour former 10% de leur énergie sous forme d'ATP et utilisent la phosphorylation oxydative pour former 90% de leur énergie sous forme d'ATP. Or, il est observé dans les cellules tumorales une augmentation significative (200 fois) du taux de glycolyse par rapport aux cellules normales [169], même dans les cellules tumorales correctement oxygénées [170]. Actuellement, le mécanisme moléculaire de ce switch métabolique (passage de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse) n'est pas élucidé [170]. Des études complémentaires sur le métabolisme des tumeurs oropharyngées sont donc nécessaires afin de conclure sur le mécanisme de production de l'énergie cellulaire entre les tumeurs HPV positives et HPV négatives.

Les tumeurs oropharyngées HPV positives se différencient également des tumeurs oropharyngées HPV négatives par une meilleure sensibilité aux traitements de radiothérapie [5, 70, 75] et de chimiothérapie et une meilleure réponse du système immunitaire.

Une grande majorité de tumeurs HPV positives se caractérisent par l'expression d'une protéine p53 sauvage [57, 63]. La carcinogenèse dépendante d'HPV repose en partie sur la dégradation de cette protéine via sa polyubiquitination par le complexe E6-E6AP. Cependant, en présence d'agents génotoxiques, tels qu'une irradiation ou des drogues de chimiothérapie, une fraction protéique suffisante de p53 pourrait s'accumuler et induire l'apoptose. Des lignées cellulaires des VADS HPV positives présentent également une radiosensibilité accrue comparée aux lignées cellulaires des VADS HPV négatives [200].

Une vascularisation tumorale accrue permet une meilleure oxygénation et par conséquent une bonne efficacité de la radiothérapie, qui s'appuie sur la présence d'oxygène. Une vascularisation plus abondante favorise également l'accès des drogues de chimiothérapie dans l'ensemble des compartiments de la tumeur. L'hypoxie intratumorale induit un phénotype tumoral plus agressif qui favorise la résistance aux traitements de radiothérapie et chimiothérapie. Par conséquent, l'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic. Les effets négatifs de l'hypoxie sur la radiothérapie sont établis depuis 1955 avec les travaux de Gray et Thomlinson qui démontrent que la présence de cellules hypoxiques viables limite fortement le succès de la radiothérapie. La surexpression protéique de HIF1 α , dans les tumeurs des VADS localement avancées, est associée à une réponse incomplète aux traitements de radiochimiothérapie et à la diminution de la survie sans récurrence, de la survie spécifique et de la survie globale des patients [184-186]. Dans les tumeurs oropharyngées, l'expression protéique de HIF1 α est également un facteur prédictif de la réponse au traitement de radiothérapie. En effet, la surexpression protéique de HIF1 α dans ces tumeurs est corrélée à une faible réponse aux radiations [186]. Nous avons démontré au niveau moléculaire que les tumeurs HPV positives présentent une signature hypoxique moindre. L'hypoxie moindre et la meilleure réponse aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie des tumeurs HPV positives comparées aux tumeurs HPV négatives sont également des observations cohérentes avec la littérature.

Les tumeurs des VADS HPV positives sont plus fréquemment infiltrées par les lymphocytes T par rapport aux tumeurs HPV négatives [201]. Ces lymphocytes T reconnaissent des antigènes correspondant aux oncoprotéines virales E6 et E7 [201]. De plus, les tumeurs HPV positives exprimeraient un fort niveau de gènes impliqués dans la réponse immunitaire [6]. Les tumeurs HPV positives, fortement infiltrées par des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, présenteraient une réponse immunitaire anti-tumorale élevée comparées aux tumeurs non infectées par HPV [6]. Les tumeurs oropharyngées HPV positives avec une forte infiltration lymphocytaire présentent une survie améliorée comparées aux tumeurs oropharyngées HPV négatives [202].

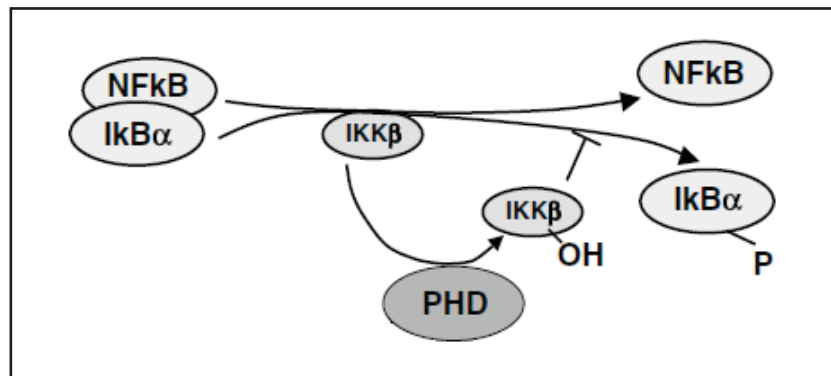


Figure 39 : L'activité de NFκB est régulée par les PHD1 et 2 en normoxie. En Hypoxie, la kinase IKKβ n'est plus hydroxylée par les PHDs et peut alors phosphoryler IκBα. Le facteur IκBα phosphorylé se dissocie de NFκB qui induit l'expression de gènes, tel que HIF1α [d'après Fong 2008].

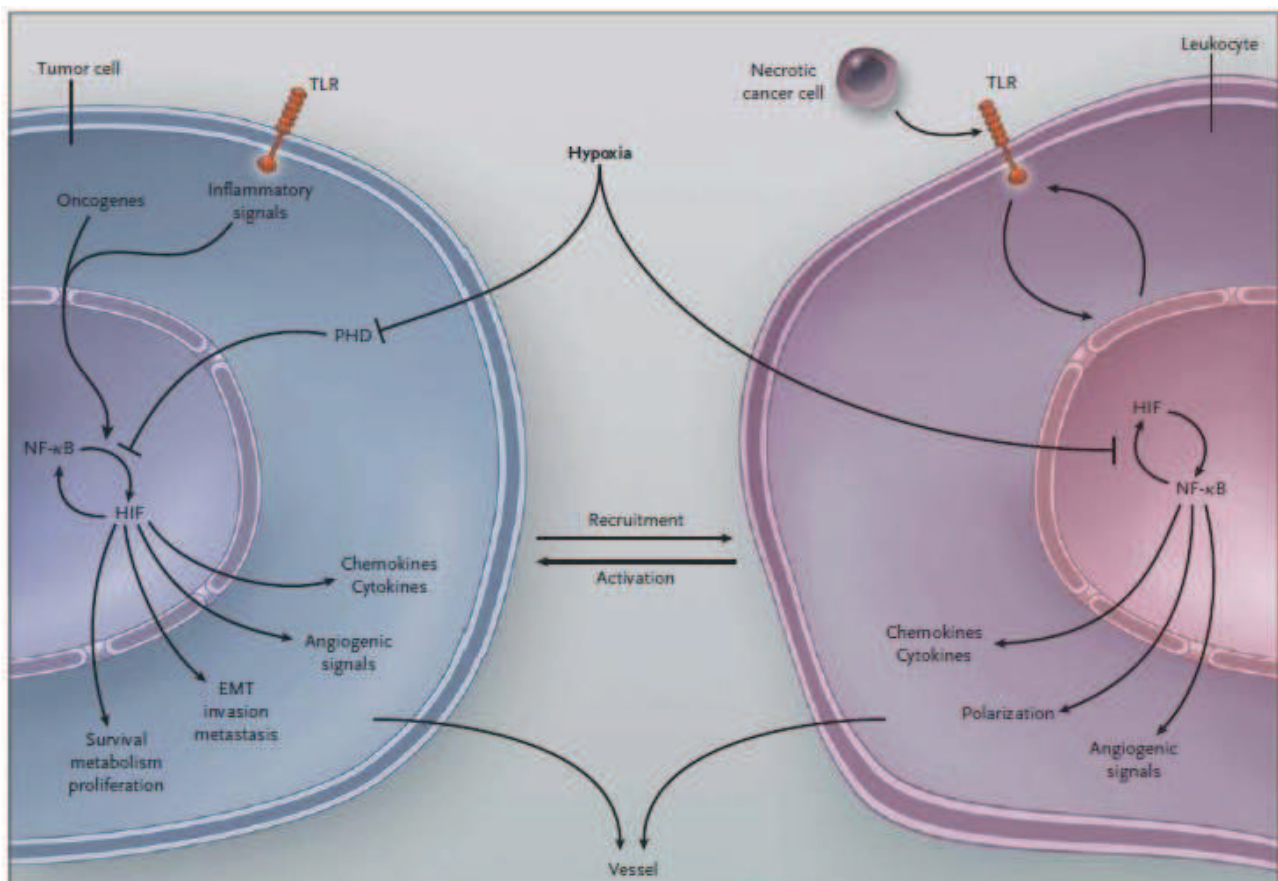


Figure 40 : Relation entre hypoxie et inflammation dans le cancer. Dans les cellules tumorales, les oncogènes, les signaux inflammatoires (médiés en partie par les récepteurs TLR (Toll Like Receptor)) et l'hypoxie activent NFκB et HIF1α. Ces facteurs induisent le recrutement et l'activation des leucocytes (via la sécrétion de chimiokines et de cytokines), la stimulation de l'angiogenèse (via la sécrétion de facteurs angiogéniques). Dans les leucocytes, l'hypoxie active également NFκB et HIF1α. Des ligands endogènes, sécrétés par les cellules nécrotiques, activent les TLR, en amont de NFκB et HIF1α. Le facteur HIF1α surexprime les TLR. [D'après Eltzschig 2011].

De plus, la relation entre l'hypoxie et le système immunitaire inné et adaptatif est de mieux en mieux établie. La réponse immunitaire innée est régulée par un ensemble de facteurs de transcription, dont le régulateur majeur est NFκB (*Nuclear Factor-κB*). NFκB régule l'inflammation, la réponse de l'immunité innée et l'homéostasie tissulaire. L'activité de ce facteur de transcription est régulée par des facteurs inhibiteurs IκB et des kinases qui phosphorylent les IκB, les IKK. Dans son état inactif, NFκB est associé à IκB. Les kinases IKK, dans leur forme non hydroxylée, phosphorylent les protéines inhibitrices IκB, qui se dissocient alors de NFκB, résultant en une activation de son activité transcriptionnelle. En normoxie, les kinases IKK sont hydroxylées par les PHD1 et 2, conduisant à une inhibition de leur activité kinase. Le facteur NFκB est alors complexé à IκB. En hypoxie, les PHDs sont privés de leur substrat, le dioxygène, et ne peuvent plus hydroxyler IKK, autorisant ces kinases à phosphoryler IκB et à libérer NFκB [203, 204] [Figure 39]. Ainsi, l'hypoxie peut stimuler l'activation de NFκB, en inhibant les PHDs qui modulent négativement l'activité catalytique de IKK [205]. Il a aussi été démontré que NFκB contrôle la régulation de la transcription du gène *HIF1α* en condition d'hypoxie [205]. En effet, dans différentes lignées de cellules myéloïdes de souris déficientes pour IKKβ, NFκB n'est pas dissocié pas de IκB en hypoxie et il n'est pas observé d'induction de l'expression du gène *HIF1α* [205]. Ces résultats suggèrent que NFκB est un activateur transcriptionnel important de *HIF1α*. Dans les cellules neutrophiles, composantes cellulaires de l'immunité innée, la protéine HIF1α est décrite pour activer l'expression du gène *NFκB* en hypoxie. Les études d'expression de gènes montrent une induction de l'expression de *NFκB* en parallèle d'une stabilisation de HIF1α. Cette induction est diminuée d'un facteur 2,4 dans des souris où l'expression du gène *HIF1α* est abrogée [206].

L'expression de HIF1α dans les macrophages et les neutrophiles contribue à la réponse à l'hypoxie en contrôlant le métabolisme cellulaire, à la réponse inflammatoire et à la régulation de la réponse du système immunitaire innée [Figure 40]. L'hypoxie serait associée à l'immunosuppression tumorale et à la progression tumorale [207], en induisant l'expression de facteurs chimiotactiques promouvant la tolérance immunitaire [208]. En effet, dans différentes lignées cellulaires de cancers du col de l'utérus, il a été démontré que l'hypoxie privilégie le recrutement de lymphocytes T CD4+ régulateurs (Treg) impliqués dans l'immunosuppression, via la sécrétion, par les cellules tumorales, de la chimiokine CCL28 (*CC-Chemokine Ligand 28*). Cette chimiokine est connue pour attirer sélectivement les Treg [208]. Les tumeurs des VADS HPV positives sont abondamment infiltrées par des lymphocytes Treg. Paradoxalement, cette infiltration a été montrée comme corrélant avec un pronostic amélioré.

Ainsi, l'hypoxie intratumorale contribue à un environnement immunotolérant. L'hypoxie moindre et l'impact de l'infiltration des lymphocytes T CD8+ sur le pronostic dans les tumeurs oropharyngées HPV positives sont donc des observations cohérentes avec la littérature. Il reste à déterminer s'il existe un lien entre le statut hypoxique et l'infiltration lymphocytaire T CD8+ dans les tumeurs des VADS.

PARTIE V : PERSPECTIVES

Etudes relatives aux modèles cellulaires et animaux :

Les investigations envisagées sur les lignées cellulaires SQ20B et SCC90 sont la réalisation d'expériences d'inhibition de l'expression de *HIF1 α* par ARN interférent, afin de déterminer la part de régulation de ce facteur dans l'induction des gènes en hypoxie tardive.

Il serait également intéressant d'évaluer la nature de la mort cellulaire que nous observons dans la lignée HPV positive SCC90. L'analyse de l'apoptose au cours de l'hypoxie pourrait être réalisée en mesurant l'activité des caspases 3 et 7. L'autophagie pourrait être analysée par l'étude de l'expression d'une protéine de fusion LC3-GFP (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 Green Fluorescent Protein*) dans des cellules transfectées. L'expression de la protéine LC3 est induite au cours de l'autophagie. Cette protéine est recrutée au niveau de la membrane des autophagosomes.

De plus, il pourrait être intéressant de réaliser les transfections pour le test luciférase et de mesurer par qRT-PCR les niveaux d'expression des gènes de l'apoptose, de l'autophagie, de *p21* et de *Mdm2* au cours de la cinétique d'hypoxie, afin de déterminer s'il existe une différence dans le niveau d'expression par rapport aux expériences sans transfection d'analyse de la mort cellulaire.

Il serait pertinent dans les cellules SCC90 (lignée exprimant une version sauvage du gène *TP53*) d'inhiber l'activité de p53 par ARN interférent et de mesurer les niveaux d'expression des gènes de la glycolyse en hypoxie, afin de comparer ces niveaux d'expression avec la lignée SQ20B exprimant une version non fonctionnelle de la protéine p53 et de déterminer la part de régulation de p53 dans le métabolisme du glucose.

Plusieurs problèmes d'ordre technique rencontrés au cours d'analyses par western blot (dégradations protéiques, bruit de fond important, signaux aspécifiques) nous ont empêchés de mener à bien nos tentatives de quantifications de l'expression des protéines Net, Elk1 et Sap1 dans les deux lignées cellulaires. Il s'avère donc nécessaire de réaliser des expériences de surexpression et d'inactivation de l'expression de ces trois facteurs de transcription pour identifier avec certitude, par western blot, le signal correspondant spécifiquement aux protéines d'intérêt.

En perspective, il serait intéressant de réaliser des expériences de surexpression et d'inactivation de l'expression de ces trois facteurs de transcription :

- afin d'évaluer les niveaux d'expression des gènes et des protéines de c-Fos et Fra-2 en normoxie et en hypoxie. Ces expériences permettraient de déterminer si la diminution de l'expression des facteurs TCF lève l'inhibition sur c-Fos ou Fra-2.
- afin de caractériser une potentielle relation inverse entre un des facteurs TCF (Net, Elk1 ou Sap1) d'une part, c-Fos ou Fra-2 d'autre part, dans la lignée SQ20B.

Le développement de modèles animaux au moyen de nouvelles xénogreffes en injectant les lignées cellulaires SQ20B et SCC90 sur des rats Nude permettra de mesurer et de visualiser,

par imagerie en temps réel, l'hypoxie intratumorale par marquage au FMISO ($[^{18}\text{F}]$ -Fluoromisonidazole) grâce à un PET-SCAN du petit animal situé sur la plateforme du Nancyclotep à Nancy.

Etudes relatives aux tumeurs humaines oropharyngées :

Une des perspectives de notre étude sur les tumeurs sera d'étudier la structure de ces vaisseaux sanguins dans les deux groupes de tumeurs oropharyngées, afin de déterminer si ces vaisseaux tumoraux sont fonctionnels, en marquant les péricytes, localisés au niveau de la lame basale de l'endothélium vasculaire et qui contribuent à la stabilité de la structure vasculaire. L'architecture vasculaire peut être visualisée par marquage immunohistochimique à l'aide :

- d'un anticorps anti-Tie2, un récepteur transmembranaire des cellules endothéliales.
- d'un anticorps anti-Ang1 (angiopoiétine 1) qui est un des ligands de Tie2. L'Ang1 permet le recrutement et la maturation des péricytes.

Dans les tumeurs oropharyngées HPV positives, il reste également à déterminer :

- le rôle des oncoprotéines virales d'HPV dans la stabilisation de la protéine HIF1 α .
- le rôle d'HPV dans l'angiogenèse accrue dans les tumeurs oropharyngées : l'angiogenèse accrue est-elle un processus spécifique caractéristique de la formation des tumeurs oropharyngées induite par HPV ?

CONCLUSION GENERALE.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse, il apparaît que les tumeurs oropharyngées HPV positives présentent un statut hypoxique moindre et une vascularisation tumorale plus abondante comparées aux tumeurs oropharyngées HPV négatives. Les marqueurs les plus pertinents pour évaluer l'hypoxie intratumorale dans les tumeurs oropharyngées semblent être :

- l'analyse de l'expression des gènes *HIF1 α* , *PHD3*, *GLUT1*, *PAI-1* et *NDRG1* par qRT-PCR.
- l'analyse de l'expression protéique de CA-IX (hypoxie) et de CD105 (angiogenèse tumorale) par immunohistochimie.

Parallèlement à cette signature moléculaire du statut hypoxique, les tumeurs oropharyngées HPV positives présentent également une importante infiltration lymphocytaire T CD8+ et Trég CD4+, corrélée à une survie améliorée. Il conviendra donc d'évaluer à l'avenir l'interaction entre cette réponse immunitaire par infiltration de lymphocytes T CD8+ et CD4+ et la présence de régions tumorales hypoxiques des tumeurs des VADS.

Le statut de moindre hypoxie associé à un meilleur pronostic implique d'en les caractéristiques moléculaires pour distinguer les catégories de tumeurs des VADS. Par ailleurs, les tumeurs des VADS ont des pronostics différents selon leur statut HPV. La détermination du statut HPV dans les échantillons tumoraux devrait reposer sur la détection de l'ADN d'HPV et de l'expression des transcrits E6 et E7 d'HPV, témoin d'un virus transcriptionnellement actif.

La distinction des différents groupes de tumeurs des VADS en fonction de leur statut HPV et de leur caractéristiques hypoxiques devrait permettre de :

- de mieux évaluer l'impact des différents protocoles d'essais thérapeutiques
- de proposer des désescalades de doses en radiothérapie et en chimiothérapie, pour en atténuer les effets secondaires, aux patients ayant une tumeur HPV positive non hypoxique ou faiblement hypoxique.
- d'améliorer la réponse des tumeurs HPV négatives et HPV positives fortement hypoxiques aux traitements de radiothérapie en utilisant des molécules radiosensibilisatrices spécifiques des régions hypoxiques, telles que le nimorazole ou le FAZA.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cancer, I.N.d., *Les cancers en France*. Edition 2013.
2. Chaturvedi, A.K., et al., *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. J Clin Oncol, 2011. **29**(32): p. 4294-4301.
3. Ramqvist, T. and T. Dalianis, *Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(11): p. 1671-7.
4. Hammarstedt, L., et al., *Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer*. Int J Cancer, 2006. **119**(11): p. 2620-3.
5. Lindel K, et al., *Human Papillomavirus Positive Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx*. Cancer 2001. **92**(4): p. 805-813.
6. Jung, A.C., et al., *CD8-alpha T-cell infiltration in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma correlates with improved patient prognosis*. Int J Cancer, 2013. **132**(2): p. E26-36.
7. Lassen, P., et al., *HPV-associated p16-expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer*. Radiother Oncol, 2010. **94**(1): p. 30-5.
8. Chen, L., A. Endler, and F. Shibasaki, *Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors*. Exp Mol Med, 2009. **41**(12): p. 849-857.
9. Harris, A.L., *Hypoxia : a key regulatory factor in tumour growth*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
10. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
11. Bose, P., N.T. Brockton, and J.C. Dort, *Head and neck cancer: from anatomy to biology*. Int J Cancer, 2013. **133**(9): p. 2013-2023.
12. Argiris A., et al., *Head and neck cancer*. The Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-1709.
13. Pai, S.I. and W.H. Westra, *Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 49-70.
14. Neufcoeur, P.E., et al., *Involvement of human papillomavirus in upper aero-digestive tracts cancers*. Bull Cancer, 2009. **96**(10): p. 941-50.
15. Gandini, S., et al., *Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis*. Int J Cancer, 2008. **122**(1): p. 155-164.
16. Vineis, P., et al., *Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence*. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 2004. **96**(2): p. 99-106.
17. Hashibe, M., et al., *Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(10): p. 777-89.
18. Macfarlane G.J. , et al., *Alcohol, Tobacco, Diet and the Risk of Oral Cancer: a Pooled Analysis of Three Case-Control Studies*. Oral Oncol, Euro J Cancer, 1995. **31B**(3): p. 181-187.
19. Hashibe, M., et al., *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(2): p. 541-50.
20. Hill, C., *Epidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures*. Bulletin du Cancer, 2000. **87**.
21. Franceschi S, et al., *Smoking and Drinking in Relation to Cancers of the Oral Cavity, Pharynx, Larynx, and Esophagus in Northern Italy*. Cancer Research, 1990. **50**: p. 6502-6507.
22. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
23. D'Souza G, et al., *Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer*. The new england journal of medicine, 2007. **356**(19): p. 1944-1956.
24. Gillison M.L., et al., *Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers*. Journal of the National Cancer Institute, 2000. **92**(9): p. 709-720.
25. Gillison, M.L., et al., *Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 5**: p. 34-54.
26. Maalouf, M., et al., *Different mechanisms of cell death in radiosensitive and radioresistant p53 mutated head and neck squamous cell carcinoma cell lines exposed to carbon ions and x-rays*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **74**(1): p. 200-209.

27. Bjorge T., et al., *Second primary cancers in patients with carcinoma in situ of the uterine cervix. The Norwegian experience 1970-1992*. Int. J. Cancer, 1996. **62**: p. 29-33.
28. Franceschi S, et al., *Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**: p. 567-575.
29. Warnakulasuriya, S., *Is human papillomavirus a risk factor for oral squamous cell carcinoma ? Evidence-Based Dentistry*, 2003. **4**(2): p. 29-29.
30. L., G.M., et al., *Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease?* Curr Opin Oncology, 1999.
31. Smeets, S.J., et al., *Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways*. Int J Cancer, 2011. **128**(7): p. 1596-605.
32. Gillison, M.L., et al., *Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010*. JAMA, 2012. **307**(7): p. 693-703.
33. Worden, F.P., 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): p. 3138-46.
34. Gillison, M.L., et al., *Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(6): p. 407-420.
35. Heck, J.E., et al., *Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium*. Int J Epidemiol, 2010. **39**(1): p. 166-81.
36. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
37. Bonner J. A., et al., *Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. The new england journal of medicine, 2008. **354**(6): p. 567-578.
38. De Villiers, E.M., *Cross-roads in the classification of papillomaviruses*. Virology, 2013. **445**.
39. Mougin C., Nicoliera M, and D.-B. AZ., *HPV et cancers : mécanismes de l'oncogénèse*. Revue Francophone des Laboratoires, 2008. **405**: p. 35-42.
40. Sapp, M. and M. Bienkowska-Haba, *Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus*. FEBS J, 2009. **276**(24): p. 7206-16.
41. Rautava, J. and S. Syrjanen, *Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis*. Head Neck Pathol, 2012. **6 Suppl 1**: p. S3-15.
42. Prétet, J.-L., et al., *Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France : EDITH study*. Int J Cancer, 2008. **122**: p. 428-432.
43. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.
44. Letian, T. and Z. Tianyu, *Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus*. Virol J, 2010. **7**: p. 2.
45. Bousarghin L, et al., *Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Enter Cells Use Different Endocytosis Pathways To*. Journal of virology, 2003. **77**(6): p. 3846-3850.
46. Raybould R, Fiander A, and H. S, *Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression*. The Open Clinical Cancer Journal, 2011. **5**: p. 1-7.
47. Prétet J-L, Charlot J-F, and M. C, *Aspects virologiques et carcinologiques des papillomavirus humains HPV*. Bull. Acad. Natle Méd, 2007. **191**: p. 611-623.
48. Kreimer, A.R., et al., *Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature*. Sex Transm Dis, 2010. **37**(6): p. 386-91.
49. Kreimer, A.R., et al., *The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011. **20**(1): p. 172-82.
50. Duray A, et al., *High prevalence of high-risk human papillomavirus in palatine tonsils from healthy children and adults*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2011. **145**(2).
51. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
52. Califano J, et al., *Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization*. Cancer research, 1996. **56**: p. 2488-2492.
53. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. The Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-1709.
54. Majchrzak, E., et al., *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature*. Radiol Oncol, 2014. **48**(1): p. 1-10.

55. Braakhuis, B.J.M., et al., *Genetic Patterns in Head and Neck Cancers That Contain or Lack Transcriptionally Active Human Papillomavirus*. Journal of the National Cancer Institute, 2004. **96**(13): p. 998-1006.
56. Smeets, S.J., et al., *Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus*. Oncogene, 2006. **25**(17): p. 2558-64.
57. Licitra, L., et al., *High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(36): p. 5630-6.
58. Agrawal, N., et al., *Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1154-1157.
59. Stransky, N., et al., *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1157-60.
60. Ragin, C.C., et al., *11q13 amplification status and human papillomavirus in relation to p16 expression defines two distinct etiologies of head and neck tumours*. Br J Cancer, 2006. **95**(10): p. 1432-8.
61. Sisk EA, et al., *Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma*. Head and Neck, 2002. **24**(9): p. 841-849.
62. Smith, E.M., et al., *Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(2): p. 421-7.
63. Westra, W.H., et al., *Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(2): p. 366-9.
64. Deshpande, A.M. and D.T. Wong, *Molecular mechanisms of head and neck cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2008. **8**(5): p. 799-809.
65. Partridge, M., D.E. Costea, and X. Huang, *The changing face of p53 in head and neck cancer*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2007. **36**(12): p. 1123-38.
66. Charfi, L., et al., *Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome*. Cancer Lett, 2008. **260**(1-2): p. 72-78.
67. Ritchie, J.M., et al., *Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx*. Int J Cancer, 2003. **104**(3): p. 336-44.
68. Hong, A., et al., *Relationships between epidermal growth factor receptor expression and human papillomavirus status as markers of prognosis in oropharyngeal cancer*. Eur J Cancer, 2010. **46**(11): p. 2088-96.
69. Shi, W., et al., *Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6213-21.
70. Lau, H.Y., et al., *Prognostic significance of p16 in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent cisplatin and radiotherapy*. Head Neck, 2011. **33**(2): p. 251-6.
71. Mellin H, et al., *Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer : clinical correlates, risk of relapse and survival*. Int J Cancer, 2000. **89**: p. 300–304.
72. Ernster J.A., et al., *Rising Incidence of Oropharyngeal Cancer and the Role of Oncogenic Human Papilloma Virus*. The Laryngoscope, 2007. **117**: p. 2115-2128.
73. Maxwell, J.H., et al., *Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(4): p. 1226-35.
74. Schwartz, S.R., et al., *Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. **125**(1): p. 1-9.
75. Ang, et al., *Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer*. The New England Journal of Medicine, 2010. **361**(1): p. 24-36.
76. Hafkamp, H.C., et al., *Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas*. Int J Cancer, 2008. **122**(12): p. 2656-64.
77. Furniss, C.S., et al., *Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2007. **120**(11): p. 2386-2392.
78. Chien, C.Y., et al., *Lower prevalence but favorable survival for human papillomavirus-related squamous cell carcinoma of tonsil in Taiwan*. Oral Oncol, 2008. **44**(2): p. 174-179.

79. Straetmans, J.M., et al., *Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas*. Laryngoscope, 2009. **119**(10): p. 1951-7.
80. Zhao, D., et al., *Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer*. Int J Oral Sci, 2009. **1**(3): p. 119-25.
81. Nichols, A.C., et al., *Bcl2 and human papilloma virus 16 as predictors of outcome following concurrent chemoradiation for advanced oropharyngeal cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(7): p. 2138-46.
82. Al-Swiahb, et al., *Prognostic Impact of p16, p53, Epidermal Growth Factor Receptor, and Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer in a Betel Nut–Chewing Area*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **136**(5): p. 502-508.
83. Alos, L., et al., *Human papillomaviruses are identified in a subgroup of sinonasal squamous cell carcinomas with favorable outcome*. Cancer, 2009. **115**(12): p. 2701-2709.
84. Kuo, K.T., et al., *The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome*. Mod Pathol, 2008. **21**(4): p. 376-86.
85. Fakhry, C., et al., *Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(4): p. 261-269.
86. Klozar, J., et al., *HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008. **265 Suppl 1**: p. S75-82.
87. Smith, E.M., et al., *Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer*. Infect Agent Cancer, 2010. **5**: p. 4.
88. Badaracco W, et al., *Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours*. Oncology reports, 2007. **17**: p. 931-939.
89. Jo S, et al., *Human Papillomavirus Infection as a Prognostic Factor in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas Treated in a Prospective Phase II Clinical Trial*. Anticancer research, 2009. **29**: p. 1467-1474.
90. Chernock R.D, et al., *Human Papillomavirus–Related Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2011. **137**(2): p. 163-169.
91. Smith E.M, et al., *p16INK4a Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer*. Oral Oncology, 2008. **44**: p. 133-142.
92. Lindquist, D., et al., *Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7*. Mol Oncol, 2007. **1**(3): p. 350-5.
93. Iglesias-Bartolome R, Martin D, and G. J.G, *Exploiting the Head and Neck Cancer Oncogenome: Widespread PI3K-mTOR Pathway Alterations and Novel Molecular Targets* Cancer Discovery, July 2013 **3**.
94. Lui, V.W., et al., *Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers*. Cancer Discov, 2013. **3**(7): p. 761-9.
95. Fei, J., et al., *Prognostic significance of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinomas of the tonsil in relation to human papillomavirus status and epidermal growth factor receptor*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(10): p. 2908-2917.
96. Ritta, M., et al., *Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression*. Head Neck, 2009. **31**(3): p. 318-27.
97. Kong, C.S., et al., *The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **74**(2): p. 553-61.
98. Sedaghat, A.R., et al., *Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas*. Laryngoscope, 2009. **119**(8): p. 1542-9.
99. Na, Il, et al., *EGFR mutations and human papillomavirus in squamous cell carcinoma of tongue and tonsil*. Eur J Cancer, 2007. **43**(3): p. 520-6.
100. Jung, A.C., et al., *Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2010. **126**(8): p. 1882-94.

101. Sugiyama, M., et al., *Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival*. Br J Oral Maxillofac Surg, 2007. **45**(2): p. 116-22.
102. Weinberger, P.M., et al., *Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis*. J Clin Oncol, 2006. **24**(5): p. 736-47.
103. De Petrini M, et al., *Head and neck squamous cell carcinoma: role of the human papillomavirus in tumour progression*. The new microbiologica, 2006. **29**: p. 25-33.
104. Dahlgren, L., et al., *Comparative genomic hybridization analysis of tonsillar cancer reveals a different pattern of genomic imbalances in human papillomavirus-positive and -negative tumors*. Int J Cancer, 2003. **107**(2): p. 244-249.
105. Li, W., et al., *Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil*. Int J Cancer, 2003. **106**(4): p. 553-8.
106. Mellin, H., et al., *Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer*. Int J Cancer, 2002. **102**(2): p. 152-8.
107. Ringström E, et al., *Human Papillomavirus Type 16 and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*. Clin Cancer Res, 2002. **8**: p. 3187-3192.
108. Haraf D J, et al., *Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival*. Clin Cancer Res, 1996. **2**: p. 755-762.
109. Koutcher, L.D., et al., *Cisplatin (CDDP) and Radiation (RT) versus Cetuximab (C) and RT in the Context of Human Papillomavirus (HPV) and P16 in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer (LAHNC)*. International Journal of Radiation Oncology*Biophysics, 2010. **78**(3): p. S63.
110. Badaracco, et al., *Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours*. Oncology Reports, 2007. **17**: p. 931-939.
111. Hoffmann M, et al., *Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients*. Cancer Letters, 2005. **218**(2): p. 199-206.
112. Azzimonti, et al., *Altered patterns of the interferon-inducible gene IFI16 expression in head and neck squamous cell carcinoma: immunohistochemical study including correlation with retinoblastoma protein, human papillomavirus infection and proliferation index*. Histopathology, 2004. **45**: p. 560-572.
113. Koskinen, W.J., et al., *Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Int J Cancer, 2003. **107**(3): p. 401-6.
114. Strome S.E, et al., *Squamous Cell Carcinoma of the Tonsils: A Molecular Analysis of HPV Associations*. Clin Cancer Res, 2002. **8**: p. 1093-1100.
115. Pintos J, et al., *Human Papillomavirus and Prognoses of Patients with Cancers of the Upper Aerodigestive Tract*. Cancer 1999. **85**(9): p. 1903-1909.
116. Riethdorf S., et al., *p53 gene mutations and HPV infection in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long term follow-up study*. J Oral Pathol Med, 1997. **26**(315-321).
117. Paz I.B, et al., *Human Papillomavirus (HPV) in Head and Neck Cancer*. Cancer 1997. **79**(3): p. 595-604.
118. Kozomara, R., et al., *p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival*. J Craniomaxillofac Surg, 2005. **33**(5): p. 342-8.
119. de Jong, M.C., et al., *HPV and high-risk gene expression profiles predict response to chemoradiotherapy in head and neck cancer, independent of clinical factors*. Radiother Oncol, 2010. **95**(3): p. 365-70.
120. Wasylyk, B., J. Abecassis, and A.C. Jung, *Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust?* Oral Oncol, 2013. **49**(10): p. e33-7.
121. Reimers, N., et al., *Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(8): p. 1731-8.
122. Koch W.M, et al., *Head and Neck Cancer in Nonsmokers: A Distinct Clinical and Molecular Entity*. The Laryngoscope, 1999. **109**: p. 1544-1551.
123. Pintos, J., et al., *Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada*. Oral Oncol, 2008. **44**(3): p. 242-50.

124. Kutler, D.I., *Human Papillomavirus DNA and p53 Polymorphisms in Squamous Cell Carcinomas From Fanconi Anemia Patients*. Cancer Spectrum Knowledge Environment, 2003. **95**(22): p. 1718-1721.
125. Mork J, et al., *Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2001. **344**(15): p. 1125-1131.
126. Lacau St Guily, J., et al., *Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France—The EDiTH VI study*. Journal of Clinical Virology, 2011. **51**.
127. Lacau St Guily, J., et al., *Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers*. Head and Neck Oncology, 2011. **3**(6).
128. Semenza, G.L., *Life with oxygen*. Science, 2007. **318**(5847): p. 62-64.
129. Puyraimond-Zemmour, D. and S. Vignot, *Le métabolisme de la cellule tumorale : l'effet Warburg*. Oncologie, 2013. **15**(9): p. 435-440.
130. Bartrons, R. and J. Caro, *Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(3): p. 223-9.
131. Carreau, A., et al., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1239-1253.
132. Bernsen, et al., *Hypoxia in a human intracerebral glioma model*. J Neurosurg, 2000. **93**: p. 449–454.
133. E., L., *Angiogenèse et radiothérapie*. Bulletin du cancer, 2007. **94**: p. S197-202.
134. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine*. Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.
135. Janssen, H.L., et al., *Hypoxia in head and neck cancer: how much, how important?* Head Neck, 2005. **27**(7): p. 622-38.
136. Bergers, G. and S. Song, *The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance*. Neuro Oncol, 2005. **7**(4): p. 452-464.
137. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(6): p. 417-427.
138. Tredan, O., R. Grantab, and C. Dumontet, *Can tumor hypoxia be turned into a chemotherapeutic advantage?* Bull Cancer, 2008. **95**(5): p. 528-34.
139. Bikflavi A, *Angiogenèse tumorale*. Bull Cancer, 2006. **Hors série**: p. 154-&64.
140. Semenza G.L and W. G.L, *A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation*. Molecular and Cellular Biology, 1992. **12**(12): p. 5447-5454.
141. Wang G L , et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1995. **92**: p. 5510-5514.
142. Iyer N.V, Leung S.W, and S. G.L, *The Human Hypoxia-Inducible Factor 1a Gene: HIF1A Structure and Evolutionary Conservation*. Genomics 1998. **52**: p. 159–165.
143. Huang L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1a is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1998. **95**: p. 7987–7992.
144. Tian, H., S.L. McKnight, and D.W. Russell, *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes & Development, 1997. **11**(1): p. 72-82.
145. Wiesener M.S, et al., *Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs* The FASEB Journal, 2002.
146. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32405-8.
147. Berra, E., A. Ginouves, and J. Pouyssegur, *The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling*. EMBO Rep, 2006. **7**(1): p. 41-45.
148. Fong, G.H., *Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(6): p. 549-560.
149. Boulahbel, H., R.V. Duran, and E. Gottlieb, *Prolyl hydroxylases as regulators of cell metabolism*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(1): p. 291-294.
150. Chan, D.A., et al., *Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6415-6426.

151. Berra, et al., *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia*. The EMBO Journal, 2003. **22**(16): p. 4082-4090.
152. del Peso, L., et al., *The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48690-48695.
153. Kaur, B., et al., *Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 134-53.
154. Nakayama, K., et al., *Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1 α abundance, and modulates physiological responses to hypoxia*. Cell, 2004. **117**(7): p. 941-52.
155. Ruas J.L., et al., *Complex Regulation of the Transactivation Function of Hypoxia-inducible Factor-1 α by Direct Interaction with Two Distinct Domains of the CREB-binding Protein/p300*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2601–2609.
156. Arany Z, et al., *An essential role for p300yCBP in the cellular response to hypoxia*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. **93**: p. 12969–12973.
157. Dayan, F., et al., *The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1 α* . Cancer Research, 2006. **66**(7): p. 3688-3698.
158. Semenza, G.L., *Oxygen homeostasis*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(3): p. 336-61.
159. Gross, C., H. Dubois-Pot, and B. Wasylyk, *The ternary complex factor Net/Elk-3 participates in the transcriptional response to hypoxia and regulates HIF-1 α* . Oncogene, 2008. **27**(9): p. 1333-1341.
160. Rerolle, et al., *L'inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène: physiologie et rôle en physiopathologie rénale*. Néphrologie, 2001. **22**(1): p. 5-13.
161. Koumenis, C., et al., *Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1297-310.
162. Sermeus, A. and C. Michiels, *Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways*. Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e164.
163. Fels D.R and K. C., *HIF-1 α and p53: the ODD couple?* TRENDS in Biochemical Sciences, 2005. **30**(8): p. 426-429.
164. Hammond, E.M., et al., *Genome-wide analysis of p53 under hypoxic conditions*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(9): p. 3492-504.
165. Yee, K.S. and K.H. Vousden, *Complicating the complexity of p53*. Carcinogenesis, 2005. **26**(8): p. 1317-22.
166. Graeber TG, et al., *Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours*. Nature, 1996. **379**(4): p. 88-91.
167. Blagosklonny M.V, et al., *p53 Inhibits Hypoxia-inducible Factor-stimulated Transcription*. J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 11995-11998.
168. Schmid T, et al., *p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Biochem. J. , 2004. **380**: p. 289–295.
169. Akram, M., *Mini-review on glycolysis and cancer*. J Cancer Educ, 2013. **28**(3): p. 454-457.
170. Denko, *Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*. Nature, 2008. **8**: p. 705-713.
171. Semenza, G.L., *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(1): p. 51-6.
172. Bensaad, K., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006. **126**(1): p. 107-120.
173. Toustrup K, et al., *Development of a Hypoxia Gene Expression Classifier with and Neck Predictive Impact for Hypoxic Modification of Radiotherapy in Head Cancer*. cancer research, 2011. **71**: p. 5923-5931.
174. Kim C.Y. , et al., *Selection of Human Cervical Epithelial Cells That Possess Reduced Apoptotic Potential to Low-Oxygen Conditions* Cancer Research 1997. **57**: p. 4200-4204.
175. Alarcón R, et al., *Hypoxia Induces p53 Accumulation through MDM2 Down-Regulation and Inhibition of E6-mediated Degradation*. Cancer Res, 1999. **59**: p. 6046-6051.
176. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *Ets ternary complex transcription factors*. Gene, 2004. **324**: p. 1-14.

177. Nakamura M, et al., *Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses*. *Virology*, 2009. **387**: p. 442–448.
178. Bodily, J.M., K.P. Mehta, and L.A. Laimins, *Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases*. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): p. 1187-1195.
179. Rodolico, V., et al., *Hypoxia inducible factor-1 alpha expression is increased in infected positive HPV16 DNA oral squamous cell carcinoma and positively associated with HPV16 E7 oncoprotein*. *Infect Agent Cancer*, 2011. **6**(1): p. 18.
180. Serchov, T., et al., *Involvement of net and Hif1alpha in distinct yet intricately linked hypoxia-induced signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(28): p. 21223-32.
181. Gross, C., et al., *The ternary complex factor net is downregulated by hypoxia and regulates hypoxia-responsive genes*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(11): p. 4133-4141.
182. van Riggelen, J., et al., *Loss of net as repressor leads to constitutive increased c-fos transcription in cervical cancer cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(5): p. 3286-94.
183. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(24): p. 10853-10862.
184. Aebersold D.M, et al., *Expression of Hypoxia-inducible Factor-1a: A Novel Predictive and Prognostic Parameter in the Radiotherapy of Oropharyngeal Cancer*. *Cancer res*, 2001. **61**: p. 2911-2916.
185. Silva, P., et al., *Prognostic significance of tumor hypoxia inducible factor-1alpha expression for outcome after radiotherapy in oropharyngeal cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008. **72**(5): p. 1551-9.
186. Choi, H.G., et al., *Expression of hypoxic signaling markers in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014.
187. Hong, A., et al., *The prognostic significance of hypoxia inducing factor 1-alpha in oropharyngeal cancer in relation to human papillomavirus status*. *Oral Oncol*, 2013. **49**(4): p. 354-9.
188. Toustrup, K., et al., *Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck*. *Radiother Oncol*, 2012. **102**(1): p. 122-9.
189. Mortensen, L.S., et al., *FAZA PET/CT hypoxia imaging in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy: results from the DAHANCA 24 trial*. *Radiother Oncol*, 2012. **105**(1): p. 14-20.
190. Hoogsteen, I.J., et al., *Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. A review*. *Head Neck*, 2007. **29**(6): p. 591-604.
191. Brockton N, et al., *High Stromal Carbonic Anhydrase IX Expression Is Associated With Decreased Survival in p16-Negative Head-and-Neck Tumors*. *International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics*, 2011. **80**(1): p. 249–257.
192. Bayer C, et al., *PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck*. *Radiotherapy and Oncology*, 2008. **86**(3): p. 361-368.
193. Schilling, D., et al., *Induction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) by hypoxia and irradiation in human head and neck carcinoma cell lines*. *BMC Cancer*, 2007. **7**: p. 143.
194. Troy, J.D., et al., *Expression of EGFR, VEGF, and NOTCH1 suggest differences in tumor angiogenesis in HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma*. *Head Neck Pathol*, 2013. **7**(4): p. 344-55.
195. Nassiri F, et al., *Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy*. *Anticancer research* 2011. **31**: p. 2283-2290.
196. Mangone, et al., *Overexpression of Fos-related antigen-1 in head and neck squamous cell carcinoma*. *Int. J. Exp. Path*, 2005. **86**: p. 205-212.
197. Zhang, L., et al., *Fos-related activator-1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and associated with tumor lymph node metastasis*. *J Oral Pathol Med*, 2010. **39**(6): p. 470-6.

198. Adiseshaiah, P., et al., *Mitogen regulated induction of FRA-1 proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TPA response elements*. *Oncogene*, 2005. **24**(26): p. 4193-4205.
199. Nikolettou, V., et al., *Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3448-59.
200. Rieckmann, T., et al., *HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity*. *Radiother Oncol*, 2013. **107**(2): p. 242-6.
201. Heusinkveld, M., et al., *Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(2): p. E74-85.
202. Ward, M.J., et al., *Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(2): p. 489-500.
203. Fong, G.H. and K. Takeda, *Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(4): p. 635-41.
204. Rius, J., et al., *NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha*. *Nature*, 2008. **453**(7196): p. 807-11.
205. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(9): p. 609-17.
206. Walmsley, S.R., et al., *Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity*. *J Exp Med*, 2005. **201**(1): p. 105-15.
207. Palazon, A., et al., *Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(5): p. 1207-13.
208. Facciabene, A., et al., *Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells*. *Nature*, 2011. **475**(7355): p. 226-30.

Titre : Analyse et caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx.

Résumé : Les carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures (VADS) se situent au sixième rang des cancers les plus fréquents dans le monde. Ces tumeurs sont liés à deux facteurs de risque : l'intoxication éthylo-tabagique (80% des cas) et l'infection de l'épithélium des VADS par les papillomavirus humain (HPV) à haut risque oncogène (20% des cas). Ces derniers définissent une sous-population de patients de meilleur pronostic. Une des hypothèses actuellement étudiées, afin d'expliquer la survie améliorée des patients HPV positifs, serait une hypoxie moindre dans ces tumeurs. En effet, les tumeurs des VADS sont fréquemment hypoxiques, et l'hypoxie intratumorale est un facteur de mauvais pronostic. Dans une première partie de cette thèse, nous avons entrepris une caractérisation moléculaire de l'hypoxie intratumorale dans les tumeurs humaines oropharyngées en fonction du statut HPV. Il apparaît que les tumeurs HPV positives présentent un statut hypoxique moindre comparées aux tumeurs HPV négatives. Ces tumeurs se caractérisent également par une abondante vascularisation intratumorale, qui pourrait être à l'origine de ce statut hypoxique moindre. Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'adaptation à l'hypoxie de la lignée cellulaire HPV négative SQ20B et la lignée cellulaire HPV positive SCC90. De plus, des modèles de xénogreffes ont été établis à partir de ces mêmes lignées cellulaires et ont été analysés du point de vue de l'hypoxie intratumorale. De façon comparable aux tumeurs HPV positives, les xénogreffes obtenus à partir de la lignée SCC90 montre un statut hypoxique réduit comparés aux xénogreffes SQ20B. Les deux lignées cellulaires s'adaptent également différemment en hypoxie *in vitro*. La réponse à l'hypoxie dans la lignée SCC90 semble plus dynamique. En effet, la lignée SCC90 tente de s'adapter et de répondre à cet environnement hypoxique en induisant de fort niveau d'expression de gènes comparée à la lignée SQ20B.

Abstract: Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents the sixth most common malignancy worldwide. The major risk factors for HNSCC identified are tobacco use and alcohol consumption (80% of all HNSCC), which seem to have a synergistic effect. A subgroup of HNSCCs (20% of cases), particularly those of the oropharynx, is caused by infection with high-risk types of human papillomavirus (HPV). Human papillomavirus HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma defines a distinct clinical subgroup of head and neck cancer patients with improved prognosis. Currently, one of the several hypothesis studied to account for their improved survival outcomes could be a distinct hypoxia status compared to their HPV-negative counterpart. Indeed, tumour hypoxia is common in solid tumours including head and neck tumours, and hypoxia is a well-known poor prognosis factor. In first part of this thesis, we have performed a molecular characterisation of tumor hypoxia on cohort of oropharyngeal tumours according to HPV status of the patients. The results support the hypothesis that HPV-related tumours display a lesser hypoxia status compared to HPV-negative oropharyngeal tumours. These HPV-related tumours also characterize by an abundant tumour vascularisation, which could be responsible for a lesser hypoxia status. In a second part, we have studied the ability of the adaptation to hypoxia of the HPV-positive SCC90 cell line and HPV-negative SQ20B cell line. Furthermore, HPV-positive and HPV-negative HNSCC xenograft models have been established and have been analysed about tumor hypoxia. Similar to HPV-related HNSCC, tumours-derived HPV positive cell lines display a reduced hypoxic status compared to tumours-derived HPV negative cell lines. The two cell lines adapt also differently to *in vitro* hypoxia. In the HPV-positive cell line, the hypoxia response pathways could be more dynamics. Indeed, SCC90 cell lines attempt to adapt and to reply to hypoxic environment inducing highly expression of all of the hypoxia related genes compared to SQ20B cell lines.