



HAL
open science

**Stratégie de sensibilisation des tumeurs des voies
aérodigestives supérieures aux anti-EGFR et résistance
induite : induction de HIF-2 et opportunité
thérapeutique**

Pierre Coliat

► **To cite this version:**

Pierre Coliat. Stratégie de sensibilisation des tumeurs des voies aérodigestives supérieures aux anti-EGFR et résistance induite : induction de HIF-2 et opportunité thérapeutique. Cancer. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ067 . tel-01380979

HAL Id: tel-01380979

<https://theses.hal.science/tel-01380979>

Submitted on 13 Oct 2016

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 :

Pierre COLIAT

soutenue le : **19 Novembre 2015**

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

Discipline/ Spécialité : **Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Stratégie de sensibilisation des
tumeurs des voies aérodigestives
supérieures aux anti-EGFR et
résistance induite : Induction de HIF-2
et opportunité thérapeutique**

THÈSE dirigée par :

Docteur JUNG Alain

CLCC Paul Strauss, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Professeur DEUTSCH Eric

CLCC Gustave Roussy, Paris

Docteur MILANO Gérard

CLCC Antoine Lacassagne, Nice

EXAMINATEUR :

Professeur DUFOUR Patrick

CLCC Paul Strauss, Université de Strasbourg

MEMBRE INVITE :

Docteur PENCREACH Erwan
de Strasbourg

Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, Université

SOMMAIRE :

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
AVANT PROPOS	9
PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	12
I) Les cancers des VADS.....	13
a) Epidémiologie	13
b) Histologie	13
c) Cancérogénèse.....	14
d) Facteurs pronostiques moléculaires identifiés	16
e) Classification TNM.....	17
f) Traitements.....	18
g) Prise en charge des cancers des VADS de stade précoce	19
h) Prise en charge des cancers des VADS localement avancés.....	20
i) Essais cliniques de chimiothérapie d'induction :	21
j) Prise en charge des cancers des VADS réfractaires ou métastatiques	22
k) Essais en cours dans la prise en charge des cancers des VADS réfractaires ou métastatiques	23
II) Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK) et sérine/thréonine Kinase mTOR... ..	27
a) Le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF) :	27
b) Les hétérodimères HER	28
c) Les voies de signalisation activées par l'EGFR	30
La voie PI3K/Akt :	30
La voie des MAPK kinases :	32
La voie des JAK/STAT Kinases :	34
La voie de la phospholipase C γ :	35
d) Le rôle de l'EGFR dans le cancer des VADS	36
e) Les médicaments ciblant l'EGFR	37
f) La protéine kinase mTOR	40
Structure et fonctions de mTOR ⁹⁶	40
Régulation de mTOR C1 :	41
Régulation de mTOR C2 :	44
Les Rapalogues	44
III) L'hypoxie Tumorale	47
a) Généralités :	47
b) Implication de l'hypoxie dans la survie des patients	48
c) Les facteurs de transcription HIFs	49
d) Implication de l'hypoxie dans la chimiorésistance	52
e) Implication de l'hypoxie dans la radiorésistance	54
f) Les mécanismes de régulation d'accumulation des HIFs	57
La régulation par les pressions en oxygène :	57
La régulation par les voies de signalisation oncogéniques	58
La régulation des HIFs par défaut d'adressage au noyau :	59
PARTIE II : OBJECTIFS	62
PARTIE III : MATERIELS ET METHODES	64
a) Avant Propos.....	65
b) Extraction d'ARN, qualification et quantification :	65

c) Retrotranscription :	65
d) qRT-PCR (Quantitative real Time Polymerase chain reaction)	65
e) Analyse statistique	66
PARTIE IV : RESULTATS.....	67
Chapitre I : Double ciblage pharmacologique de l'axe EGFR/mTOR/HIF-1 par la rapamycine et le cetuximab : analyse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	68
I) Caractérisation des lignées cellulaires :	69
a) Statut mutationnel :	69
b) Expression de HIF-1 α et activation des voies oncogéniques en fonction de l'hypoxie :	69
c) Capacité de survie aux rayonnements ionisants :	72
d) Efficacité du Cetuximab:.....	73
II) Radiosensibilisation par inhibition de l'axe EGFR/mTOR/HIF-1	74
III) Données complémentaires à l'étude :	108
a) Courbe de croissance des tumeurs irradiées <i>in vivo</i> :	108
b) Analyse de l'expression de HIF-2 <i>in vivo</i> :	110
c) Cinétique d'accumulation de HIF-2 par le cetuximab	112
d) Analyse des effets de la Rapamycine sur les voies de signalisations oncogénique.	114
e) Effet de la combinaison rapamycine + cetuximab associé aux rayonnements ionisants sur l'activation des voies de signalisation oncogéniques.....	117
f) Effet des traitements combinés et de l'irradiation sur l'activité transcriptionnelle des facteurs HIFs :.....	120
g) Analyse fonctionnelle d'une inhibition directe des facteurs HIFs par siRNA.....	123
h) Analyse des effets de l'inhibition ciblée d'EGFR :	127
Chapitre II : Stratégie d'inhibition du facteur HIF-2.....	131
I) Stratégie d'inhibition de HIF-2 par un inhibiteur allostérique :	132
a) Analyse de l'interaction HIF-1 α /HIF-2 β par immunoprécipitation :	133
b) Analyse de la survie clonogénique après inhibition allostérique de HIF-2 :	134
II) Stratégie d'inhibition indirecte de HIF-2 par les poisons du fuseau.....	135
a) Avant propos :	135
1) Les Taxanes	135
2) Les Benzimidazoles	136
b) Résultats :	138
PARTIE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	144
Le lien entre l'induction de HIF-2 et l'inhibition de l'EGFR.....	145
Un mécanisme de résistance via HIF-2 dépendant du profil de lignée.....	145
Un mécanisme de résistance multi-organes.....	146
L'association des facteurs HIFs aux phénomènes de résistance en clinique et stratégie thérapeutique.....	146
BIBLIOGRAPHIE.....	149
ANNEXES.....	158

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Anatomie des voies aérodigestives supérieures

Figure 2 : Processus multi-étape de la cancérogénèse dans le cancer des VADS

Tableau 1 : Les différents stades de la classification TNM dans le cancer des VADS

Tableau 2 : Prise en charge indiquée des cancers des VADS de stades précoces

Tableau 3 : Prise en charge indiquée des cancers des VADS localement avancé

Figure 3 : Courbes de survie globale et sans progression issues de l'étude EXTREM

Tableau 4 : Essais de phase II dans le traitement des cancers des VADS en rechute ou métastatiques

Tableau 5 : Essais de phase III en 1ère ligne de traitement du cancer des VADS en rechute ou métastatique

Figure 4 : Activation et recyclage des récepteurs HER.

Tableau 6 : Ligands connus des récepteurs HER. Tableau inspiré de Normanno

Figure 5 : Implication de HER2 dans la formation d'hétérodimères.

Figure 6 : Sites de liaison probable de protéines sur les récepteurs.

Figure 7 : Activation de la voie PI3K/AKT

Figure 8 : Voie d'activation RTK/RAS/RAF/MAPK

Figure 9 : Activation de la voie JAK/STAT kinase

Figure 10 : Activation de la voie de la PLC γ

Figure 11 : Mécanismes d'action du Cetuximab

Figure 12 : Voie de régulation du complexe mTORC1

Figure 13 : Structure de la rapamycine, le temsirolimus et de l'everolimus

Figure 14 : Représentation schématique de l'angiogénèse tumorale

Figure 15 : Courbe de survie des patients porteurs de tumeurs classées comme étant hypoxiques par rapport aux non hypoxiques selon l'étude de Mortensen

Figure 16 : Stabilisation ou destruction de HIF-1 α

Figure 17 : Processus dont HIF-1 contrôle l'expression

Figure 18 : Domaines des sous unités α de HIF-1, HIF-2 et HIF-3 et de HIF-1 β selon Koh

Figure 19 : Résumé des mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales induits par HIF-1. Adapté de Rohwer et al 2011¹.

Figure 20 : Réaction catalysée par les prolylhydroxylases

Figure 21 : Principaux régulateurs de l'accumulation de HIF-1

Figure 22 : Propriétés inhibitrices des taxanes sur les Hifs selon Carbonaro

Tableau 7 : Statut mutationnel des lignées CAL27 et SQ20B

Figure 23: Adaptation à l'hypoxie des lignées SQ20B et CAL27

Figure 24: Activation basale de ERK, AKT et PS6RP dans les conditions de normoxie et d'hypoxie (SQ20B, CAL27)

Figure 25: Test de survie clonogénique pour les lignées SQ20B et CAL27

Figure 26: Effet du Cetuximab sur la liaison de l'EGF à son récepteur sur la lignée SQ20B et CAL27

Figure 27: Croissance tumorale de xénogreffes de lignée SQ20B traitées par cetuximab, rapamycine et irradiation.

Figure 28: Courbe de survie des souris xénogreffées avec une lignée tumorale SQ20B et traitées par cetuximab, rapamycine et irradiation

Figure 29: Expression de HIF-2 α sur les tumeurs de souris traitées par cetuximab et rapamycine sur les xénogreffes SQ20B et Cal27

Figure 30: Cinétique d'accumulation de HIF-2 après traitement par cetuximab

Figure 31: Cinétique d'activation de ERK, AKT et PS6RP avec avec 5nM de rapamycine sur CAL27

Figure 32: Cinétique d'activation de ERK, AKT et PS6RP avec des concentrations croissantes de rapamycine

Figure 33: Analyse de l'inhibition de ERK, et AKT après traitement (48h) dans des conditions d'hypoxie à 1% en oxygène (Lignée SQ20B)

Figure 34: Analyse de l'activation de ERK et AKT 48h après traitement en normoxie et hypoxie (SQ20B)

Figure 35: Analyse de l'activation de ERK et AKT 48h après traitement en normoxie et hypoxie (CAL27)

Figure 36 : Expression transcriptionnelle de HIF-1 et HIF-2 dans les conditions des tests de survie clonogénique à 20% en O₂ pour les deux lignées SQ20B et CAL27

Figure 37: Expression transcriptionnelle de gènes cibles des HIFs, d'*EGFR* et *MET*, dans les conditions des tests de survie clonogénique à 20% en O₂ pour les deux lignées SQ20B et CAL27

Figure 38: Expression transcriptionnelle des gènes HIF1A et EPAS1 après traitement par siRNA, dans les lignées SQ20B et CAL27

Figure 39 : Expression transcriptionnelle des gènes cibles des HIFs, d'*EGFR* et *MET* après traitement par siRNA, dans les lignées SQ20B et CAL27

Figure 40 : Test de survie clonogénique des lignées CAL27 et SQ20B avec SiRNA anti-HIF-1, et ou irradiation

Figure 41: Expression transcriptionnelle de *HIF1A* et *EPAS1* (HIF-2) dans la lignée SQ20B dans les conditions de traitement des tests clonogénique (Figure 4 du manuscrit)

Figure 42: Expression transcriptionnelle *SLC2A1*, *VEGF-A*, *EGFR*, *MET*, et *BNIP3* dans la lignée SQ20B dans les conditions de traitement des tests clonogénique (Figure 4 du manuscrit)

Figure 43: Expression transcriptionnelle d'*EGFR*, *HER2*, *HER3*, *HIF1A* et *EPAS1* (HIF-2) après inhibition par siRNA anti EGFR, dans les lignées SQ20B et CAL27

Tableau 8: Récapitulatif des expériences in vitro

Figure 44: *Taxus Baccata* ou If commun

Figure 45: Structure du Benzimidazole.

Figure 46 : Analyse de l'expression de HIF-2 α après traitement par Rapamycine + cetuximab et un inhibiteur de HIF-2

Figure 47 : Test de Survie Clonogénique de la lignée SQ20B traitée par l'inhibiteur de HIF-2, la rapamycine + cetuximab, et l'irradiation

Figure 48 : Analyse de prolifération par SRB dans la lignée SQ20B 24h après traitement par des concentration croissantes de Paclitaxel et de Mebendazole

Figure 49: Analyse de l'expression de HIF-2 (rouge) et de la bêta-tubuline (vert) après traitement ou non par mébendazole 10 μ M, paclitaxel 1 μ M, et cetuximab 2,5 μ g/ml sur la lignée SQ20B en normoxie.

Figure 50: Test de survie clonogénique sur SQ20B après traitement par Mebendazole, Cetuximab, Paclitaxel et rayonnements ionisants (2Gy)

Figure 51: Hypothèse d'activité délétère précoce du cetuximab

LISTE DES ABREVIATIONS

5FU : 5-FluoroUracile

ACPF : Protocole de chimiothérapie associant cetuximab + 5FU + cisplatine + nab-paclitaxel

ADCC : Cytotoxicité Dépendant des Anticorps

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide Ribonucléique

AUC : Aire sous la courbe en pharmacocinétique

CDDP : Cisplatine

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4: Récepteur intervenant dans la co-stimulation immunitaire.

DAG : Di-acyl glycérol

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

ESMO: European Society of Medical Oncology

FKBP12: FK506 Binding Protein

GAB-1: Grb2 Associated Binding Protein 1

HE : Coloration à l'héματοxylline + éosine

HER: Famille de récepteurs HER ou ErbB

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HPV : Human Papillomavirus

HSP: Heat Shock Protein

IGF: Insulin Growth Factor

IP3: Inositol Tri-phosphate

JAK: Janus Kinase

MAPK: Mitogen Activated Kinase

mTOR: Mammalian (ou Mechanistic) Target of Rapamycin

NK: Natural-Killer

O₂: Oxygène

ORL: Oto-Rhino-Laryngologie

PDGFR : Plateled Derived Growth Factor Receptor

PD-1 et PD-L1: Program Death -1 ou Program Death Ligand 1
PF: Protocole de chimiothérapie associant Fluorouracile et sel de platine
PH : Domaine PH= Pleckstrin homology domain
PI3K: PhosphoInositol3 Kinase
PIP2: Phospho inositol di phosphate
PKC: Proteine Kinase C
pRb: Protéine du Rétinoblastome
RHEB : Ras Homolog Enriched in Brain
ROS : Espèces réactives à l'oxygène
RT-CT: Radiochimiothérapie concomittante
RTK: récepteur à tyrosine Kinase
RE : Réticulum Endoplasmique
Ser : Serine
SOS : Son Of Sevenless
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF: Transforming Growth Factor
Thr: Thréonine
TKI: Inhibiteur de tyrosine kinase
TPex: Protocole de chimiothérapie associant Cetuximab + Taxotere + sel de platine
TPF : Protocole de chimiothérapie associant 5FU + Taxotere + sel de platine
TSC: Tuberosis Sclerosis Factor
VADS: Voies Aerodigestives Supérieures
VEGFA: Vascular Endothelium Growth Factor A
VEGFRs: Vascular Endothelium Growth Factor Receptors

AVANT PROPOS

Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) représentent le sixième cancer le plus fréquent au monde et la quatrième cause de décès par cancer chez l'homme (Globocan 2012). La France se caractérise par une des incidences les plus élevées au monde avec en 2012, 14638 nouveaux cas (les cancers en France Ed 2013). Les facteurs étiologiques responsables de leur survenue sont principalement l'intoxication éthylo-tabagique (75-80% des cas) et l'infection persistante de l'épithélium de la sphère ORL par les papillomavirus humain (HPV ; 20-25% des cas). L'incidence de ces cancers augmente, et est liée à une augmentation des infections à HPV dans la sphère ORL. Les cancers HPV-, dont l'étiologie dépend de l'intoxication éthylo-tabagique (HPV négatifs), ont à l'inverse une incidence en diminution liée à la moindre consommation d'alcool et de tabac ces 10 dernières années²⁻⁴.

Les cancers des VADS comprennent les tumeurs de la bouche, du nez, du pharynx, du larynx et du nasopharynx. Les caractéristiques histologiques de ces cancers sont principalement épidermoïdes (95% des cas)⁵. Les approches thérapeutiques pour la prise en charge des cancers de la sphère ORL reposent sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, seuls ou en combinaison. La preuve de l'efficacité de la radiochimiothérapie concomitante (associant cisplatine (CDDP) et radiothérapie fractionnée) à l'égard du contrôle loco-régional et de la survie globale tend à faire se généraliser cette pratique. Cependant, malgré des essais d'intensification du traitement incluant également de nouvelles molécules (dérivés des taxanes, traitements ciblés des récepteurs à tyrosine kinase), le pronostic associé aux carcinomes épidermoïdes des VADS reste mauvais, avec une survie globale à cinq ans inférieure à 50%, et ce toutes localisations confondues. De plus, ces traitements s'accompagnent souvent de toxicités sévères (xérostomie, mucites, ...) qui impactent négativement sur la qualité de vie des patients. Parmi les facteurs associés aux échecs thérapeutiques, au fort taux de récurrence locale et à la dissémination métastatique, figure l'hypoxie tumorale chronique qui caractérise une majorité des lésions des VADS⁶.

L'adaptation des cellules tumorales à cet environnement hypoxique est régulée, entre autres, par une famille de facteurs de transcription, Hypoxia Inducible Factors, dont HIF-1 a été l'un des plus étudiés⁷. HIF-1 joue un rôle majeur dans la progression tumorale via la régulation de l'expression de centaines de gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'adaptation métabolique à l'hypoxie, la transition épithélio-mésenchymateuse, ainsi que le chimiotactisme. Des travaux ont montré que les cancers VADS, et en particulier les plus

agressifs d'entre eux, surexpriment fréquemment HIF-1 à des niveaux très élevés et que certains gènes cibles de HIF-1, pouvaient être des marqueurs pronostiques de la formation de métastases et de la survie des patients^{8,9}.

HIF-2 est une isoforme et un homologue fonctionnel de HIF-1. HIF2 contrôle l'expression d'un panel de gènes en partie commun à HIF-1. Les réponses cellulaires à l'hypoxie peuvent impliquer l'un et/ou l'autre des deux facteurs de transcription.

Le principe de la radiothérapie, utilisée en tant que traitement des cancers des VADS repose principalement sur la génération d'espèces réactives à l'O₂ (ROS)¹⁰. Il a déjà été montré que la radiothérapie peut entraîner une augmentation de l'activité de HIF-1 via l'activation de voies oncogéniques telle que la voie PI3K/AKT/mTOR mais aussi une stabilisation de HIF-1 α via les HSP90 (Heat Shock Protein 90)^{11,12}. De plus, une des conséquences d'un traitement par radiothérapie est la destruction du microenvironnement vasculaire tumoral, favorisant une baisse des pressions en O₂ au niveau du tissu tumoral, en résultant une stabilisation de HIF-1.

Le rôle central de la kinase mTOR dans l'intégration de signaux oncogéniques (PI3K/AKT, Ras/MAPK) a été montré dans de nombreux modèles de tumeurs solides, en particulier les cancers VADS¹³. Elle participe également au contrôle de la synthèse du facteur HIF-1 α et, secondairement, à la progression tumorale. EGFR a également été impliqué dans l'activation de l'axe PI3K/mTOR/HIF-1 en particulier en condition normoxique, suggérant que les effets délétères de l'accumulation de HIF-1 pouvaient également avoir lieu à des pressions normales en O₂. Ces observations ont été le rationnel ayant abouti à l'utilisation d'anticorps monoclonaux, comme le cetuximab, dirigés contre l'EGFR dans les cancers des VADS¹⁴.

Compte-tenu des données de la littérature, l'inhibition simultanée de l'EGFR, par anticorps monoclonal (cetuximab) ou inhibiteur pharmacologique (erlotinib), et de mTOR (par des rapalogues) a déjà été étudiée dans différents modèles de tumeurs solides. En particulier des travaux réalisés sur des cancers du sein, du côlon et de la prostate¹⁵ ou de la bile¹⁶ montrent un effet clairement synergique. De plus, l'inhibition de mTOR permettrait de resensibiliser des cellules devenues résistantes aux inhibiteurs de l'EGFR. Néanmoins, la plupart des études *in vitro* citées ci-dessus ont été réalisées en conditions de culture normoxiques, conditions dans lesquelles HIF-1 α n'est pas ou peu actif au sein des cellules tumorales. Il convient donc de tester l'efficacité de ces drogues dans des conditions de culture optimales, en l'occurrence hypoxiques.

De plus, de manière intéressante, des études pré-cliniques ont mis en évidence l'efficacité de l'association entre des inhibiteurs de mTOR et les radiations ionisantes à

l'égard de la croissance tumorale de lignées cellulaires des cancers des VADS xéno greffées chez la souris nude, ainsi que sur la survie des individus xéno greffés¹⁷. Ces effets pourraient être dus à l'inhibition de l'expression de HIF-1 α , facteur important de radiorésistance dans les tumeurs VADS. L'association de radiations ionisantes avec des anti-EGFR a aussi montré leur capacité à resensibiliser des cellules résistantes à la radiothérapie¹⁸ au cours d'études pré-cliniques,. Enfin, peu de données existent sur l'expression de HIF-2 consécutive à ces traitements.

Après avoir fait une introduction bibliographique de l'état de l'art au moment de l'écriture de cette thèse, nous nous proposons d'exposer ensuite les techniques utilisées, puis les résultats publiés et non publiés. Nous discuterons ceux-ci afin de conclure et d'envisager les prochaines expériences à mener.

PARTIE I : INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

I) Les cancers des VADS

a) Epidémiologie

Les carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures (VADS) représentent le sixième cancer le plus fréquent dans le monde¹⁹ et la huitième cause de décès par cancer chez l'homme en France²⁰. La France se caractérise par l'une des incidences les plus élevées au monde (deux fois supérieures aux pays de l'Europe du sud et quatre fois supérieures aux Pays-Bas, ou au Danemark)²¹. En 2012, en France, 14638 nouveaux cas sont estimés dont 74% chez des hommes²⁰.

L'incidence de ces cancers a fortement diminué ces dernières années, depuis 1980 chez les hommes, mais est en constante augmentation chez la femme (environ +1% par an). Ces cancers restent de mauvais pronostic. Entre 1989 et 2004, en France, la survie à 5 ans ne dépassait pas 34% (Hors cancers de la lèvre et de la cavité buccale qui sont de meilleur pronostic).

Les facteurs étiologiques responsables de la survenue des cancers des VADS sont principalement l'intoxication éthylo-tabagique (75-80% des cas) et l'infection de l'épithélium de la sphère ORL par les papillomavirus humain (HPV ; 20-25% des cas).

b) Histologie

Ces cancers sont majoritairement des carcinomes épidermoïdes (plus de 90%²²). D'autres types histologiques comme des lymphomes, des mélanomes, des sarcomes, ou à localisation bien définie comme les tumeurs malignes des glandes salivaires, ou encore l'adénocarcinome du cavum (plus ou moins différenciés voire non kératinisants) sont plus rares.

Ces cancers regroupent toutes les tumeurs solides survenant dans une région anatomique allant de la cavité buccale à l'hypopharynx.

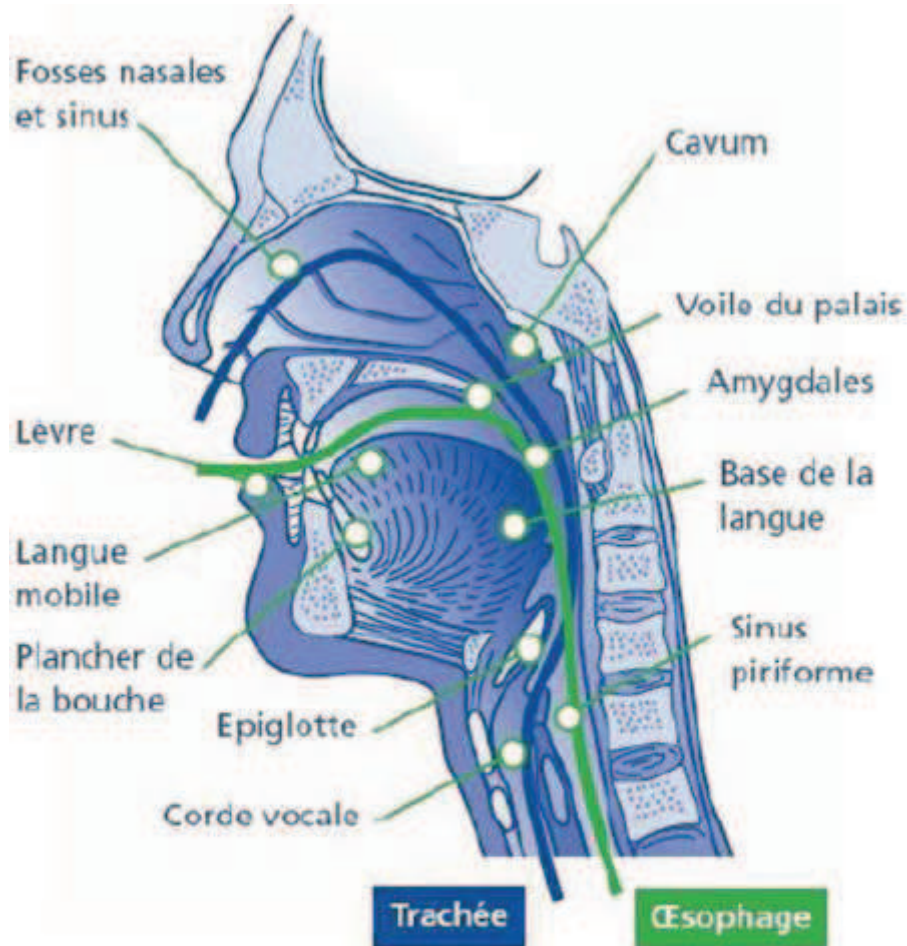


Figure 1: Anatomie des voies aérodigestives supérieures: Les voies aérodigestives supérieures comprennent la cavité buccale (Lèvre, langue, plancher de la bouche), le larynx (Epiglote, cordes vocales), le nasopharynx (Cavum); l'oropharynx (voile du palais, amygdales, base de la langue), l'hypopharynx (Sinus piriforme), et les glandes salivaires. (Crédit image: www.destinationsante.com/IMG/pdf/cancer_voiesdigestives.pdf).

c) Cancérogénèse

Les cancers des VADS regroupent un ensemble de tumeurs très hétérogène de par leur localisation, leur présentation clinique, leur survie, mais aussi leur carcinogénèse. En effet, il est maintenant admis qu'il existe des causes étiologiques différentes entre les cancers dus au papillomavirus humain (HPV+), et les cancers HPV négatifs. Ces derniers présentent une carcinogénèse « classique », où l'exposition à des agents carcinogènes chimiques sur une longue période provoque des événements génétiques et épigénétiques (comme des mutations) permettent la survenue du processus cancéreux. Ce processus est multi-étape comme l'illustre la figure²³. Nous discuterons des anomalies mutationnelles observées des différentes voies de signalisation oncogéniques dans la deuxième partie de cette revue.

Pour les tumeurs HPV-, des pertes d'hétérozygotie des chromosomes 3p, 9p et 17p sont détectables dans les lésions précancéreuses et constituent donc des événements moléculaires précoces de la carcinogénèse des cancers des VADS. Ces événements sont associés à une perte d'activité de la télomérase et une inactivation de p16. Dans les carcinomes *in situ*, on retrouve des pertes des régions 11q, 13q et 14q. Enfin les régions 4q, 6p et 8p sont observées dans des métastases²⁴.

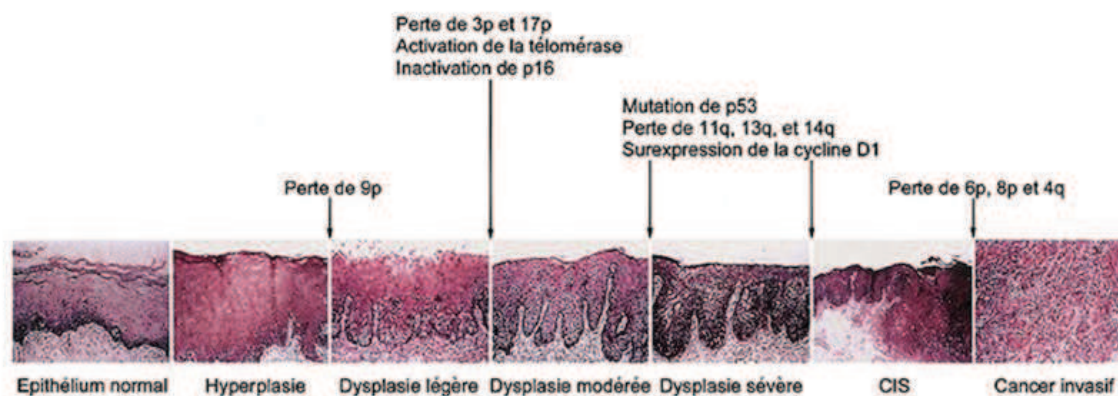


Figure 2: Processus multi-étapes de la carcinogénèse des cancers des VADS²³.

L'intoxication éthylo-tabagique joue un rôle prépondérant dans les cancers HPV négatifs²⁵. Le risque de cancer augmente de manière synergique en fonction de la consommation de tabac et d'alcool (jusqu'à 43 fois plus de risque de développer un cancer des VADS pour quelqu'un qui fume plus de 26g de tabac par jour et bois plus de 120g d'alcool par jour²⁵).

Les événements moléculaires participant au processus d'initiation tumorale des cancers du col de l'utérus, qui sont quasi exclusivement induits par HPV, sont bien documentés²⁶. Par analogie, on imagine que pour les cancers des VADS, le processus est similaire.

HPV est un virus non enveloppé, possédant un ADN double brin circulaire. Il se transmet essentiellement par voie sexuelle et infecte les cellules épithéliales. En 2010, 189 génotypes de papillomavirus ont été répertoriés²⁷, dont 80 environ peuvent infecter la sphère ano-génitale. On distingue les HPV de bas risque, à faible potentiel oncogénique (HPV 6 et 11 par exemple), responsables de condylomes génitaux, et les HPV de haut risque à fort potentiel oncogène (HPV 16 et 18 par exemple), responsables de lésions cancéreuses ano-génitales et de l'oropharynx.

Le processus de carcinogénèse débute par la perte de répression de l'expression des oncoprotéines virales E6 et E7 par la protéine virale E2 dans les cellules basales et

mitotiquement actives de l'épithélium. La production des oncoprotéines E6 et E7 est ainsi augmentée.

L'oncoprotéine E7 est responsable de l'inactivation de la protéine du Rétinoblastome pRb, un suppresseur de tumeur qui régule l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S²⁸.

L'oncoprotéine E6 se lie à p53 et entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome²⁹. p53 est un suppresseur de tumeurs qui permet le contrôle du cycle et l'activation de la mort cellulaire par apoptose, notamment suite à l'induction de dommages irréversibles à l'ADN. L'augmentation de la production des oncoprotéines E6 et E7 a donc pour conséquence une activation de la prolifération cellulaire, une instabilité génétique, et une inactivation du processus de mort cellulaire. Elle participe donc aux processus d'initiation et de progression tumorale³⁰. D'autres co-facteurs seraient également impliqués dans l'acquisition de l'infection, notamment l'immunodépression ou des facteurs environnementaux comme le tabac.

d) Facteurs pronostiques moléculaires identifiés

Peu de facteurs pronostiques ont été identifiés à ce jour et aucun d'entre eux n'est actuellement utilisé en routine clinique pour la prise en charge thérapeutique des patients.

La présence d'HPV figure parmi les différents facteurs pronostiques identifiés. Celle-ci est corrélée avec une survie supérieure à celle des cancers des VADS HPV négatifs, et serait donc de bon pronostic³¹.

La surexpression et l'amplification de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) sont décrites dans environ 80% des tumeurs et seraient au contraire, des facteurs de mauvais pronostic^{32,33}, tout comme l'anémie, l'angiogénèse et l'hypoxie.

En effet, l'anémie est fréquente dans les cancers des VADS. Elle est multifactorielle (Anémie inflammatoire, hémorragies, chimiothérapie,...), et est associée à un moins bon contrôle loco-régional dans différents cancers depuis des années. En ce qui concerne le cancer des VADS, Lee *et al.* ont repris les données de l'essai clinique RTOG 85-27 qui comparerait deux bras de traitement associant ou non l'etanidazole, une molécule radiosensibilisante, à la radiothérapie standard fractionnée. Ils ont montré que les patients anémiques (Hémoglobine inférieure à 14,5g/dl pour les hommes et inférieure à 13g/dl pour les femmes) avaient une survie à 5 ans inférieure aux patients non anémiques (respectivement 22% et 35,7%) et un contrôle locorégional inférieur aux patients non anémiques (respectivement 32% et 48%)³⁴. A cette anémie est corrélée une hypoxie tumorale. Nordmark et Overgaard ont montré dans un essai clinique que la survie globale

des patients ayant une hypoxie tumorale importante, était inférieure aux autres patients³⁵. Ces observations ont conduit à des essais cliniques utilisant des analogues de l'érythropoïétine (EPO), afin de corriger l'anémie et en partie pallier à l'hypoxie tumorale profonde. Malheureusement, les dernières études ont conclu à une absence de gain en terme de survie globale^{36,37}.

Enfin l'angiogénèse tumorale, dont l'impact pronostic est démontré dans d'autres cancers, est induite notamment par l'expression du Vascular Endothelial Factor (VEGF). Dans l'étude de Maeda, la survie globale étaient meilleure chez les patients avec une faible expression de VEGF³⁸(⁶ pour revue).

e) Classification TNM

Comme pour la plupart des tumeurs solides, il existe une classification TNM (Tumeur, Nodule, Métastase) des cancers des VADS³⁹ (Cf. Tableau 1). Le T permet de donner une évaluation de la taille tumorale selon une classification spécifique de la localisation de la lésion. La partie N permet de classer le cancer selon le nombre et la taille des adénopathies (cervicales en ce qui concerne les VADS), et la partie M permet de classer le cancer selon la présence ou non de métastases. Celles-ci vont se manifester principalement au niveau pulmonaire et osseux, mais aussi dans une moindre mesure au niveau hépatique et cérébral. La classification TNM permet surtout de pouvoir distinguer des tumeurs aux stades précoces des tumeurs localement avancées. Différents stades composent celles-ci selon la classification TNM.

Ainsi on distingue :

Tableau 1: Les stades de la classification TNM dans le cancer des VADS

Tumeurs de stade précoce		Tumeurs localement avancées (et métastases si M≥1)	
Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV
$T_1N_0M_0$	$T_2N_0M_0$	$T_3N_0M_0$	$T_4N_xM_x$
		$T_{1-2-3}N_1M_0$	$T_xN_{2-3}M_0$
			$T_xN_xM_1$

Les tumeurs localement avancées sont les tumeurs de plus mauvais pronostic.

f) Traitements

La prise en charge de ces cancers se fait en tenant compte des bilans cliniques et paracliniques, de la classification TNM, de l'âge des patients ainsi que de leur état général. La stratégie thérapeutique repose principalement sur la chirurgie et la radiothérapie. La chirurgie et/ou la radiothérapie sont curatives lorsque les tumeurs sont opérées et/ou irradiées à un stade très précoce alors que la chimiothérapie est surtout palliative, en cas d'échec aux deux approches précédentes.

i) La prise en charge chirurgicale consiste en une exérèse complète de la tumeur primitive associée à un curage ganglionnaire dont l'étendue dépendra de la localisation tumorale. Celle-ci sera plus ou moins mutilante en fonction de l'organe, de la localisation tumorale et de son extension, puisque les marges d'exérèse doivent passer en tissu sain et nécessitera donc le plus souvent l'ablation d'une « zone de sécurité ». Des techniques plus avancées se sont développées ces dernières années. La prise en charge des stades les plus précoces pourra notamment se faire par chirurgie trans-orale, robotisée permettant une conservation des fonctions des organes et améliorant la survie globale.

ii) La radiothérapie est utilisée selon différentes techniques :

-Radiothérapie externe : il s'agit d'une irradiation quotidienne de 1.8 à 2 Gy cinq jours sur sept. 70 Grays (Gy) seront délivrés à la tumeur primitive et environ 50 Gy au niveau des aires ganglionnaires sur une période de 7 semaines. Différentes modalités de fractionnement existent :

-hypofractionnées : La dose totale équivalente est fractionnée en moins de séances. Les doses journalières sont donc augmentées.

-hyperfractionnées : a) La dose totale équivalente est fractionnée en plus de séances. Les doses journalières sont moins fortes.

b) Le nombre de séances est plus important avec des doses journalières normales, augmentant de fait la dose totale.

-accélérées : le nombre de séances est classique avec une intensification des doses journalières. La dose totale est normale ou augmentée.

L'utilisation de l'IMRT (irradiation par modulation d'intensité) est devenue la technique de choix de par sa diminution des effets indésirables. Cette technique permet de

délivrer des doses plus importantes à la tumeur de manière plus ciblée, en limitant l'atteinte aux organes sains voisins (Pour revue :⁴⁰).

-La curiethérapie : des tubes plastiques avec des fils chargés d'irridium sont implantés au niveau de la tumeur. La curiethérapie peut être exclusive (70 Gy délivrés à la tumeur) ou associée à une radiothérapie externe avec une dose délivrée de 35 Gy, ou à la chirurgie lorsqu'il reste des résidus tumoraux. Cette technique est réservée à certaines tumeurs accessibles, bien délimitées, à distance des os.

iii) La prise en charge par chimiothérapie se fait en situation palliative pour les stades avancés, en induction avant chirurgie pour diminuer le volume tumoral, ou en association avec la radiothérapie.

Selon l'indication, les protocoles vont être différents. Nous détaillerons les protocoles de chimiothérapie ci-dessous en fonction de l'indication.

g) **Prise en charge des cancers des VADS de stade précoce**

La prise en charge se fera selon la localisation de la tumeur⁴¹. Les traitements de référence sont la chirurgie et la radiothérapie. Ce traitement peut être associé selon le risque de métastase ganglionnaire à un curage ganglionnaire ou une irradiation des aires ganglionnaires.

Tableau 2 Prise en charge indiquée des cancers des VADS de stades précoces

	Oropharynx	Larynx	Hypopharynx	Cavité buccale
Chirurgie première, associée à la radiothérapie en cas de risque élevé de récurrence	X	X	X	X
Radiothérapie seule	X	X (sauf pour les tumeurs T2 à atteinte glottique où on va préférer une chirurgie conservatrice)	X	
Curiethérapie	X	X	X	X (tumeurs accessibles à distance des os)

h) Prise en charge des cancers des VADS localement avancés

La prise en charge se fera selon la localisation de la tumeur, de la possibilité d'une chirurgie, de l'état du patient. Le standard consiste soit en une exérèse de la tumeur associée à une radiothérapie suivie ou non d'une chimiothérapie ; soit seulement en une radiochimiothérapie concomitante (radiothérapie associée à une chimiothérapie par cisplatine 100mg/m² exclusivement à J1, J22 et J43). Ce traitement, recommandé à l'heure actuelle, permet d'obtenir un contrôle loco-régional pour 40 à 80% des patients, et une survie globale à 5 ans estimée entre 35 et 50% des patients. Les causes de décès étant principalement des rechutes locorégionales (40-60%), des métastases (15-30%), des 2^{èmes} cancers (10%), des co-morbidités (20-30%)⁴².

Tableau 3 Prise en charge indiquée des cancers des VADS localement avancé

	Oropharynx	Hypopharynx	Larynx	Cavité buccale
Chirurgie [♂]	X	X	X	X
Radiochimiothérapie concomitante	X	X	X	X (Si chirurgie impossible)
Radiothérapie seule [♀]	X	X	X	X
Radiochimiothérapie concomitante après un traitement par chimiothérapie d'induction		X	X	

♂ : si possible, associée an adjuvant à la radiothérapie seule ou à une combinaison de radiochimiothérapie⁴³ selon le risque de rechute.

♀ : si l'état du patient ne permet pas d'avoir une chimiothérapie

Dans certains cas de tumeurs opérables du larynx ou de l'hypopharynx, une chimiothérapie d'induction peut être proposée si la chirurgie risque de détériorer les fonctions d'organes.

Le standard consiste en une chimiothérapie d'induction par le protocole TPF (docetaxel 75mg/m² à J1, cisplatine 75 mg/m² à J1, 5FU 750mg/m² de J1 à J5 toutes les trois

semaines), suivi d'une radiothérapie fractionnée (70 Gy sur environ 7 semaines), ou d'une chirurgie de rattrapage s'il n'y a pas de réponse à la chimiothérapie d'induction. Ce schéma n'est pas la référence aux Etats Unis, où l'on préfère utiliser une radiochimiothérapie concomitante (RT-CT) pour laquelle la réponse en terme de contrôle locorégional est meilleure : 69% de réponse après RT-CT contre 55% après la chimiothérapie d'induction par PF (cisplatine ou carboplatine + 5FU). Néanmoins la survie globale est quasi identique à 5 ans dans les deux groupes⁴⁴. Enfin, les chimiothérapies d'induction par TPF (docetaxel + cisplatine + 5FU) est validé (en europe) pour la préservation laryngée, mais reste controversé dans d'autres localisations (Préservation laryngée : TPF :70% Vs PF : 58%⁴⁵).

Le cetuximab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur à l'EGFR a été testé en association avec la radiothérapie à la place du cisplatine dans les schémas de préservation d'organe. L'essai de phase II TREMPIN a montré l'absence de différence significative en terme de préservation laryngée comparé au bras de traitement de référence (radiothérapie + cisplatine)⁴⁶ avec une meilleure tolérance en faveur du traitement radiothérapie + cetuximab. Etant donné l'absence d'essai comparateur de phase III, on réservera le cetuximab pour les patients ne pouvant être traités par cisplatine.

i) Essais cliniques de chimiothérapie d'induction :

Ces dernières années, des essais cliniques de phase II ont essentiellement montré que d'autres schémas d'induction pourraient être intéressants. C'est le cas du protocole ACPF, associant le cisplatine 75mg/m² J1, le cetuximab 250mg/m² J1,J8,J15, le 5FU 750mg/m² J1,J2,J3, et le nab-paclitaxel 100mg/m² J1,J8,J15. Ce protocole s'administre toutes les 3 semaines pendant 3 cycles suivi par une radiochimiothérapie concomitante. Cet essai de phase II montre une survie globale à 2 ans de 84%. Des effets indésirables de grade 3 ou supérieurs ont été observés chez 40% des patients⁴⁷. C'est le cas aussi du protocole PCC, associant le cetuximab 250mg/m² au paclitaxel 135mg/m² et au carboplatine AUC2 toutes les semaines durant 6 cycles. L'étude de phase II de Kies montre une survie globale de 91% à 3 ans, avec une bonne tolérance (45% des patients ont eu des effets indésirables de grades 3 ou supérieurs)⁴⁸. Néanmoins, il s'agit d'essais de phase II et il sera nécessaire de réaliser un essai d'efficacité, randomisé de phase III pour confirmer ces résultats.

Des études de phase I⁴⁹ et II, dont l'étude CAPRA⁵⁰, ont mis en évidence des effets prometteurs d'une combinaison d'un inhibiteur de mTOR, l'everolimus associé à un taxane (paclitaxel ou docetaxel), avec un sel de platine (cisplatine ou carboplatine) en protocole d'induction avec une bonne tolérance. Des essais d'efficacité de phase III sont attendus.

j) Prise en charge des cancers des VADS réfractaires ou métastatiques

Dans le cas des cancers des VADS récidivants, bien souvent la tumeur a été précédemment irradiée. Si la chirurgie est possible, le patient est (ré)opéré, sinon dans certains cas, il peut être à nouveau irradié. Si aucune de ces deux options thérapeutiques n'est envisageable, le traitement tout comme le pronostic rejoint celui des cancers des VADS métastatiques. Dans ce cas, une chimiothérapie palliative est proposée. Le but du traitement va être de retarder l'évolution de la maladie, et d'améliorer la qualité de vie restante. Les recommandations de l'European Society of Medical Oncology (ESMO) de 2010 proposent une chimiothérapie par sels de platine (cisplatine, ou carboplatine) associée au 5FU et au cetuximab pour les patients atteints de cancers des VADS en rechute, réfractaires ou métastatiques. En effet, l'essai clinique de phase III EXTREME en 2009 a montré que l'ajout du cetuximab aux sels de platines + 5FU permet d'augmenter la survie globale de 3 mois en la faisant passer de 7,4 mois à 10,1 mois et de doubler la survie sans progression (3,3 à 5,6 mois)⁵¹. Si cette chimiothérapie n'est pas bien tolérée, un traitement par methotrexate hebdomadaire est possible⁵². En effet, il n'existe à l'heure actuelle aucune deuxième ligne de chimiothérapie validée et la participation à un essai clinique est vivement recommandée.

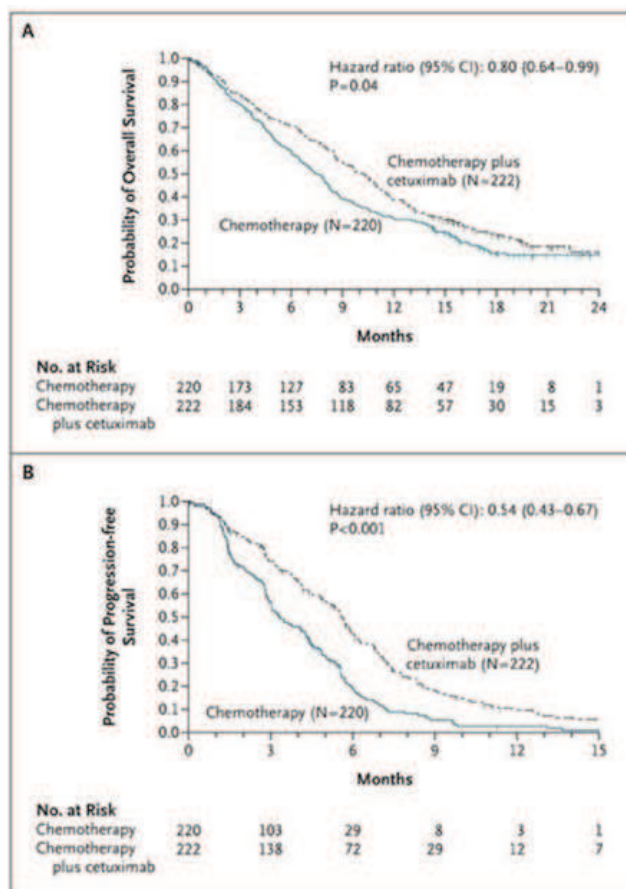


Figure 3: Courbes de survie globale (A) et sans progression (B) issues de l'étude EXTREME⁵¹.

Dans cette étude de phase III, deux bras de traitement sont comparés et composés ainsi: Chimiothérapie à base de sels de platines + 5FU, associée ou non au Cetuximab.

L'ajout du Cetuximab permet d'augmenter la survie globale de 3 mois (de 7,4 mois à 10,1 mois) et d'augmenter la survie sans progression de 2,3 mois (3,3 mois à 5,6 mois).

Cette étude a permis l'octroie de l'autorisation de mise sur le marché pour le Cetuximab associé à la chimiothérapie à base de sels de platine dans les cancers des VADS en rechute ou réfractaires.

k) Essais en cours dans la prise en charge des cancers des VADS réfractaires ou métastatiques

Des essais cliniques en cours évaluent d'autres associations en 1^{ère} ligne ou 2^{ème} ligne de traitement à ce stade de la maladie⁴⁰ (Cf tableaux 4 et 5).

Tableau 4: Essais de phase II dans le traitement des cancers des VADS en rechute ou métastatiques

Protocole	Phase	Ligne de traitement	Statut	Numéro NCT ou Nom
TPex versus Schéma Extreme	II	1 ^{ère} ligne métastatique ou rechute	Terminé vers une phase III en cours	Phase III : NCT02268695
Carboplatine + temsirolimus + paclitaxel	II	1 ^{ère} ligne métastatique ou rechute	En cours	NCT01016769
temsirolimus	II	2 ^{ème} ligne pour les patients réfractaires aux sels de platine et au cetuximab.	Terminé Survie globale = 5,2 mois	TEMHEAD
Afatinib versus méthotrexate	II	2 ^{ème} ligne après un traitement à base de sels de platine en 1 ^{ère} ligne	Terminé, Phase III terminée Pas de différence en Survie globale. Amélioration de la SSP de 0,9 mois	LUX-Head&Neck-1
Cisplatine + 5FU +/- panitumumab	II	1 ^{ère} ligne métastatique ou rechute	Terminé et phase III terminé : résultats négatifs.	SPECTRUM
Cisplatine + 5FU + Cetuximab +/- Cilengitide	I/II	1 ^{ère} ligne métastatique ou rechute	Terminé résultats négatifs.	ADVANTAGE
Pemêtredex + cisplatine + Cetuximab	II	1 ^{ère} ligne métastatique ou rechute	Terminé toxicité importante	NCT01057589
Temsirolimus + Erlotinib	II	2 ^{ème} ligne après un traitement à base de sels de platine en 1 ^{ère} ligne	Terminé toxicité importante	NCT01009203

A noter l'utilisation du protocole TPEX (Docetaxel 75mg/m² + cisplatine 75mg/m² toutes les 3 semaines, + cetuximab 500mg/m² tous les 15 jours) dans un essai clinique de phase II a montré des résultats prometteurs⁵³. Un essai de phase III versus le standard (protocole de l'essai EXTREME) est en cours (NCT02268695).

Différents essais de phase II associant un inhibiteur de mTOR sont en cours avec des protocoles différents. Citons par exemple un essai associant le temsirolimus au carboplatine et au paclitaxel [NCT01016769]. L'essai TEMHEAD s'est terminé récemment⁵⁴. Le temsirolimus y était utilisé en 2^{ème} ligne pour la prise en charge de patients réfractaires aux sels de platine et au cetuximab. La survie globale était d'environ 5,2 mois, dans le même ordre de grandeur que ce qui a pu être obtenu dans d'autres études avec des soins palliatifs sans chimiothérapie⁵⁵. Un essai de phase III ne sera certainement pas prévu.

D'autres essais de phase II ont positionné l'afatinib (un inhibiteur irréversible multikinases de HER1, 2, 3 et 4) à la place du cetuximab en 2^{ème} ligne après un traitement à base de sels de platine en 1^{ère} ligne. Les résultats de la phase III (LUX-Head&Neck-1) viennent d'être publiés⁵⁶. Ils montrent une survie sans progression de 2,6 mois contre 1,7 mois pour le methotrexate sans différence significative en termes de survie globale. Cette légère efficacité (+0,9 mois) risque d'être insuffisante pour une validation de cette indication. D'autres essais avec l'afatinib sont en cours comme LUX-Head&Neck-2. Il est proposé d'utiliser l'afatinib de manière adjuvante après la radiochimiothérapie (NCT01345669).

Certaines associations ont été testées mais les résultats obtenus sont négatifs. C'est le cas entre autre :

- du panitumumab (anticorps humain anti-EGFR, étude SPECTRUM, + PF (cisplatine + 5FU), malgré une amélioration de la survie sans progression dans le sous-groupe p16- (HPV-négatif)⁵⁷),

- de l'anti-intégrine cilengitide associé au cetuximab et au cisplatine⁵⁸,

- le pemêtrexed (antifolate) avec le cisplatine et le cetuximab en phase II⁵⁹,

- du temsirolimus associé à l'erlotinib dans une étude de phase II, dont l'association très mal tolérée⁶⁰.

Tableau 5: Essais de phase III en 1^{ère} ligne de traitement du cancer des VADS en rechute ou métastatique

Classe	Type de molécule	Phase
Inhibiteurs de PI3K	BKM120 et BYL719	III
Immunothérapie	<p>Anti PD-1 : Pembrolizumab, Nivolumab, ou son ligand PDL-1 : MEDI4736 associé ou non à un anti CTLA-4 : tremelimumab</p> <p>Anticorps glucoconjugués: CetuGex®,</p> <p>Anticorps stimulant le TLR8 (Toll like receptor-8): VTX-2337 associé au cetuximab pour les patients surexprimant c-MET</p> <p>Injection intratumorale de plasmide permettant la surexpression d'IL-12</p>	
Inhibiteur de Wee1	MK-1775	
Inhibition d'EGFR	<p>Protocole PCC (Carboplatine, Cetuximab, Paclitaxel)</p> <p>methotrexate + cetuximab</p> <p>Panitumumab + Paclitaxel</p> <p>Cisplatine + cetuximab + docetaxel</p> <p>Cetuximab + 5FU vs Platine + Cetuximab</p> <p>Cetuximab + dasatinib (un inhibiteur de Bcr/abl et Src)</p> <p>Afatinib + methotrexate</p> <p>Docetaxel + cisplatine + erlotinib</p> <p>Protocole PCC + erlotinib</p> <p>Cetuximab + MEHD7945A (un anticorps inhibiteur de HER3 et HER1).</p>	

Les essais de phases III en 1^{ère} ligne concernent (Clinicaltrials.gov) cf tableau 5:

- des inhibiteurs de la PI3K (BKM120 et BYL719),
- l'immunothérapie :
 - i) des anticorps bloquant le récepteur PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) ou son ligand PDL-1 (MEDI4736), associé ou non à un anti CTLA-4 (tremelimumab)

ii) un anticorps glucoconjugués afin d'améliorer la cytolysse dépendant des anticorps (ADCC) : CetuGex®,

iii) un anticorps stimulant le TLR8 (Toll like receptor-8), ayant pour but d'activer la réponse immunitaire dépendante des cellules Natural Killer (NK) (VTX-2337), associé au cetuximab chez les patients surexprimant c-MET (une protéine tyrosine kinase impliquée dans les phénomènes de résistance au Cetuximab),

iv) l'injection intratumorale de plasmide permettant la surexpression d'IL-12 (interleukine 12), ayant pour but de créer une réponse inflammatoire,

- un inhibiteur de wee1 (MK-1775), protéine régulatrice du cycle cellulaire,
- l'inhibition d'EGFR (cf tableau 5):

Des essais sont en cours évaluent des protocoles pouvant être proposés en 2^{ème} ligne de traitement, mais le pronostic des patients reste très péjoratif. Les essais incluant le sunitinib (TKI dirigé contre VEGFR1, 2, 3, PDGFR et Kit) en 2^{ème} ligne sont négatifs du fait des effets indésirables hémorragiques trop importants⁴⁰.

Malgré ces innovations, et en particulier l'introduction des TKI dans l'arsenal thérapeutique, seuls ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie classique, la survie à 5 ans reste toujours inférieure à 50% (toutes localisations confondues).

On remarque l'apparition de l'immunothérapie qui semble être appelé à prendre une place importante dans la prise en charge de ces cancers. En effet, comme le montre les essais de phase III en 1^{ère} ligne (cf ci-dessus), les prochaines molécules innovantes seront issues de ce type. Les anticorps anti-PD-1 ou anti-PDL-1 montrent déjà des résultats très prometteurs dans la prise en charge d'autres cancers, comme le cancer du poumon, ou le mélanome. Néanmoins, il semblerait que les patients répondeurs soient surtout des patients dont la tumeur surexprime PD-1⁶¹ (entre 45 et 100%) des patients dans les cancers des VADS (pour revue : ⁶²).

II) Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK) et sérine/thréonine Kinase mTOR

Les RTK sont une famille de récepteurs impliqués dans la transmission du signal. Ils participent notamment au développement et fonctionnement de différents organes et dans la communication cellulaire⁶³. Cette famille regroupe des récepteurs connus et impliqués dans des processus importants dont la reconnaissance et la transmission de signaux impliquant des facteurs de croissance comme l'Insulin growth Factor (IGF), l'Epidermal Growth Factor (EGF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), et dont l'activité est très régulée. Des mutations affectant les gènes codant pour les RTK et/ou la surexpression des protéines correspondantes ont été mises en évidence dans différents cancers et participent à la croissance et la progression tumorale. C'est le cas du récepteur à l'EGF, impliqué dans une proportion importante des tumeurs dont celles issues des cancers des VADS, du pancréas, du carcinome rénal, du cancer colorectal, du sein ou de l'ovaire⁶⁴. Ces récepteurs constituent donc des cibles thérapeutiques d'intérêt.

a) Le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF) :

L'EGFR, fut historiquement le premier récepteur à activité tyrosine kinase découvert en 1982. Il fait partie de la famille des récepteurs HER (Human Epidermoid Receptor), au sein de la famille des RTK. La famille HER comprend 4 membres : l'EGFR (ou HER1 ou ErbB1), HER2 (ou ErbB2), HER3 (ou ErbB3) et HER4 (ou ErbB4)⁶⁴. Ce sont des protéines transmembranaires avec une partie extracellulaire qui interagit avec le ligand, une partie transmembranaire, et une partie intracellulaire avec un domaine catalytique à activité tyrosine kinase⁶⁵. Les membres de la famille HER sont exprimés à la surface des cellules à l'état de monomères. L'activation du récepteur par la liaison avec son ligand sur la partie extracellulaire entraîne l'homo- ou l'hétérodimérisation des monomères, puis à la transphosphorylation du site catalytique, afin de former un récepteur biologiquement fonctionnel et capable de transduire le signal vers le compartiment intracellulaire. Le récepteur est ensuite internalisé par des mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines ou non, puis dégradé par des lysosomes ou recyclé⁶⁶.

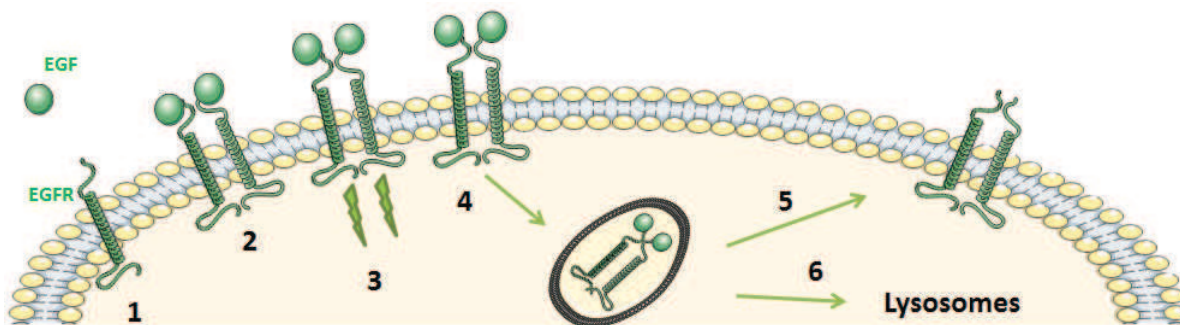


Figure 4: Activation et recyclage des récepteurs HER. Ici l'exemple du récepteur HER1 (EGFR): 1. L'activation de l'EGFR par son ligand induit une dimérisation (2) avec un autre récepteur HER (1,2,3, ou 4). S'en suit une transduction du signal (3), puis une internalisation du récepteur (4), et soit son recyclage (5), soit sa destruction par des lysosomes (6).

b) Les hétérodimères HER

La dimérisation combinant différentes sous-unités HER permet la formation de différents récepteurs. Ainsi les récepteurs s'organisent en homodimères ou hétérodimères. Chacun de ces récepteurs présente une affinité particulière pour un ou plusieurs ligands possibles, dont un nombre important a été identifié (Cf. tableau 6). Chaque dimère formé aura un impact sur la transduction du signal en aval.

Tableau 6: Ligands connus des récepteurs HER. Tableau inspiré de Normanno66

Récepteurs HER	EGFR	HER2	HER3	HER4
Ligands connus	EGF	Aucun	NRG1	NRG1
	TGF α		NRG2	NRG2
	Amphireguline			NRG3
	Epireguline			NRG4
	HB-EGF			Tomoreguline
				HB-EGF
				betacelluline
				Epireguline

Différentes combinaisons de récepteurs sont possibles. Celles-ci sont déterminées en fonction de la stabilité entre les ligands impliqués et les deux monomères HER⁶⁷. Parmi ces combinaisons, il existe une hiérarchisation : la dimérisation avec HER2 est préférentielle⁶⁸ et les homodimères induisent un signal plus faible voire nul. Les hétérodimères formés avec HER2 sont responsables d'une signalisation puissante et prolongée en raison⁶⁷:

- i) D'une forte affinité entre le ligand et son récepteur HER avec HER2, limitant fortement la dissociation de ceux-ci,

ii) D'une internalisation et dégradation du récepteur moins rapide.

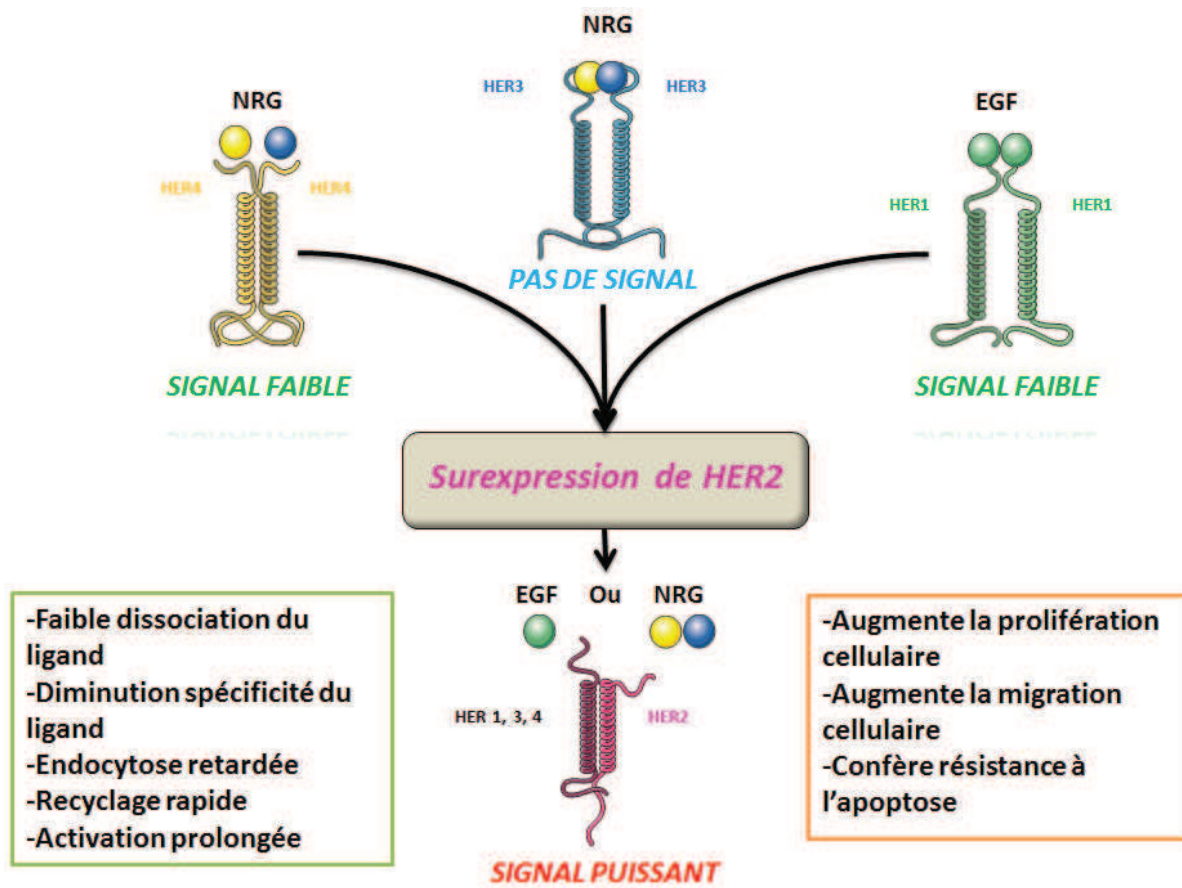


Figure 5: Implication de HER 2 dans la formation d'hétérodimères. Les hétérodimères contenant HER2 sont les plus puissants. Les raisons de cette augmentation de puissance de signalisation sont essentiellement dues aux interactions ligand-récepteur HER et HER2. D'après Yarden¹

Aucun ligand n'est identifié pour HER2. Cependant, son rôle est prépondérant dans les variations de signaux induits selon sa présence dans le cytosol ou non. Ainsi, sa surexpression dans certains cancers solides, notamment le cancer du sein HER2+, joue un rôle majeur dans la progression tumorale.

HER3 présente lui aussi quelques particularités. Les homodimères HER3 n'induisent pas de signaux (dus à une absence d'activité kinase de ces récepteurs). En revanche hétérodimères formés par HER3 (en particulier HER2/HER3) sont responsables d'une signalisation puissante⁶⁷.

Les dimères ainsi formés vont conditionner l'intensité et le type de signal de transduction en aval du récepteur. En effet, l'activation de certaines voies de signalisation va être privilégiée selon les monomères HER impliqués. Chaque monomère HER comporte des domaines de fixation de protéines activatrices de voies de signalisation. Lorsque la protéine est fixée sur son domaine, elle va être activée par le dimère (phosphorylation). Par exemple

le domaine intracellulaire des monomères HER1 présente des sites de liaison de protéines activant la voie des MAPK (Grb2, Shc), et des sites de liaison activant la phospholipase C γ . Lorsque ce monomère est impliqué, ces voies de signalisation seront activées. HER3, lui active surtout la voie PI3K/AKT du fait du nombre de sites de liaisons de la sous-unité régulatrice de la PI3K (p85)⁶⁹.

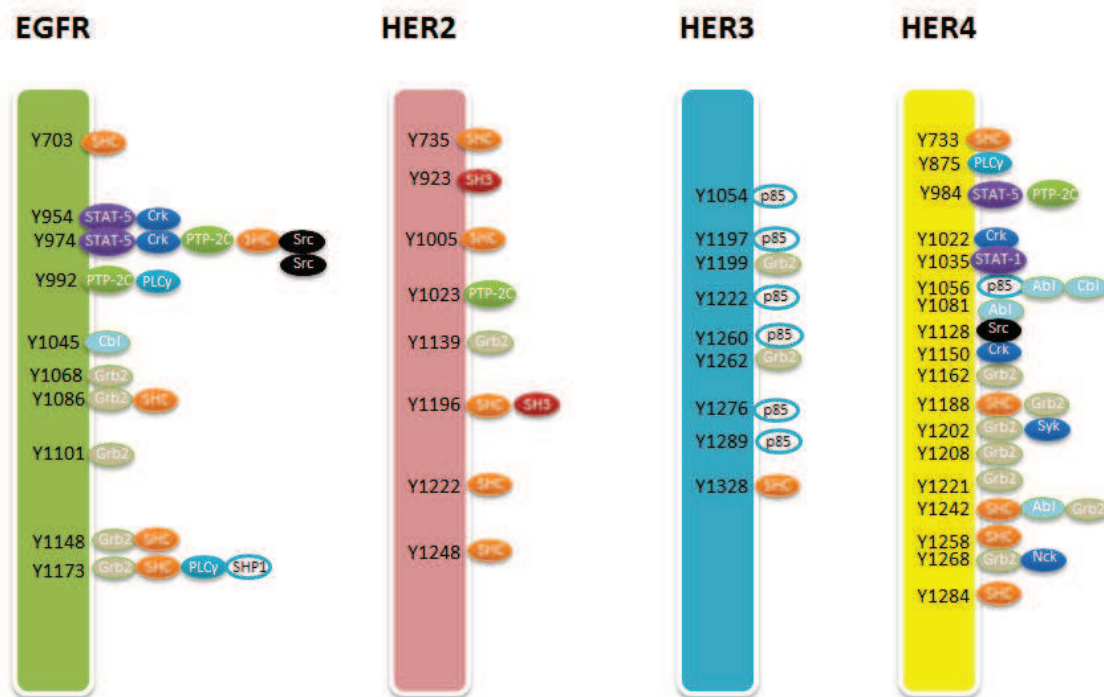


Figure 6: Sites de liaison probable des protéines sur les récepteurs HER. Selon Wilson⁶⁹, HER3 active particulièrement la voie PI3K/AKT du fait de son grand nombre de sites de liaisons de p85. Certains sites n'interviennent pas dans l'activation des voies oncogéniques mais permettraient l'internalisation du récepteur comme Cbl.

c) Les voies de signalisation activées par l'EGFR

Les voies de signalisations activées en aval de l'EGFR sont majoritairement la voie PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT Kinases, et phospholipase C γ ⁷⁰.

La voie PI3K/Akt :

La phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) est une sérine thréonine kinase. Il en existe 3 classes différentes (I, II, et III) qui se différencient selon la structure de leurs sous unités, leur régulation et leur sélectivité pour les substrats. Chaque classe contient différentes isoformes⁷¹. La classe IA par exemple, est la classe la plus étudiée dans le cancer. Dans cette classe, PI3K est un hétérodimère, avec une sous unité catalytique p110 (isoformes : PI3KCA, PI3KCB, et PI3KCD) et une sous unité régulatrice p85 (isoformes : PI3KR1, PI3KR2, et PI3KR3).

L'activation de p110 peut se faire en aval des récepteurs HER de 3 façons⁷²⁻⁷⁴:

-par liaison de p85 au domaine correspondant sur le récepteur HER, entraînant l'activation de p110 sur le site catalytique (ce qui est le cas lorsque les hétérodimères comportent au moins le monomère HER3 ou HER4),

-par liaison de SOS (Son Of Sevenless) à GRB2, liée elle-même aux domaines correspondants sur le récepteur HER. Cela entraîne l'activation de Ras, qui à son tour active P110

-par liaison de GRB2 aux domaines correspondants sur le récepteur HER, et activation de p110 via GAB-1 (Grb2 Associated Binding Protein 1)⁷⁵.

La transduction du signal par la PI3K se fait par l'intermédiaire d'un second messenger. La partie catalytique (p110) de la PI3K va catalyser la phosphorylation de PIP2 (phosphoinositol diphosphate) et générer du PIP3 (phosphoinositol tri phosphate). PIP3 est ancré à la membrane plasmique, où il permet le recrutement d'AKT et sa phosphorylation par les kinases PDK1 et PDK2, nécessaires à son activation complète. Une des enzymes antagonistes de PI3K, est la phosphatase PTEN, qui catalyse la formation de PIP2 à partir de PIP3.

AKT (ou PKB) est une sérine thréonine kinase comportant 3 isoformes (AKT1, AKT2, et AKT3). AKT est composé d'un domaine PH (Pleckstrin Homology), un domaine régulateur et un domaine catalytique.

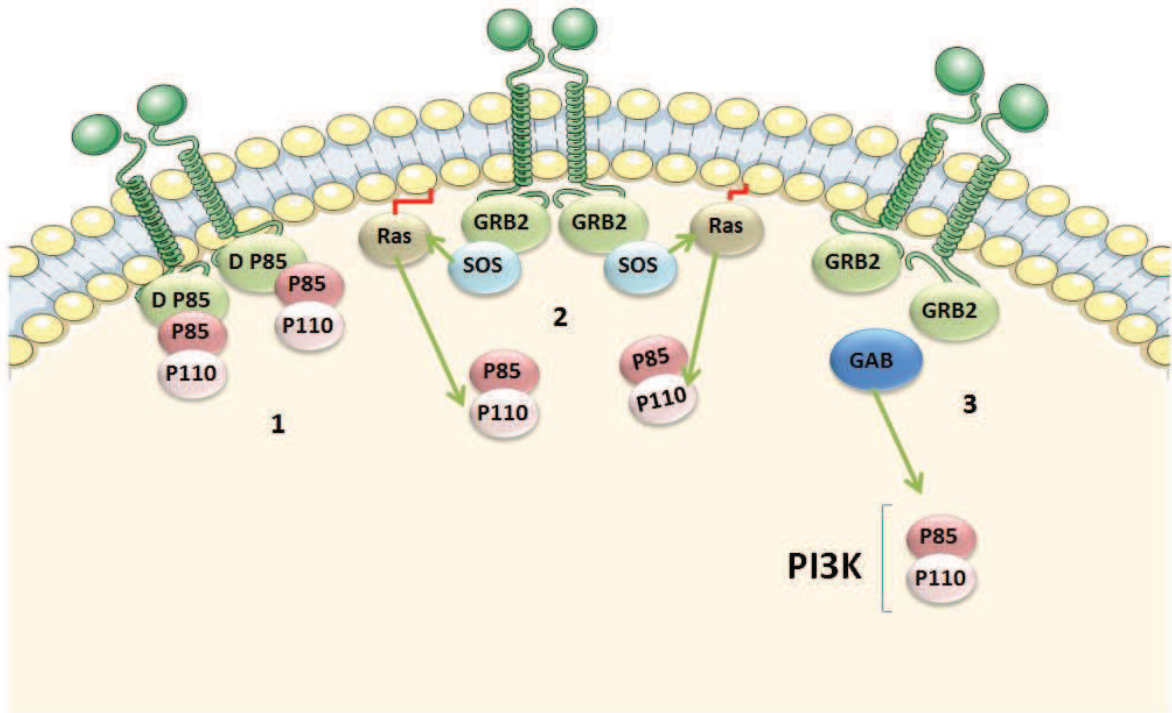


Figure 7: Activation de la voie PI3K/AKT. D'après Cully72 et al.

L'activation de PI3K peut se faire selon 3 façon:

1. Par liaison de p85 au domaine correspondant sur le récepteur HER.
2. Par liaison de GRB2 aux domaines correspondant sur HER, leur activation, l'activation de SOS, qui a son tour active Ras, puis PI3K.
3. Par liaison de GRB2, activation de GAB, qui a son tour active PI3K.

La kinase AKT joue un rôle central au sein de la signalisation cellulaire, elle stimule notamment des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la croissance et la survie⁷⁶. Cette voie de signalisation est constitutivement activée dans un grand nombre de cancers. Nous développerons plus tard son implication dans les cancers, et plus particulièrement les cancers des VADS.

La voie des MAPK kinases :

La voie des MAPK la plus étudiée est la voie des Ras/Raf/MAPK. Cette voie est impliquée dans de multiples phénomènes cellulaires comme la croissance cellulaire, la sénescence ou la prolifération. La kinase Ras est une petite protéine monomérique à activité GTPase ancrée à la membrane par des groupements isopréniques (farnesyl ou geranyl). Il en existe différentes isoformes : N-Ras (Neuroblastoma Ras), H-Ras (Harvey Ras), K-Ras (Kirsten-Ras) codées par les gènes NRAS, HRAS et KRAS.

Ras est activée en aval des récepteurs HER par l'intermédiaire de SOS. L'activation de SOS dépend elle-même de Grb2, qui se lie à HER soit directement au niveau de ses sites de liaisons spécifiques dans le domaine intracellulaire, soit par l'intermédiaire des protéines SHC (Sarc Homology Domain 2 Containing) (Figure 7):

SOS est une « guanine nucleotide exchange factor », qui permet l'échange d'un radical GDP lié à Ras (Ras-GDP : forme inactive de Ras) avec un radical GTP (Ras-GTP : forme active de Ras), et induit ainsi son activation (Figure 7). La protéine Ras activée agit comme une kinase capable d'activer d'autres protéines dont des membres de la voie PI3K/AKT, des petites protéines G (Rho, Rac) mais surtout des protéines de la cascade RAF/MEK/ERK⁷⁷.

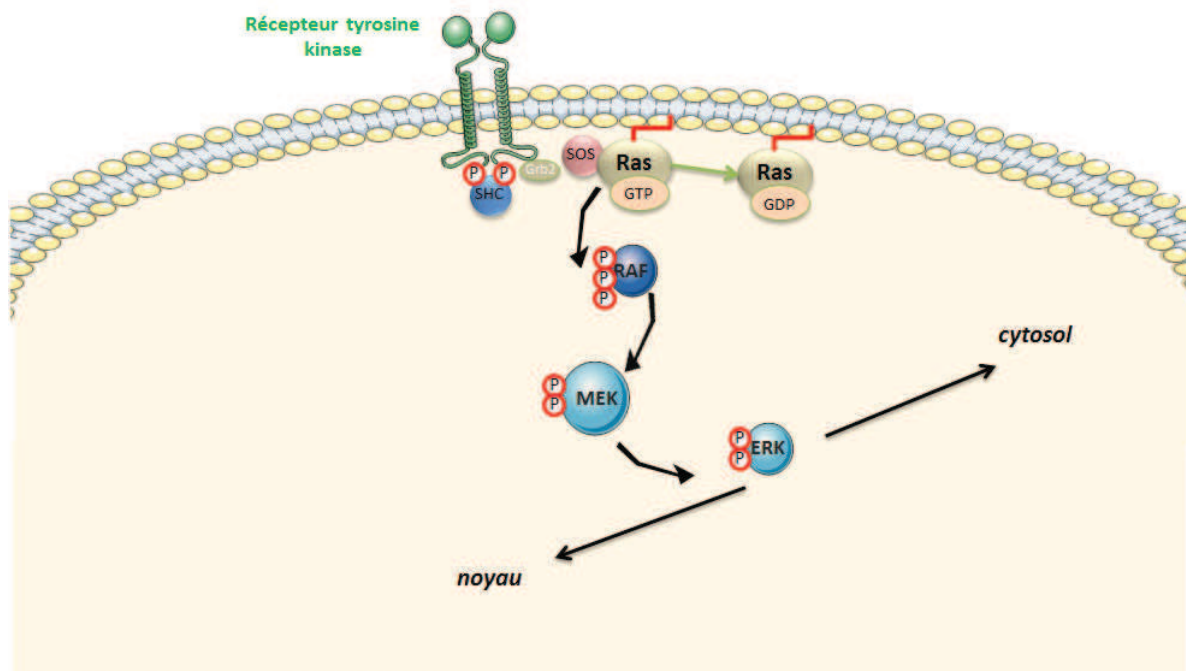


Figure 8: Voie d'activation RTK/RAS/RAF/MAPK. Selon Santarpià⁷⁷

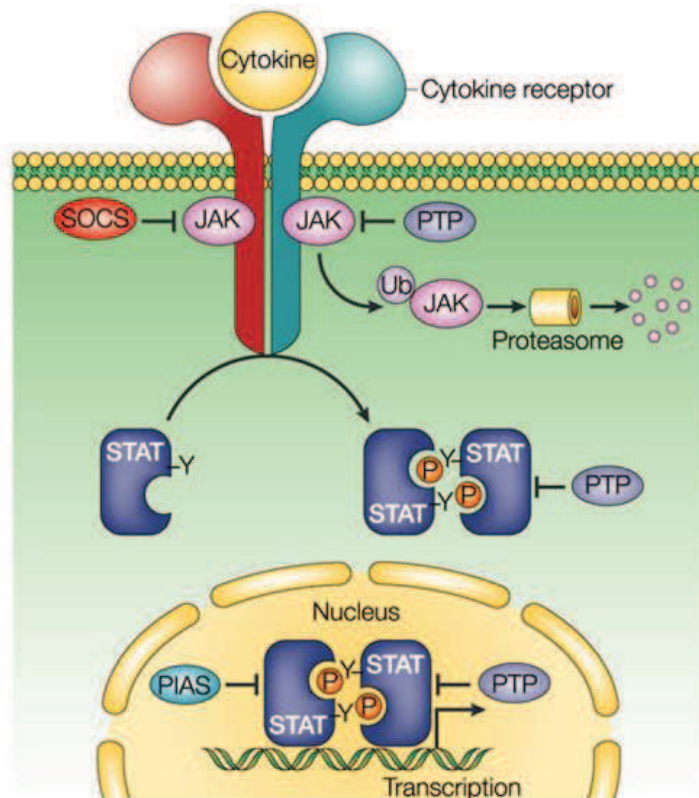
Le récepteur à activité tyrosine kinase va activer SOS via Grb2 lié aux domaines SHC ou Grb2 du récepteur à tyrosine kinase. SOS, peut activer Ras (sous sa forme GTP). Sous cette forme active s'en suit une cascade de phosphorylations et d'activations des protéines RAF, MEK, et ERK. ERK activé va soit rester dans le cytoplasme activer des substrats, soit entrer dans le noyau activer des facteurs de transcription tels que FOS, JUN, MYC, qui à leur tour activent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie, la différenciation la migration cellulaire ou l'angiogénèse.

L'activation de la voie RAF/MEK/ERK nécessite le recrutement à la membrane de la protéine RAF cytosolique par Ras.

RAF est une sérine thréonine kinase dont 3 isoformes (A-Raf, B-Raf, et C-Raf ou Raf-1) sont décrites. Lorsque le complexe RAS-RAF est formé, RAS active RAF, qui à son tour phosphoryle les autres MAPK à savoir MEK1/2 puis ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases). Une fois phosphorylée, ERK1/2 peut activer des substrats cytoplasmiques ou bien être transloquée dans le noyau où elle va induire l'activation de facteurs tels que FOS, JUN, MYC, ELK1. Ces derniers sont des facteurs de transcription qui, à leur tour, activent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie, la différenciation, la migration cellulaire ou l'angiogénèse⁷⁸.

La voie des JAK/STAT Kinases :

La voie JAK/STAT fait appel à la Janus Kinase (JAK) qui active le facteur de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Chez les Mammifères, il existe 4 Janus Kinase (JAK1–3 et tyrosine kinase 2 (TYK2)) et 7 isoformes de STAT (STAT1–4, 5A, 5B et 6). Cette voie est principalement activée par des cytokines. Les Janus kinases possèdent un domaine SH2, et peuvent donc être activées par les récepteurs HER. Leur activation nécessite une dimérisation, et une activation croisée des unités JAK. STAT peut alors être recrutée à partir du cytosol sur des sites d'ancrage dévoilés une fois que JAK est activée. Une fois recrutée, STAT est phosphorylée par les JAK. Cette phosphorylation désolidarise le complexe JAK/STAT du récepteur et permet sa translocation vers le noyau sous forme de dimères, où STAT va agir comme facteur de transcription⁷⁹. Les gènes cibles régulés par cette voie sont nombreux, mais plus particulièrement STAT3 est impliquée dans l'expression de gènes comme *VEGF-A*, les cyclines D, Myc, Jun et Fos. Des études récentes ont aussi montré une interconnexion entre STAT3 et la voie PI3K/AKT⁸⁰.



Nature Reviews | Immunology

Figure 9: Activation de la voie JAK/STAT kinase. Selon Liu et Shuai (2003). Leur activation nécessite une dimérisation, et une activation croisée des unités JAK. STAT cytosolique va alors être recruté, et être activé par les JAK. Les dimères STAT sont ensuite transloqués dans le noyau où ils vont jouer leur rôle de facteur de transcription. Les protéines cytosoliques régulatrices de JAK sont en partie SOCS et PTP qui agissent soit par fixation sur JAK phosphorylé, soit par déphosphorylation. L'inactivation de JAK augmente l'ubiquitinylation et la destruction de celui-ci par le protéasome.

La voie de la phospholipase C γ :

La phospholipase C γ se lie directement à l'EGFR au niveau des tyrosines 1173 et 992. Son activation par l'EGFR lui permet de catalyser le clivage de PIP₂ en Diacylglycérol (DAG) et inositol tri phosphate (IP₃). IP₃ participe au relargage du calcium à partir du réticulum endoplasmique et la présence de DAG membranaire et de calcium cytoplasmique permet le recrutement de la Protéine Kinase C (PKC), qui à son tour active par phosphorylation d'autres substrats comme ERK, NF- κ B, ou la glycoprotéine P (Pgp)⁸¹. La PKC est impliquée dans différents processus tels que la prolifération, la survie, la migration cellulaire ou l'apoptose⁸².

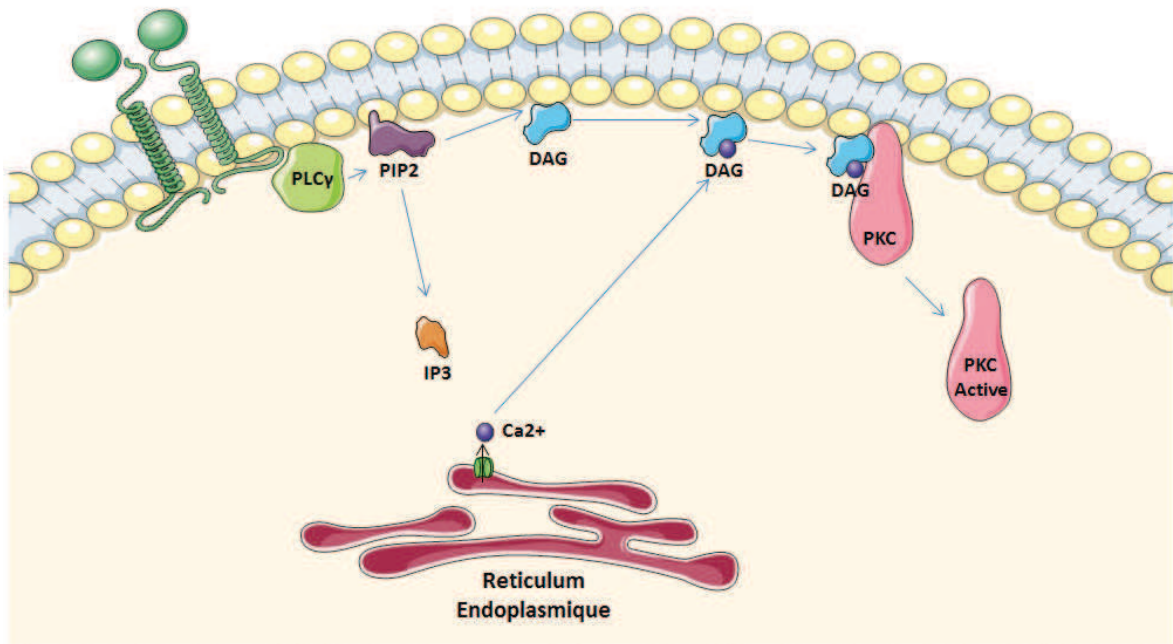


Figure 10: Activation de la voie de la PLC γ . D'après Dorn⁸¹. La Phospholipase C clive le PIP2 (Phospho-inositol di phosphate) en DAG (Di AcylGlycérol) et IP3 (Inositol tri phosphate). L'IP3 va permettre la sortie du calcium à l'intérieur d'organites tels que le RE (Reticulum Endoplasmique). Le DAG va être activé grâce à l'afflux de calcium, permettant la phosphorylation de la PKC (PhosphoKinase C).

d) Le rôle de l'EGFR dans le cancer des VADS

Depuis sa découverte, le rôle critique de l'EGFR et la dérégulation de son expression dans les cancers ont été démontrés en particulier dans les cancers des VADS, le cancer colorectal, le cancer bronchique, le cancer du sein, le cancer du pancréas ou dans les tumeurs cérébrales. Le récepteur est exprimé préférentiellement dans le tissu épithélial, neuronal, ou mésenchymateux. Ces observations ont renforcé l'idée qu'une dérégulation de l'EGFR joue un rôle important dans la transformation maligne. Cette dérégulation a été démontrée dans les cancers des VADS, du poumon, du sein, le cancer colorectal, les tumeurs cérébrales, les cancers gastriques et pancréatiques ainsi que les tumeurs de l'endomètre⁸³, et a été reliée à des phénomènes de croissance tumorale, de prolifération, et à la formation de métastases. L'augmentation de l'activité de l'EGFR dans la progression tumorale peut être due, entre autre, à^{84,85} :

- une augmentation de la synthèse du ligand
- une augmentation de l'activation du récepteur (mutations activatrices)
- une augmentation de l'expression du récepteur
- une perte d'inhibition de l'EGFR (mutation de protéines induisant l'internalisation et la destruction du récepteur, augmentation d'expression de HER2)
- la formation d'hétérodimères avec d'autres récepteurs que ceux de la famille HER comme MET, RET,...

Dans le cancer des VADS, 80 à 90% des tumeurs surexpriment EGFR⁸⁶. De plus, plusieurs études ont montré un lien direct entre la surexpression d'EGFR et la survie globale, ou la survie sans progression^{87,88}, ainsi qu'une moins bonne sensibilité à la radiothérapie^{87,89} ou la chimio-radiothérapie concomitante⁹⁰.

Les mécanismes impliqués dans la surexpression d'EGFR dans le cancer des VADS sont⁹¹ :

- principalement une augmentation de la transcription du gène codant l'EGFR (retrouvée dans plus de 90% de tumeurs des VADS)

- une amplification génique de la région chromosomique où est localisé le gène codant l'EGFR (7p11, retrouvée dans environ 15% des tumeurs VADS)

- des mutations du gène codant p53 (entre 20 à 40% des tumeurs VADS), qui a été associé une augmentation de l'activité du promoteur d'*EGFR*⁹²

- le polymorphisme de l'intron 1 où une région de celui-ci est composée de répétition de dinucléotides CA (Cytosine-Adénine)

- des mutations d'EGFR (0 à 4% des tumeurs) conduisant notamment à l'expression d'une forme tronquée de l'EGFR (variant EGFRvIII), constitutionnellement active.

Ces observations ont conduit au ciblage pharmacologique de l'EGFR dans ce cancer.

e) Les médicaments ciblant l'EGFR

Ces différentes observations décrites dans le paragraphe ci-dessus ont conduit au développement de thérapeutiques dirigées contre l'EGFR. On parle de thérapies ciblées. Deux classes de médicaments existent :

- les anticorps dirigés contre l'EGFR
- les inhibiteurs de tyrosines kinases.

i) Les anticorps monoclonaux :

A ce jour seuls deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR disposent d'une AMM. Il s'agit du cetuximab et du panitumumab. Le premier est un anticorps monoclonal,

une IgG1 chimérique humain/murin (65%/35%), alors que le second est une IgG2 100% humain. Seul le cetuximab bénéficie d'une AMM dans le cancer des VADS. Le panitumumab présente pour le moment des résultats négatifs pour l'octroi d'AMM dans ce cancer mais d'autres essais de combinaison avec la chimiothérapie sont en cours (cf plus haut).

Le cetuximab présente un mécanisme d'action assez particulier. En effet, il est à lui seul responsable de différents effets (Figure 11):

- il entre en compétition avec le ligand naturel (EGF) pour la liaison au récepteur
- il inhibe la dimérisation avec un autre récepteur HER
- il stimule l'internalisation du récepteur et active sa dégradation dans les lysosomes
- il bloque le cycle cellulaire en phase G1
- il diminue la synthèse de facteurs pro-angiogéniques observés lorsque l'EGF se lie à l'EGFR
- il induit l'expression de facteurs pro-apoptotiques et diminue l'expression de facteurs favorisant la survie cellulaire
- il active le processus de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) via les cellules NK (Natural Killer) et promeut l'immunité antitumorale innée.

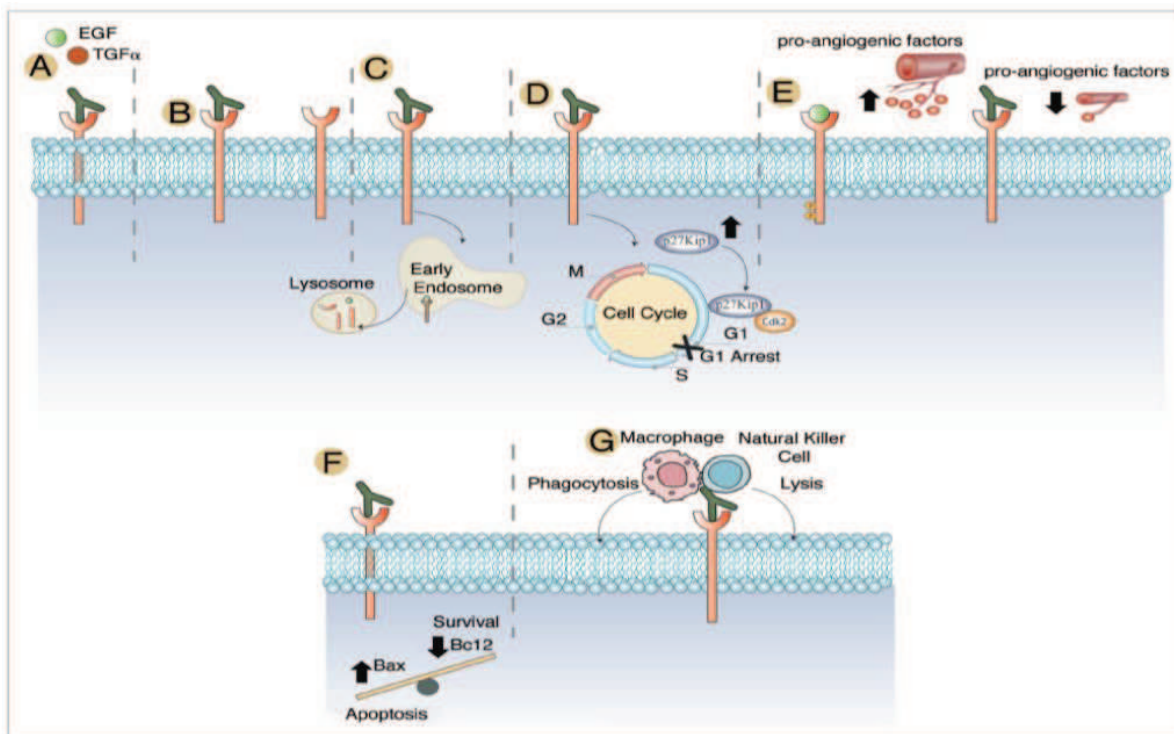


Figure 11: Mécanismes d'action du Cetuximab. Selon Brand70. Les différents modes d'action du Cetuximab. A. Par compétition avec le ligand (TGF, EGF); B. Par inhibition de la dimérisation des récepteurs HER; C. Par internalisation rapide et dégradation; D. Par arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S; E. Par diminution de sécrétion de facteur pro-angiogéniques; F. par augmentation d'expression de protéine pro apoptotique et diminution d'expression de protéine anti-apoptotique; G. Par ADCC (Cytolyse dépendant des anticorps).

Le cetuximab est aussi responsable d'une amélioration des effets de la radiothérapie lorsque utilisé en association avec les radiations ionisantes. En effet, l'essai clinique de Bonner a montré en 2006 une amélioration de la survie globale à 5 ans lorsque le cetuximab était ajouté à la radiothérapie par rapport à la radiothérapie seule (respectivement 46% contre 36% de survie à 5 ans)⁹³. Tout comme le cetuximab associé à la radiothérapie, le cisplatine associé à la radiothérapie a montré de meilleurs résultats en termes de survie globale lorsqu'on le compare à la radiothérapie seule. Néanmoins, aucun essai comparatif n'a permis de distinguer quelle association (cetuximab + radiothérapie ou cisplatine + radiothérapie) produit les meilleurs résultats. Un essai clinique est en cours (NCT01969877). Néanmoins, l'ajout du cetuximab à la radiochimiothérapie à base de cisplatine n'améliore pas la survie globale (RTOG 05-22⁹⁴). Les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer ce phénomène ne sont pas encore complètement élucidés. Récemment, Kiyozuka suggérait que cet effet passerait par l'inhibition de l'autophosphorylation d'EGFR induite par la radiothérapie⁹⁵.

ii) Les inhibiteurs de tyrosine kinase :

Les TKI sont des petites molécules dont la cible est le site catalytique de la partie intracellulaire des récepteurs à tyrosine kinases dont ceux de la famille HER. Cette liaison

permet d'inhiber la transduction du signal en aval du récepteur. Chaque inhibiteur développé comme médicament aura une affinité plus ou moins grande pour son récepteur. Ainsi l'erlotinib, molécule utilisée dans le cancer du poumon a une très grande affinité pour les récepteurs HER1. Le lapatinib, molécule utilisée dans le cancer du sein, présente plus spécifiquement une affinité sélective pour HER1 et HER2.

A plus fortes doses la sélectivité des TKI est perdue, la molécule peut se fixer sur d'autres RTK et induire des effets indésirables. A ce jour, aucun TKI ne dispose d'une AMM pour la prise en charge des cancers des VADS, aucune molécule n'ayant prouvé, seule ou en association avec la chimiothérapie, sa capacité à améliorer la survie globale des patients. Néanmoins, d'autres essais de combinaison sont en cours pour l'erlotinib et l'afatinib (cf plus haut).

La transmission du signal cellulaire peut impliquer les RTK, ou d'autres kinases comme celles de la famille des Sérines-Thréonines kinases. Plus particulièrement les kinases mTOR sont au carrefour de ces signaux cellulaires.

f) La protéine kinase mTOR

Structure et fonctions de mTOR⁹⁶

Parmi les sérines-thréonine kinases figure la kinase mTOR. mTOR a un rôle intégrateur d'activation de diverses voies de signalisation dont ceux induits par les RTK, comme la voie de signalisation des MAPK ou la voie PI3K/AKT. mTOR est impliquée dans des processus aussi divers que la biogenèse des ribosomes, la synthèse protéique, la croissance cellulaire et la prolifération, l'autophagie, la migration ou l'angiogenèse. Cette protéine de 289 kDa est hautement conservée au cours de l'évolution, ce qui peut s'expliquer en partie par sa position centrale en temps qu'intégrateur du signal cellulaire descendant en amont, et activateur de phénomènes en aval, assurant l'homéostasie cellulaire.

mTOR est composée de deux complexes mTORC1 et mTORC2. Les complexes formés comportent des activateurs et des inhibiteurs de l'activité de mTOR.

mTORC1 est un complexe constitué de 5 protéines : mTOR, RAPTOR, mLST8, PRAS40 et DEPTOR.

Sous unité	Activité
PRAS40	Inhibiteur du complexe mTORC1
DEPTOR	Inhibiteur du complexe mTORC1
RAPTOR	Nécessaire à l'assemblage, rôle dans la coopération avec d'autres protéines.
mLST8	Activateur du complexe mTORC1 ?
mTOR	

- PRAS40 et DEPTOR sont des inhibiteurs du complexe mTORC1,
- RAPTOR serait essentiel à l'assemblage du complexe, son recrutement aux lysosomes et endosomes tardifs et la colocalisation avec RHEB, une petite GTPase activatrice de mTORC1,
- le rôle de mLST8 est mal compris encore à ce jour. Il serait un activateur nécessaire à la solubilisation et au fonctionnement du complexe mTORC1.

L'activation du complexe mTORC1 dépend essentiellement des nutriments et acides aminés, des facteurs de croissance, ou de la pression en oxygène.

mTORC2 est composé de 6 protéines : mTOR, RICTOR, PROTOR-1, mLST8, DEPTOR, et mSIN1.

Sous unité	Activité
PROTOR-1	Augmente l'activation de protéines par mTOR
DEPTOR	Inhibiteur du complexe mTORC1
RICTOR	Nécessaire à l'assemblage, rôle dans la coopération avec d'autres protéines.
mLST8	Activateur du complexe mTORC2 ?
mSIN1	Contrôle assemblage du complexe mTORC2, et son interaction avec mSIN1
mTOR	

L'activation de mTORC2 répond essentiellement aux facteurs de croissance en activant l'entrée dans le cycle, la survie cellulaire, la polarisation cellulaire ou le métabolisme. Les principaux substrats connus du complexe sont les Ser/Thr protéines kinases AKT et PKC.

Régulation de mTOR C1 :

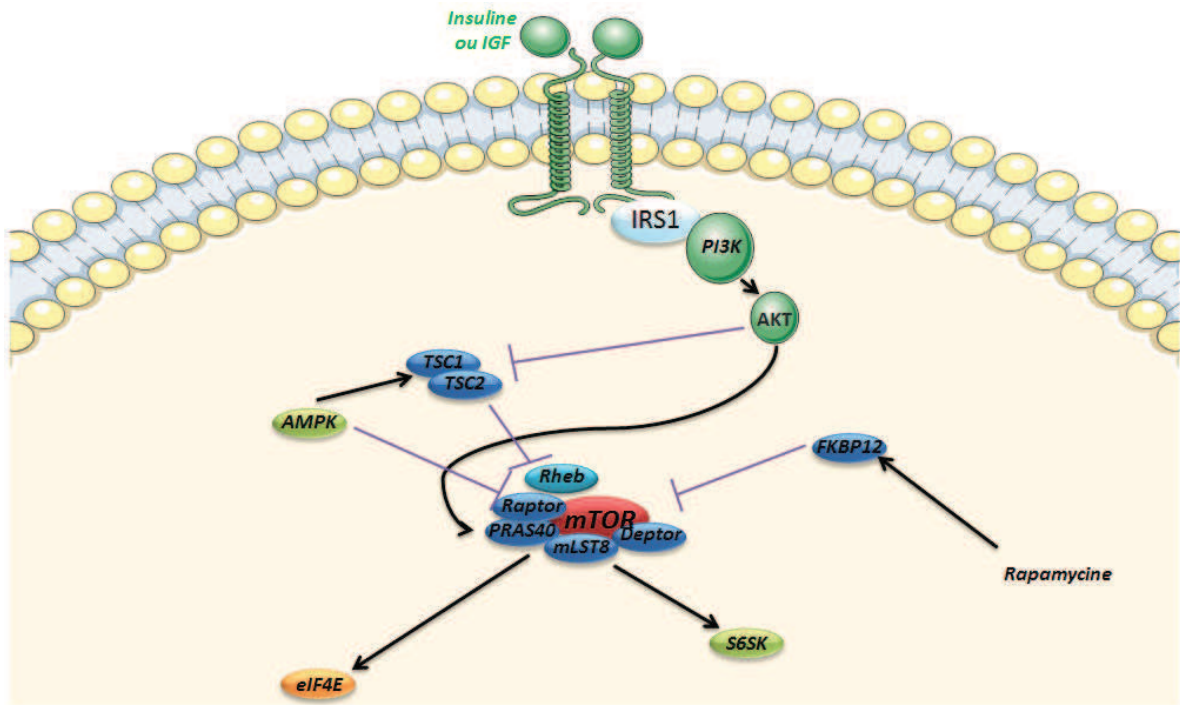


Figure 12: Voies de régulation du complexe mTORC1. Selon Laplante¹⁰¹.

Le complexe mTORC1 est composé de mTOR, PRAS40, mLST8, Raptor, Deptor. AKT active mTORC1 via PRAS40, mais aussi en inhibant les protéines TSC, levant ainsi l'inhibition de Rheb. La Rapamycine se fixe sur FKBP12, et ce complexe inhibe mTOR.

La régulation de ces complexes fait appel essentiellement à des protéines levant l'inhibition exercée par d'autres. Parmi ces protéines figurent les TSC1/2 (Tuberous Sclerosis protéines 1 et 2). En effet, les protéines TSC1 (hamartin) et TSC2 (tuberin) inhibent l'activité de mTORC1. Il a été avancé que la régulation de l'activité de mTORC1 peut se faire aussi de manière indépendante des protéines TSC. Néanmoins, cette hypothèse n'est pas encore complètement élucidée^{97,98}.

L'inactivation de mTORC1 par les TSC se fait de manière indirecte en inactivant la protéine RHEB (Ras homolog enriched in brain) (Axe TSC/RHEB).

L'activation de l'axe TSC/RHEB peut être induite par :

- la phosphorylation de TSC2 par AMPK (5'AMP Activated Kinase), un détecteur d'équilibre de la balance AMP/ATP lors d'une grande consommation d'énergie, l'hypoxie, ou les dommages à l'ADN (via p53).

- l'activation de TSC2 par REDD1, lui-même induit par l'hypoxie, le stress cellulaire par carence énergétique ou la présence d'espèces réactives à l'oxygène (ROS).

- l'inhibition directe de RHEB par BNIP3, une protéine inductrice de l'autophagie BNIP3 et REDD1 peuvent être induits par le facteur de transcription HIF-1.

Activation axe TSC/RHEB	Protéines impliquées
Phosphorylation de TSC2	AMPK
Activation de TSC2	REDD1
Inhibition de RHEB	BNIP3

mTORC1 peut être activé durant les phénomènes inflammatoires (IKK inactive TSC1⁹⁹, ou indépendamment de TSC (par les acides aminés (leucine essentiellement)¹⁰⁰).

Plusieurs voies de signalisation permettent l'activation de mTORC1 via l'inhibition de l'axe TSC/RHEB. Une des voies la plus connue est la voie PI3K/AKT/mTOR. L'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR aboutit à l'inhibition des protéines TSC1/2. De ce fait, l'inhibition exercée sur RHEB est levée, ce qui permet l'activation du complexe mTORC1. AKT peut aussi activer mTORC1 via l'inhibition de PRAS40.

L'activation de mTORC1 permet à son tour la formation du complexe de traduction Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF-4E) ou la phosphorylation S6RP (protéine kinase S6), impliquée elle aussi dans la traduction protéique¹⁰¹, et notamment dans celle du facteur de transcription HIF-1 α .

Une boucle de rétrocontrôle négatif de cette voie de signalisation a été décrite. Ce phénomène est assez commun en biologie, et permet d'éviter un « emballement » du système. Ce rétrocontrôle fait intervenir IRS1 (Insulin Receptor Substrate-1)¹⁰².

La phosphorylation de S6RP par mTORC1 permet l'inhibition d'IRS-1 par phosphorylation, qui aboutit à une inhibition de la voie PI3K/AKT. *In fine* mTORC1 se retrouve inhibée à son tour.

Le ciblage de la kinase mTOR présente donc un intérêt:

- de manière générale pour diminuer la prolifération cellulaire, l'autophagie, la migration, l'angiogénèse

- et plus particulièrement pour inhiber la traduction du facteur de transcription HIF-1 et son accumulation cytosolique.

Régulation de mTOR C2 :

La régulation et l'activité de mTORC2 est moins bien connue. mTORC2 permet l'activation de AKT, et de PKC. L'activation de mTORC2 semble être régulée par les facteurs de croissance et l'insuline principalement.

Récemment, un lien a été montré entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène induites par les Nox oxydases et la formation du complexe mTORC2 via RICTOR. La stabilisation et l'activation du complexe mTORC2 est dépendant des phénomènes d'oxydoreduction via les Nox oxydases. L'inhibition de celles-ci diminue l'expression transcriptionnelle de HIF-2 dépendant d'eIF4E et *a fortiori* de ses gènes cibles dans un modèle de lignées de cancer rénal à cellules claires, par une diminution de la transcription de HIF-2¹⁰³.

A ce jour, des médicaments ciblant directement la kinase mTOR sont utilisés en thérapeutique : Les rapalogues.

Les Rapalogues

Le chef de file de cette classe thérapeutique est la rapamycine, connue également sous le nom de sirolimus. Ce médicament a été découvert en 1975 à partir de la bactérie *streptomyces hygroscopicus* provenant de l'île de Pâques, dont le nom dans la langue autochtone est *rapa*. Les recherches concernant cette molécule ont d'abord montré qu'il s'agissait d'un antibiotique de type macrolide, d'où son suffixe en -ycine comparable à d'autres antibiotiques de la même famille, comme la streptomycine. Il s'est avéré que son activité antimicrobienne était insuffisante pour poursuivre le développement de cette molécule en infectiologie. Cependant, la mise en évidence de ses propriétés immunosuppressives a conduit au développement rapide de son utilisation en transplantation pour la prévention du rejet de greffe. D'autres propriétés sont rapportées, comme notamment ses effets sur la longévité probablement liées aux effets métaboliques et à l'activation de l'autophagie¹⁰⁴. Enfin, au cours des dernières années, l'intérêt pour les inhibiteurs de mTOR s'est principalement focalisé sur leurs effets anti-tumoraux avec le développement de nombreux analogues structuraux de la rapamycine (rapalogues).

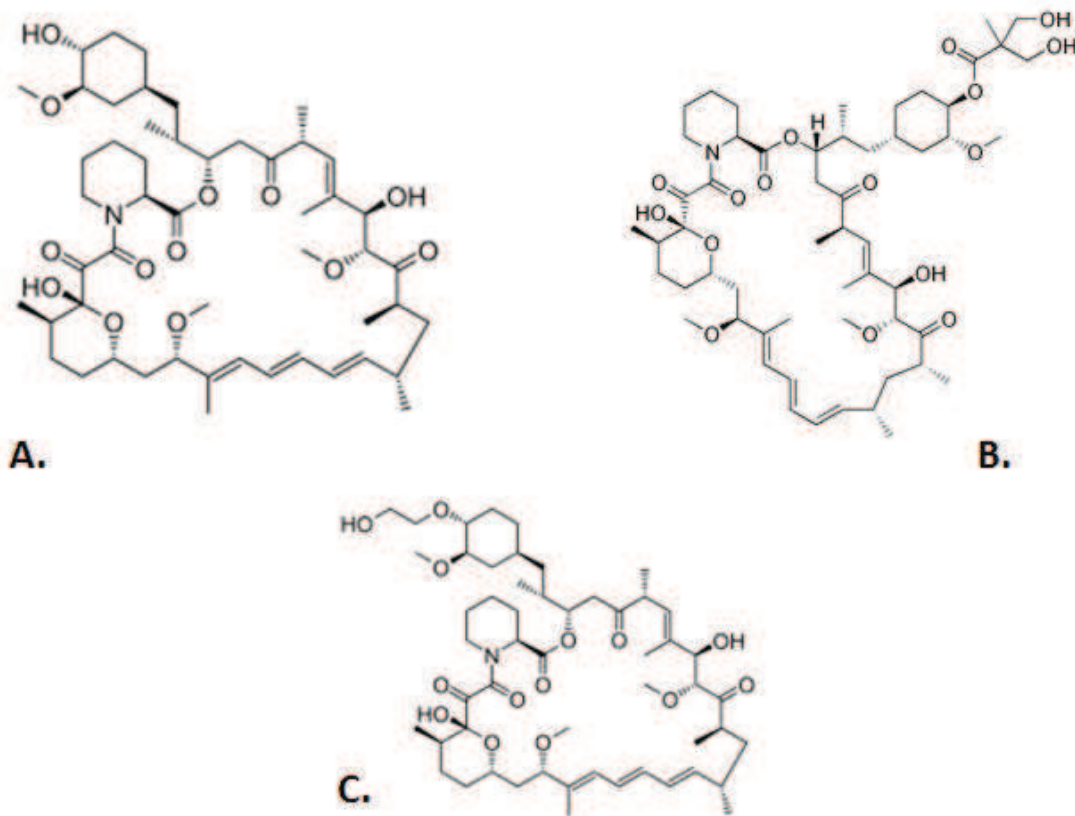


Figure 13: Structure de la Rapamycine ou sirolimus (A), le temsirolimus (B), et l'everolimus (C). La Rapalogues sont des grosses molécules de type macrolide.

Les Rapalogues sont une famille de médicaments ayant le même mécanisme d'action et une structure similaire à la rapamycine. On y retrouve : L'everolimus (RAD0001), le temsirolimus (CCI-779) et le deforolimus (MSD, ARIAD). Le développement de ce dernier n'a pas été poursuivi. L'everolimus est un dérivé hydroxyethyl du sirolimus, et le temsirolimus est une prodrogue (dérivé ester) du sirolimus. Le 1^{er} est indiqué comme immunosuppresseur, et est utilisé aussi en oncologie. Le second est utilisé seulement en oncologie, notamment dans le cancer du rein¹⁰⁵.

La rapamycine inhibe le complexe mTORC1 en se liant à FK506 binding protein 12 (FKBP12), une protéine intracellulaire qui active préférentiellement mTORC1¹⁰⁶ et peu mTORC2, sauf à des doses élevées¹⁰⁷. De plus, il semblerait que mTORC2 soit inhibé lorsqu'on utilise la rapamycine de manière chronique. En effet, au long court, la rapamycine empêche la formation de nouveaux complexes mTORC2 sans déstabiliser les complexes déjà formés^{108,109}.

Outre le rôle de la rapamycine sur l'inhibition de mTORC1 et de ses effets sur l'inhibition de la traduction, de la progression tumorale, de la survie cellulaire, de

l'induction de l'autophagie et ses effets immunosuppresseurs, d'autres effets sont démontrés à l'heure actuelle, notamment ceux sur l'immunité antitumorale. En effet, à de faibles doses, la rapamycine a des effets immunostimulants en améliorant quantitativement et qualitativement la réponse adaptative des lymphocytes TCD8, alors qu'aux doses employées en thérapeutique, elle en empêche la prolifération et l'expansion clonale, ce qui lui confère ses propriétés immunosuppressives¹⁰⁷.

III) L'hypoxie Tumorale

a) Généralités :

L'apparition des organismes eucaryotes il y a plus de deux milliards d'années a été rendue possible grâce à l'enrichissement en O₂ de l'atmosphère induit par la photosynthèse. L'O₂ participe à la phosphorylation oxydative qui permet la production d'énergie par oxydation du glucose en CO₂ et H₂O au sein des mitochondries. La phosphorylation oxydative permet en effet la récupération efficace de l'énergie contenue dans les liaisons carbonées du glucose, via la production de cofacteurs réduits (NADH,H⁺ ; NADPH,H⁺) par la glycolyse et le cycle de Krebs, et secondairement la synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces réactions métaboliques sont possibles dans des conditions de normoxie, *i.e* à des pressions physiologiques en O₂ (environ 40mmHg).

Toute augmentation (hyperoxie) ou baisse (hypoxie) anormale de la biodisponibilité de l'O₂ se traduit par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et la production de dérivés actifs de l'O₂ (ROS). Ces ROS peuvent altérer l'homéostasie cellulaire par oxydation des lipides membranaires, des acides nucléiques ou des protéines et participer à - ou accompagner - de nombreux processus pathologiques (cardiopathies, cancers, etc)⁵.

Le lien entre hypoxie et cancer a été mis en évidence pour la première fois par Otto Heinrich Warburg dès 1930. Récompensé en 1931 par l'obtention du prix Nobel de médecine pour ses travaux sur la glycolyse aérobie, il a montré le lien entre une privation en O₂ et la sélection de cellules cancéreuse. Ces travaux ont été confirmés en 1953 par Goldblatt et Cameron, qui ont cultivés des fibroblastes cardiaques dans des conditions de normoxie et d'hypoxie durant 2 ans et demi , et qui ont montré l'apparition et la sélection de cellules cancéreuses en hypoxie¹¹⁰.

L'hypoxie tumorale trouve son origine dans l'angiogénèse tumorale. En effet, la prolifération rapide des cellules tumorales nécessite un apport conséquent en O₂ et nutriments et pour assurer leur croissance. Les cellules tumorales activent donc en permanence le processus d'angiogénèse afin de promouvoir l'irrigation de la tumeur⁶. Les cellules tumorales expriment par exemple des facteurs de croissance et des chimiokines – les VEGFs, les angiopoéitines (Ang , Ang2), IL8, PIGF, IGF-1 ...). Ces stimuli sont activés de manière désordonnée et non régulés en comparaison avec le processus physiologique

d'angiogénèse. Ainsi, l'architecture vasculaire tumorale créée est dense mais présente une structure aberrante et une perméabilité accrue qui peuvent expliquer en partie l'hypoxie intra-tumorale.

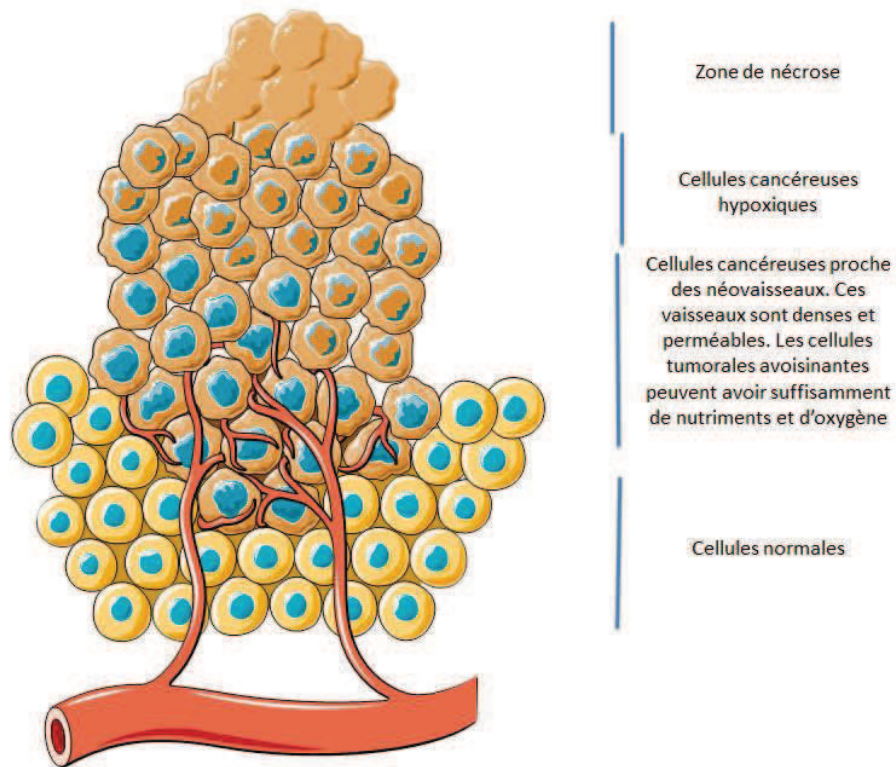
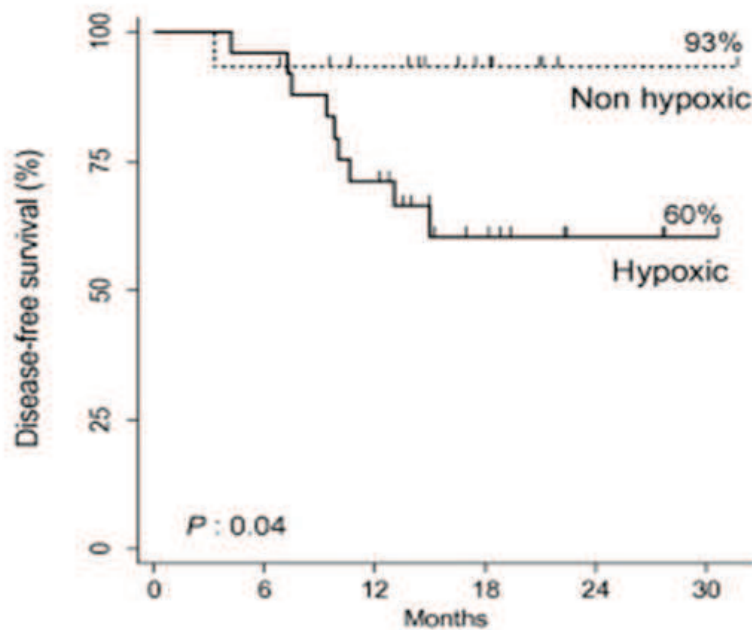


Figure 14 :Représentation schématique de l'angiogénèse tumorale. L'angiogénèse tumorale permet la synthèse de néovaisseaux parfois immatures. La synthèse anarchique de ces néovaisseaux entraînent des dysfonctionnements telle une grande perméabilité, ou le transport d'oxygène. Ils peuvent donc être responsables d'hypoxie intermittentes. Les cellules cancéreuses trop éloignées des néovaisseaux sont en état d'hypoxie profonde voire anoxie. Lorsque celle-ci est prolongée, les cellules tumorales meurent, et il apparaît des zones de nécrose.

b) Implication de l'hypoxie dans la survie des patients

L'amélioration des techniques d'imagerie ces dernières années ont permis de mettre au point des protocoles avec des nitroimidazolés, révélant entre autres, les zones d'hypoxie tumorales. Citons l'étude de Mortensen¹¹¹ qui a étudié les volumes hypoxiques de tumeurs de patients atteints de cancer des VADS en utilisant le FAZA couplé au PET/CT (¹⁸F-fluoroazomycin arabinoside (FAZA) positron emission tomography (PET)/computed tomography (CT)). Les patients (stades inclus : T1-4 N0-N3 M0) ayant les tumeurs hypoxiques avaient une survie globale inférieure aux patients ayant les tumeurs les moins hypoxiques (survie globale à 30 mois : 60% contre 93%).



Pts at risk:		0	6	12	18	24	30
Non hypoxic:	15	14	11	6	1	1	
Hypoxic:	25	24	17	8	3	1	

Figure 15 : Courbe de survie des patients porteurs de tumeurs classées comme étant hypoxiques par rapport aux non hypoxiques selon l'étude de Mortensen. Les patients porteurs de tumeurs les moins hypoxiques ont une survie supérieure au patient porteurs de tumeurs hypoxiques.

c) Les facteurs de transcription HIFs

L'adaptation des cellules tumorales à l'environnement hypoxique est régulée en partie par la famille des facteurs de transcription Hypoxia Inducible Factors (HIFs), dont HIF-1 est le plus étudié⁷. Cette famille de facteurs de transcription fait partie de la « superfamille » de protéines comportant les domaines PAS (Per Arnt Sim Domain). Cette « superfamille » comporte plus de 6000 familles de protéines différentes présentes dans toute forme de vie¹¹². Ces protéines ont toutes des fonctions de détecteur de signaux et réagissent à des variations de luminosité, d'équilibre redox, O₂,... Les plus étudiées sont les protéines comportant un domaine (b-HLH)-PAS (basic Helix-loop-Helix) permettant de se lier à l'ADN et dont les HIFs font partie.

Les HIFs sont une famille de facteurs de transcription découverts dans les années 1990 par Greg Semenza¹¹³. Il a découvert la 1ere de ces isoforme : HIF-1. Cette famille est composée de 3 isoformes : HIF-1, HIF-2 et HIF-3 codés par les gènes *HIF1A*, *EPAS1* et *HIF3A* situés sur les chromosomes 14q23.2 ; 2p21-p16, 19q13.32.

HIF-1 est exprimé dans de nombreux type cellulaire. HIF-2 est retrouvé dans la plupart des tissus mais est surtout exprimé dans les tissus très vascularisés comme le cœur, les poumons, le foie.

Dans la plupart des cancers solides, on observe fréquemment une surexpression de HIF-1 α .

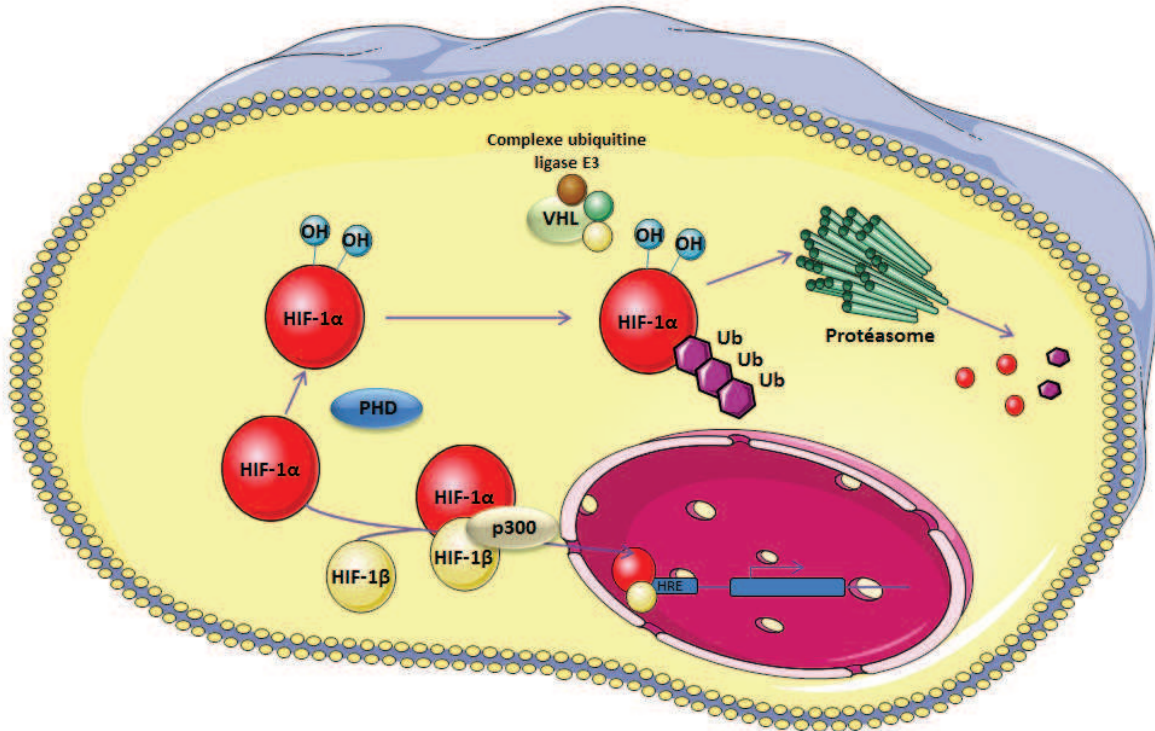


Figure 16: Stabilisation ou destruction de HIF-1 α . En présence d'oxygène, les prolyl hydroxylases (PHD) sont actives, et hydroxylent des résidus proline de HIF. Cette hydroxylation permet le recrutement du complexe ubiquitine ligase E3, dont la protéine Von Hippel Lindau (VHL) fait partie. HIF1 est ubiquitinylé par ce complexe, permettant son envoi au protéasome pour destruction. En l'absence d'oxygène, HIF-1 α est stable, et peut se lier à HIF-1 β , pour atteindre le noyau et exercer son rôle de facteur de transcription en se liant au domaines HRE (Hypoxia Responsive Elements) et induire la transcription de gènes cibles de HIF.

HIF-1, HIF-2 et HIF-3 sont des facteurs hétérodimériques constitués d'une sous-unité HIF-1 β (ou ARNT) exprimée de façon constitutive, et d'une sous-unité HIF- α dont l'expression dépend de la pression en oxygène. L'association de HIF-1 α et de HIF-1 β forme le facteur de transcription HIF-1, de même pour HIF-2 (association de HIF-2 α et de HIF-1 β) et pour HIF-3 (association de HIF-3 α et de HIF-1 β).

HIF-1 β est une protéine décrite comme constitutive exprimée dans tous les tissus. Il existe une protéine HIF-2 β (ARNT2) et HIF3 β (ARNT3) qui présentent environ 80% d'homologie avec HIF-1 β /ARNT, et sont capables de dimériser avec les sous-unités alpha des HIFs. Il semblerait que leur expression soit importante surtout à la naissance au niveau rénal, et leur expression diminue avec l'âge¹⁴.

Chacune des sous unités alpha a un domaine bHLH et un domaine PAS impliqué dans leur liaison à l'ADN et dans leur dimérisation, un domaine de régulation ODD

(Oxygen dependand Degradation Domain), et des domaines catalytiques dits de transactivation TAD-N et TAD-C nécessaires à l'activation transcriptionnelle¹¹⁵.

HIF-1 est fréquemment exprimé dans les tumeurs, en raison de l'hypoxie importante retrouvée dans les cancers, et de l'activation des voies de signalisation oncogéniques (que nous détaillerons après). L'activation et l'accumulation de ce facteur de transcription tient une place importante dans les mécanismes de résistance aux traitements notamment. HIF-1 joue un rôle majeur dans la progression tumorale via la régulation de l'expression de dizaines de gènes impliqués dans l'angiogénèse et l'érythropoïèse (*VEGF-A*, *VEGFRs*, *Angiopoïétines*,...), l'adaptation métabolique à l'hypoxie (*GLUT1*, *GLUT3*, enzymes de la glycolyse), la transition épithélio-mésenchymateuse (*E-Cadhérine*, *N-Cadhérine*, *Twist*, *Snail* ...), l'invasion (*LOX*), la dégradation de la matrice extra-cellulaire (métalloprotéases) ainsi que le chimiotactisme (*CXCR4*, *CXCL12/SDF-1*).

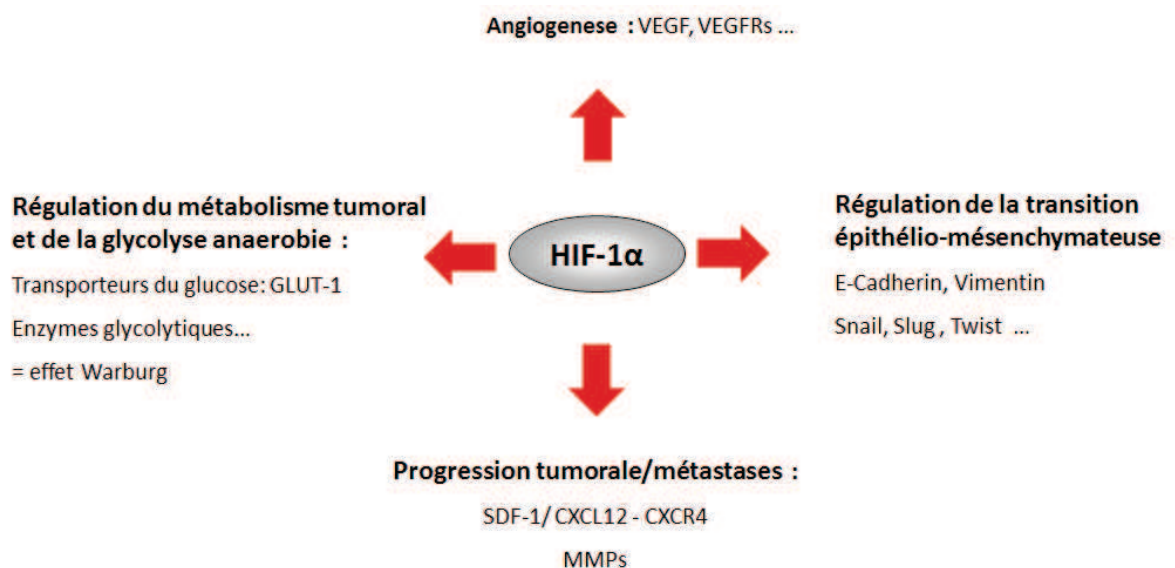


Figure 17: Processus dont HIF-1 contrôle l'expression. HIF-1 contrôle l'expression de plus d'une centaine de gènes impliqués dans différents processus, notamment le métabolisme cellulaire, l'angiogénèse tumorale, la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse, la progression tumorale et la formation de métastases.

HIF-2 est moins étudié en cancérologie, hormis dans le cancer rénal à cellules claires, où les HIFs et particulièrement HIF-2 jouent un rôle oncogénique prépondérant. HIF-2, initialement appelé EPAS1 (Endothelial PAS Domain Protein 1), régule l'expression d'un panel de gènes communs à HIF-1, impliqués dans les processus de glycolyse (*GLUT1*), d'angiogénèse (*VEGF-A*), d'invasion (*MMP2*)¹¹⁵, mais aussi plus spécifiques (*EPO*).

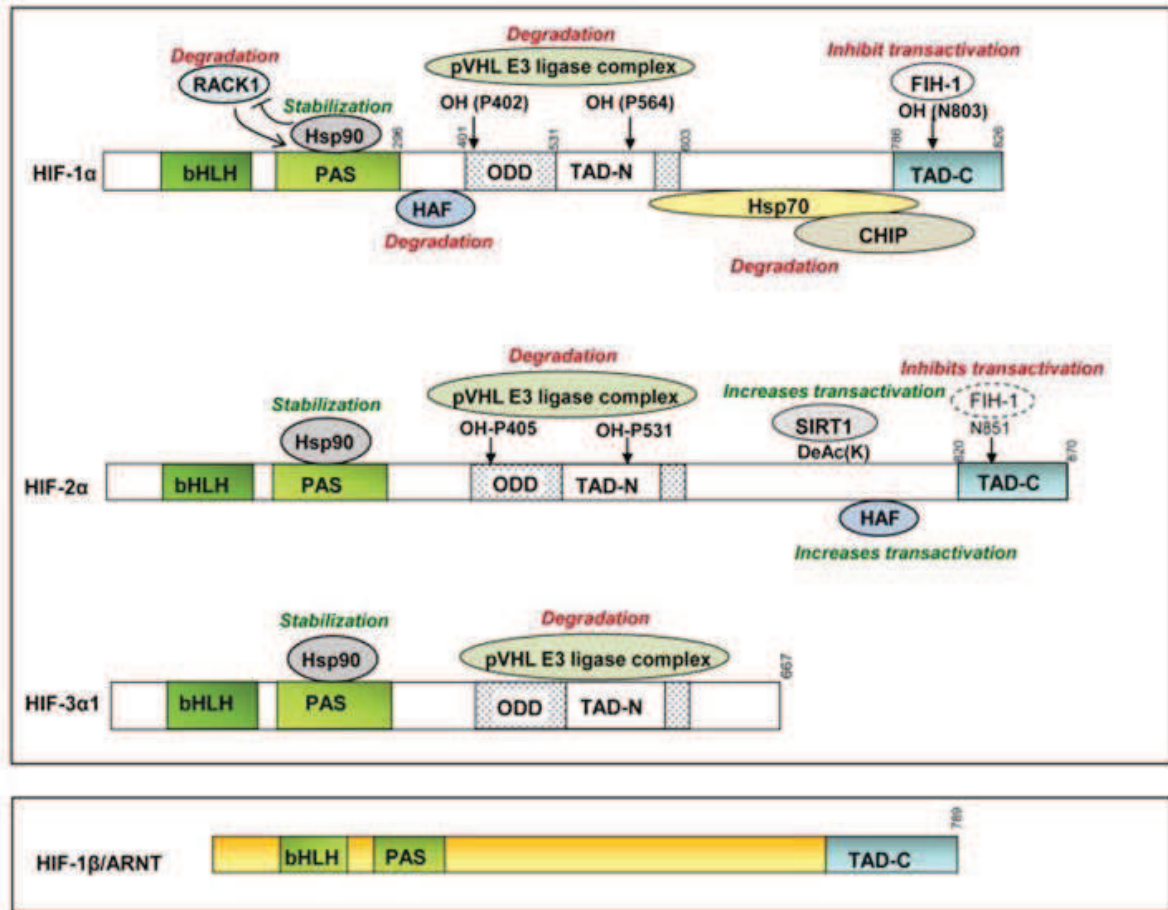


Figure 18: Domaines des sous unités α de HIF-1, HIF-2 et HIF-3 et de HIF-1 β selon Koh . Chacune des sous unités alpha a un domaine bHLH et un domaine PAS impliqué dans leur liaison à l'ADN et dans leur dimérisation, un domaine de régulation ODD (Oxygen dependand Degradation Domain), et des domaines catalytiques dits de transactivation TAD-N et TAD-C nécessaires à l'activation transcriptionnelle¹⁰⁷

HIF-3 est moins étudié. Il ne possède pas de domaine de transactivation TAD-C. Il existe de nombreux variants d'épissage de HIF-3, dont un des plus étudiés est IPAS, et agirait comme un inhibiteur de HIF-1 α . Nous ne le détaillerons pas dans la suite de ce travail.

La stabilisation des sous unités HIF- α peut être régulée par différents mécanismes dont certains ne sont pas totalement élucidés. Nous détaillerons par la suite surtout les voies de régulations principales, à savoir la régulation par les pression en O₂¹¹⁶ ou par l'activation des voies de signalisation oncogéniques, comme la voie PI3K/Akt/mTOR¹¹⁷.

d) Implication de l'hypoxie dans la chimiorésistance

Les mécanismes de résistances aux chimiothérapies utilisées actuellement sont multifactoriels. Elles sont : i) d'ordre pharmacocinétique, ii) inhérents à la tumeur (par la synthèse de protéines d'efflux, la mutation des cibles,...) iii) et enfin, peuvent s'expliquer par le microenvironnement tumoral. Parmi les causes de résistance dans lesquelles le

microenvironnement joue un rôle important, l'hypoxie apparait comme l'un des phénomènes le plus connus et le plus ancien¹.

Au sein de chaque tumeur la pression en O₂ varie dans le temps et dans l'espace. Deux comportements sous-jacents au niveau d'hypoxie auront deux conséquences différentes :

i) l'absence totale d'O₂ (anoxie) où des pressions extrêmement faibles entraînent une mort cellulaire par nécrose (un phénomène fréquemment observé au centre des tumeurs)

ii) un niveau modéré d'hypoxie, suivi de phases de réoxygénation, accroît au contraire l'agressivité tumorale et la résistance aux traitements¹¹⁸.

En effet, l'environnement tumoral hypoxique impose un stress oxydatif, nécessitant une adaptation des cellules tumorales pour survivre à ces conditions défavorables. Elle va conduire à la sélection d'une sous-population tumorale dont les mutations ou altérations génétiques favorisent un phénotype plus agressif et chimiorésistant¹¹⁹. Ces modifications comprennent :

-une diminution de l'activité apoptotique par sélection de tumeurs ayant perdu l'activité de la protéine p53 (par mutation), qui participe à l'apoptose induite, en particulier, après exposition aux agents génotoxiques

-des altérations dans les mécanismes de réparation de l'ADN¹, qui sont la cible de certains agents anti-cancéreux

Outre cette sélection clonale, d'autres mécanismes dépendants du facteur de transcription HIF-1 induit par l'hypoxie, sont impliqués¹:

- i) une augmentation de l'activité anti-apoptotique : HIF-1 participe à la stabilisation de NF-κB, un facteur de transcription responsable du contrôle de l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels que BCL-2¹¹⁸. HIF-1 permet aussi d'inhiber l'apoptose induite par p53¹
- ii) une augmentation de l'autophagie, induisant une résistance aux chimiothérapies ciblant la prolifération cellulaire¹²⁰
- iii) une diminution de la sénescence induite par les drogues de chimiothérapie¹²¹
- iv) une inhibition de mécanismes de réparation de l'ADN impliquant la topoisomérase II¹²²
- v) une induction de l'expression des protéines d'efflux comme les transporteurs ABC

- vi) une activation des voies de signalisation, comme les voies PI3K/Akt, Ras/MAPK, ou NF- κ B, impliquées dans la survie cellulaire

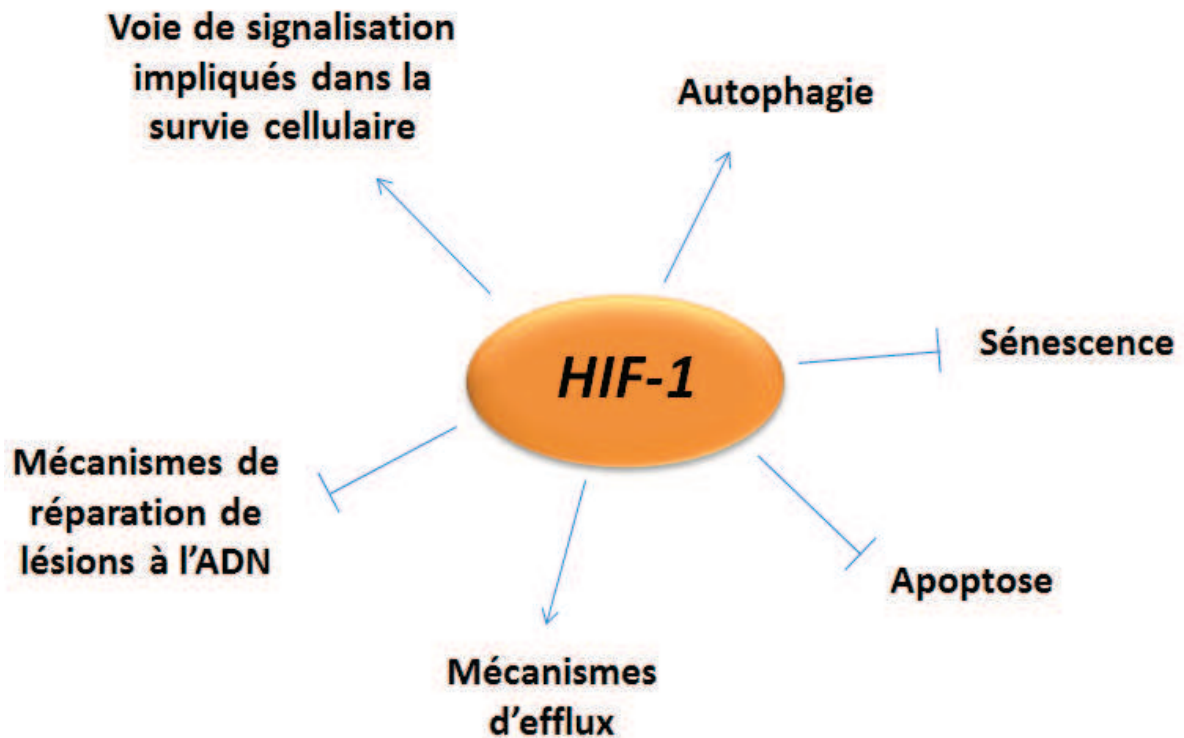


Figure 19: Résumé des mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales induits par HIF-1. Adapté de Rohwer et al 2011¹.

e) Implication de l'hypoxie dans la radiorésistance

Le lien entre hypoxie et radiorésistance est établi de longue date : Louis Gray l'évoquait déjà en 1953¹²³. Le mécanisme d'action de la radiothérapie repose principalement sur la génération de ROS capables d'induire de nombreux dommages aux molécules qu'elles rencontrent et notamment l'ADN, où les ROS induisent, entre autres, des cassures doubles brins qui seront létales pour la cellule. L'absence d'O₂ diminue la génération de ROS au cours de l'irradiation et l'efficacité des rayonnements s'en trouve amoindrie. En 1996, Raleigh a démontré un lien proportionnel entre le niveau d'hypoxie et la quantité de rayonnement ionisant nécessaire pour induire le même effet biologique sur les cellules : plus l'hypoxie est profonde, plus la quantité de rayonnement ionisant nécessaire est importante. Ces observations ont permis de relier la radiorésistance à l'hypoxie¹²⁴.

Dans sa revue de 2007, Overgaard évoque le fait que la radiorésistance est surtout observée soit à des pressions en O₂ inférieures à 5mmHg, soit à une hypoxie importante, alors que les effets cellulaires dus à l'hypoxie sont visibles dès que les pressions en O₂ sont

inférieures à la normale soit 20mmHg. Selon lui, les cellules de tumeurs épithéliales trouvant leur origine dans un épithélium peu vascularisé, sont plus à même de supporter une baisse importante des pressions en O₂, et de maintenir une survie clonogénique. Bien que ce phénomène soit connu depuis presque un siècle et intéresse principalement les radiobiologistes, peu de retombées cliniques ont pu être obtenues jusqu'alors, comme en témoigne l'écart entre le nombre de publications précliniques et cliniques¹²⁵. Néanmoins, ces observations ont permis le développement d'essais cliniques évaluant des molécules qui ciblent les cellules en hypoxie, afin de pallier aux effets observés de radiorésistance. Le nimorazole, un 5-nitroimidazolé a été testé dans des essais cliniques. En 1998, un essai danois de phase III, par Overgaard, a montré que l'utilisation du nimorazole associé à la radiothérapie permet d'améliorer le contrôle loco-régional par rapport à la radiothérapie seule chez des patients traités pour un carcinome du pharynx ou du larynx supraglottique¹²⁶. La sélection des patients au profil de tumeurs hypoxique ne pouvait se faire à la fin du siècle dernier. Récemment, une étude danoise de 2012, a montré que l'utilisation du FAZA PET/CT pourrait permettre de sélectionner ces patients¹¹¹. Le mécanisme d'action de ces molécules repose surtout sur leur groupement nitro. Celui-ci est réduit par les nitroreductases cellulaires à l'intérieur de la cellule, et nécessite d'être sous forme oxydée pour la quitter. Dans les cellules normoxique, cette oxydation pourra se faire, alors que dans les cellules hypoxiques une seconde réduction entraîne une réaction du composé avec les éléments de la cellule¹²⁷. Depuis le 2 Mars 2011, le nimorazole est inscrit à l'agence européenne des médicaments (EMA) comme médicament orphelin.

Outre l'hypoxie, HIF-1 et HIF-2 semblent jouer un rôle dans les phénomènes de radiorésistance. Les mécanismes par lesquels ils sont induits reposent entre autre:

- 1) Sur l'hypoxie
- 2) Sur les voies de signalisation oncogéniques
- 3) Sur l'équilibre redox perturbé par les rayonnements ionisants.

Ces derniers induisent la formation de ROS qui vont avoir un impact direct sur l'équilibre redox de la cellule, et sur les enzymes dépendant de celui-ci.

Les prolyl hydroxylases (PHDs) sont des enzymes dont le centre catalytique comprend un atome de fer qui est actif sous sa forme réduite (fer ferreux, Fe²⁺). Ces enzymes catalysent l'hydroxylation de la sous-unité α des HIFs, débutant ainsi une réaction de dégradation des sous unités α que nous détaillerons dans un paragraphe ci-après. Cette hydroxylation s'accompagne d'une oxydation d' α -cetoglutarate en succinate au cours de laquelle

l'ascorbate permet la réduction de l'atome de fer ferrique (Fe^{3+}) généré en atome de fer ferreux (Fe^{2+}) et le maintien de l'activité enzymatique des PHDs¹²⁸.

Les ROS générés par la radiothérapie sont capables d'empêcher le recyclage des groupements ferrique (Fe^{3+}) en groupement ferreux (Fe^{2+}) des prolyl hydroxylases¹²⁹, ils inhibent donc l'activité enzymatique des PHDs et permettent la stabilisation de HIF-1, même dans des conditions de normoxie, où les PHDs sont normalement actives.

La stabilisation et *in fine* l'activation de HIF-1/2 a des conséquences directes dont l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale et la survie cellulaire, permettant aux cellules de résister aux rayonnements ionisants.

Différentes études ont montré le lien direct entre la surexpression de HIF-1 ou de HIF-2 et la radiorésistance (pour revue HIF-1 : ¹³⁰; HIF-2 : ¹³¹).

Des essais précoces sont en cours afin d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs directs de HIF-1 (PX-478, EZN-2968) pour les tumeurs solides, et de HIF-2 (PT-2385) dans les cancers rénaux à cellule claires. Il n'existe pas à ce jour d'essai clinique associant ces inhibiteurs directs de HIF à la radiothérapie.

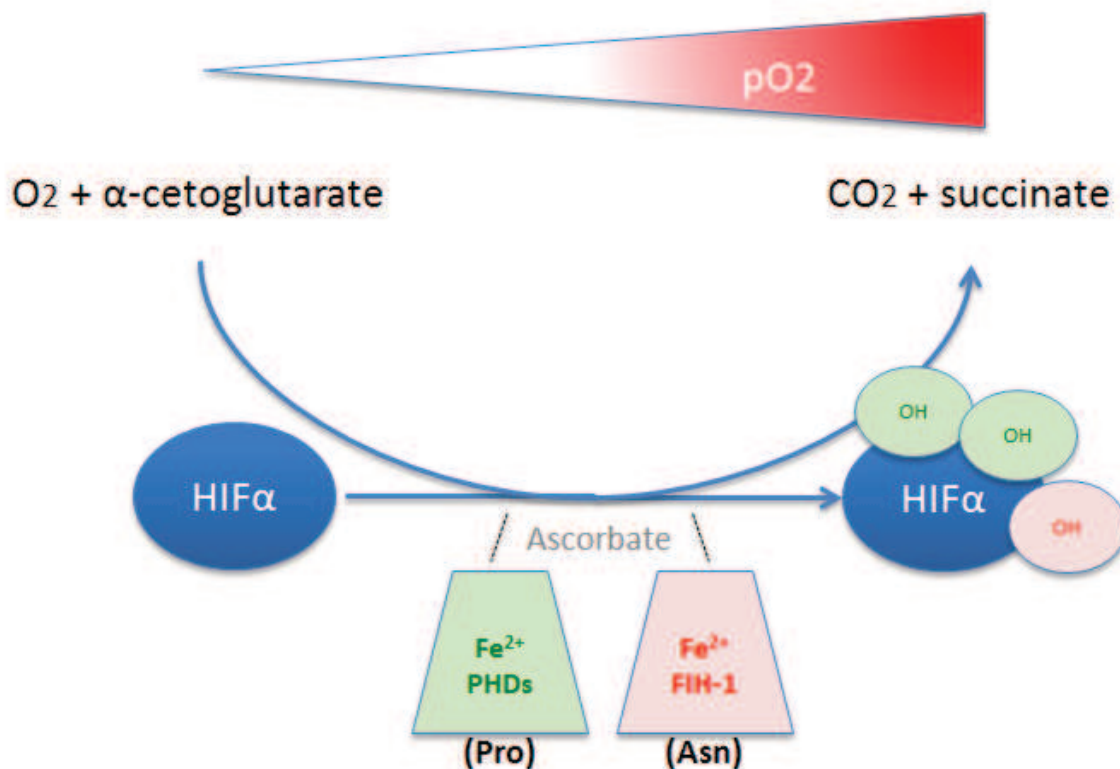


Figure 20: Réaction catalysée par les Prolylhydroxylases. Le recyclage des prolyl hydroxylases nécessite la présence de cetoglutarate et d'oxygène. Les prolyl hydroxylases sont réduites au niveau de leur structure hémique, où le fer ferrique (Fe^{3+}) est réduit en fer ferreux (Fe^{2+}). C'est sous cette forme qu'elle peuvent hydroxyler HIF-1 α .

f) Les mécanismes de régulation d'accumulation des HIFs

La régulation par les pressions en oxygène :

Le mécanisme est commun à HIF-1 α et HIF-2 α .

En condition de normoxie, la sous-unité α peut-être hydroxylée :

- i) sur des résidus proline du domaine ODD/TAD-N par les PHDs. Cette hydroxylation permet la liaison de HIF-1 α ou HIF-2 α à la protéine Von Hippel Lindau (VHL). Cette dernière est une ubiquitine ligase qui catalyse l'ubiquitinylation de la sous unité α , et induit sa destruction par le protéasome¹³².
- ii) sur des résidus asparagine du domaine TAD-C par le facteur FIH (Factor Inhibiting HIF), ce qui inhibe son interaction avec la protéine p300 et réduit l'activité transcriptionnelle du facteur HIF.

Dans les conditions d'hypoxie, les prolyl hydroxylases privées d'O₂ sont inactives. La diminution de l'hydroxylation des sous unités α se traduit donc par une baisse de son ubiquitinylation par VHL, aboutissant à sa stabilisation et son accumulation. La sous-unité α se lie à la sous-unité β ainsi qu'à la protéine p300. Le facteur de transcription HIF ainsi constitué peut se fixer notamment sur un domaine d'activation de la transcription de l'ADN, le domaine HRE (Hypoxia responsive Element), et activer l'expression de centaines de gènes en aval.

Cependant, mêmes dans des conditions normoxiques, on sait que HIF-1 peut être actif. C'est le cas notamment des tumeurs avec mutations des gènes codant VHL, IDH1 (Isocitrate Deshydrogénase), SDH (Succinate Deshydrogénase), FH (Fumarate Hydratase) dont la conséquence est une perte d'activité des PHDs¹³³. Il en résulte une diminution de la dégradation des HIFs, et leur stabilisation^{134,135}. Ces mutations prédisposent au développement de certains cancers comme le cancer rénal à cellule claire, les gliomes ou les paragangliomes¹³⁵.

Outre cette régulation dépendante de l'O₂ via l'hydroxylation de résidus proline et asparagine, d'autres mécanismes régulent la stabilité de la sous-unité α , notamment par phosphorylation de résidus stabilisant la protéine et empêchant sa dégradation¹³⁶.

La régulation par les voies de signalisation oncogéniques

De nombreuses protéines peuvent être directement impliquées dans la régulation de l'activité ou de la stabilisation de HIF-1 comme les protéines E6 et E7 du papillomavirus (HPV). Ces protéines sont des activateurs de la stabilisation de HIF-1. Il existe aussi des inhibiteurs de la stabilisation comme la protéine VHL¹³⁷, ubiquitine ligase responsable de sa dégradation. On retrouve notamment les protéines impliqués dans les voies de signalisation oncogénique. Parmi celles-ci figurent les voies en aval de l'EGFR (Epidermal Growth Factor) : la voie PI3K/AKT/mTOR, et la voie des Mitogen Activated Kinases (MAPK).

Ces voies de signalisation détaillées dans les paragraphes précédents, peuvent induire une activation de la transcription de HIF-1 et de HIF-2 via l'activation de la kinase mTOR. Celle-ci est aussi associée à une stimulation de la stabilisation de HIF-1¹³⁸. De plus, il semblerait qu'elles participent également de manière importante à la rémanence d'activité de HIF-1, notamment au niveau tumoral. En effet, des expériences d'ischémie reperfusion sur des petites xénogreffes de tumeurs, non hypoxiques, ont permis de montrer l'induction rapide de HIF-1 et de son activité transcriptionnelle, et ce, de manière plus prolongée (24h) dans le tissu tumoral que dans le tissu sain¹³⁹.

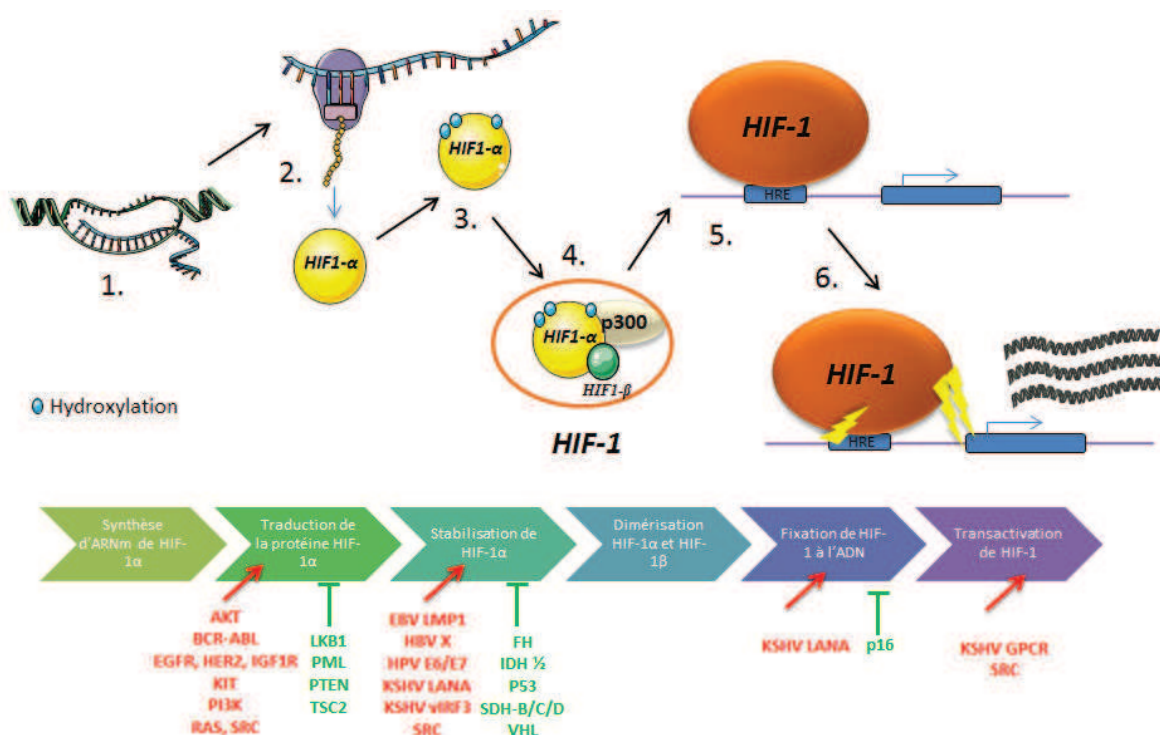


Figure 21: Principaux régulateurs de l'accumulation de HIF-1. Inspiré de Semenza³² 2012 Trends pharmacol.

1. Synthèse d'ARN messenger; 2. Traduction; 3. Stabilisation par hydroxylation sur les résidus Proline 564 et 402 et Asparagine 803; 4. Formation du complexe HIF-1 comprenant HIF-1 α ,HIF-1 β et p300; 5. Liaison à l'ADN sur les domaines HRE (Hypoxia Responsive Elements); 6. Transactivation de HIF-1.

Des anomalies oncogéniques associées à ces voies conduisent donc à une accumulation des HIFs. Dans les cancers des VADS, Lui et al en 2013 ont analysé les

données de mutation de 145 tumeurs par NGS (Next Generation Sequencing) Illumina™. En colligeant leur données avec celles existantes (soit plus de 300 tumeurs), ils ont identifiés les fréquences de mutation des voies de signalisation oncogéniques dans les cancers des VADS. Les taux de mutations observés au sein des échantillons est le suivant : plus de 30% de mutations activatrices de la voie PI3K (dont les mutations de mTOR et PTEN) ; 9% de la voie JAK/STAT ; 9% de la voie des MAPK¹⁴⁰. De plus, Beasley et al en 2002¹⁴¹, ont montré une surexpression de HIF-1 α et de HIF-2 α dans environ 75% de cas comparés à du tissu sain dans une cohorte d'une vingtaine de patients. Une étude plus récente, basé sur l'exploitation de coloration immunohistochimique par la technique du TMA (Tissu Micro array) rapportent une surexpression de HIF-1 dans 40% des tumeurs de leur cohorte de 90 patients¹⁴². Enfin, à contrario, les HIFs semblent jouer un rôle important dans l'induction de l'EGFR. Wang a notamment montré que les HIFs permettent une activation de l'EGFR par augmentation de l'expression de caveolin-1. La formation des cavéoles permettraient d'augmenter les probabilités de dimérisation avec un autre récepteur dans les endosomes, et d'induire leur activation indépendamment du ligand¹⁴³.

Les voies de signalisations oncogéniques jouent donc un rôle important dans l'accumulation des HIFs. Néanmoins, leur accumulation cytosolique doit s'accompagner d'un transfert vers le noyau pour être actif.

La régulation des HIFs par défaut d'adressage au noyau :

La régulation des HIFs par les pressions en oxygène ou les voies de signalisation oncogéniques sont bien connus. En revanche, l'adressage des HIFs vers le noyau l'est moins, et beaucoup reste à découvrir.

Les sous-unités alpha des HIFs (HIF-1 et 2) comme la sous unité β comportent, sur le domaine C-terminal, une séquence de translocation vers le noyau dite NLS (Nuclear Localization Signal)¹⁴⁴. Ce signal est reconnu par des protéines spécialisées dans le transport nucléaire, les importines, notamment les importines 4, 7, α et β . Néanmoins, d'autres mécanismes restant à identifier permettraient le passage des sous unités vers le noyau, puisque l'inhibition des importines n'inhibe pas complètement la translocation nucléaire de HIF-1 α ^{145,146}. D'autres protéines sont impliquées, et notamment les protéines chaperonnes HSP90 ou RACK1. Celles-ci interviennent dans le cytosol. Elles agissent en compétition l'une avec l'autre. RACK1 favorise la liaison de pVHL, leur ubiquitinylation et empêche le transport vers le noyau¹⁴⁷. HSP90 empêche l'ubiquitinylation des sous unités HIF α et leur dégradation par le système du protéasome. Lorsque HSP90 est liée à HIF-1 α , elle induit un

changement de conformation des sous unités α . Le changement de conformation démasque le domaine NLS, permettant leur transfert dans le noyau¹⁴⁸.

Les HIFs peuvent être renvoyées du noyau vers le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome¹⁴⁹ via un signal d'export : NES (Nuclear Export Signal) faisant intervenir la protéine CRM1¹⁵⁰. En conditions normales, il existerait donc un équilibre entre l'import des sous unités alpha et leur export du noyau.

Les voies de signalisation oncogénique peuvent aussi perturber cet équilibre. En effet, il a été montré qu'une phosphorylation du NES par les MAPK empêcherait l'export du noyau vers le cytoplasme de HIF-1¹⁵⁰. Ceci rejoint les observations de ZHENG¹⁵¹. Selon cette étude, il semblerait que la localisation préférentielle des sous unités α ou le lieu de dégradation dépende du type cellulaire : Les cellules à fort potentiel prolifératif conservent une accumulation des sous unités α dans le noyau, et nécessitent un export dans le cytoplasme pour être dégradées, alors que pour les cellules endothéliales, les sous unités α ne sont pas localisées de manière préférentielle dans le noyau ou le cytosol. De même leur dégradation peut se faire aussi bien dans le noyau que dans le cytosol. L'adressage des sous unités α nouvellement synthétisées, ne peut pas se faire uniquement par phénomène passif. Ces protéines doivent pouvoir répondre à un phénomène de stress, ce qui suggère qu'une relocalisation proche du noyau doit être rapide. Carbonaro a montré récemment que HIF-1 α utilise un des transporteurs associés aux microtubules, la dyneine. En effet, ces transporteurs permettent de déplacer rapidement des protéines du cytosol vers le la membrane du noyau. L'inhibition pharmacologique des microtubules inhibent l'adressage de la protéine HIF-1 α vers le noyau, et *in fine*, son activité. Néanmoins, bien que fonctionnant dans des lignées d'origines différentes, les taxanes (qui sont des inhibiteurs de la fonction des microtubules et un poison du fuseau mitotique) se sont avérés inefficaces dans les lignées de cancer du rein à cellules claires, suggérant l'existence de transports alternatifs¹⁵². De plus, elle a montré que ces agents perturbant les microtubules, dont les taxanes, permettaient aussi d'inhiber la traduction de ces protéines avec un mécanisme différent. En effet, les poisons du fuseau mitotique, (autre nom des inhibiteurs des microtubules) permettent d'inactiver les polyribosomes traduisant l'ARNm de HIF-1. Cette inactivation fait suite à l'inhibition des microtubules par le paclitaxel. De plus, ce poison du fuseau induit l'adressage des ARNm de HIF-1 vers les P-bodies (Processing bodies) Argonaute 2 (Ago2). Les P-bodies dont Ago2 sont des protéines qui interviennent pour inactiver et détruire différentes sortes d'ARN dont les miRNA, siRNA, ou les mRNA¹⁵³.

HIF-1 est donc une cible intéressante, dont le ciblage pharmacologique peut se faire par différentes approches.

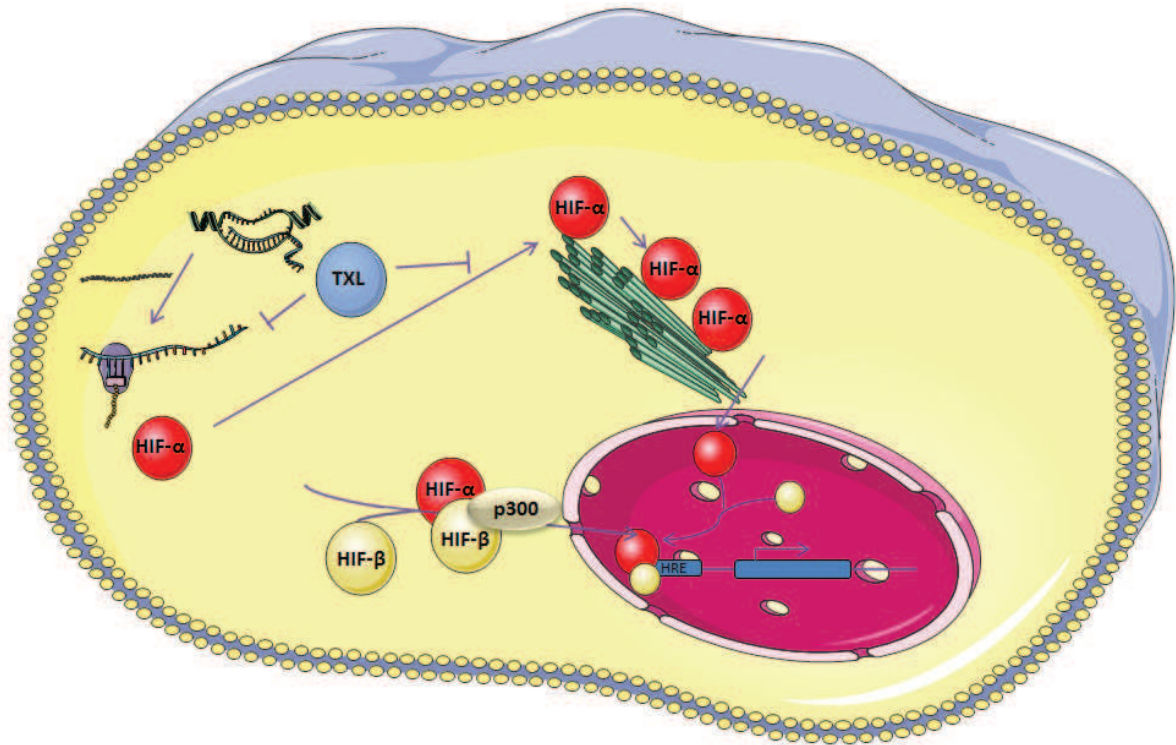


Figure 22 : Propriétés inhibitrices des taxanes sur les Hifs selon Carbonaro: Le paclitaxel (TXL) et par extension les poisons du fuseau inhibent la traduction des transcrits des sous unités alphas, et favorisent leur envoi vers les p-Bodies. De part leur propriétés inactivatrices des microtubules, elles empêchent le trafic des sous unités alpha vers le noyau

PARTIE II : OBJECTIFS

Les HIFs, et plus particulièrement HIF-1, jouent un rôle prépondérant comme facteurs de radorésistance et de chimiorésistance. Ces deux phénomènes peuvent en partie expliquer les échecs thérapeutiques. Le cancer des VADS est un des cancers au pronostic le plus sombre, avec peu de traitements disponibles et efficaces à long terme pour la prise en charge des tumeurs localement avancées ou en progression.

Etant donné l'importance des HIFs dans les phénomènes de résistance, nous avons évalué l'impact de leur inhibition par différentes combinaisons de drogues afin de sensibiliser les cellules tumorales aux thérapeutiques classiquement utilisées dans le cancer des VADS. Ces combinaisons ont été testées avec ou sans irradiation.

Nous nous proposons de réaliser dans une première partie un ciblage pharmacologique vertical de l'axe EGFR/mTOR en associant un inhibiteur de mTOR, la **rapamycine**, et l'anticorps monoclonal anti EGFR utilisé en thérapeutique, le **cetuximab**, afin de diminuer l'accumulation de HIF-1, en analysant :

- ses effets *in vitro* sur l'inhibition de l'axe mTOR/HIF-1,

- ses effets de potentialisation et de radiosensibilisation *in vitro* et *in vivo*

- les effets moléculaires des drogues, notamment sur les voies de signalisation oncogéniques PI3K/AKT, et MAPK.

Enfin, dans une dernière partie, nous terminerons avec deux stratégies de traitement permettant de contrôler l'induction d'une autre protéine dont nous avons mis en évidence son implication dans les phénomènes de résistance aux traitements.

PARTIE III : MATERIELS ET METHODES

a) Avant Propos

Nous avons choisi de citer ci-après uniquement les méthodes utilisées qui ne sont pas mentionnées dans le manuscrit (partie résultats).

b) Extraction d'ARN, qualification et quantification :

L'ensemble des échantillons d'ARN a été extrait au préalable par le kit miRNeasy (Qiagen[®]), dont le principe repose sur une extraction au phénol et au chloroforme. Les échantillons ont été qualifiés par BioAnalyzer2100[®](Agilent), et sont quantifiés sur Nanodrop[®].

c) Retrotranscription :

La réaction de transcription inverse des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir de 500ng d'ARN, 1µg d'oligo dT15 (OligodT, Promega[®]) et de Random Primer (Promega[®]) qui s'hybrident aux queues poly A des ARNm, pendant 5 min à 70°C. Après avoir baissé la température à 25°C, 1µl/tube de transcriptase inverse (ADN polymérase ARN dépendante) (GoScript[™] Reverse Transcriptase) sont rajoutées pour permettre l'élongation de l'ADNc pendant 5 min puis une heure à 42°C. L'ADNc est conservé à -20°C après inactivation de la transcriptase inverse à 85°C pendant 15 min.

d) qRT-PCR (Quantitative real Time Polymerase chain reaction)

Polymérase Chain Reaction (PCR) quantitative en temps réel:

La PCR est réalisée sur Lightcycler 480 (Roche) par la technique dite du SYBRGreen (Qiagen). Le SYBRGreen est un agent intercalant qui émet une fluorescence verte (550nm) lorsqu'il est incorporé à de l'ADN double brin. La PCR est réalisé au moyen d'une Taq polymérase contenue dans le mix de Qiagen. La réaction se fait dans 10µL. La PCR se déroule en 3 étapes sur 35 cycles: i) une étape de dénaturation à 95°C (5 minutes), ii) une étape d'amplification avec des cycles d'hybridation des amorces et élongation à 60°C puis dénaturation à 95°C iii) une dernière étape permettant de vérifier la spécificité des amplicons obtenus par une courbe de fusion où l'on mesure la fluorescence liée aux amplicons en augmentant progressivement la température du milieu réactionnel de 60°C à 95°C et nous permettant de déterminer le point de fusion du l'amplicon obtenu. L'expression des gènes suivants a été analysée avec des amorces commerciales spécifiques (QuantiTect, Qiagen) en

comparaison avec le gène de référence *PBGD*: *HIF1A*, *EPAS1*, *SLC2A1*, *VEGFA*, *EGFR*, *HER2*, *HER3*, *MET*.

Quantification relative par la méthode des deltas de delta Ct:

La quantification de l'amplification des gènes se fait avec la méthode de comparaison des Ct (cycle threshold).

Pour un nombre de cycles de la réaction d'amplification, on a un nombre n de copies de chaque gène tel que: $n = n_0^{(1+e)^n}$ où e est l'efficacité d'amplification et n_0 le nombre de copie de l'ARNm cible pour une efficacité de 100%, $e = 1$ et donc $n = n_0^{2^n}$.

- Au nombre de cycle $n = Ct$, on compare n_0 (gène cible) et n_0 (gène référence) pour définir le nombre absolu de copies : $n_0(\text{cible})/n_0(\text{référence}) = 2^{-[Ct(\text{cible}) - Ct(\text{référence})]} = 2^{-\delta Ct}$

- Pour comparer le nombre de copies dans l'ADNc (échantillon) à un ADNc(contrôle), on calcule le ratio :

$$[n_0(\text{cible})/n_0(\text{contrôle})]_{\text{éch}} / [n_0(\text{cible})/n_0(\text{cont.})]_{\text{cont}} = 2^{-\delta Ct(\text{éch})} / 2^{-\delta Ct(\text{cont})} = 2^{-\delta\delta Ct}$$

Ce calcul permet de déterminer les différents niveaux d'expression de l'ARNm.

e) Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le test de Student, ou le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les différences observées sont considérées comme étant statistiquement significatives quand $p \leq 0,05$.

PARTIE IV : RESULTATS

**Chapitre I : Double ciblage pharmacologique de l'axe
EGFR/mTOR/HIF-1 par la rapamycine et le cetuximab : analyse *in
vitro* et *in vivo*.**

I) Caractérisation des lignées cellulaires :

a) Statut mutationnel :

Les mécanismes de résistance à l'inhibition de l'EGFR peuvent être en partie expliqués par des mutations de protéines intervenant notamment dans les voies oncogéniques. Pour définir les modèles cellulaires sur lesquels nous travaillons, et en collaboration avec le laboratoire de biologie moléculaire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, nous avons analysé les lignées SQ20B et CAL27 et recherché, par séquençage NGS (New Generation Sequencing), les mutations dépistées en routine dans d'autres cancers à savoir celles affectant K-RAS (codons 12 et 13 de l'exon 2), EGFR (exons 18-21) et BRAF (V600E). Nous avons complété ces résultats avec les données de la littérature (ATCC) pour les mutations de PI3KCA, et de p53.

Tableau 7: Statut mutationnel des lignées CAL27 et SQ20B

	SQ20B	CAL27
K-Ras (codons 12-13 exon 2)	Sauvage	Sauvage
EGFR (18-21)	Sauvage	Sauvage
B-Raf (V600E)	Sauvage	Sauvage
PI3KCA (1 ;2 ;9 ;20)	Sauvage	Sauvage
p53	Mutée (exon 5)	Mutée (exon 6 A578T)
Mutations activatrices, amplifications	EGFR (amplification) ¹⁵⁴	non
HPV (p16 + PCR HPV)	Négative	Négative

Les lignées SQ20B et CAL27 sont des lignées HPV négatives. Toutes nos lignées sont indemnes des mutations traditionnellement associées à la résistance aux anti-EGFR, à savoir les mutations de l'EGFR, de K-Ras, B-Raf, ou PI3KCA^{155,156}. Enfin, une amplification et surexpression de l'EGFR ont été décrites dans la lignée SQ20B¹⁵⁴.

Nous avons ensuite analysé le phénotype cellulaire de nos deux lignées cultivées en hypoxie et leur radiosensibilité. Chacune des lignées a été cultivée dans des conditions de normoxie (20% O₂) et d'hypoxie (3% et 1% O₂ durant 24h).

b) Expression de HIF-1 α et activation des voies oncogéniques en fonction de l'hypoxie :

Dans un 1^{er} temps, nous avons mesuré l'effet de l'hypoxie sur l'expression de la protéine HIF-1 α , dont l'accumulation est associée à la résistance aux rayonnements ionisants. Pour cela, nous avons analysé l'expression de HIF-1 α par western blot, et quantifié cette expression avec le logiciel ImageJ®.

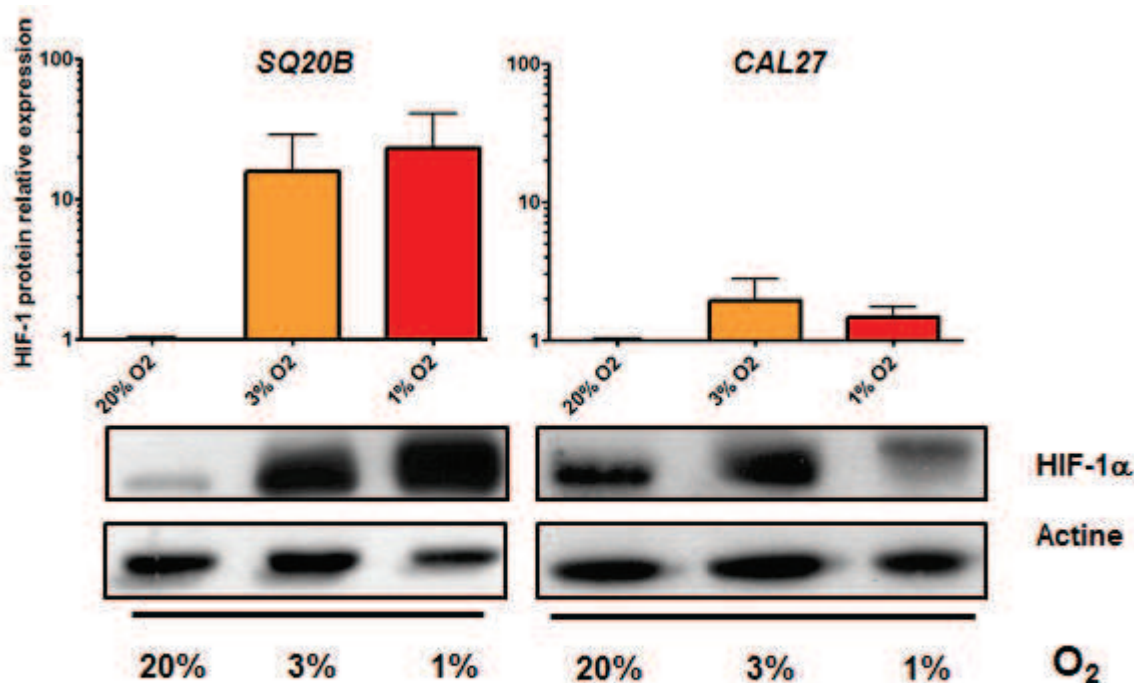


Figure 23: Adaptation à l'hypoxie des lignées SQ20B et CAL27: SQ20B et CAL27 accumulent HIF-1 dans les conditions d'hypoxie. A noter un gradient d'accumulation dans la lignée SQ20B, alors qu'on observe une diminution de celle-ci à 1% pour CAL27. L'induction de HIF-1 dans la lignée SQ20B est beaucoup plus importante que pour CAL27.

De manière attendue, l'hypoxie induit une accumulation de la sous-unité HIF-1 α , dans les lignées SQ20B et CAL27. Cependant, cette accumulation varie selon la lignée et les pressions en O₂. Dans la lignée SQ20B, l'expression de HIF-1 α est d'autant plus importante que l'hypoxie est prononcée (3% vs 1%), alors que pour la lignée CAL27, l'accumulation de HIF-1 est plus importante à 1% qu'à 3% O₂. De plus, l'augmentation d'expression protéique n'est pas du même ordre de grandeur dans les deux lignées. Pour la lignée SQ20B, l'augmentation de HIF-1 α est de l'ordre de 10 fois par rapport à son expression en normoxie, alors que pour la lignée CAL27, elle est d'un peu moins du double.

Ensuite nous avons analysé l'état de phosphorylation des protéines impliqués dans les voies de signalisation oncogéniques agissant en aval de l'EGFR. De la même manière que pour la quantification de HIF-1 α , nous avons quantifié l'expression des protéines ERK (intervenant dans la voie des MPAK), AKT (intervenant dans la voie PI3K/AKT), ainsi que leurs formes phosphorylées. Pour comparer l'état d'activation de ces protéines, nous avons

calculé le ratio forme phosphorylée/forme totale. Nous avons aussi analysé l'expression de PS6RP, une protéine qui agit en aval de mTOR.

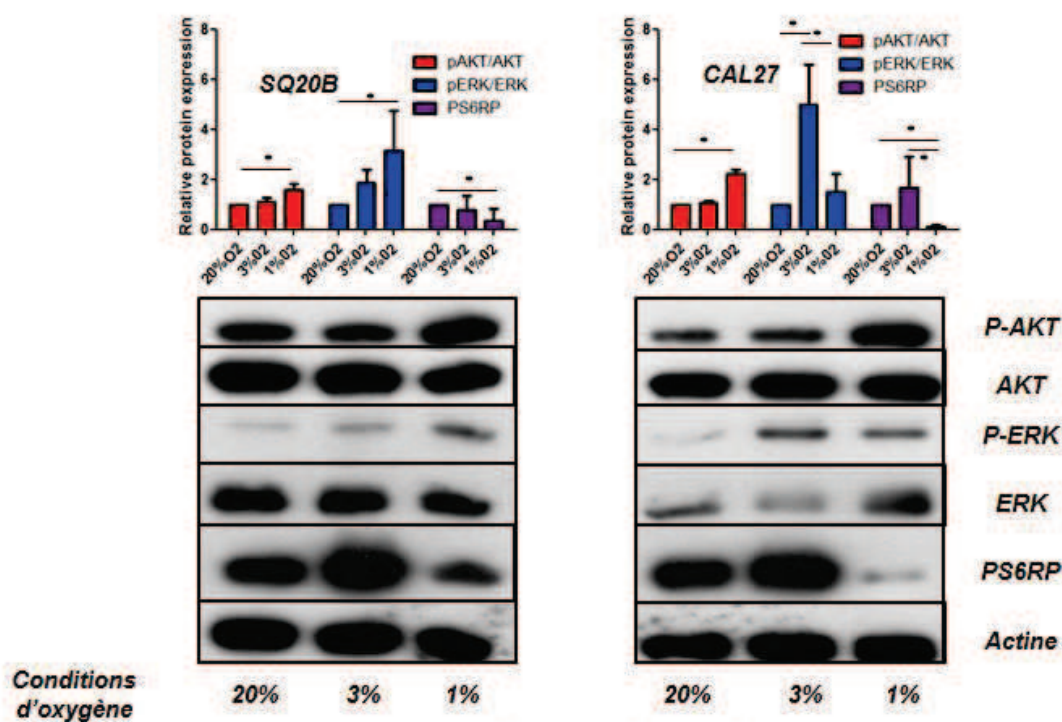


Figure 24: Activation basale de ERK, AKT et PS6RP dans les conditions de normoxie et d'hypoxie (SQ20B, CAL27). L'hypoxie induit une activation des voies de signalisation. Cette activation est dépendante des pressions en oxygène. A noter l'activation moins importante pour CAL27 à 1% en oxygène. Nous avons vu précédemment qu'à 1% O₂, l'accumulation de HIF-1 est moins importante qu'à 3% O₂.

L'analyse des trois expériences indépendantes montre une augmentation du ratio Phospho-AKT/AKT total, et du ratio Phospho-ERK/ERK total, de manière parallèle à l'accumulation de HIF-1 α , suggérant une activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK induite par l'hypoxie dans les lignées SQ20B et CAL27. De manière similaire à l'accumulation de HIF-1, l'activation des voies oncogénique est statistiquement plus importante dans la lignée SQ20B à 1% en O₂ qu'à 3% en O₂. Pour la lignée CAL27, l'activation de la voie des MAPK est plus importante à 3% en O₂ qu'à 1% en O₂. En revanche, l'activation de la voie PI3K/AKT est très faible voire quasi nulle à 3% en O₂, et doublée en hypoxie profonde à 1% en O₂. Cette activation conjointe des voies de signalisation et de HIF-1 en hypoxie dans la cellule cancéreuse est conforme à ce qui est décrit dans la littérature¹⁵⁷.

Enfin, l'hypoxie profonde se caractérise, dans chacune des deux lignées, par une diminution importante de l'expression de PS6RP par rapport aux conditions de normoxie et d'hypoxie à 3% en O₂.

Ces résultats sont conformes à ce qui est décrit dans la littérature. L'hypoxie stabilise HIF-1 α et permet son accumulation, et induit l'activation des voies oncogéniques¹⁵⁸.

c) Capacité de survie aux rayonnements ionisants :

Pour définir nos modèles cellulaires de résistance et de sensibilité aux rayonnements ionisants, nous avons analysé par un test de survie clonogénique leur capacité de survie à des doses de rayonnements ionisants croissants. Les cellules SQ20B et CAL27 ont été irradiées avec des doses de rayonnement de 0, 2, 4, 6, 8 grays dans les conditions de normoxie. Cette expérience nous a permis de calculer la SF 2Gy (Survival Fraction à 2 Gy) pour chacune des lignées. La SF 2Gy est propre à chaque lignée cellulaire et permet de comparer leur comportement en réponse aux rayonnements ionisants. SQ20B est décrite comme une lignée radiorésistante de référence, alors que CAL27 serait plus sensible aux rayonnements ionisants.

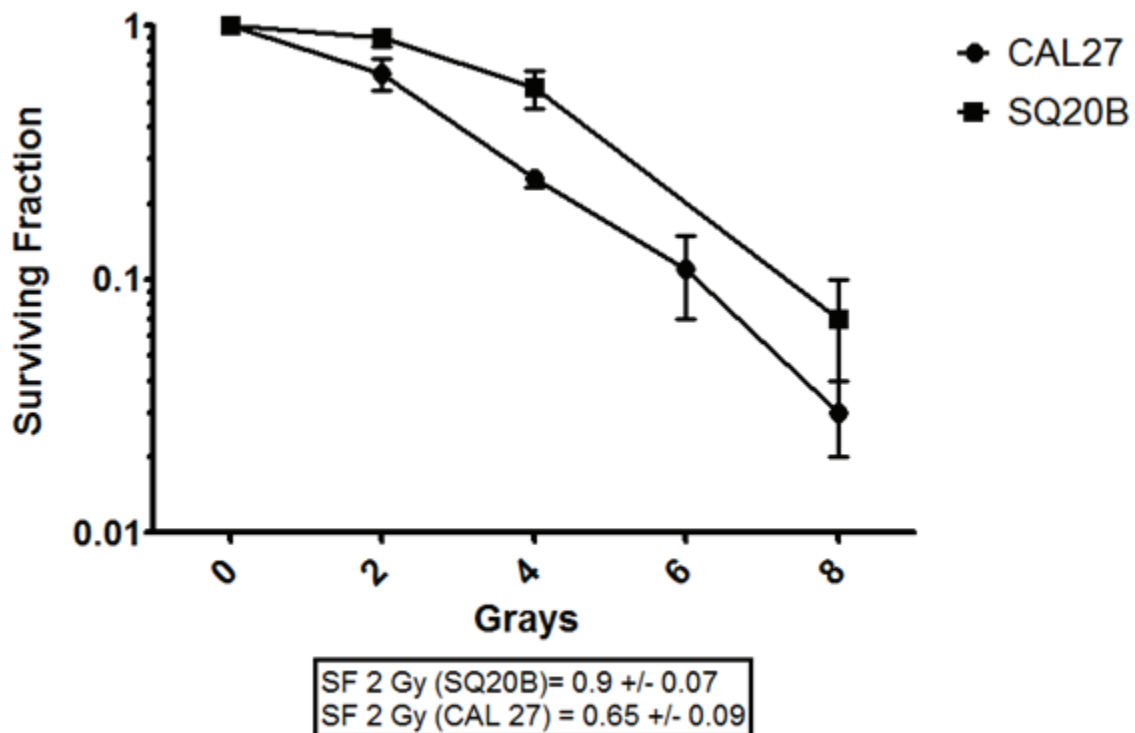


Figure 25: Test de survie clonogénique pour les lignées SQ20B et CAL27. La lignée SQ20B est notre lignée radiorésistante de référence, sa SF2Gy calculée est de 0,9 (+/-0,07), et de 0,65 (+/-0,09) pour CAL27, notre lignée radiosensible.

Nos résultats confirment les données de la littérature. La lignée SQ20B significativement plus résistante à l'irradiation (SF 2Gy = 0.9) que CAL27 (SF 2Gy = 0.65). La confirmation des niveaux de sensibilité aux rayonnements ionisants était essentielle avant l'initiation de notre étude dans la mesure où la culture cellulaire *in vitro* peut faire évoluer différemment les propriétés des lignées tumorales entre les laboratoires, en particulier lorsque ces lignées

sont génétiquement instables (mutations p53, perte d'activité des gènes de réparation de l'ADN ...).

d) Efficacité du Cetuximab:

Effets sur la stimulation par l'EGF :

Le Cetuximab est un anticorps monoclonal bloquant le récepteur à l'EGFR. Ce blocage empêche la liaison du ligand au récepteur. Nous avons voulu savoir si dans notre modèle, le cetuximab empêche cette liaison. Ce travail a été réalisé sur les deux lignées cellulaires dans des conditions de culture normoxiques. Compte tenu des données de la littérature, nous avons plus spécifiquement étudié la localisation de l'EGFR par immunofluorescence, avant et après stimulation par l'EGF, avec ou sans pré-traitement par du cetuximab, et ce en normoxie. Les cellules ont été traitées comme suit :

- i) témoin négatif : absence de stimulation à l'EGF, ou de traitement au cetuximab
- ii) témoin positif : stimulation par l'EGF (50ng/mL) durant 1h ;
- iii) traitement par cetuximab (2,5µg/mL soit 20nM) durant 8h ;
- iv) traitement par cetuximab durant 8h et stimulation par l'EGF la dernière heure ;

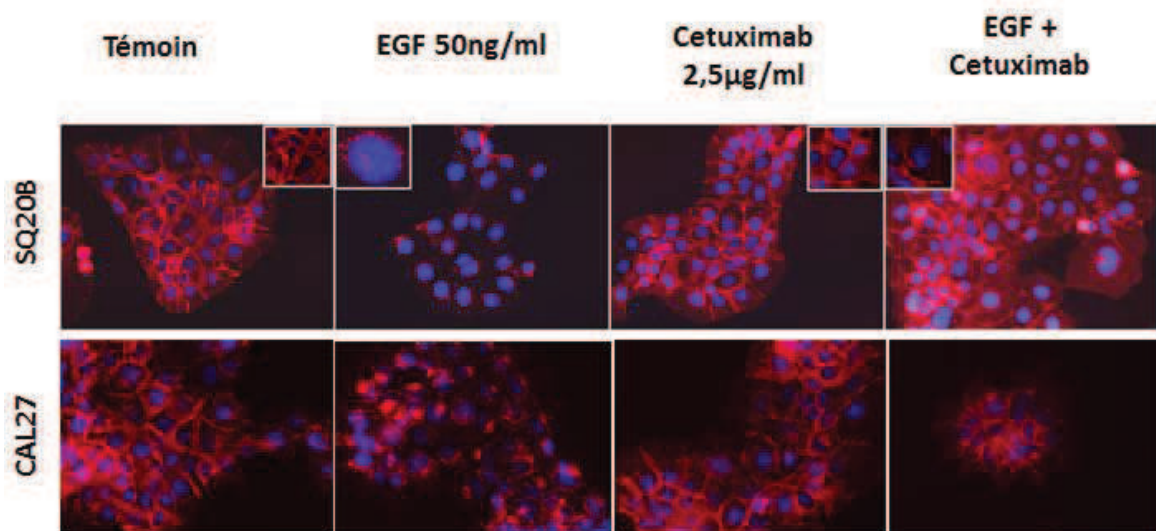


Figure 26: Effet du Cetuximab sur la liaison de l'EGF à son récepteur sur la lignée SQ20B et CAL27. Analyse par immunofluorescence de la localisation du récepteur à l'EGF (EGFR) (en rouge) par rapport au noyau colorés au DAPI (bleu). La stimulation du récepteur par l'EGF induit une internalisation de l'EGFR. L'ajout du Cetuximab semble limiter l'action de l'EGF.

Pour les deux lignées cellulaires, en l'absence de tout traitement, le marquage de l'EGFR est fort au niveau des membranes cellulaires. Conformément aux données déjà publiées, la stimulation par l'EGF induit une relocalisation du récepteur qui disparaît quasi totalement des membranes cytoplasmiques et se retrouve localisé dans des vésicules d'internalisation principalement autour du noyau des cellules. Lorsque les cellules sont traitées au cetuximab seul pendant 8h, le marquage membranaire de l'EGFR est maintenu, suggérant que l'anticorps ne modifie pas la localisation du récepteur en l'absence de son ligand. En revanche, après stimulation par l'EGF des cellules pré-traitées par le cetuximab, la formation de vésicules d'internalisation est très largement inhibée et suggère que l'anticorps a bien inhibé la liaison du ligand à son récepteur.

Effets sur la prolifération :

La figure supplémentaire 3 du manuscrit (détaillée dans le paragraphe suivant) montre les effets du cetuximab sur la prolifération des lignées CAL27 et SQ20B. La lignée CAL27 est sensible au cetuximab, alors que le cetuximab n'induit pas d'inhibition de prolifération des cellules SQ20B. Les résultats obtenus dans le paragraphe précédent, par stimulation avec de l'EGF, ne permettent pas de conclure quant à l'effet du cetuximab sur la signalisation induite en aval de l'EGFR, mais ils démontrent clairement que pour les cellules SQ20B, l'absence de liaison de l'EGF à son récepteur est insuffisante pour inhiber la prolifération cellulaire. Ils permettent aussi de constater l'efficacité de l'anticorps pour bloquer la fraction du ligand avec lequel il est en compétition.

II) Radiosensibilisation par inhibition de l'axe EGFR/mTOR/HIF-1

Etant donné la forte induction de HIF-1 α dans la lignée SQ20B associé à un profil de résistance aux rayonnements ionisants et au cetuximab, nous avons émis l'hypothèse qu'une inhibition plus en aval des voies de signalisation, au niveau de mTOR, permettrait de diminuer l'accumulation de HIF-1 α , et de limiter les conséquences d'une activation des voies de signalisation en amont. *In fine*, cette diminution de HIF-1 limiterait les mécanismes de résistances auquel il est associé.

La rapamycine a donc été utilisée associée au Cetuximab afin d'inhiber l'axe EGFR/mTOR/HIF-1 α . Cette combinaison a été testée *in vitro* et *in vivo* sur des xénogreffes de lignées tumorales chez la souris nude. Après avoir déterminé les doses efficaces de notre combinaison, nous avons montré que l'ajout de la rapamycine permettait de sensibiliser nos

lignées tumorales au cetuximab et aux rayonnements ionisant. Néanmoins, nous avons observé une induction de l'expression de HIF-2 consécutive au traitement. Les conditions expérimentales dans laquelle cette induction était la plus importante étaient celles où les traitements associaient le cetuximab et l'irradiation. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un manuscrit intitulé "HIF-2 addiction and tumour relapse induced by EGFR inhibition and radiotherapy in Head and Neck Cancer", et présenté ci-dessous.

HIF-2 addiction and tumour relapse induced by EGFR inhibition and radiotherapy in Head and Neck Cancer

Pierre Coliat^{1,2,4}, Ludivine Ramolu^{1,4}, Alain C. Jung^{1,4,£}, Erwan Pencreach^{3,4,£}

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

2. Service de Pharmacie, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, Strasbourg, France

3. Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

4. EA3430 de l'Université de Strasbourg, France

£ These authors contributed equally to this work

Running title: Therapy-induced HIF-2 addiction in HNSCC

Key Words: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; anti-EGFR targeted therapy; Resistance; HIF-2 α

Financial support: This work was financially supported by the French Académie de Pharmacie/SFPO, the Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est de la Ligue Contre le Cancer, and Merck/Serono (Bourse oncologie).

Conflict of interest disclosure: The authors have no potential conflict of interest to disclose. The sponsors did not play a role in the design of the study, the acquisition of the data or its interpretation, or the manuscript preparation.

Correspondence to: Dr. Alain Jung, Laboratoire de Biologie Tumorale, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Paul Strauss, 3 Rue de la Porte de l'Hôpital, F. 67000 Strasbourg, France (Tel : +33 3 88 25 24 43 ; email : AJung@strasbourg.unicancer.fr); or Dr. Erwan Pencreach, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, 3 Avenue Molière, F. 67200 Strasbourg, France (Tel: +33 3 88 12 75 37; email : erwan.pencreach@chru-strasbourg.fr)

Abstract

Promising results were obtained with anti-EGFR antibodies and concomitant radiation therapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), but resistance rapidly emerges in most patients despite infrequent RAS genes mutations. Since Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) has been associated with treatment failure and tumor progression, we hypothesized that combination of cetuximab with rapamycin could radiosensitize HNSCC via efficient EGFR/mTOR/HIF-1 axis inhibition. We xenografted the cetuximab-sensitive (CAL27) and cetuximab-resistant (SQ20B) cell lines to nude mice, and evaluated the impact on HIF-1 expression, as well as the anti-tumor effect, of cetuximab and rapamycin, alone or in combination with radiation therapy. DNA double-strand breaks accumulation, clonogenic survival, and EGFR/mTOR axis signaling were evaluated *in vitro*. Whereas rapamycin sensitized HNSCC resistant cells to EGFR-targeted treatment, concomitant delivery of radiation therapy to SQ20B bearing mice shortened the time to tumor progression and increased tumor relapse frequency, despite efficient HIF-1 inhibition. *In vitro*, increased DNA double strand breaks observed with cetuximab/rapamycin treatment combined with γ -ray irradiation did not correlate with reduced clonogenic survival fraction. Treatment failure was associated with a synergistic induction of HIF-2 expression by cetuximab and radiotherapy independent of HIF-1 inhibition, and clonogenic survival dropped <1% after HIF-2 silencing, suggesting a therapeutic-induced mechanism of oncogenic addiction. Similar results were observed with EGFR tyrosine kinase inhibitors (erlotinib, canertinib) in HNSCC and colon cancer cell lines. Our data suggest that resistance to EGFR inhibition may result from HIF-2 accumulation in tumors and underline the urgent need to develop novel HIF-2 targeted treatments.

Introduction

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a transmembrane tyrosine kinase receptor that activates multiple downstream pathways as a homo- or heterodimer with other members of the ErbB/HER family, regulating cell survival, proliferation or migration [1]. The overexpression of EGFR in a majority of HNSCC lesions (>90%) correlates with adverse prognosis and was used as a rationale to evaluate the effect of EGFR-targeted therapies [2]. However, more than 10 years after FDA approval of the use of Cetuximab, an anti-EGFR monoclonal antibody, alone or in combination with either radiotherapy or chemotherapy, HNSCC patient outcome was only moderately improved [3]. The molecular mechanisms that drive head and neck tumor resistance to EGFR-targeted therapies are poorly understood (for review see [4]). Mutations that stimulate the EGFR signaling pathway (mutations of the EGFR tyrosine kinase domain; expression of the EGFR variant III; *RAS* gene mutations) are infrequent in HNSCC [5]. In contrast, hypoxia, a common feature of the microenvironment in HNSCC [6], and Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) has been associated with resistance to chemo- and radiotherapy and poorer outcome [7, 8]. Hypoxia-related radioresistance has been acknowledged for decades but the specific role of HIF-1, independently of oxygen tension, was only recently demonstrated [9], suggesting HIF-1 inhibition as a promising strategy to radiosensitize tumor cells. While hypoxia is the primary stimulus for HIF-1 upregulation, the constitutive activation of the EGFR/mTOR axis in a majority of lesions contributes to the increased HIF-1 α subunit expression through translational regulation [10], and represents a candidate druggable target in HNSCC.

Here we have evaluated the interest of inhibiting the EGFR/mTOR axis to radiosensitize head and neck cancer cells based on combining the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab and the mTOR inhibitor rapamycin. We first analyzed the effect of drug combination alone *in vivo* in two xenografted models, *i.e.* the cetuximab- and radiosensitive CAL27 cells and the cetuximab- and radioresistant SQ20B cells. As expected, mTOR inhibition correlated with efficient inhibition of HIF-1 α and significantly improved the antitumor effect of cetuximab in SQ20B cells. Surprisingly, addition of radiotherapy to EGFR-targeted treatment accelerated tumor relapse in SQ20B tumors. We then demonstrated *in vitro* that despite increased DNA double strand breaks generation upon EGFR/mTOR axis inhibition, a significant clonogenic survival fraction correlated with HIF-2 expression induced by EGFR inhibition and ionizing radiation, independently of HIF-1 inhibition. Finally, a ~100% inhibition of clonogenic survival upon cetuximab and radiotherapy treatment was achieved after HIF-2 silencing, suggesting an induced oncogenic addiction responsible for tumor escape and accelerated relapse *in vivo*. These findings were

confirmed in different colon cancer cell lines and with two different tyrosine kinase inhibitors targeting the EGFR, highlighting a potential general mechanism of resistance to EGFR-targeted therapies.

Materials and Methods

HNSCC cell lines treatments and proliferation assay

Human Head and Neck Carcinoma SQ20B, CAL27 and SW480 cell lines were maintained at 37°C in normoxic (21% O₂, 5% CO₂) or hypoxic (94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂) conditions in DMEM (1 g/L glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum. SQ20B cells were a kind gift of Dr Pierre Bischoff; CAL27 cells were a kind gift of Dr Sophie Pinel; SW480 were obtained from the ATCC in December 2014. SQ20B and CAL27 cell lines authentication and/or absence of cross-contamination were last performed by DNA (STR) profiling (16 loci) on genomic DNA in June 2014. Cells were treated during exponential growth conditions (70% confluence). 3.10³ cells per well were seeded in 96-well flat-bottomed plates and incubated for 48h with cetuximab (0.25 to 50 µg/ml), rapamycin (0.1 to 500 nM), or a combination of both drugs (5nM rapamycin and 0.25 to 50 µg/ml Cetuximab). For irradiation experiments, cells were plated 24 to 48 hours prior to irradiation, and a single 2 Gy γ -ray irradiation dose was delivered with a ¹³⁷Cs γ -irradiator (Biobeam 8000 irradiator, Gamma Service Medical, Leipzig, Germany) on the Centre Paul Strauss irradiation facility. Cell proliferation was measured using a Sulforhodamine B proliferation assay (Sigma Aldrich, Lyon, France) and coloration was quantified using a Synergy HT[®] Biotek plate reader according to the manufacturer's instructions.

Animals and tumor 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 under the supervision of authorized investigators. CAL27 and SQ20 xenografts were obtained by injecting cell suspensions subcutaneously into the flank of mice. Treatment was delivered by intraperitoneal injections (i.p) when tumors reached an average volume of 150-200mm³ and mice were randomized into 4 groups: control (non-treated mice); cetuximab (1mg every 3

days); rapamycin (3 mg/kg every 5 days); combination of cetuximab and rapamycin at the same doses and according to the same schedule (Figure 1A). The treatment was continued for 4 weeks (two cycles of treatment) or 2 weeks (one cycle of treatment). Mice were observed daily for tumor growth, the mean tumor volume (MTV) was measured every 3 days and the relative tumor volume (RTV) was calculated for each group of treatment. Tumor irradiation was carried out by protecting mice with lead shield and exposing xenografts only to ionizing radiation on the Centre Paul Strauss irradiation facility, using a ¹³⁷Cs γ -Biobeam 8000 irradiator (Gamma Service Medical, Leipzig, Germany). Three doses of 2 Gy (Gray) were delivered on day 11, 13 and 15. When cetuximab +/- rapamycin treatment was combined to radiation therapy, irradiation was performed 2 days after the fourth injection of cetuximab.

Histologic and immunohistochemical studies

One tumor was harvested in each group at midcourse and after completion of the treatment. Tissue fragments were either fixed with a zinc fixative solution and embedded in paraffin for immunohistochemical (IHC) analysis, or rapidly frozen on dry ice, and stored at -80°C . For conventional histology, 4 μm paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin-eosin. For IHC staining of pan-cytokeratin, slides from formalin-fixed paraffin-embedded xenografts were stained with a primary rabbit anti-pan-cytokeratin polyclonal antibody (1/100; Invitrogen) and a secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1/500; Roche Molecular Biochemicals). Signal detection was carried out with a DAB substrate kit (Roche diagnostics), according to the manufacturer's instructions.

Small interfering RNA transient transfection

Validated stealth small interfering RNAs (FlexiTube GeneSolution, which are a gene-specific package of 4 siRNAs; Qiagen) targeting HIF-1 α and HIF-2 α were used alone or in combination for each target gene. Cells were transfected using Lipofectamine RNAiMAX, according to the manufacturer's instructions. 3×10^5 cells were incubated with siRNAs, either alone or in combination, and total protein and RNA extractions were carried out 48h after transfection.

Clonogenic survival assay

Cells were diluted and seeded 24h after irradiation (i.e, 48h after cetuximab +/- rapamycin treatment; see Figure 4A for treatment schedule) and incubated in normoxic conditions for

up to 2 weeks after irradiation. Clones were stained with crystal violet 0,05% (Sigma Aldrich, Lyon, France) in a 5% ethanol solution, and positive colonies (>64 cells) were counted. The surviving fraction at 2 Gy (SF 2 Gy) was calculated by dividing the number of positive colonies by the number of cells that were seeded, multiplied by the plating efficiency. The plating efficiency was calculated by dividing the number of positive colonies that grew in the absence of irradiation divided by the number of cells that were seeded.

Immunofluorescence staining of γ H2AX, HIF-1, HIF-2, CA9.

Immunofluorescence staining experiments were performed both on 4 μ m tissue sections from paraffin embedded xenografts and Labtek® chamber slides. Paraffin embedded sections or Labtek® Slides were stained with anti- γ H2AX (1/500e; Clone JBW301 Millipore), anti-HIF-1 α (1/75e; Novus Biologicals), anti-HIF-2 α (1/500; Abcam), and anti-CA9 (1/500e; Abcam) antibodies. Nuclei were stained with a DAPI solution (1/30000) and slides were mounted with Aqua Polymount (Polysciences Inc.) Fluorescence images were captured using a fluorescence microscope axioimager Z2 (Zeiss Industries). All images were acquired using the same variables (exposure time, contrast, and brightness), and were further uniformly processed with Adobe Photoshop software (Adobe Systems) in order to improve the contrast. γ H2AX and HIF-2 α signal quantification was performed by using the ImageJ software.

Western Blot analysis

Total protein extraction was carried out by homogenizing 10⁶ cells in 200 μ L lysis buffer [10 mmol/l Tris (pH 7.5), 5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l NaCl, 0.5% NP-40, protease and phosphatase inhibitors, Sigma]. 20 μ g of total proteins were resolved by SDS-PAGE according to standard methods. Proteins were detected with anti-HIF-1 α (1/500e; BD Biosciences), polyclonal anti- α / β -tubulin (1/2000; Cell Signaling), polyclonal anti-actin (1/20000; Santa Cruz Biotech), and anti-phospho-S6 ribosomal protein (1/1000; Cell Signaling).

Immunoprecipitation

500 μ g of nuclear protein extracts were diluted to a final volume of 1ml with IP buffer (150 mM NaCl, 50mM TrisHCl [pH 8], 1% NP40, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche ref 11697498001) and incubated with a mouse anti-HIF1 β antibody (Abcam 2771).

Immunoprecipitation was carried out by using protein G-agarose beads. Immunoprecipitated proteins were resuspended in Laemmli buffer after standard centrifugation, and quantified by Western Blot analysis with rabbit anti-HIF2 α analysis (1/500, Abcam).

Statistical analysis

Data analysis of results was performed from at least three independent experiments with GraphPad Prism software version 5.2. Differences between groups (tumor size, proliferation, clonogenic survival fraction, protein expression levels) were considered statistically significant for p values <0.05 (one-side Wilcoxon test).

Results

EGFR/mTOR axis inhibition efficiently reduces HNSCC tumor burden in a Cetuximab-resistant xenograft model

In order to assess the efficacy of the combination of the monoclonal anti-EGFR antibody cetuximab and the rapamycin mTOR inhibitor in controlling tumor growth, we established HNSCC heterotopic xenograft models of the cetuximab-sensitive CAL27 and cetuximab-resistant SQ20B cell lines (Fig. 1A). Rapamycin administration resulted in RTV stabilization but rapid tumor regrowth was observed after the end of treatment in both cell line models (Fig. 1B). These macroscopic results were fully consistent with the observation of remaining carcinoma cells labelled with standard Hematoxylin/Eosin staining (Supplementary Fig 1A) and pan-cytokeratin immunohistochemistry (Fig. 1C). Contrastingly, cetuximab alone induced long-term tumor shrinkage in the CAL27 xenograft model only, early in treatment (residual tissue dissected in the CAL27 tumor bed after treatment showed no remaining carcinoma cells (Supplementary Figure 1; Figure 1B-C)), whereas SQ20B tumors exhibited intermediate sensitivity to anti-EGFR therapy, with accelerated regrowth at the end of treatment (positively stained carcinoma cells remained after treatment completion; Supplementary Figure 1; Figure 1C). Strikingly, the addition of rapamycin significantly enhanced the efficacy of cetuximab in the SQ20B xenograft model, resulting in tumor shrinkage without relapse up to 6 months post-treatment (Figure 1B-C; Supplementary Figure 1). Impairment in HIF-1 α expression and HIF-1 target Carbonic Anhydrase IX (CAIX) was assessed using fluorescent immunohistochemistry. CAL27 xenografts from naïve or treated mice showed no positive HIF-1 α or CAIX staining, suggesting an absence of hypoxic regions in these tumors. However, carcinoma cells with nuclear HIF-1 α or membranous CAIX staining could be observed in SQ20B xenografts

harvested from non-treated mice. Administration of cetuximab alone was not found to have an impact on these expression patterns. Interestingly, treatment with rapamycin or with rapamycin and cetuximab resulted in a significant reduction of both HIF-1 α and CAIX staining (Supplementary Figure 2).

Radiation therapy combined with cetuximab accelerates tumor relapse in resistant SQ20B cells

As radiotherapy is a therapeutic gold standard for the management of locally advanced HNSCC, we hypothesized that drugs targeting both EGFR and mTOR could improve the sensitivity of HNSCC cell lines to ionizing radiation. Thus, mice bearing cetuximab-resistant radio-resistant SQ20B heterotypic xenografts were randomized in treatment groups and received fractionated radiotherapy (6 Gy, delivered in 3 daily doses) concomitantly delivered with one cycle of cetuximab alone (1mg/injection; q5d3) or in combination with rapamycin (1mg/injection, q5d3 and 3mg/kg, q3d5, respectively). Consistent with our previous observation, delivery of 1 cycle of cetuximab and rapamycin combination achieved 90% control rate of tumor regrowth (1 out of 10 tumor relapsed 45 days post-treatment; Table 1). Strikingly, the concomitant delivery of radiation therapy in this combination had an adverse effect, with accelerated relapse and reduced control rate (5 out of 8 tumors relapsed 15 days post-treatment; Table 1). All mice (10 out of 10 tumors; Table 1) treated with a combination of Cetuximab and radiotherapy - the FDA-approved therapy for locally advanced HNSCC - showed rapid tumor regrowth in this resistant model (3 days after the last irradiation).

Targeting the EGFR/mTor/HIF-1 α pathway partially increases the sensitivity of SQ20B cells to ionizing radiation.

In order to decipher the molecular bases of this treatment failure, the response of SQ20B cells to cetuximab, rapamycin and ionizing radiation was studied *in vitro* by using specific molecular read outs. The minimal efficient dose of rapamycin in cell proliferation inhibition was first measured on SQ20B cells grown in the presence of increasing concentrations of rapamycin, in normoxic (20% O₂) and hypoxic (1% O₂) conditions. Rapamycin treatment was found to efficiently inhibit cell proliferation; this effect reached a plateau at low concentrations (Supplementary Figure 3A, B). 5 nM rapamycin inhibited SQ20B cell proliferation (15% and 25% in normoxia and hypoxia respectively; Supplementary Figure 3A, B) and efficiently reduced HIF-1 α accumulation and S6 Ribosomal Protein (S6RP) phosphorylation. This concentration of rapamycin was retained for further experiments. Using a similar approach, we determined the minimal efficient dose of Cetuximab for SQ20B growth inhibition. The minimal concentration to achieve maximal antiproliferative

effect was 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of cetuximab (5% and 20% inhibition in normoxia and hypoxia, respectively; Supplementary Figure 3A, B), without affecting S6RP phosphorylation or Hif-1 α expression (Supplementary Figure 3C). The combination of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ cetuximab and 5 nM rapamycin improved the growth inhibition of SQ20B obtained with individual drugs to 25% (Supplementary Figure 3A, B), an effect found to be additive (Supplementary Table 1). Interestingly, we observed that the rapamycin-dependent inhibition of S6RP phosphorylation and Hif-1 α expression was increased by the addition of cetuximab.

We then evaluated the radiosensitizing effect of the drug combination. Cells were cultured with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ Cetuximab, 5 nM rapamycin, and exposed to 2 Gy of γ -rays, delivered in one dose. The mean percentage of living cells from 4 independent experiments was counted. The association of cetuximab and rapamycin had no significant effect on clonogenic survival of SQ20B cells (Figure 2A). Consistent with the fact that SQ20B cells have been reported to be radioresistant, no significant decrease of their clonogenic survival was observed upon irradiation (Figure 2A). However, a ~40% drop in survival of SQ20B cells was observed after treating cells with both irradiation and the rapamycin/cetuximab combination (one-side Wilcoxon test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; Figure 2A). These observations suggest that co-treatment of SQ20B cells with rapamycin and cetuximab increases their sensitivity to ionizing radiation to certain extents *in vitro*.

To further investigate this effect at a molecular level, SQ20B cells were labeled with an anti- γH2AX antibody in order to measure the induction of treatment-dependent DNA double strand breaks (DSBs; Figure 2B)). The number of induced γH2AX -positive foci were counted in all experimental conditions, normalized to the number of nuclei labeled with DAPI and the mean value from 2 independent experiments was plotted for each treatment category (Figure 2C). A single dose of 2 Gy delivered alone or with chemotherapy resulted in an important and significant increase of the number of DSBs. Generation of DSBs was significantly higher when cells were exposed to cetuximab, rapamycin and ionizing radiation, as compared to irradiation alone and correlated with reduced clonogenic survival fraction.

EGFR inhibition and ionizing radiation induce Hif-2 α expression.

Although the combination of cetuximab and rapamycin treatment with radiation therapy was relatively efficient *in vitro*, it failed to fully eliminate carcinoma cells: i) 50% of SQ20B cells retained clonogenic survival abilities after having received chemoradiation (Figure 2A); ii) more frequent tumor relapses were observed in nude mice bearing SQ20B xenografts and treated with chemoradiation compared to mice treated with chemotherapy alone (Table 1). We hypothesized that Hif-1 α inhibition obtained after cetuximab and

rapamycin exposure could functionally be circumvented by Hif-2 α induction. Hif-2 α expression was therefore monitored at the RNA and protein levels in the same treatment conditions. We observed that ionizing radiation alone and cetuximab induced a 3- to 4-fold increase of *Hif-2 α* mRNA (data not shown). Immunofluorescent analysis of Hif-2 α expression in SQ20B cells was performed (Figure 3A), and HIF-2 α -related signal was measured, normalized to the number of nuclei labeled with DAPI. The mean value from 2 independent experiments was measured for each treatment category (Figure 3B). SQ20B cells grown in the presence of cetuximab showed a striking induction of Hif-2 α . This effect was further increased by exposing cells to ionizing radiation. Interestingly, incubation of cells with rapamycin impaired HIF-2 α expression to certain extents. These observations were further validated by immunoprecipitation of whole SQ20B cell protein extracts with an anti-HIF β antibody. Purified proteins were resolved by SDS-PAGE and membranes were probed with an anti-HIF-2 α antibody or an anti-HIF- β antibody (control). The protein input was evaluated by resolving whole protein extracts by SDS-PAGE and membranes. Non-immunoprecipitated proteins were loaded as a negative control. (Figure 3C). We hypothesized the induction of HIF-2 α upon EGFR-targeted inhibition could be a more general mechanism. We therefore measured HIF-2 α protein expression after exposure of HNSCC (SQ20B) and microsatellite-stable colon cancer (SW480) cell lines to reversible (erlotinib) and irreversible (canertinib) EGFR tyrosine kinase inhibitors. Interestingly, both molecules were able to induce a significant and transient accumulation of HIF-2 α after treatment initiation (Supplementary Figure 5).

Hif-2 addiction induced by EGFR inhibition and ionizing radiation is involved in SQ20B cell resistance to treatment

To functionally evaluate the impact of Hif-2 α expression upon EGFR inhibition +/- irradiation, specific siRNAs targeting Hif-1 α and/or Hif-2 α were transfected to SQ20B cells (Supplementary Figure 5A, B), and cell clonogenic survival was assessed (Figure 4A). The mean percentage of living cells counted from 3 independent experiments are plotted, and a one-side Wilcoxon test was used to compare cell treated with cetuximab, rapamycin et irradiation to other groups (Figure 4B, C). The siRNA-mediated inhibition of Hif-1 α was used to mimic the effect of cetuximab and rapamycin combination as previously described. Irradiation was delivered as a single dose of 2 Gy. Neither the scramble siRNAs, nor the Hif-2 α siRNA impacted the clonogenic survival of SQ20B cells. However, Hif-1 α silencing induced a significant decrease of SQ20B clonogenic survival, an effect not enhanced by simultaneous siRNA-mediated inhibition of Hif-1 α and Hif-2 α . However, a major decrease in SQ20B clonogenic survival was achieved when cells were treated with

cetuximab/rapamycin combination after Hif-2 α silencing. The outcome was further improved by ionizing radiation, with a dramatic drop of clonogenic survival, below 0,5% (p < 0,05).

Discussion

Several molecular mechanisms have been proposed as responsible for resistance to cetuximab in HNSCC. Upstream mechanisms such as the overexpression of EGFR ligands Heparin-Bound-EGF (HB-EGF), amphiregulin and Transforming-Growth Factor α (TGF α) have been shown to trigger cell lines and xenograft resistance [11-13]. Also, overexpression of amphiregulin was found to correlate with adverse prognosis in HNSCC patients treated with a cetuximab-docetaxel regimen [14]. Similarly, downstream signalling pathways, like the RAS/MAPK and PI3K/Akt pathways, may be responsible for anti-EGFR treatment resistance. Despite infrequent mutations in the RAS gene family compared to colon cancer, activating *H-Ras* mutations have been reported in some HNSCC patients (for review, see [5]). The downregulation of *H-Ras* in the cetuximab-resistant BB49 HNSCC cell line, that harbours a *H-Ras* mutation, fully restores sensitivity to EGFR blockade [15]. Phosphorylation of EGFR is known to trigger the Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K) signalling pathway, which plays a key role in cell proliferation and survival. Whole exome sequencing programs have demonstrated that up to 30% of HNSCC harbour mutated members of this pathway, including *PI3KCA*, *PTEN*, *AKT* and *mTOR* [16]. Interestingly, a crosstalk mechanism between the Ras and the PI3K pathways has been involved in resistance to cetuximab via the induction of a specific gene expression signature in head and neck cells [15]. However, genomic DNA sequence analysis of both cell lines used in this study confirmed the absence of mutation in the genes mentioned above, and no differences in RAS/AMPK and PI3K/AKT/mTOR pathway activation were observed (data not shown). Altogether, our data suggest that other mechanisms could be implicated in treatment failure after cetuximab and radiation exposure.

Tumor hypoxia is known to impact tumor response to radiation and chemotherapy adversely [17, 18], including HNSCC [7]. Hypoxia and HIF-1 have been shown to induce the upregulation of EGFR [19]. In addition, HIF-1 α expression can be stimulated independently of oxygen pressure by oncogenic pathways, including the EGFR/PI3K/mTOR pathway [10]. We therefore reasoned that head and neck cancer cells could be resensitized to ionizing radiation by targeting EGFR and mTOR with cetuximab and rapamycin, respectively. The

radiosensitivity of HNSCC cells was previously shown to improve upon impairing HIF-1 α expression [20] and the mTOR inhibitor CCI-779 was shown to potentiate the efficiency of radiotherapy in HNSCC xenograft models [21]. Similarly, treatment of head and neck cancer cell lines with OSI-027, an mTORC1/2 inhibitor, synergistically enhances the effect of the reversible EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib on cell survival [22]. Agreeing with this data, we found the combination of rapamycin and cetuximab to more efficiently inhibit HIF-1 α than both agents used as a monotherapy. As previously demonstrated [23], the rapamycin/cetuximab treatment shows remarkable efficiency *in vivo*, since nude mice bearing CAL27 xenografts, used as a cetuximab-sensitive model, showed complete tumor regression and were free of relapse 6 months post-treatment. Interestingly, animals were treated in our work with lower doses of cetuximab and rapamycin, compared to injection protocols traditionally used in the literature. In the study by Wang and colleagues, CAL27 cells were engineered to overexpress mutant versions of *PI3KCA* or *K-Ras* that are constitutively active. Similar tumor responses were observed with xenografts from the Detroit 562 (endogenous *PI3KCA* mutation) and UMSCC17B (endogenous H-Ras mutation) cells. In our study, we used SQ20B cells as a cetuximab-resistant model, a “wild-type” HNSCC cell line, representing the most frequent phenotype in patients. Locally advanced metastatic HNSCC are managed with concomitant radiotherapy and cetuximab. We therefore evaluated the efficiency of the cetuximab/rapamycin combination provided with ionizing radiation. Radiotherapy is known to induce HIF-1 α expression, which can be prevented by cetuximab [24], and we reasoned that treatment with rapamycin could further potentiate this effect. This hypothesis was challenged in nude mice models bearing SQ20B xenografts treated with concomitant radiotherapy and cetuximab or the cetuximab/rapamycin combination. Tumor growth was impaired during the treatment period. Surprisingly, and although the chemotherapy regimens we used were able to inhibit HIF-1 α expression, we observed that all SQ20B xenografts relapsed rapidly consequent to concomitant cetuximab and radiation therapy. This effect was partially contained by the addition of rapamycin. *In vitro* evaluation of treatment efficiency via measurement of SQ20B clonogenic survival after treatment consistently showed that, although ionizing radiation combined with incubation with rapamycin and cetuximab induced increased DNA DSBs and a significant drop of surviving fraction, about 50% of the cells were still able to generate positive clones. In order to elucidate the molecular bases of this resistant phenotype, we measured the expression of HIF-2 α . Indeed, HIF-2 α is a functional homologue of HIF-1 α that was previously shown to be expressed in HNSCC [8, 25, 26]. Interestingly, high HIF-2 α expression correlated with increased micro-vessel density,

incomplete response to chemotherapy and adverse prognosis [26]. We found HIF-2 α to be strongly induced in SQ20B cells in the presence of cetuximab +/- radiotherapy. Strikingly, when HIF-1 α was inhibited by the cetuximab/rapamycin combination after silencing of HIF-2 α by siRNA transfection, the clonogenic-surviving fraction of SQ20B cells after irradiation dropped under 1%. Moreover, HIF-1 α silencing did not induce HIF-2 α RNA or protein expression, and combined siRNA targeting HIF-1 α and HIF-2 α were not able to inhibit clonogenic survival. These results demonstrate that EGFR-targeted treatments combined with ionizing radiation may induce HIF-2 α oncogenic addiction, and that HIF-2 α induction is not a compensatory mechanism triggered by HIF-1 α inhibition. Interestingly, we observed that EGFR tyrosine kinase inhibitors erlotinib and canertinib were able to induce HIF-2 α protein expression at higher levels compared to cetuximab or irradiation alone in HNSCC, as well as colon cancer cell lines. This may explain the absence of proven clinical benefits of EGFR TKI in HNSCC [27, 28] or colon cancer, and suggests a more general molecular mechanism correlated with EGFR inhibition and implicated in treatment failure. To the best of our knowledge, no studies about treatment-dependent induction of HIF-2 α have been reported so far.

Overall, our results suggest that cetuximab and EGFR-targeted therapies, as well as ionizing radiation trigger cell resistance via the induction of HIF-2 α and underline the urgent need for the development of HIF-2 targeted therapies.

Acknowledgements: The authors are most grateful to Cyril Bour, Christelle Lasthaus, Dr. Isabelle Gross and the members of the department of pathology of the Centre Paul Strauss for invaluable technical assistance and advices. We thank Dr. Sophie Pinel for sharing cell lines. We are grateful to Rob Simmons for editing the manuscript.

Figure legends

Figure 1: Effect of Cetuximab and Rapamycin treatment on SQ20B and CAL27 xenografts. A) Schematic representation of the treatment protocol delivered to nude mice bearing CAL27 and SQ20B xenografts. B) Mean relative tumor volume of CAL27 et SQ20B xenografts measured during and after treatment (D: Days) (N=10 tumor per group). Error bars represent the standard deviation in each panel. Statistical significance was evaluated after the completion of the 2 treatment cycles (one-side Wilcoxon test; * p<0.05). C) Immunohistochemistry analysis of pan-cytokeratin staining in xenograft tissue harvested from nude mice after the completion of the treatment. One representative micrograph is shown for each treatment arm for both cell lines.

Figure 2: The cetuximab and rapamycin combination sensitizes SQ20B cells to ionizing radiation. A) Clonogenic survival assay of SQ20B after cetuximab/rapamycin treatment and 2 Gy irradiation, delivered alone or in combination. Error bars represent the standard deviation. (one-side Wilcoxon test ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). B) Fluorescent immunohistochemistry analysis of γ H2AX stainings (green) performed on SQ20B cells treated with cetuximab and/or rapamycin, and 2 Gy irradiation delivered alone or in combination. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Representative micrographs from 2 independent experiments are shown. C) Quantitative analysis of γ H2AX immunohistochemical stainings shown in Fig. 2B. Error bars represent the standard deviation. (one-side Wilcoxon test ; * $p < 0.05$).

Figure 3: Cetuximab and ionizing radiation induce HIF-2 expression in SQ20B cells. A) Fluorescent immunohistochemistry analysis of HIF-2 α stainings (red) performed on SQ20B cells treated with cetuximab and/or rapamycin, and 2 Gy irradiation delivered alone or in combination. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Representative micrographs from 2 independent experiments are shown. B) Quantitative analysis of HIF-2 α immunohistochemical stainings shown in Fig. 3A. Error bars represent the standard deviation. (one-side Wilcoxon test ; * $p < 0.05$). C) Analysis of HIF-2 α expression in SQ20B cells after cetuximab and rapamycin treatment, alone or in combination. Protein extracts were immunoprecipitated with an anti-HIF- β antibody. Purified proteins were resolved by SDS-PAGE and membranes were probed with an anti-HIF-2 α antibody or an anti-HIF- β antibody (control). Signal corresponding to HIF-2 α (upper panel) and HIF- β proteins (lower panel) are highlighted with an arrow.

Figure 4: HIF-2 expression in SQ20B cells induces oncogenic addiction. A) Schematic representation of the clonogenic survival assay performed to evaluate HIF-2 α oncogenic addiction in SQ20B cells (D: Day). B) Clonogenic survival assay of SQ20B cells that were either non-treated or treated with a cetuximab/rapamycin combination, and transfected with anti-HIF-1 α and/or anti-HIF-2 α siRNA. Cells were either non-irradiated or a 2 Gy dose of ionizing radiation was delivered. Error bars represent the standard deviation. (one-side Wilcoxon test ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$). C) Representative examples of clonogenic survival assays from 3 independent experiments analyzed in Fig. 4B are shown.

Table 1: Cetuximab and radiotherapy accelerates tumor relapse in nude mice bearing SQ20B xenografts. Nude mice bearing SQ20B cells were randomized to 3 treatments arms: i) Cetuximab (1 cycle: q5d3) + rapamycin (1 cycle:q3d5); ii) Cetuximab (1 cycle:q5d3) + irradiation (3X2 Gy); iii) Cetuximab (1 cycle:q5d3) + rapamycin (1 cycle:q3d5) + irradiation (3X2 Gy). The number and the percentage of tumours that relapsed after treatment, as well as the time to progression are shown.

References

1. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities.* Eur J Cancer, 2001. 37 Suppl 4: p. S3-8.
2. Kalyankrishna, S. and J.R. Grandis, *Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer.* J Clin Oncol, 2006. 24(17): p. 2666-72.
3. Bonner, J.A., P.M. Harari, J. Giralt, N. Azarnia, D.M. Shin, R.B. Cohen, *et al.*, *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck.* N Engl J Med, 2006. 354(6): p. 567-78.
4. Chen, L.F., E.E. Cohen, and J.R. Grandis, *New strategies in head and neck cancer: understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors.* Clin Cancer Res, 2010. 16(9): p. 2489-95.
5. Boeckx, C., M. Baay, A. Wouters, P. Specenier, J.B. Vermorken, M. Peeters, *et al.*, *Anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance.* Oncologist, 2013. 18(7): p. 850-64.
6. Vaupel, P., *Blood flow and oxygenation status of head and neck carcinomas.* Adv Exp Med Biol, 1997. 428: p. 89-95.
7. Aebbersold, D.M., P. Burri, K.T. Beer, J. Laissue, V. Djonov, R.H. Greiner, *et al.*, *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer.* Cancer Res, 2001. 61(7): p. 2911-6.
8. Beasley, N.J., R. Leek, M. Alam, H. Turley, G.J. Cox, K. Gatter, *et al.*, *Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients.* Cancer Res, 2002. 62(9): p. 2493-7.

9. Strofer, M., W. Jelkmann, E. Metzen, U. Brockmeier, J. Dunst, and R. Depping, *Stabilisation and knockdown of HIF--two distinct ways comparably important in radiotherapy*. Cell Physiol Biochem, 2011. 28(5): p. 805-12.
10. Phillips, R.J., J. Mestas, M. Gharaee-Kermani, M.D. Burdick, A. Sica, J.A. Belperio, *et al.*, *Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha*. J Biol Chem, 2005. 280(23): p. 22473-81.
11. Bedi, A., X. Chang, K. Noonan, V. Pham, R. Bedi, E.J. Fertig, *et al.*, *Inhibition of TGF-beta enhances the in vivo antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy*. Mol Cancer Ther, 2012. 11(11): p. 2429-39.
12. Hatakeyama, H., H. Cheng, P. Wirth, A. Counsell, S.R. Marcrom, C.B. Wood, *et al.*, *Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2010. 5(9): p. e12702.
13. Jijon, H.B., A. Buret, C.L. Hirota, M.D. Hollenberg, and P.L. Beck, *The EGF receptor and HER2 participate in TNF-alpha-dependent MAPK activation and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells*. Mediators Inflamm, 2012. 2012: p. 207398.
14. Khambata-Ford, S., C.R. Garrett, N.J. Meropol, M. Basik, C.T. Harbison, S. Wu, *et al.*, *Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab*. J Clin Oncol, 2007. 25(22): p. 3230-7.
15. Rampias, T., A. Giagini, S. Siolos, H. Matsuzaki, C. Sasaki, A. Scorilas, *et al.*, *RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2014. 20(11): p. 2933-46.
16. Lui, V.W., M.L. Hedberg, H. Li, B.S. Vangara, K. Pendleton, Y. Zeng, *et al.*, *Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers*. Cancer Discov, 2013.
17. Bertout, J.A., S.A. Patel, and M.C. Simon, *The impact of O2 availability on human cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(12): p. 967-75.
18. Wouters, A., B. Pauwels, F. Lardon, and J.B. Vermorken, *Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions*. Oncologist, 2007. 12(6): p. 690-712.

19. Wouters, A., C. Boeckx, J.B. Vermorken, D. Van den Weyngaert, M. Peeters, and F. Lardon, *The intriguing interplay between therapies targeting the epidermal growth factor receptor, the hypoxic microenvironment and hypoxia-inducible factors*. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(5): p. 907-17.
20. Yang, X., H. Zhu, Y. Ge, J. Liu, J. Cai, Q. Qin, *et al.*, *Melittin enhances radiosensitivity of hypoxic head and neck squamous cell carcinoma by suppressing HIF-1alpha*. *Tumour Biol*, 2014. 35(10): p. 10443-8.
21. Ekshyyan, O., Y. Rong, X. Rong, K.M. Pattani, F. Abreo, G. Caldito, *et al.*, *Comparison of radiosensitizing effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 to cisplatin in experimental models of head and neck squamous cell carcinoma*. *Mol Cancer Ther*, 2009. 8(8): p. 2255-65.
22. Cassell, A., M.L. Freilino, J. Lee, S. Barr, L. Wang, M.C. Panahandeh, *et al.*, *Targeting TORC1/2 enhances sensitivity to EGFR inhibitors in head and neck cancer preclinical models*. *Neoplasia*, 2012. 14(11): p. 1005-14.
23. Wang, Z., D. Martin, A.A. Molinolo, V. Patel, R. Iglesias-Bartolome, M.S. Degese, *et al.*, *mTOR co-targeting in cetuximab resistance in head and neck cancers harboring PIK3CA and RAS mutations*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. 106(9).
24. Lu, H., K. Liang, Y. Lu, and Z. Fan, *The anti-EGFR antibody cetuximab sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cells to radiation in part through inhibiting radiation-induced upregulation of HIF-1alpha*. *Cancer Lett*, 2012. 322(1): p. 78-85.
25. Winter, S.C., K.A. Shah, C. Han, L. Campo, H. Turley, R. Leek, *et al.*, *The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer*. *Cancer*, 2006. 107(4): p. 757-66.
26. Koukourakis, M.I., A. Giatromanolaki, E. Sivridis, C. Simopoulos, H. Turley, K. Talks, *et al.*, *Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. 53(5): p. 1192-202.
27. Argiris, A., M. Ghebremichael, J. Gilbert, J.W. Lee, K. Sachidanandam, J.M. Kolesar, *et al.*, *Phase III randomized, placebo-controlled trial of docetaxel with or without gefitinib in recurrent or metastatic head and neck cancer: an eastern cooperative oncology group trial*. *J Clin Oncol*, 2013. 31(11): p. 1405-14.
28. Martins, R.G., U. Parvathaneni, J.E. Bauman, A.K. Sharma, L.E. Raez, M.A. Papagikos, *et al.*, *Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally*

advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. J Clin Oncol, 2013. 31(11): p. 1415-21.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1: Effect of Cetuximab and Rapamycin treatment on SQ20B and CAL27 xenografts. Mice bearing CAL27 or SQ20B xenografts were treated with cetuximab and rapamycin, alone or in combination. Xenograft tissue was harvested after completion of the treatment, formalin-fixed and paraffin-embedded. Tissue sections were labelled with standard Hematoxylin/Eosin staining. Representative micrographs are shown for each treatment arm.

Supplementary Figure 2: Effect of Cetuximab and Rapamycin treatment on SQ20B and CAL27 xenografts. Fluorescent immunohistochemical analysis of the effect of cetuximab and rapamycin treatment on HIF-1 α expression (red) and tumour hypoxia (visualized via the expression of Carbonic Anhydrase IX; green) in SQ20B and CAL27 xenografts. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). A representative example of merged staining is shown for each treatment arm.

Supplementary Figure 3: *In vitro* analysis of the effect of cetuximab and rapamycin treatment on CAL27 and SQ20B cell lines. A) Upper graph: CAL27 cells were grown in the presence of increasing concentration of rapamycin, cell proliferation was measured with a sulforhodamine B proliferation assay, and results were plotted. Lower graph: CAL27 cells were grown in the presence of the minimal efficient dose of rapamycin (5nM) and increasing concentration of cetuximab, cell proliferation was measured with a sulforhodamine B proliferation assay, and results were plotted. Both experiments were carried out in normoxic (plain line) and hypoxic conditions (dashed line). Curves were compared using a one-side Wilcoxon test (* $p < 0.05$). Error bars represent the standard deviation in each graph. B) Upper graph: SQ20B cells were grown in the presence of increasing concentration of rapamycin, cell proliferation was measured with a sulforhodamine B proliferation assay, and results were plotted. Lower graph: SQ20B cells were grown in the presence of the minimal efficient dose of rapamycin (5nM) and increasing concentration of cetuximab, cell proliferation was measured with a sulforhodamine B proliferation assay, and results were plotted. Both experiments were carried out in normoxic (plain line) and hypoxic conditions (dashed line). Curves were compared using a one-side Wilcoxon test (* $p < 0.05$). Error bars represent the standard deviation in each graph. C) Western blot analysis of whole protein extracts from CAL27 (left panels) and SQ20B cells (right panels), grown in hypoxic conditions (1% O₂) and in the

presence of 2,5 µg/ml cetuximab and/or 5nm rapamycin. Cells were harvested 24h and 48h after the end of cetuximab/rapamycin treatment. Blots were probed with anti-HIF-1α, anti-S6RP and anti-Actin (loading control) antibodies. Signal was measured and normalized to the level of actin expression. Calculated expression levels are shown for each experimental condition.

Supplementary Figure 4: Inhibition of HIF-1α and HIF-2α expression in SQ20B cells. SQ20B cells were transfected with anti HIF-1α and/or HIF-2α specific siRNAs. Non transfected cells and transfection with a scramble siRNA were used as a negative control. A. The expression levels HIF-1α (left panel) and HIF-2α mRNAs (right panel) were measured by quantitative RT-PCR. The mean expression level for each experimental condition was calculated from 3 independent experiments and plotted, and results were using a one-side Wilcoxon test (* p<0.05). Error bars represent the standard deviation. B Western Blot analysis (left) and signal quantification (right) of HIF-1α and HIF-2α in SQ20B cells transfected with anti HIF-1α or HIF-2α specific siRNAs. Non transfected cells and transfection with a scramble siRNA were used as a negative control. β-tubulin was used as a loading control. The mean expression level for each experimental condition was calculated from 3 independent experiments and plotted, and results were using a one-side Wilcoxon test (** p<0.01; *** p<0.001). Error bars represent the standard deviation.

Supplementary Figure 5: Anti-EGFR treatments induce HIF-2 expression in head and neck (SQ20B) and colon (SW480) cancer cell lines. Fluorescent immunohistochemistry analysis of HIF-2α stainings (red) performed on SQ20B (upper panels) and SW480 cells (lower panels) treated with cetuximab, canertinib or erlotinib delivered as monotherapies. Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Merge of HIF-2α and DAPI staining is shown for each experimental condition. Representative micrographs from 2 independent experiments are shown.

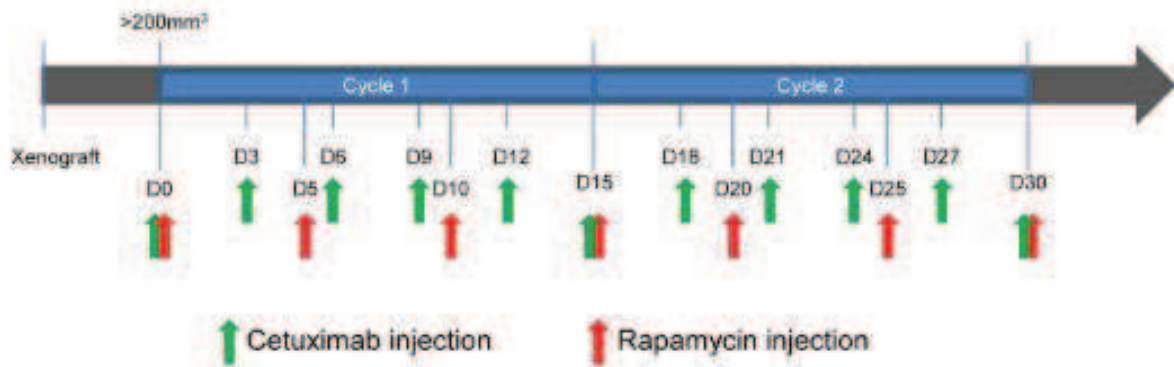
Supplementary Table 1: Cetuximab and Rapamycin drug combination study. CAL27 and SQ20B cells were treated with 5nM Rapamycin and increasing concentrations of Cetuximab in normoxic and hypoxic conditions. Antiproliferative effect was measured with a sulforhodamine B proliferation assay and combination index was calculated using the Chou-Talalay method [1].

References

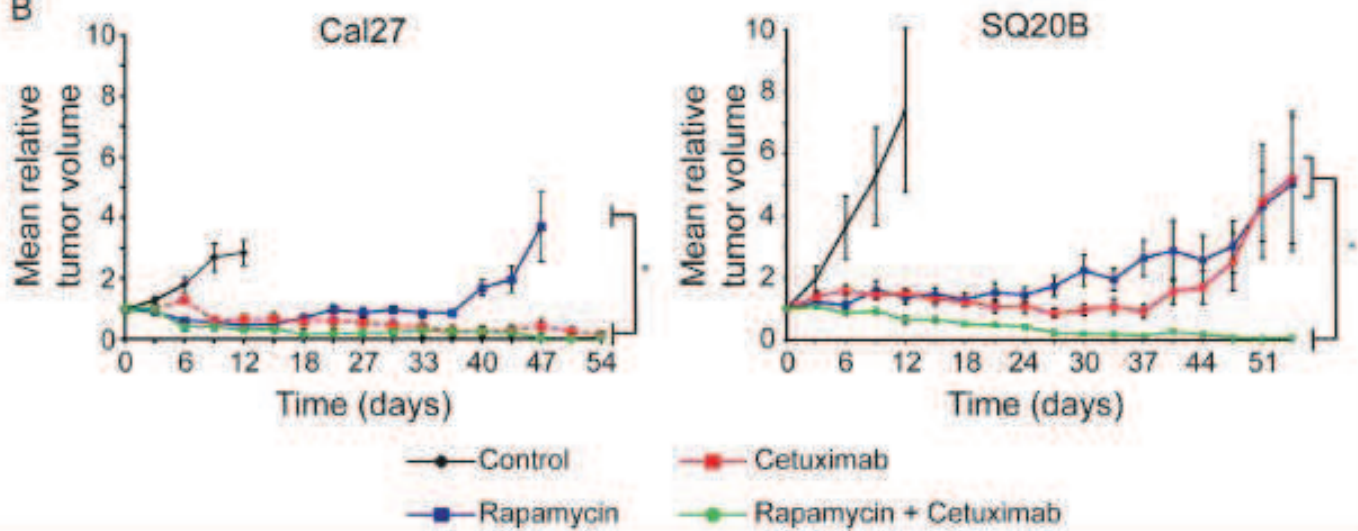
1. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul., 1984. **22**: p. 27-55.

Figure 1

A



B



C

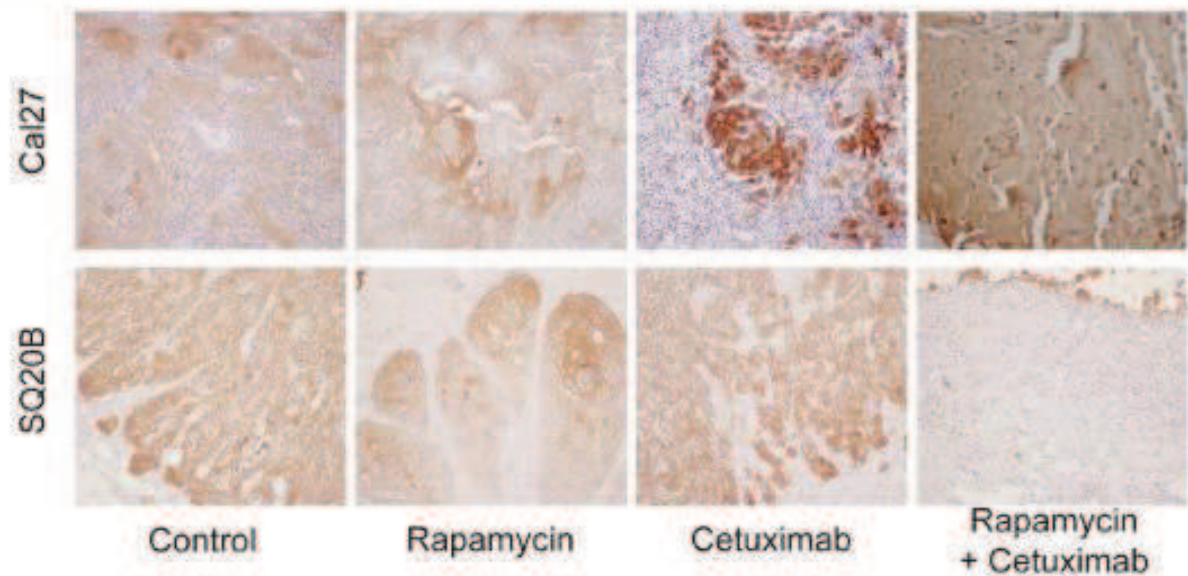


Figure 2

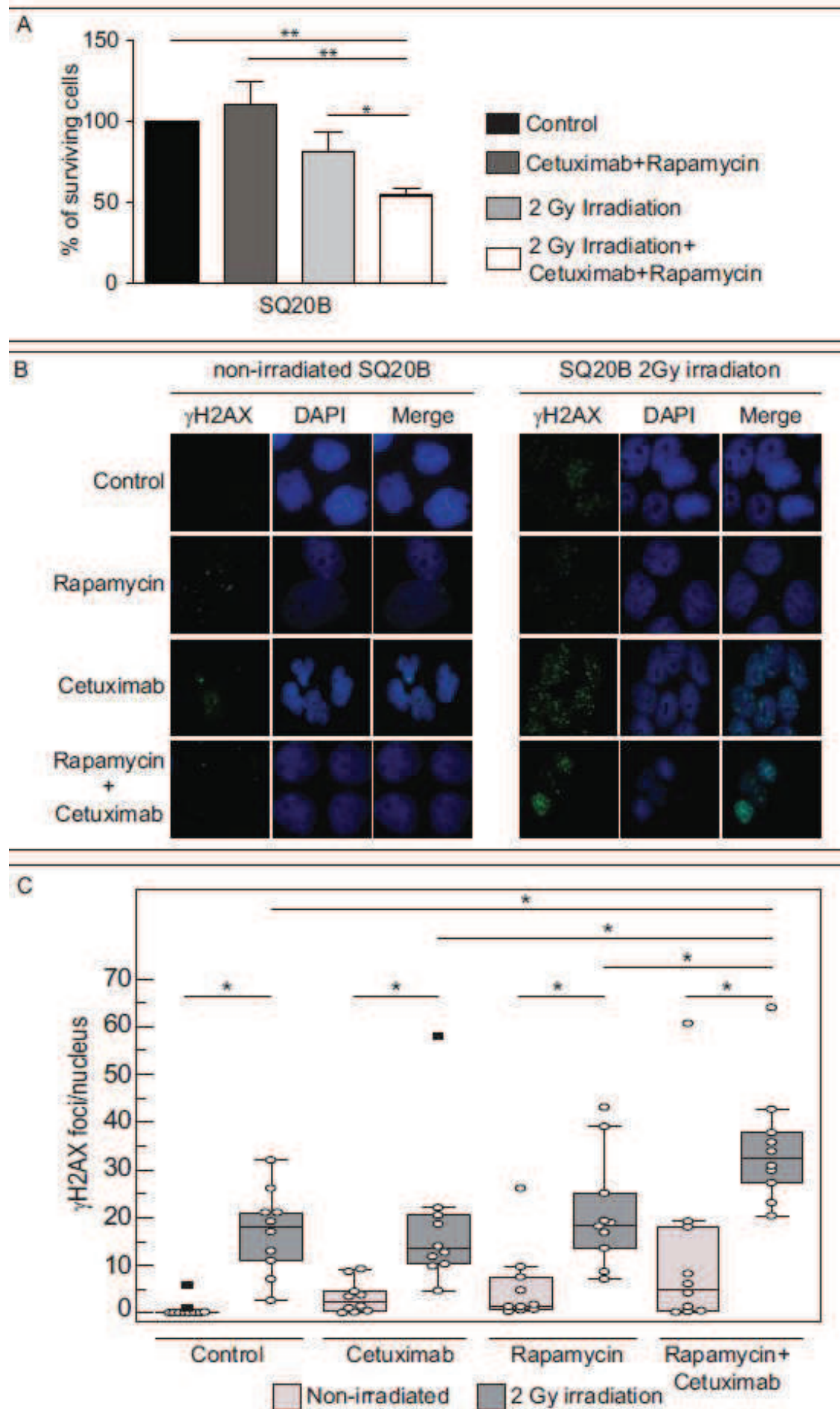


Figure 3

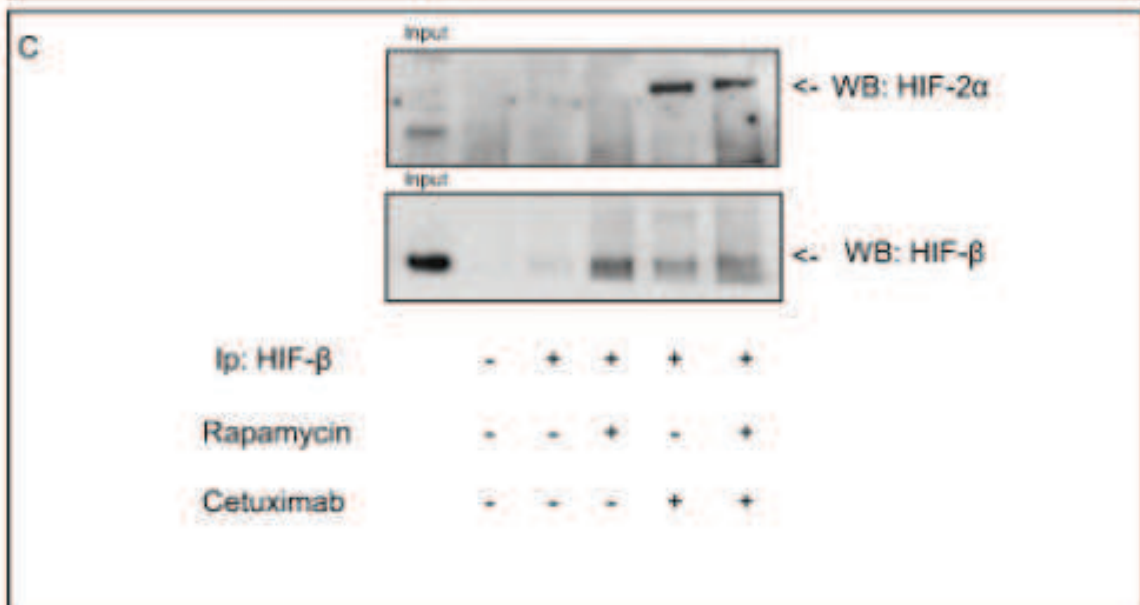
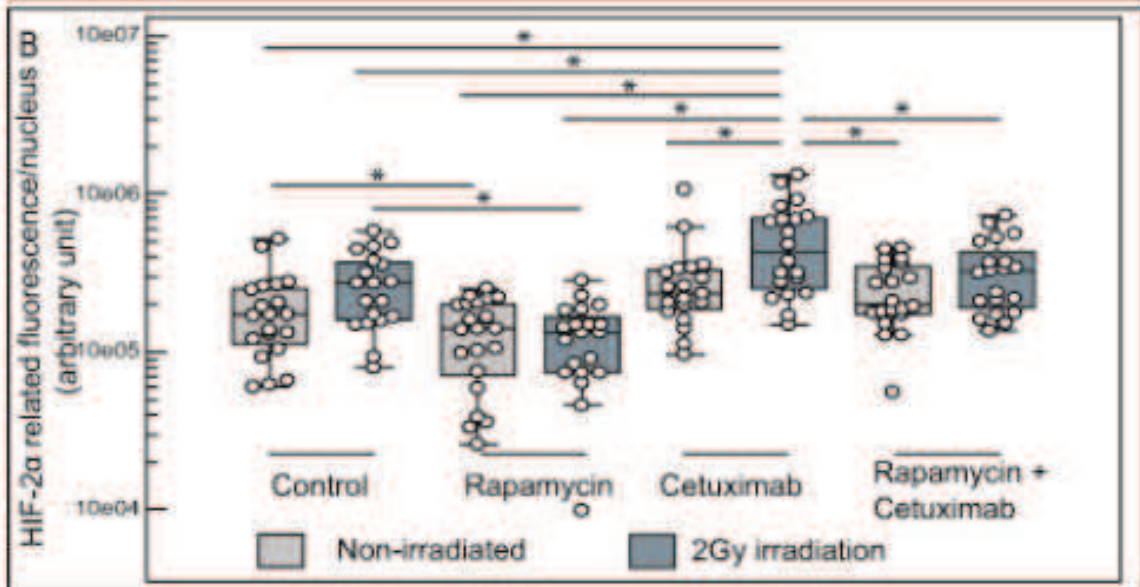
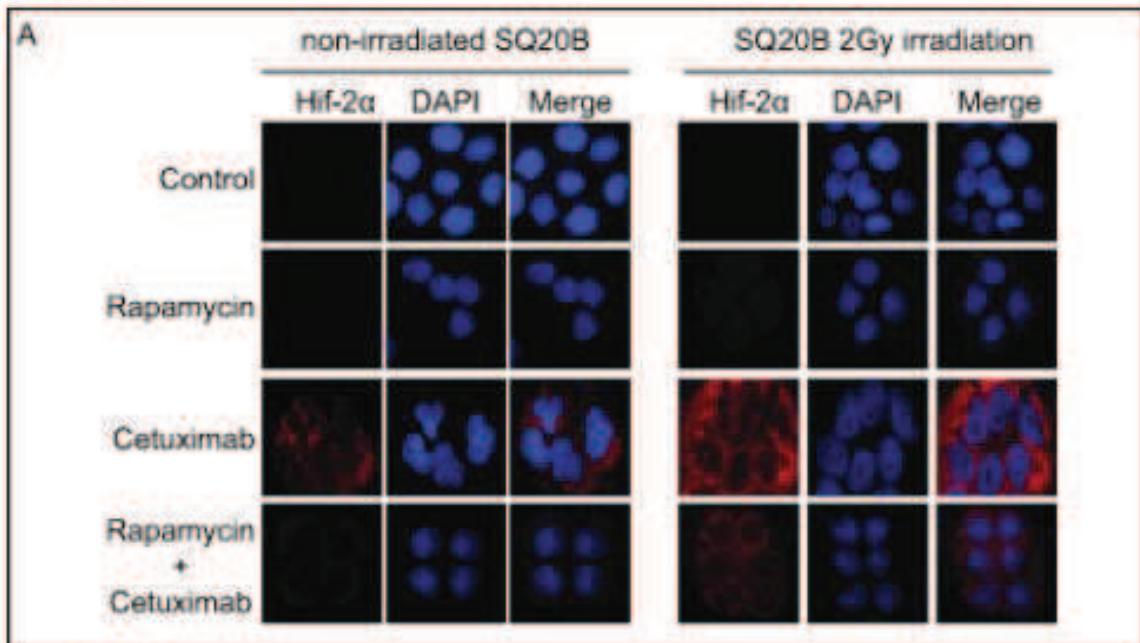


Figure 4

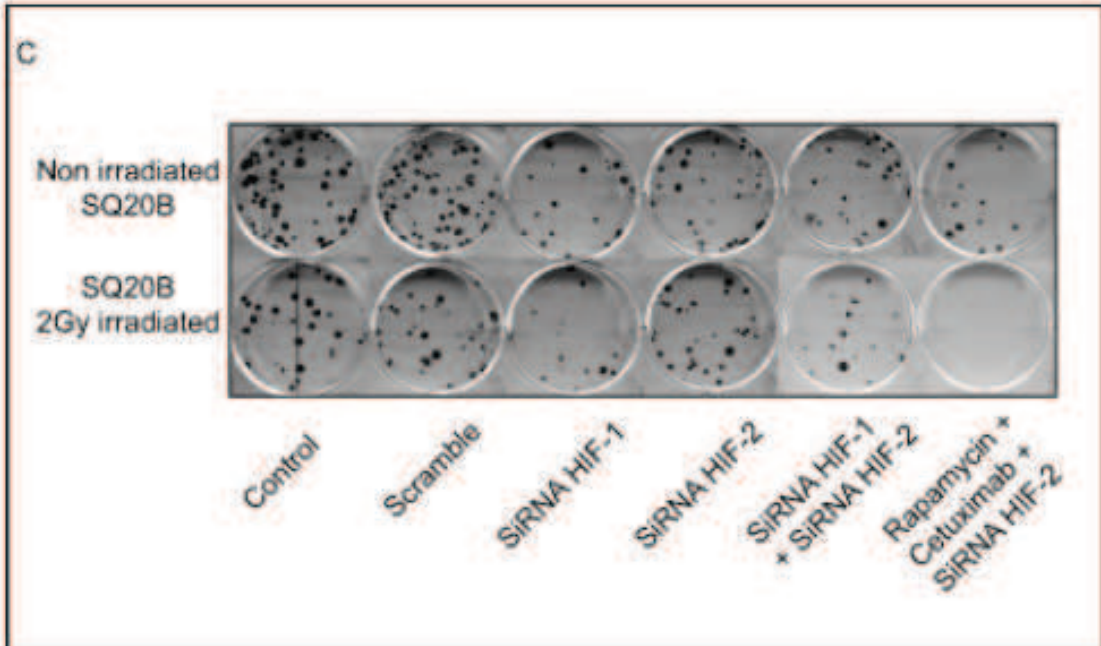
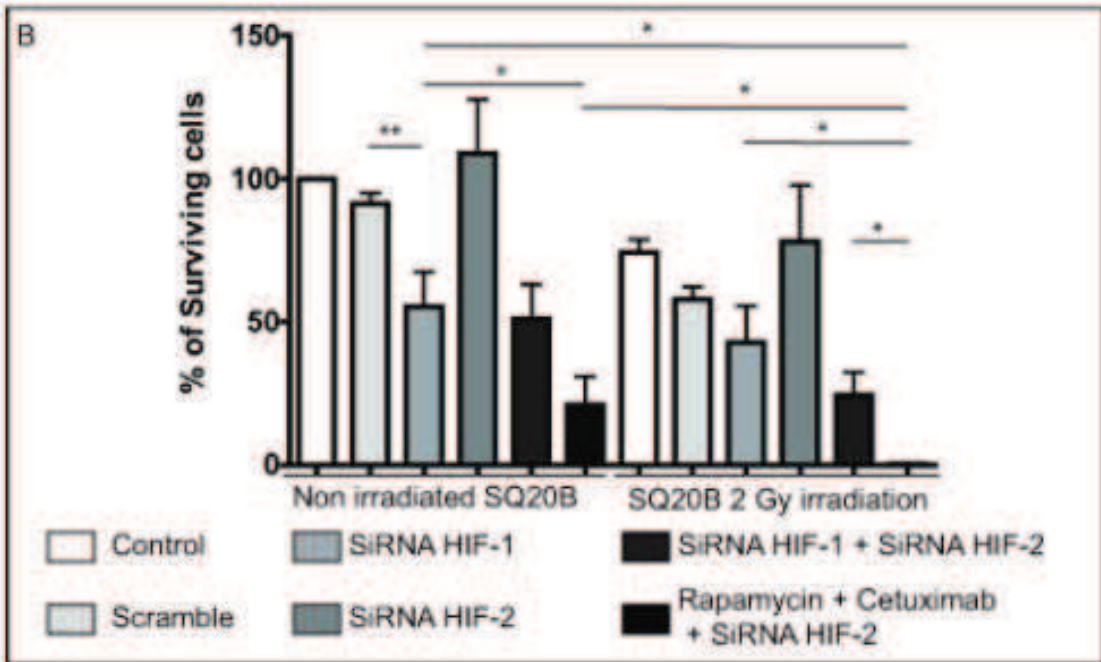
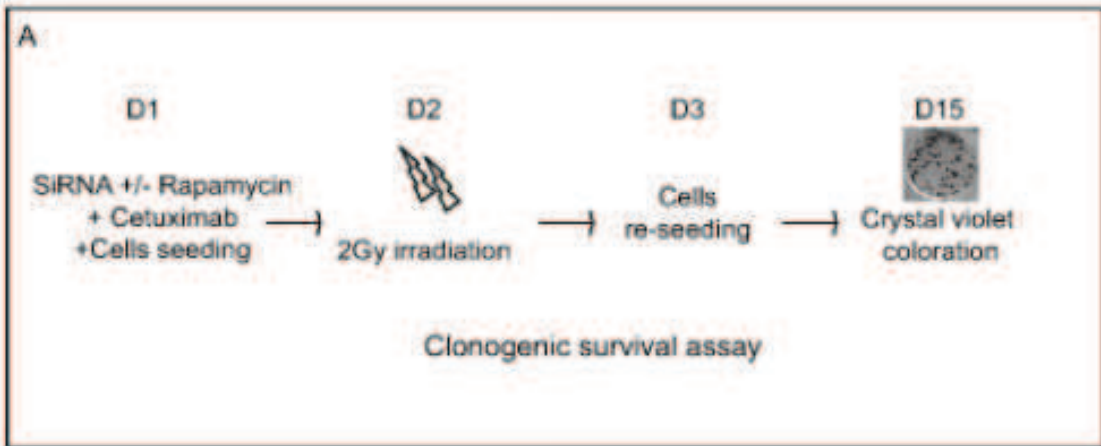


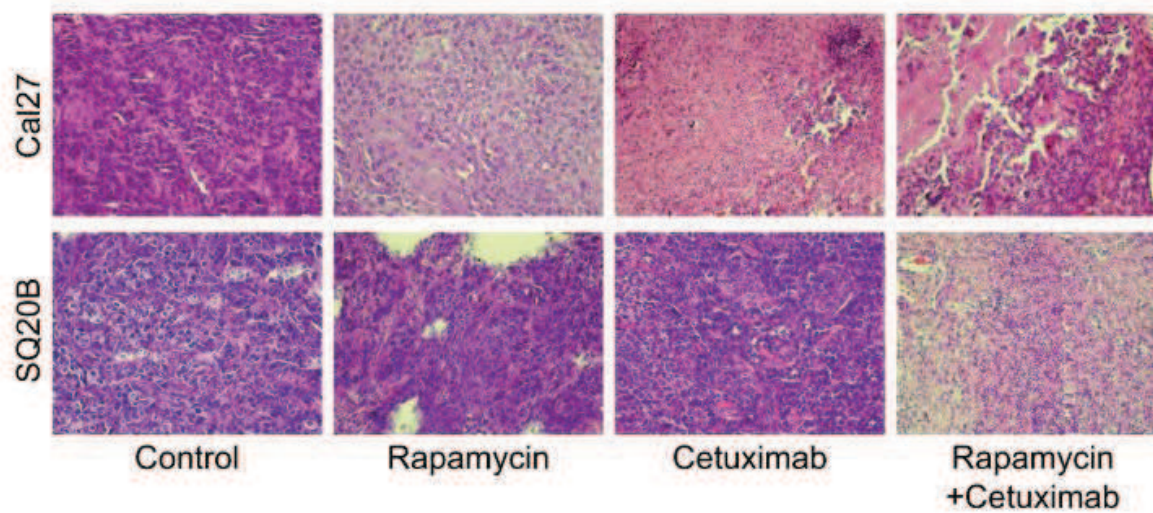
Table 1 :

Treatment	# tumors	% relapse (N)	Time to progression
Cetuximab (1 cycle: q5d3) + rapamycin (1 cycle:q3d5)	10	10% (1/10)	45 days
Cetuximab (1 cycle:q5d3) + rapamycin (1 cycle:q3d5) + irradiation (3X2 Gy)	8	62.5% (5/8)	15 days
Cetuximab (1 cycle:q5d3) + irradiation (3X2 Gy)	10	100% (10/10)	3 days

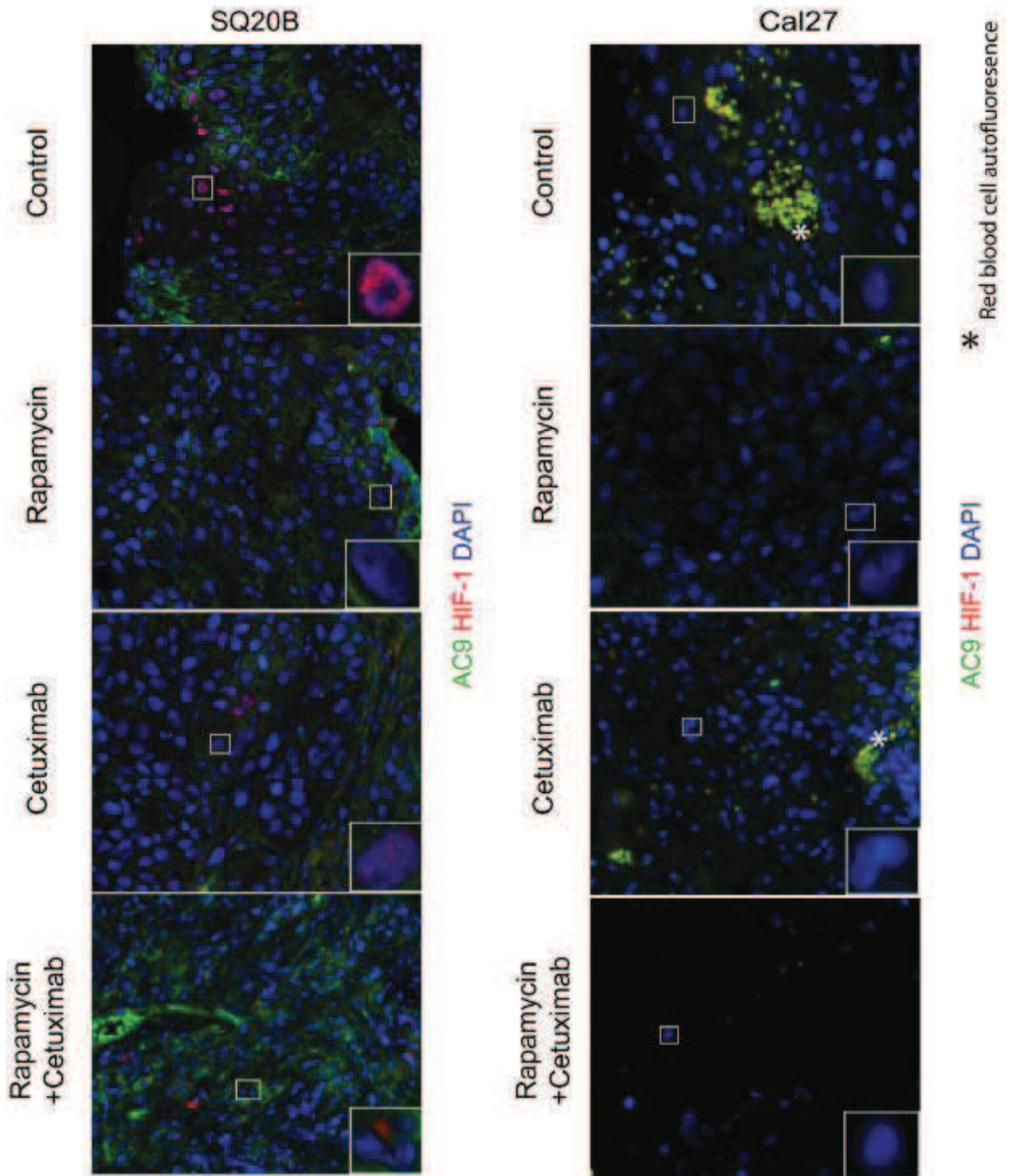
Supplemental Table 1 : Cetuximab and Rapamycin drug combination study

	Cal27		SQ20B	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
Ratio	0,86	0,94	0,98	0,89
Association	Additive	Additive	Additive	Additive

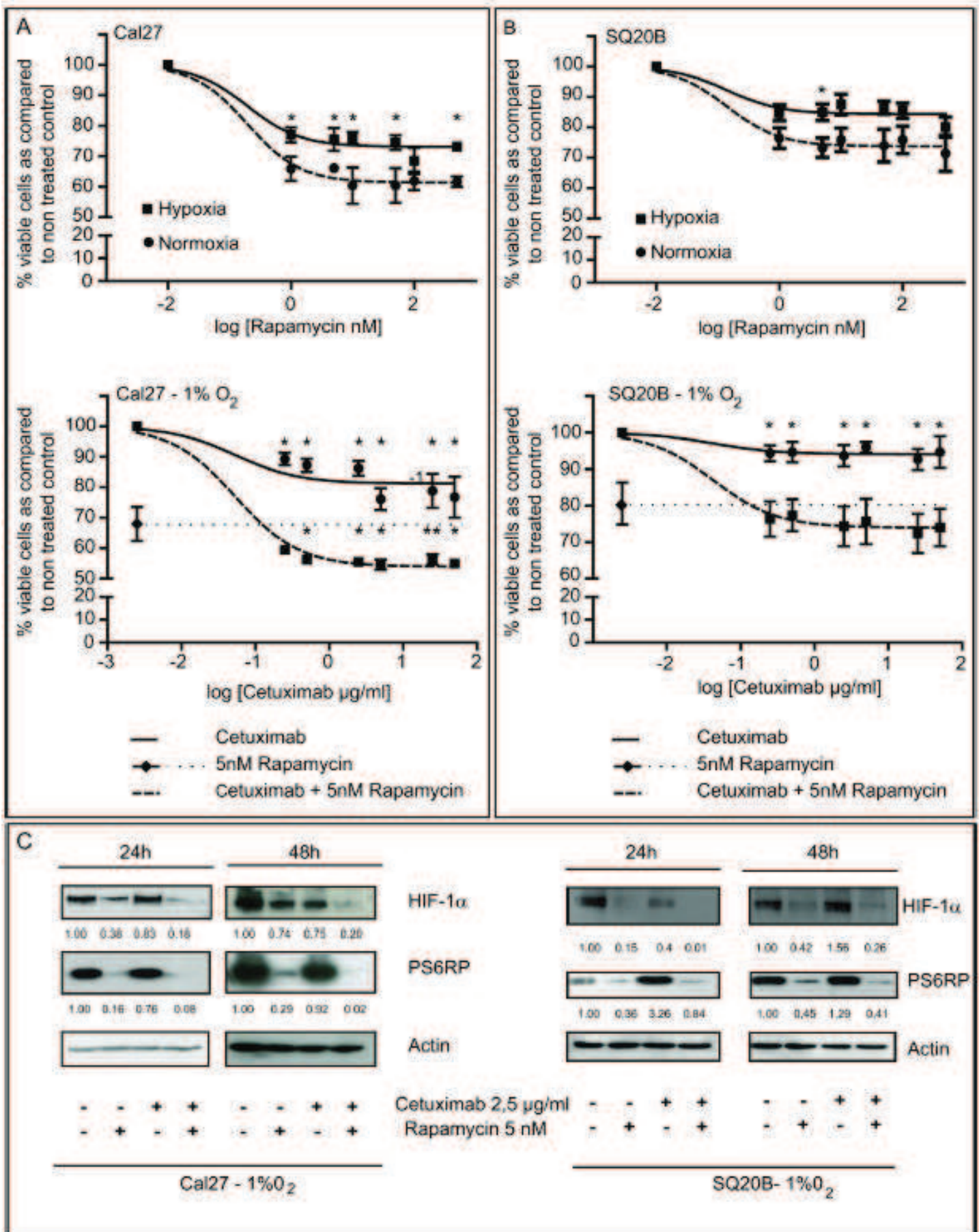
Supplemental Figure 1



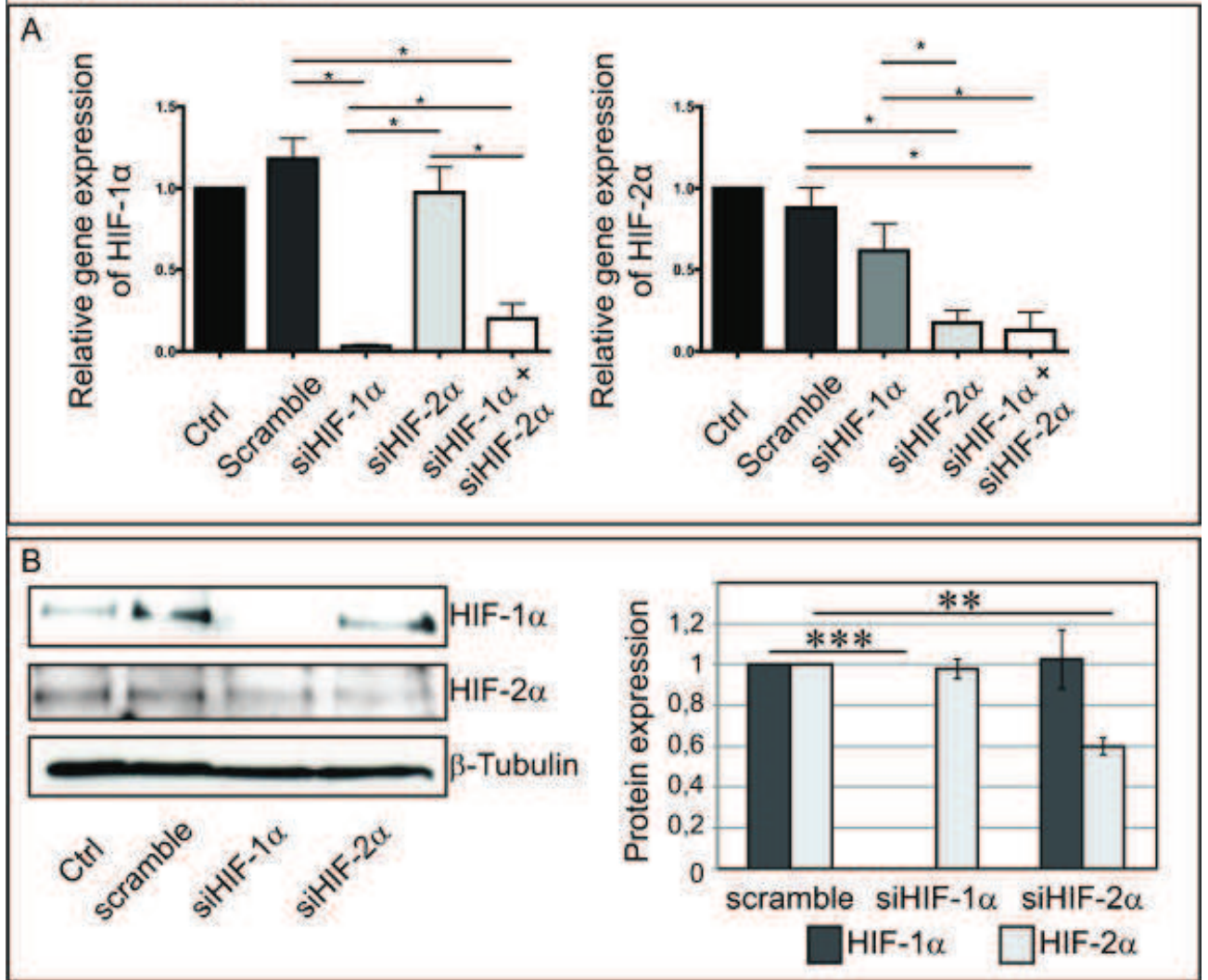
Supplemental Figure 2



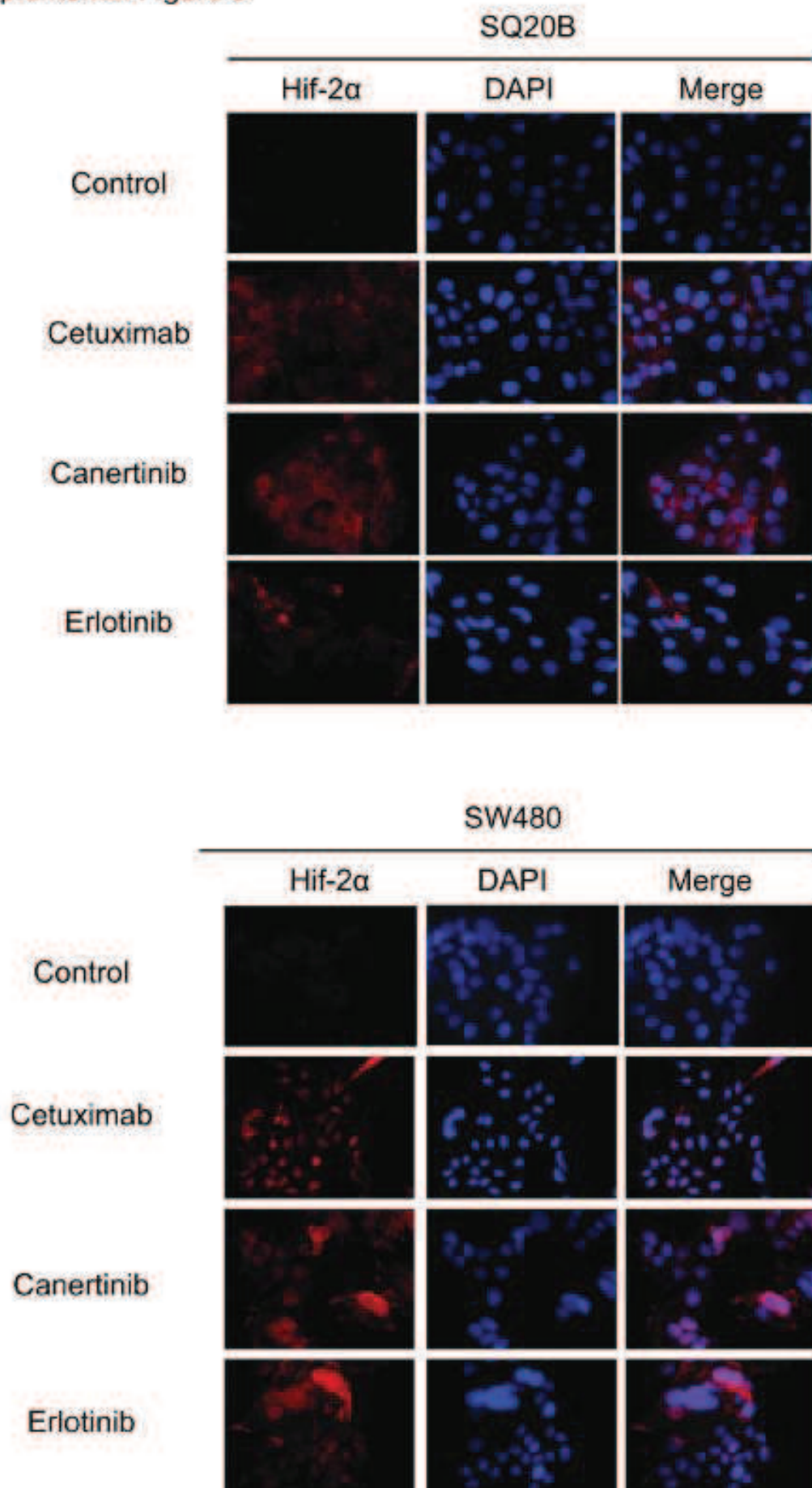
Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5



Conclusion :

La réponse adaptative des cellules tumorales à leur environnement caractérise leur degré de résistance.

Dans notre modèle, nous montrons que suite à un traitement par anti-EGFR ou irradiation, les cellules tumorales induisent une protéine de stress hypoxique HIF-2. Cette réponse conditionne la résistance au traitement en conférant des propriétés plus agressives aux cellules tumorales. L'inhibition combinée de HIF-2 à ces traitements permettrait, dans le cas où la cellule tumorale utilise ce mécanisme d'adaptation, d'améliorer leur efficacité. Cette solution thérapeutique sera dépendante de la validation en clinique d'un inhibiteur de HIF-2, et d'une méthode robuste pour détecter les patients porteurs de tumeurs chez lesquelles l'expression de HIF-2 est induite.

III) Données complémentaires à l'étude :

D'autres données viennent compléter celles présentées dans le manuscrit. Il s'agit d'études complémentaires sur les expériences *in vivo* (courbes de croissance, courbe de survie, analyse de l'expression de HIF-2), et *in vitro* par une cinétique d'accumulation de HIF-2, et une étude sur l'impact des traitements sur les voies de signalisations oncogéniques, et sur l'impact différentielle de l'inhibition directe de HIF-1, HIF-2 et EGFR par des siRNA.

a) Courbe de croissance des tumeurs irradiées *in vivo* :

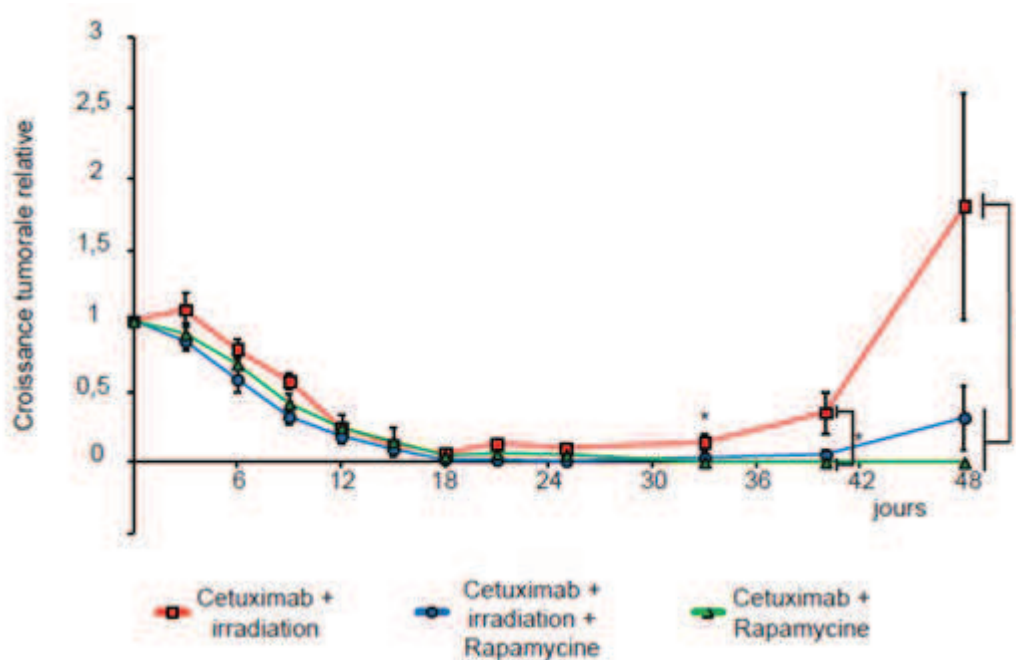


Figure 27: Croissance tumorale de xénogreffes de lignée SQ20B traitées par cetuximab, rapamycine et irradiation. Les traitements ont démarré à J0 lorsque le volume tumoral moyen était supérieur à 300mm³. Les traitements ont été terminés à J15 et consistaient en des combinaisons de cetuximab 1mg tous les 3 jours, Rapamycine 3mg/kg tous les 5 jours et 2gy les J11, J13, et J15. Les courbes de croissance du groupe traité par Cetuximab + irradiation sont significatives versus le groupe traité par Rapamycine et cetuximab dès J33, et versus les deux autres groupes de traitements à J48.

Dans l'article soumis, nous faisons état d'une expérience *in vivo* montrant que la radiothérapie associée au cetuximab est responsable de rechutes tumorales plus rapides et plus fréquentes comparées aux groupes traités uniquement par le cetuximab ou par la combinaison cetuximab + rapamycine (Table 1 du manuscrit). Nous avons choisi de compléter les données présentées par la mesure de l'évolution du volume tumorale pendant et après traitement, ainsi que par l'analyse des courbes de survie des individus.

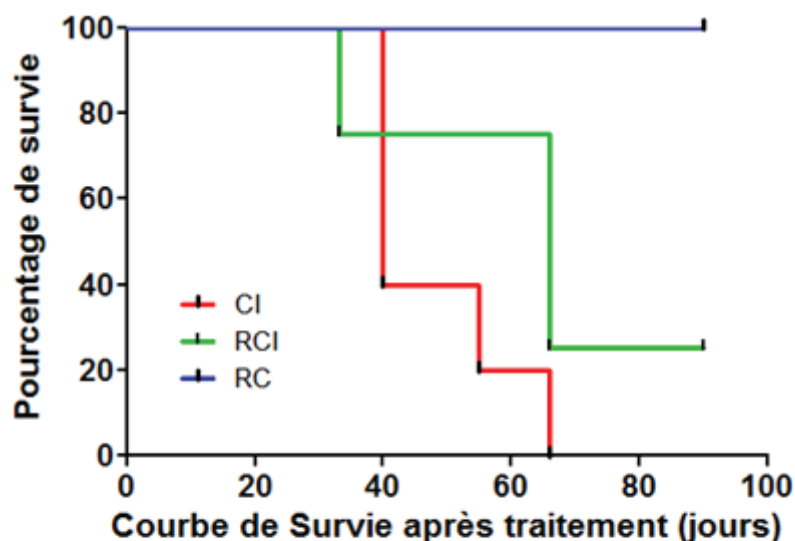


Figure 28: Courbe de survie des souris xéno greffées avec une lignée tumorale SQ20B et traitées par cetuximab, rapamycine et irradiation. Les groupes de souris traitées sont CI pour la combinaison Cetuximab + irradiation, RCI pour la combinaison Rapamycine + Cetuximab + irradiation et RC pour la combinaison Rapamycine + Cetuximab. La courbe de survie RC est statistiquement différentes des deux autres courbes.

L'utilisation de la combinaison rapamycine + cetuximab, ou cetuximab + irradiation ou la combinaison des trois modalités thérapeutiques ont une efficacité similaire dans un premier temps, avec une diminution du volume tumoral à moins de 30mm³. Nous interprétons cette observation comme une réponse complète des tumeurs xéno greffées aux différents traitements. Cependant, l'évolution des tumeurs varie en fonction du traitement :

- Les souris traitées par l'association cetuximab + irradiation sont celles chez qui les rechutes (reprise de la croissance tumorale après traitement) sont les plus rapides, et concernent tous les individus. Le taux de survie de ces souris est faible : 50% de la population initiale 40 jours après traitement. L'ensemble des souris de ce groupe ont été sacrifiées moins de 70 jours après la fin du traitement pour des raisons éthiques (volume tumoral trop important ; perte de poids importante ; etc)
- L'association des la rapamycine, du cetuximab et des radiations ionisantes montre une bonne efficacité : les rechutes sont plus tardives, et ne concernent pas l'ensemble des tumeurs (60% de rechute). La survie est d'environ 50 % à 65 jours, mais n'est pas statistiquement significativement supérieure à la survie du groupe cetuximab + irradiation.
- Enfin, la combinaison cetuximab + rapamycine est celle qui montre à la fois une bonne efficacité, une survie globale des animaux supérieure à 90 jours après traitement pour l'ensemble des souris, et le moins de rechute (10%) à plus de 45

jours après traitement. La courbe de survie de cette combinaison étant statistiquement différente des deux autres courbes ($p < 0.05$ log rank test).

En résumé, nous avons donc montré que :

- 1) Malgré une réponse primaire comparable, l'ajout de l'irradiation (2Gy) dans le modèle résistant accélère les rechutes et diminue la survie globale des animaux.
- 2) L'ajout de la rapamycine, quelle que soit la combinaison, améliore l'efficacité globale des traitements dans le modèle résistant.

b) Analyse de l'expression de HIF-2 in vivo :

Nous avons montré que la sous-unité HIF-2 α est induite dans les cellules SQ20B après traitement par cetuximab, et se lie à HIF- β (figure 3C du manuscrit). Notre objectif a donc été de vérifier si HIF-2 était également induit *in vivo* suite au traitement par cetuximab.

Une analyse par immunofluorescence a été réalisée sur des coupes de xénogreffes incluses en paraffine. Le matériel utilisé est issu des expériences représentées dans la figure 1B de l'article. Les tumeurs ont été extirpées à J27 pour la lignée SQ20B (soit 3 jours après le dernier traitement par Cetuximab et 2 jours après le dernier traitement par rapamycine), et J33 pour la lignée CAL27 (soit 3 jours après le dernier traitement par cetuximab, et 3 jours après le dernier traitement par rapamycine). Dans cette expérience, les noyaux sont colorés en bleu au DAPI, et HIF-2 α a été détecté au moyen d'un anticorps primaire spécifique, et d'un anticorps secondaire couplé à la cyanine 3 (marquage rouge).

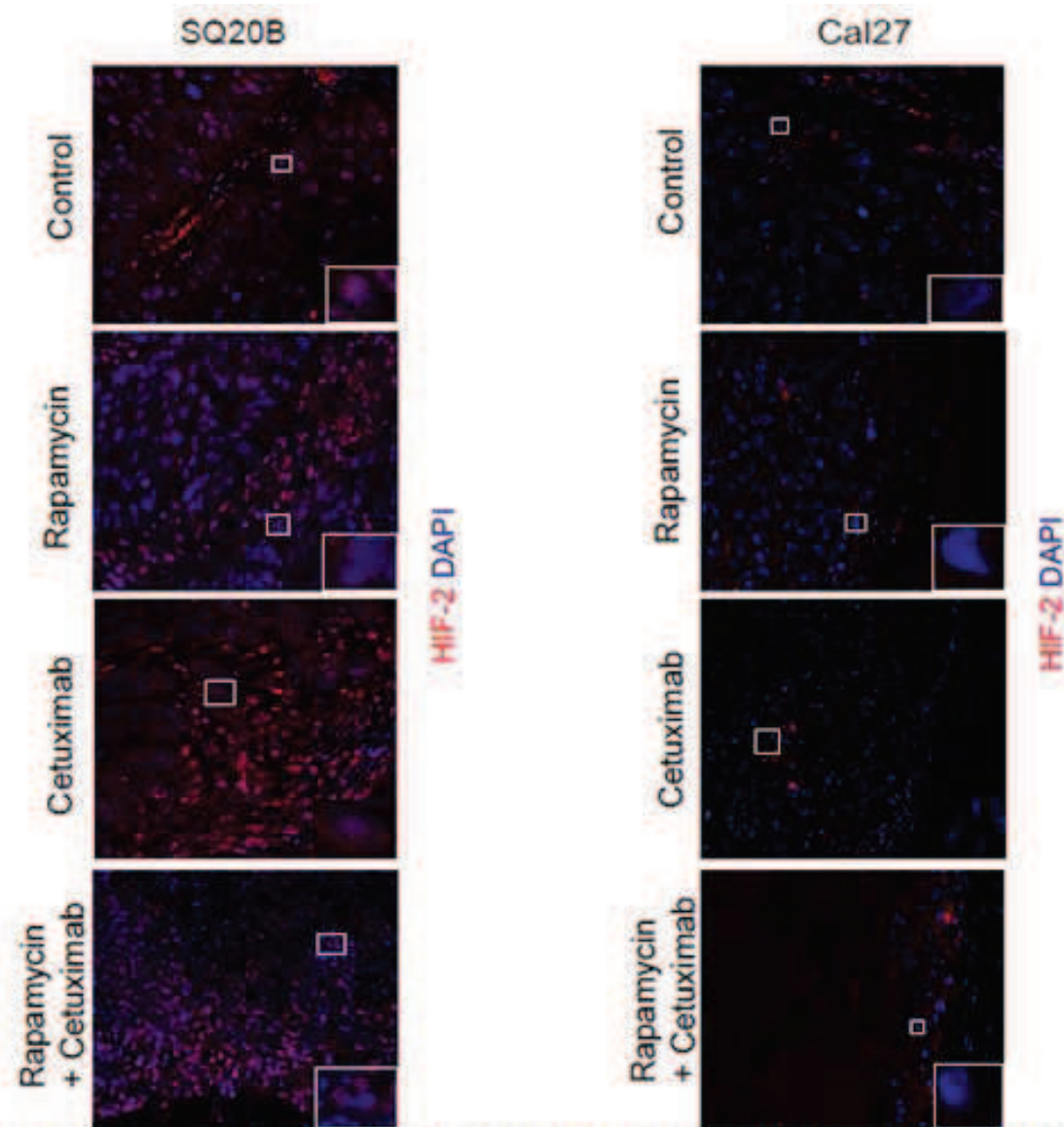


Figure 29: Expression de HIF-2 α sur les tumeurs de souris traitées par cetuximab et rapamycine sur les xénogreffes SQ20B et Cal27. L'analyse a été réalisée par immunofluorescence sur l'expression de HIF-2 (rouge). Les noyaux sont coloré avec du DAPI (bleu). Un agrandissement de l'expression de HIF-2 à proximité des noyaux est montré pour chaque condition de traitement.

- **En l'absence de traitement**, l'expression de HIF-2 est différente selon les xénogreffes. Elle est très faible pour les xénogreffes de la lignée CAL27, alors que pour la lignée SQ20B, elle est exprimée à un état basal. En effet, nous avons montré dans le manuscrit et dans l'article en annexe (cf figure supplémentaire 2 de l'article et publication Hanns et al en annexe¹⁵⁹) que les tumeurs SQ20B expriment l'anhydrase Carbonique 9 et HIF-1 de manière plus importante. Les zones hypoxiques sont plus fréquentes et plus étendues, ce qui pourrait expliquer la différence d'expression de HIF-2 observée dans les xénogreffes des deux lignées.
- **Lors du traitement par cetuximab (+/- rapamycine)**, HIF-2 α est induit dans la lignée résistante SQ20B. Cette induction se fait au niveau du tissu tumoral et du stroma avec une localisation qui semble être en partie dans la zone périnucléaire.

- **Pour les xénogreffes CAL27**, nous n'avons pas pu observer d'induction de l'expression de HIF-2 α consécutivement au traitement. En effet, dans les conditions où les souris sont traitées par le cetuximab +/- rapamycine, le matériel extirpé ne contenait plus de tissu tumoral (figure 1C du manuscrit). De plus, ce tissu résiduel prélevé à l'issue du traitement par cetuximab ne correspond pas à un stroma tumoral classique, et exprime très faiblement HIF-2 α . En effet, la coloration par H&E met en évidence une population plus importante de cellules à petits noyaux, qui pourrait correspondre à un infiltrat lymphocytaire.
- **Enfin, lorsque les souris sont traitées avec la rapamycine**, nous n'avons pas observé plus d'expression de HIF-2 α dans les cellules tumorales que dans les conditions témoin respectives de chaque lignée.

Ces résultats confirment ce que nous avons montré *in vitro*, avec une induction de HIF-2 lors du traitement par cetuximab dans la lignée résistante SQ20B.

c) Cinétique d'accumulation de HIF-2 par le cetuximab

Nous avons montré, dans l'article (figure 3), une accumulation de HIF-2 α *in vitro* après 4h de traitement par du cetuximab. Nous avons poursuivi cette étude par une analyse en cinétique (0, 2h, 4h, 16h et 24h) de l'accumulation de cette sous-unité par immunofluorescence. Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI, et un marquage de HIF-2 α à été réalisé en utilisant un anticorps primaire spécifique, et un anticorps secondaire couplé à la cyanine 3 (fluorescence rouge). L'intensité du signal a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ® et rapportée au nombre de noyaux comptés. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et les résultats obtenus devront être confirmés. Néanmoins, cette réponse différentielle avait déjà été observé dans d'autres expériences 4h, 8h, 24h, et 48h après traitement par cetuximab (La figure 3 de l'article représente les résultats à 4h).

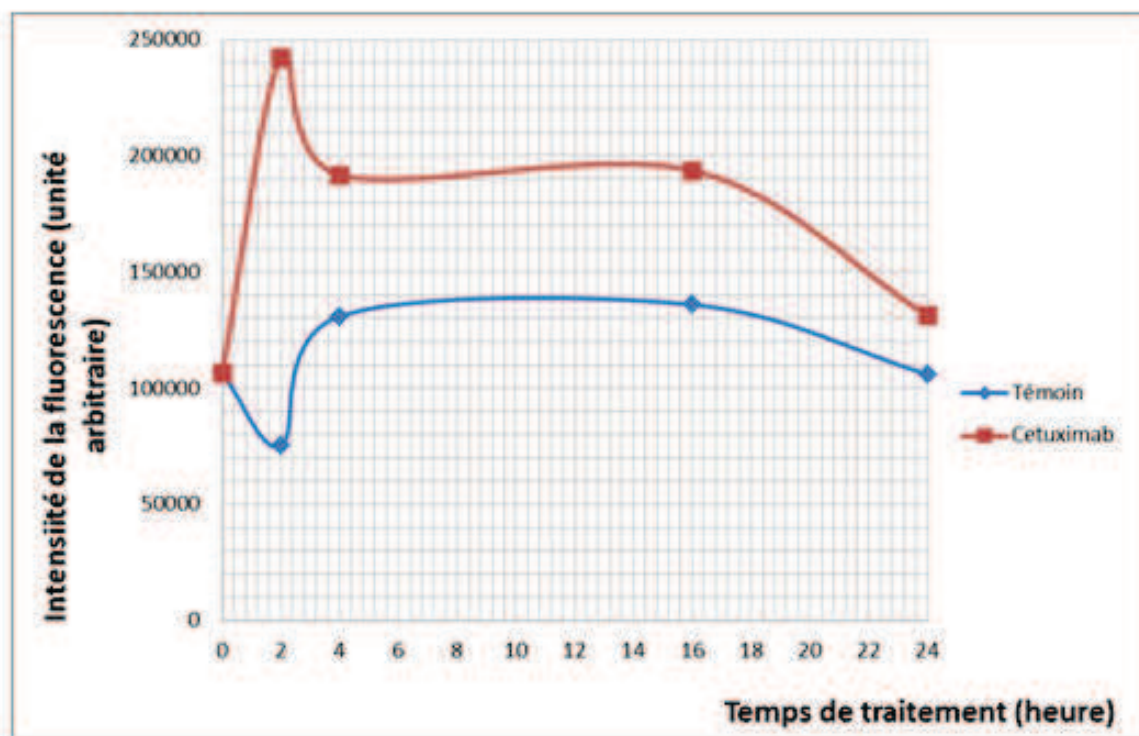


Figure 30: Cinétique d'accumulation de HIF-2 après traitement par cetuximab. L'intensité du signal basal se trouve aux alentours de 100000 unités arbitraires. L'accumulation de HIF-2 est plus importante en présence de cetuximab, avec un pic d'intensité du signal entre 2h et 4h, avant de décroître à la 24^{ème} heure

L'accumulation de HIF-2 α intervient à des temps précoces, après le début du traitement par cetuximab, avec un pic dès la deuxième heure. L'intensité de marquage décroît à partir de 4h après le traitement, tout en restant à un niveau plus élevé que le niveau basal jusqu'à la 24^{ème} heure.

Compte tenu des résultats de cette cinétique, il semble peu probable que l'accumulation de la sous-unité HIF-2 α soit due uniquement à une augmentation de la transcription et/ou de la traduction de la protéine. D'autres mécanismes peuvent être envisagés, en particulier une diminution de la dégradation (de la sous-unité α). Cette hypothèse devra être vérifiée.

Lorsqu'on met en regard cette cinétique avec les résultats d'induction de HIF-2 observés *in vivo* sur le matériel prélevé, nous observons dans un cas une décroissance de l'induction de l'accumulation de HIF-2 α *in vitro* au bout de 24h. Dans l'autre cas, *in vivo*, 3 jours après le dernier traitement par cetuximab, l'induction de HIF-2 est toujours présente. Cette variation entre les deux modèles *in vitro* et *in vivo* peut s'expliquer en partie par la pharmacocinétique du cetuximab chez la souris. En effet, une étude de pharmacocinétique chez la souris montre que le temps de $\frac{1}{2}$ vie ($T_{1/2}$) du cetuximab est de 40h avec un faible volume de distribution ($V_d=0.065L/Kg$) suggérant que l'anticorps reste dans le

compartiment plasmatique avec une faible diffusion tissulaire, et encore moins tumorale. Les auteurs concluent que les doses optimales à utiliser pour un effet antitumoral doivent être supérieures à 0.25mg/3jours en IV¹⁶⁰. Dans notre étude, au bout de 80h, soit 2T½, le quart de la dose administrée est toujours disponible. Les concentrations en cetuximab seraient donc dans le même ordre de grandeur que ceux d'une dose considérée comme active (0.25mg). Il est donc très probable qu'avec une dose de 1mg/3j, le cetuximab soit au bout de 80h, encore biodisponible et capable de se fixer aux cellules tumorales.

d) Analyse des effets de la Rapamycine sur les voies de signalisations oncogénique

De nombreuses études ont montré que l'activation des voies de signalisation oncogéniques, en particulier les voies PI3K/Akt et Ras/MAPK, pouvait induire l'accumulation de HIF-1 α . Un des objectifs de ce travail a donc été de vérifier s'il existait une corrélation entre l'effet antitumoral observé, en particulier après ajout de la rapamycine et une inhibition de ces voies.

Doses croissantes et cinétique d'activation des voies de signalisation par la rapamycine seule:

L'inhibition de mTOR par la rapamycine peut induire une réactivation des voies de signalisation oncogéniques via IRS-1. Les voies de signalisation étant responsables d'une transmission de signaux de survie cellulaire, nous avons voulu savoir dans quelle mesure ces voies de signalisation sont perturbées par de faibles doses de rapamycine. Pour cela, nous avons analysé le rapport d'expression entre la forme phosphorylée et la quantité totale de protéines d'intérêt par western blot dans les lignées SQ20B et CAL27 cultivées en hypoxie (1% O₂). Les protéines analysées sont AKT et ERK, qui agissent respectivement en aval des voies PI3K/AKT et des MAPK. Nous avons complété cette analyse par l'étude de l'expression de PS6RP, utilisé comme marqueur de l'inhibition de mTOR par la rapamycine. L'activité de la rapamycine étant rapide, nous avons choisi de réaliser une cinétique entre 5 minutes et une heure post-traitement. Nous avons de plus analysé les variations de ces voies avec des concentrations plus élevées de rapamycine sur la lignée SQ20B.

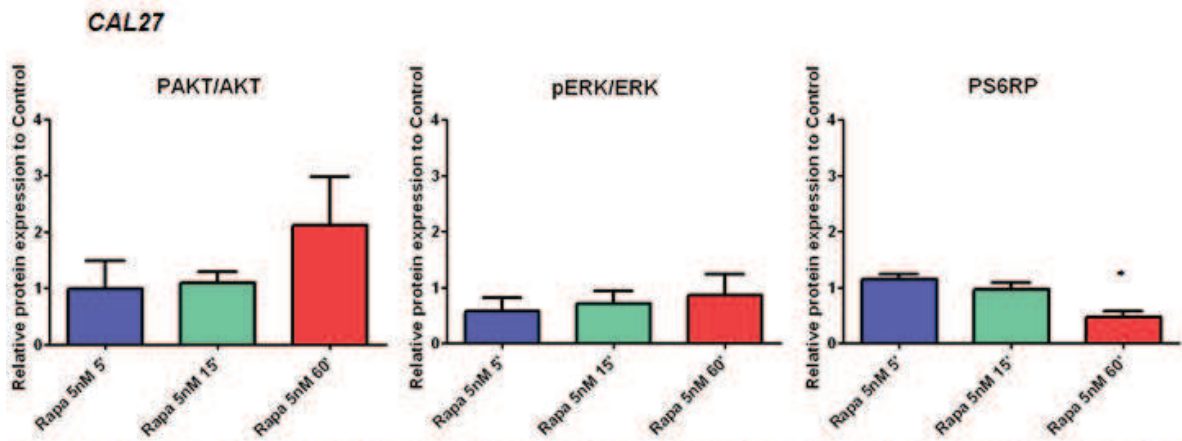


Figure 31: Cinétique d'activation de ERK, AKT et PS6RP avec 5nM de rapamycine sur CAL27. Les voies de signalisation étudiées sont la voie PI3K/AKT par analyse de la phosphorylation d'AKT par rapport à AKT total, et la voie des MAPK, par l'analyse de la phosphorylation de ERK par rapport à ERK total. L'analyse de l'inhibition de la phosphorylation de PS6RP nous permet de montrer l'activité de la rapamycine sur mTOR. Nous avons analysé ces effets à 5 minutes, 15 minutes et 60 minutes après traitement.

- Dans le cas de la lignée CAL27, l'effet de la rapamycine sur l'inhibition de la phosphorylation de S6RP est observé au bout d'une heure ($p < 0.05$), tout comme l'activation d'AKT doublée au bout d'une heure. Néanmoins, cette activation d'AKT n'est pas significative et peu de variations sont observées sur l'activation de ERK.

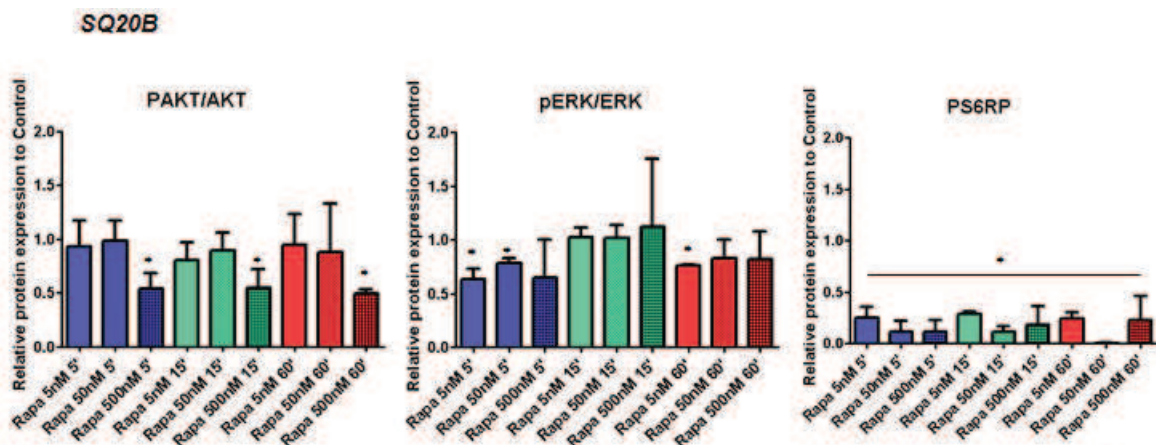


Figure 32: Cinétique d'activation de ERK, AKT et PS6RP avec des concentrations croissantes de rapamycine. Les variations dans la voies PI3K/AKT par la rapamycine se fait à des concentrations élevées (500nM), et permet d'inhiber la voie de 50% rapidement dès la cinquième minute. La voie des MAPK semble être peu impacté par la rapamycine quelque soit la dose. L'inhibition de PS6RP se fait rapidement, dès la cinquième minute et avec les plus faibles doses.

- Dans le cas de la lignée SQ20B, l'inhibition de la phosphorylation de S6RP est observée dès la 5^{ème} minute ($p < 0.05$). La phosphorylation de ERK et AKT est peu impactée par la rapamycine à 5nM. C'est à partir de 500nM que l'on observe des modifications de phosphorylation d'AKT, avec une inhibition de 50% ($p < 0.05$), sans qu'aucune variation importante ne soit notée sur la phosphorylation de ERK quelle que soit la dose.

Une des limites à l'utilisation des inhibiteurs de mTOR est l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif, qui aboutit à la phosphorylation d'AKT et à sa réactivation. Nous montrons ici dans nos modèles, que de faibles doses de rapamycine permettent une inhibition de mTOR de plus de 75%, sans impact sur l'activation de protéines ERK et AKT. Au contraire, une inhibition de l'activité d'AKT est obtenue à des doses 100 fois plus importantes, sans pour autant induire une plus franche inhibition de PS6RP. Ces résultats *in vitro* sont favorables à l'utilisation des inhibiteurs de mTOR à de plus faibles doses, selon le concept de chimiothérapie métronomique, dès lors que PS6RP est inhibée de manière suffisante. Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre la cinétique jusqu'à obtenir une réactivation de PS6RP, ce qui permettrait d'estimer la durée d'action de la rapamycine et de suivre à des doses croissantes le phénomène de rétrocontrôle, qui se traduit par l'activation des voies. Cette expérience nous permettrait d'estimer dans cette lignée, la dose optimale de rapamycine, c'est-à-dire celle qui permet d'être efficace, le plus longtemps possible, sans pour autant induire de rétrocontrôle.

Effets de la rapamycine associés au cetuximab sur les voies de signalisations

L'utilisation de la rapamycine à de faibles doses montrait peu d'impact sur l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation. L'ajout du cetuximab permet-il une inhibition plus efficace de celles-ci ?

Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une analyse de l'expression des formes phosphorylées et non phosphorylées d'AKT et ERK, par Western blot, après traitement isolé ou combiné du cetuximab et de la rapamycine en hypoxie (1% O₂ pendant 48h) sur la lignée SQ20B.

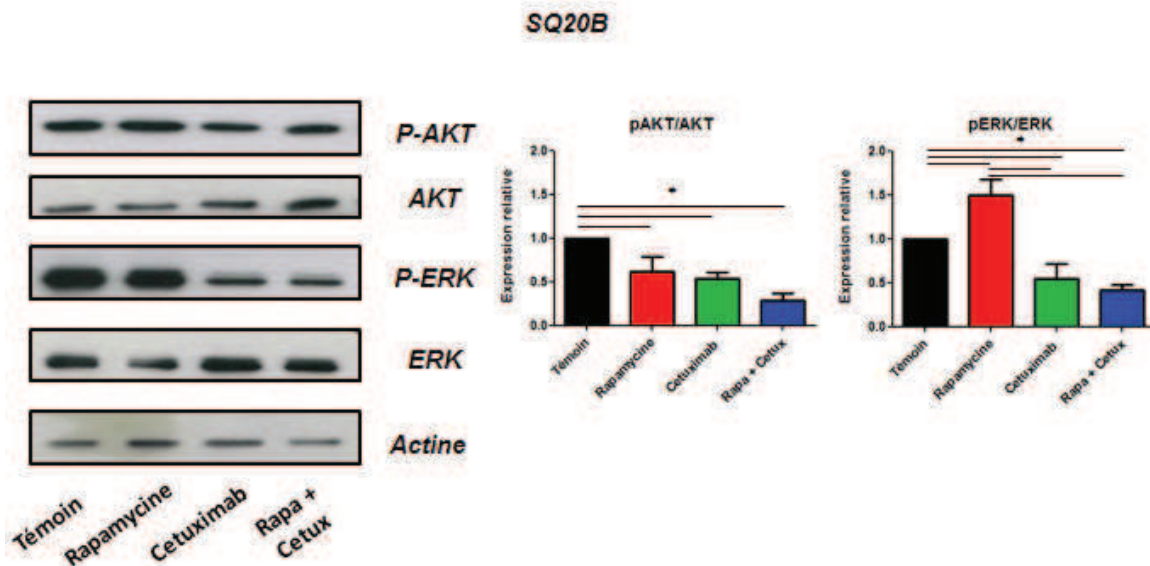


Figure 33: Analyse de l'inhibition de ERK, et AKT après traitement (48h) dans des conditions d'hypoxie à 1% en oxygène (Lignée SQ20B). L'utilisation de la Rapamycine seule induit une réactivation de SQ20B à 48h. Cet effet n'était pas observé à 24h après traitement (voir figure). Le cetuximab seul et la combinaison cetuximab + rapamycine inhibent de 50% les voies de signalisation oncogénique.

- La rapamycine utilisée seule modifie peu la phosphorylation d'AKT dans la lignée SQ20B ($p < 0.05$). En revanche, on note une augmentation de 50% du niveau de phosphorylation de ERK ($p < 0.05$). Le cetuximab inhibe la phosphorylation d'AKT, et celle de ERK. La combinaison des drogues permet une diminution d'au moins 50% du niveau de phosphorylation des deux protéines ($p < 0.05$).

L'utilisation de combinaison de drogues peut avoir des effets additifs ou synergiques, mais peut aussi induire des effets délétères. Ici nous montrons que ces deux traitements potentialisent leurs effets respectifs: Le cetuximab, permet une inhibition des voies de signalisation en aval de l'EGFR et la rapamycine permet de potentialiser cet effet inhibiteur. Nous avons montré dans l'article une inhibition de l'accumulation de HIF-1 48h après traitement par la combinaison rapamycine/cetuximab en condition hypoxique. L'ensemble des résultats obtenus suggèrent donc que cette inhibition pourrait être due à la baisse de l'activation d'AKT et ERK d'une part, et à l'inhibition spécifique de mTOR par la rapamycine d'autre part.

e) Effet de la combinaison rapamycine + cetuximab associé aux rayonnements ionisants sur l'activation des voies de signalisation oncogéniques

Les rayonnements ionisants ont été décrits comme étant capables d'activer les voies de signalisation oncogéniques Ras/MAPK¹⁶¹ et PI3K/Akt¹⁷. Nous avons donc analysé de la même manière que précédemment, l'impact de l'association radiothérapie + chimiothérapie

(rapamycine + cetuximab) sur l'activation de ces voies. L'analyse par western blot a été réalisée sur des protéines extraites 48h après le traitement par chimiothérapie, et ce à partir de cellules cultivées en normoxie et en hypoxie.

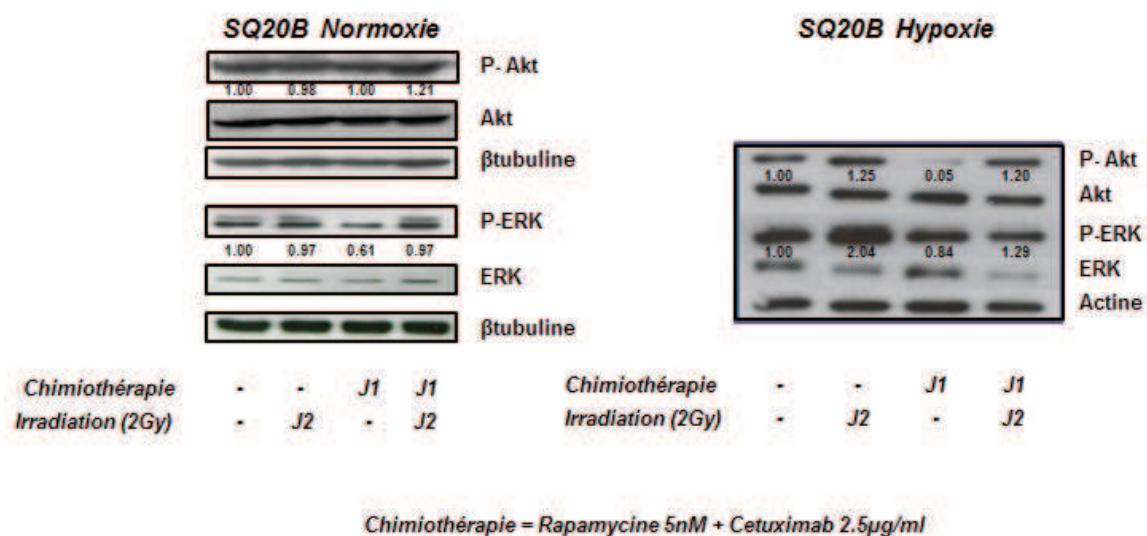


Figure 34: Analyse de l'activation de ERK et AKT 48h après traitement en normoxie et hypoxie (SQ20B). L'association de drogues permet d'annuler l'effet activateur de la voie ERK par l'irradiation seule dans les conditions d'hypoxie.

- **Dans le cas de la lignée SQ20B**, l'impact de l'association des drogues sur les voies de signalisation est plus important en hypoxie qu'en normoxie ce qui suggère un bénéfice plus important des drogues dans les conditions où les mécanismes de résistances vont être prononcés, à savoir de faibles pressions en oxygène. C'est aussi en hypoxie où l'on observe les effets les plus marqués de l'irradiation, notamment sur l'induction d'une forte phosphorylation de ERK. La radiochimiothérapie permet, quelle que soit la condition expérimentale, d'avoir un niveau de phosphorylation de ERK de ces voies proche du niveau basal.

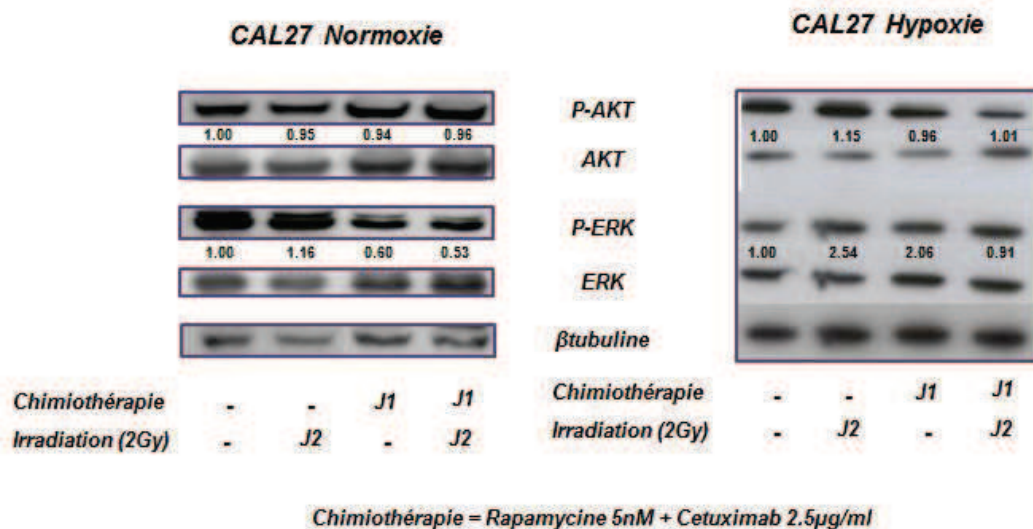


Figure 35: Analyse de l'activation de ERK et AKT 48h après traitement en normoxie et hypoxie (CAL27). L'association de drogues permet d'annuler l'effet activateur de la voie ERK par l'irradiation seule dans les conditions d'hypoxie

- **Dans les cellules CAL27**, traitées par la rapamycine en normoxie, on observe une diminution de l'expression de la forme phosphorylée de ERK, et une augmentation de celle-ci en hypoxie. Alors que la phosphorylation de ERK est très induite après irradiation en hypoxie, la radiochimiothérapie permet, comme pour les cellules SQ20B, un contrôle de l'activation de ERK.

Aux temps étudiés, nous observons uniquement une induction de la phosphorylation de ERK, suggérant une activation de la voie des MAPK en hypoxie. Nous montrons que l'utilisation combinée irradiation + cetuximab + rapamycine permet de contrôler l'induction de ces voies. Il est probable que ce contrôle de l'activation des voies oncogéniques est associé à une plus faible induction de HIF-1 α , et donc une plus faible radiorésistance.

L'impact du niveau d'activation des voies de signalisation oncogénique sur l'accumulation de HIF-1, dépend de la lignée cellulaire analysée. En effet, le niveau d'accumulation de HIF-1 étant faible dans la lignée CAL27 en hypoxie, il est peu probable que l'apport de la combinaison de traitement sur l'inhibition de HIF-1 α via l'inhibition d'activation des voies oncogéniques soit plus important que pour SQ20B. Enfin, il faut noter qu'il existe une activation de la voie des MAPK propre à l'hypoxie (voir figure 24), et que bien que la combinaison permette un retour à un niveau basal en hypoxie, la voie des MAPK est tout de même activée comparé à la normoxie.

f) Effet des traitements combinés et de l'irradiation sur l'activité transcriptionnelle des facteurs HIFs :

L'accumulation des facteurs HIFs est régulée en partie par les voies de signalisation oncogéniques. Nous avons montré que nos combinaisons limitent l'impact de ces voies et permet une diminution de l'accumulation de HIF-1 α . Dans quelle mesure cet effet a-t-il un impact sur l'activité transcriptionnelle des HIFs et sur l'induction de l'expression de leurs gènes cibles ? De plus, la sensibilisation aux radiations ionisantes recherchée par l'utilisation de la combinaison de drogues repose sur l'inhibition de HIF-1 α . Nous avons montré dans l'article soumis que HIF-2 joue un rôle prépondérant dans le phénomène de résistance au cetuximab de la lignée SQ20B. L'induction de HIF-2 α suite aux traitements par irradiation ou par le cetuximab peut être consécutive, en partie, à une activation de l'expression du gène *EPAS1* codant HIF-2. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse de l'expression des gènes induits par les traitements dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées lors de l'analyse de la survie clonogénique (Figure 2A de l'article soumis), et ce sur les deux lignées.

Activité de l'expression des facteurs HIF-1 et HIF-2 au niveau ARN après traitements :

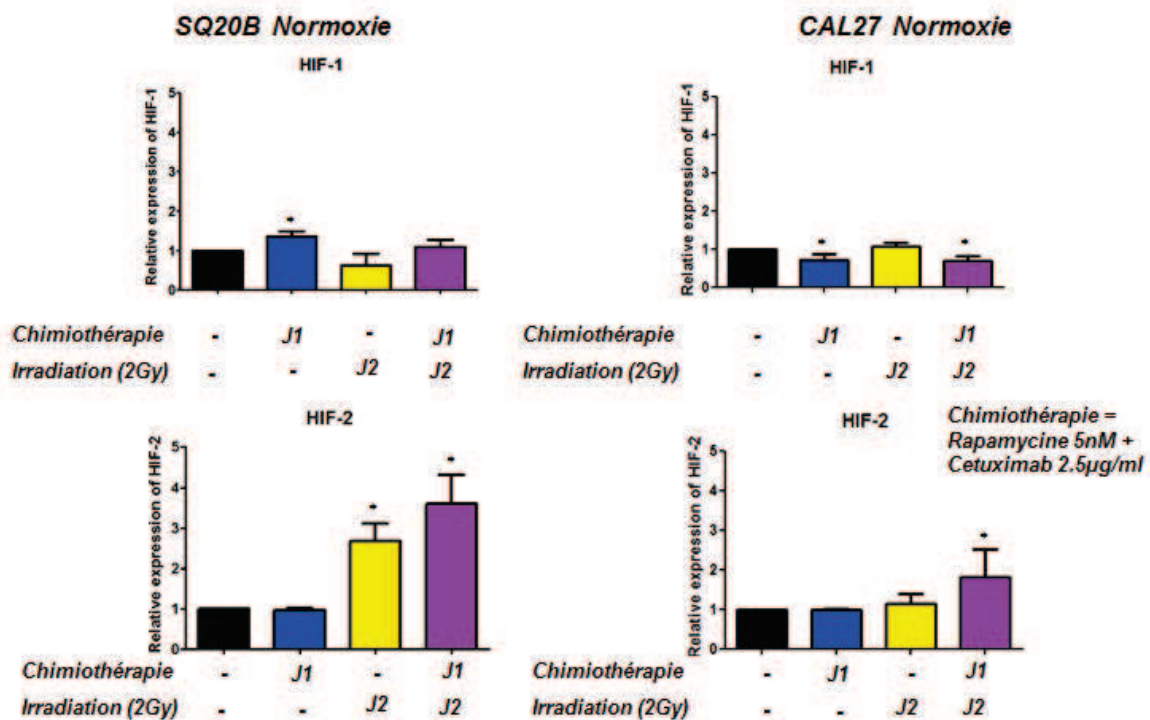


Figure 36 : Expression transcriptionnelle de HIF-1 et HIF-2 dans les conditions des tests de survie clonogénique à 20% en O₂ pour les deux lignées SQ20B et CAL27. L'irradiation induit une augmentation de l'expression de HIF-2 dans la lignée SQ20B. Cet effet n'est pas observé pour la lignée CAL27.

- Les traitements (chimiothérapie et/ou radiothérapie) sont sans effet significatif sur l'expression du gène codant HIF-1 α dans les deux lignées (augmentation ou diminution de moins de 30% par rapport au contrôle).
- La combinaison cetuximab + rapamycine n'a pas d'impact sur la transcription du gène *EPAS1* dans les deux lignées. En revanche, on note une augmentation par un facteur trois de l'expression du gène *EPAS1* après irradiation de la lignée radiorésistante SQ20B ($p < 0.05$). Cet effet n'est pas observé lorsqu'on irradie la lignée radiosensible CAL27. La combinaison des traitements de chimiothérapie et d'irradiation augmente l'expression du transcrite codant HIF-2 α dans les deux lignées, de manière plus importante pour la lignée résistante SQ20B ($p < 0.05$).

En résumé, le cetuximab et l'irradiation induisent la protéine HIF-2 (figure 3 de l'article soumis) dans la lignée résistante. Le mécanisme de cette induction est différent selon le traitement. L'irradiation augmente la transcription du gène *EPAS1* alors que la combinaison cetuximab + rapamycine n'a pas d'impact au niveau ARN, mais uniquement au niveau protéique.

L'induction de la formation du complexe HIF-2 α /HIF- β suite aux traitements par l'association cetuximab + rapamycine et mis en évidence par les expériences d'immunoprécipitation (voir figure 3C de l'article) pourrait donc être due :

- à une induction de la traduction de la sous unité α ,
- à une diminution de sa dégradation (stabilisation)

Activité transcriptionnelle des gènes cible des facteurs HIFs après traitements :

Nous avons mis en évidence une réponse différentielle entre les lignées CAL27 et SQ20B après traitement par du cetuximab +/- irradiation, avec une augmentation importante de l'expression transcriptionnelle de HIF-2 dans la lignée SQ20B, et une réponse plus faible voire nulle dans la lignée CAL27. L'accumulation de la protéine seule n'est pas suffisante pour démontrer son activité transcriptionnelle, nous avons donc analysé l'expression de gènes cibles de HIF-1 et HIF-2. Ces deux facteurs de transcription régulent l'expression d'un panel de gènes cibles communs, nous avons donc dans un premier temps réalisé une analyse de l'expression de certains de ces gènes : *SLC2A1* (qui code pour la protéine de transport du glucose GLUT-1, dont l'expression est contrôlée par HIF-1 et HIF-2¹¹⁵) et *VEGF-A* (une protéine impliquée dans l'angiogénèse, dont l'expression dépend de HIF-1 et HIF-2¹¹⁵). De plus nous avons également analysé l'expression de *MET*, dont

l'expression a été associée à la résistance au cetuximab¹⁵⁵. Enfin, nous avons également analysé l'expression d'EGFR pour vérifier s'il existe une régulation du récepteur par les facteurs HIFs dans nos modèles cellulaires. L'analyse de l'expression de ces gènes a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel à partir d'extraits d'ARN de cellules CAL27 et SQ20B traitées par cetuximab +/- rapamycine, avec ou sans irradiation.

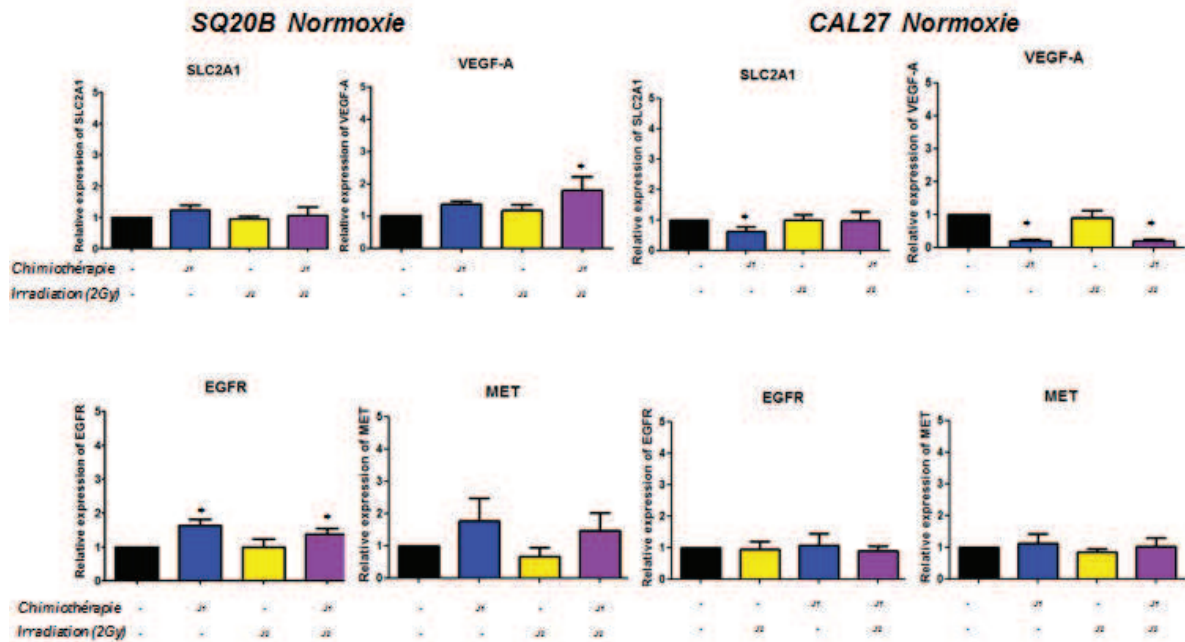


Figure 37: Expression transcriptionnelle de gènes cibles des HIFs, d'EGFR et MET, dans les conditions des tests de survie clonogénique à 20% en O₂ pour les deux lignées SQ20B et CAL27. L'expression de VEGFA est inversée entre la lignée résistante et la lignée sensible. Aucune variation d'expression des gènes EGFR et MET n'a été observé dans la lignée sensible alors que la combinaison de drogue induit leur expression.

- **L'expression de SLC2A1** n'est pas modifiée par les traitements quelle que soit la lignée, sauf pour la lignée CAL27 traitée par la combinaison de drogue (diminution de 40% p<0.05).
- **L'expression de VEGF-A** est augmentée de 80% dans la lignée SQ20B après traitement par la combinaison de drogues +/- irradiation (p<0.05). A contrario, nous observons l'effet inverse pour CAL27 lorsque les cellules sont traitées avec la combinaison de drogue ou la combinaison de drogues + irradiation (p<0.05).
- **L'expression de MET et d'EGFR** n'est pas modifiée dans la lignée CAL27, alors qu'une augmentation de l'expression d'EGFR est observée dans la lignée SQ20B lors des traitements par rapamycine + cetuximab associé ou non à l'irradiation. L'irradiation seule n'induit pas l'expression de ces gènes.

En conclusion, nous avons montré que :

-Les drogues sont responsables d'une inhibition de l'accumulation de HIF-1 α dans les deux lignées à 48h (cf figure supplémentaire 3 C).

-le complexe HIF-2 est formé en réponse à un traitement par cetuximab de la lignée SQ20B (cf figure 3C), 24h après traitement.

-l'accumulation de HIF-2 α semble décrire une cinétique avec une réponse franche et rapide après traitement par cetuximab. Cette accumulation diminue dans le temps.

A partir de ces données, nous pouvons proposer une hypothèse expliquant l'expression différentielle du gène *VEGF-A* en fonction de la lignée : pour SQ20B, l'augmentation d'expression de *VEGF-A* pourrait être due à l'accumulation de HIF-2 α plus faible à 48h. Pour CAL27, la diminution de son expression pourrait être due à l'inhibition de HIF-1, sans que HIF-2 ne prenne le relai de manière significative. Nous reviendrons par la suite sur cette hypothèse.

Enfin, l'augmentation de l'expression d'*EGFR* et de *MET* (non significatif) consécutivement au traitement par le cetuximab et la rapamycine est cohérente avec les données de la littérature, où l'augmentation de l'expression de HIF-2 est associée à une augmentation de l'expression de ces gènes¹⁶². Néanmoins, dans la condition irradiée, nous n'observons pas d'induction de l'expression de ces gènes. L'augmentation d'expression de ces gènes serait donc plutôt dépendante des traitements par la rapamycine et/ou le cetuximab que des facteurs HIFs. De plus, l'induction de *MET* et d'*EGFR* par le cetuximab a déjà été montré dans différentes publications, et serait un des mécanismes de résistance aux anti-*EGFR*¹⁵⁵.

Ces résultats préliminaires sont actuellement complétés par une analyse de l'expression de gènes cibles spécifiques de HIF-2 potentiellement impliqués dans l'échappement au traitement par anti-*EGFR* et dans la progression tumorale.

Afin de confirmer le rôle des facteurs HIFs dans la survie cellulaire et la résistance au traitement, nous avons poursuivi notre travail par une analyse des effets d'une inhibition ciblée de HIF-1 et HIF-2 par ARN interférence.

g) Analyse fonctionnelle d'une inhibition directe des facteurs HIFs par siRNA

La diminution de l'accumulation de HIF-1 α par le cetuximab et la rapamycine corrèle avec une inhibition efficace de l'axe *EGFR*/mTOR, cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie des effets antitumoraux de la combinaison soit au moins partiellement indépendante de HIF-1 α . Afin de montrer l'implication des facteurs HIFs dans les

mécanismes de survie et de résistance, nous avons choisi de les inhiber spécifiquement et de manière directe en utilisant des ARN interférants (siRNA).

Compte tenu de l'homologie de séquence entre HIF-1 α et HIF-2 α , nous avons testé l'efficacité et la spécificité de chaque siRNA isolément ainsi que leur combinaison. Cette efficacité a été évaluée en mesurant, dans chaque lignée, le niveau d'expression des gènes codant HIF-1 α et HIF-2 α par qRT-PCR, ainsi que celui des gènes cible déjà étudiés ci-dessus. Nous avons réalisé cette expérience 48h après transfection des cellules par les siRNA, ce qui correspond au pic d'inhibition (déterminé dans des expériences de mise au point entre 24 et 72h post transfection).

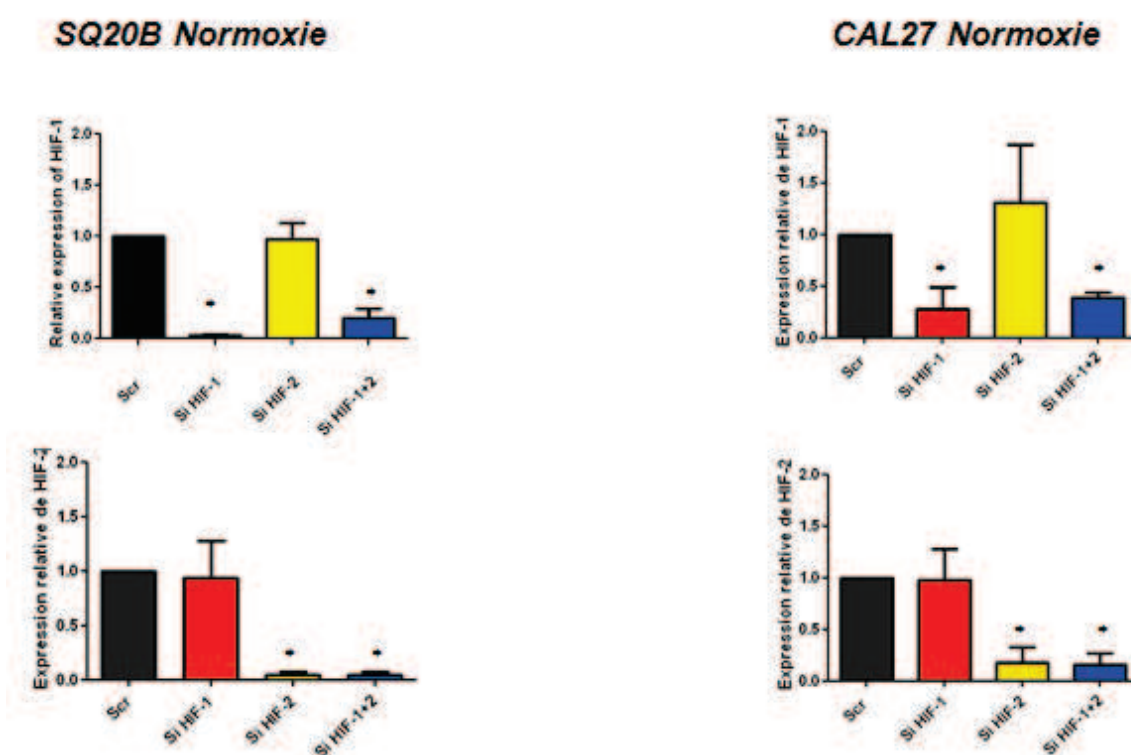


Figure 38: Expression transcriptionnelle des gènes HIF1A et EPAS1 après traitement par siRNA, dans les lignées SQ20B et CAL27. Les expressions des gènes sont relatives au Scramble, utilisé comme témoin de transfection.

- Le siRNA anti-HIF-1 α permet d'obtenir une inhibition efficace de l'expression de HIF-1 α (<90%) sans effet sur l'expression de HIF-2 α .
- Le siRNA anti-HIF-2 α permet une inhibition efficace de l'expression de HIF-2 sans effet sur HIF-1.

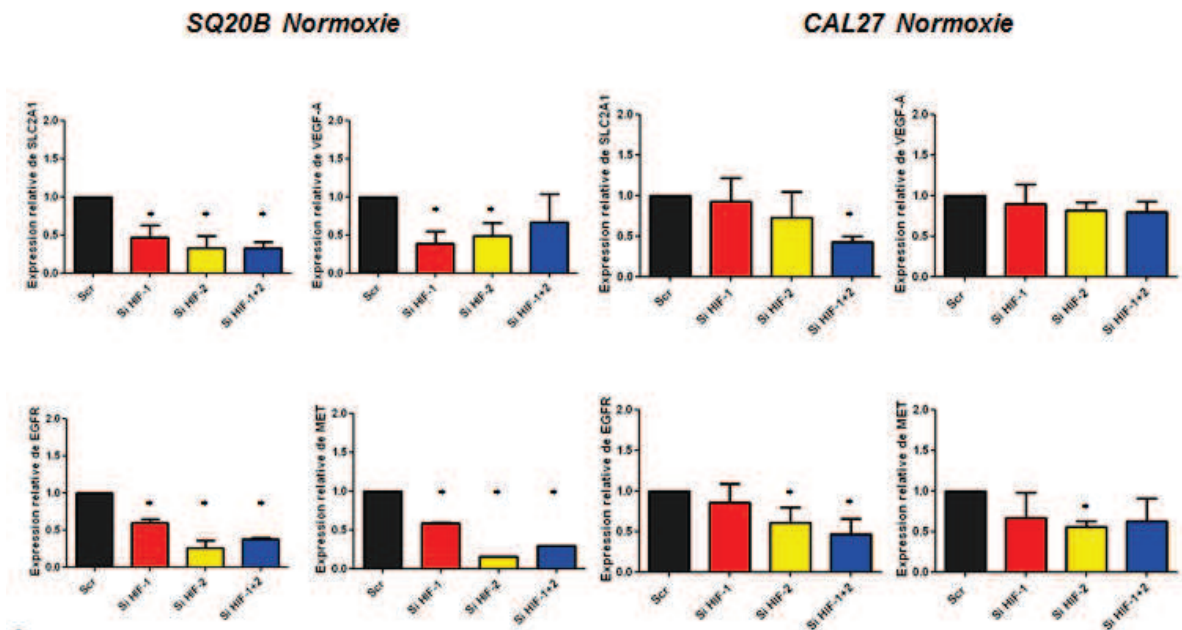


Figure 39 : Expression transcriptionnelle des gènes cibles des HIFs, d'EGFR et MET après traitement par siRNA, dans les lignées SQ20B et CAL27. Les expressions des gènes sont relatives au Scramble, utilisé comme témoin de transfection.

- **L'inhibition respective de HIF-1 α et HIF-2 α induit une diminution de l'expression de *SLC2A1*, *VEGF-A*, *EGFR* et *MET* dans la lignée SQ20B. Cette inhibition est plus importante avec le siRNA anti-HIF-2 α et n'est pas significativement modifiée par l'inhibition combinée de HIF-1 et HIF-2.**
- **La lignée SQ20B est plus sensible à l'inhibition des HIFs, comme le montre la diminution importante de l'expression des gènes codant l'EGFR et Met.**
- **Dans la lignée CAL27, l'inhibition isolée des HIFs semble avoir peu d'impact sur l'expression de leurs gènes cibles, suggérant que l'effet du cetuximab sur la lignée CAL27 est indépendant de HIF-1 α . Seule l'inhibition isolée de HIF-2 α induit une diminution de l'expression d'EGFR et de MET et la combinaison des deux siRNA, accroît l'inhibition de *SLC2A1*, et *EGFR*.**

Les inhibitions combinées des facteurs HIFs par siRNA, sur la lignée CAL27, ne permettent pas de reproduire les résultats obtenus avec les traitements par le cetuximab et la rapamycine en particulier pour *VEGF-A*. Ces résultats renforcent l'hypothèse qu'une partie des effets antitumoraux de la combinaison cetuximab + rapamycine sont indépendant d'une inhibition de l'accumulation de HIF-1 et pourraient être expliqués par l'inhibition des voies Ras/MAPK et/ou PI3K/Akt.

Analyse du rôle de HIF-1 dans la survie clonogénique :

Les effets antitumoraux de la combinaison cetuximab + rapamycine en association avec l'irradiation sont-ils exclusivement dus à l'inhibition de l'accumulation de HIF-1 α ? Pour répondre à cette question, nous avons testé l'effet de l'inhibition spécifique de HIF-1 α par siRNA sur la survie clonogénique de manière similaire aux expérimentations qui font l'objet de la figure 2A de l'article.

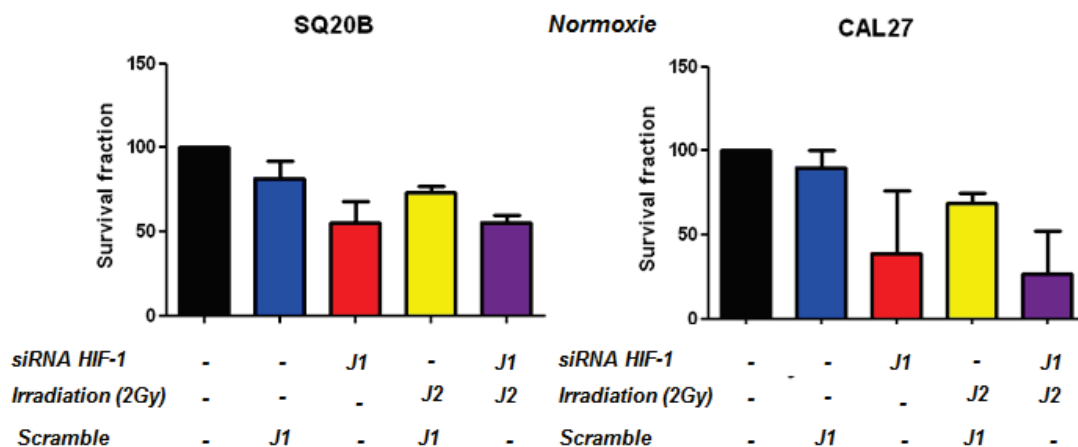


Figure 40 : Test de survie clonogénique des lignées CAL27 et SQ20B avec siRNA anti-HIF-1, et ou irradiation. Le Scramble est utilisé comme témoin de transfection.

- **Le siRNA anti-HIF-1 α** induit une diminution de la fraction de survie de 55% dans les deux lignées, ce qui est beaucoup plus important que ce que nous avons obtenue avec la combinaison rapamycine + cetuximab (pas de modification de la fraction de survie dans la lignée SQ20B, et diminution faible de la fraction de survie dans la lignée CAL27).
- **L'ajout de l'irradiation ne permet pas d'obtenir plus d'effet** que le siRNA anti-HIF-1 α seul.

Ces résultats confortent ce que nous avons observé précédemment. La re-sensibilisation des cellules aux radiations ionisantes est obtenue par l'utilisation des drogues, dont l'une des conséquences est l'inhibition de HIF-1 α , mais l'inhibition seule de HIF-1 α n'est pas suffisante pour expliquer les mécanismes de la radiosensibilisation. Ces résultats suggèrent également que l'action des drogues sur la survie clonogénique est efficace uniquement en association avec l'irradiation (SQ20B). Nous avons montré que cette association permettait de limiter les effets inducteurs de l'irradiation sur l'activation des voies de signalisation oncogéniques. Cet effet pourrait expliquer la plus grande diminution de la fraction de survie

dans la lignée SQ20B par les drogues associées aux rayonnements ionisants par rapport aux résultats obtenus avec le siRNA anti-HIF-1 associé aux rayonnements ionisants.

h) Analyse des effets de l'inhibition ciblée d'EGFR :

Plusieurs mécanismes de résistance au cetuximab ont été décrits, notamment la surexpression de dimères HER2-HER3. Le cetuximab étant activateur d'une résistance impliquant HIF-2 dans la lignée résistante SQ20B, il était intéressant de savoir si l'induction de HIF-2 est une conséquence de l'inhibition de l'activité d'EGFR. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre EGFR, et étudié leur impact sur l'expression des facteurs HIF-1 et HIF-2, d'*EGFR* (*HER1*), *HER2*, et *HER3*. Aucune amplification de *HER2*, *HER3*, et *HER4* n'est rapportée dans la littérature concernant SQ20B. Nous avons dans un premier temps réalisé ces expériences par RT-PCR quantitative, puis par marquage immunofluorescent. Malheureusement, les résultats obtenus par immunofluorescence étaient difficilement quantifiables. Je présenterai ici seulement les résultats des qRT-PCR réalisés deux fois.

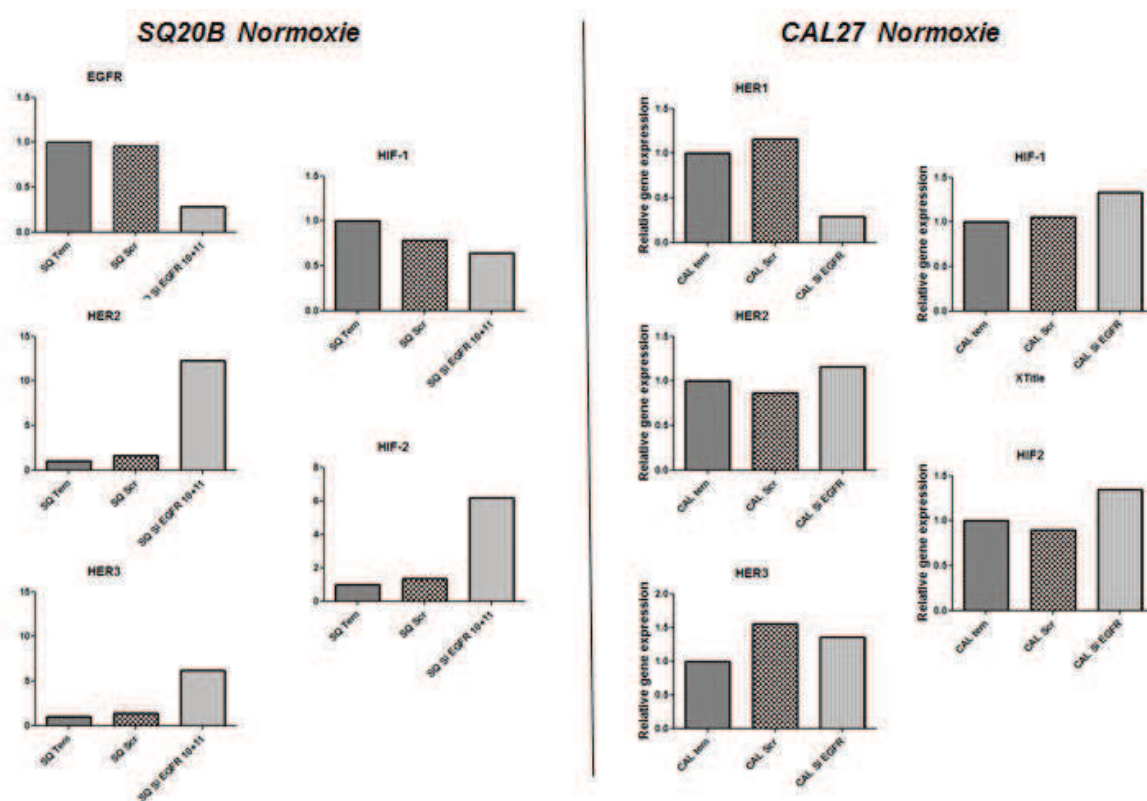


Figure 43: Expression transcriptionnelle d'*EGFR*, *HER2*, *HER3*, *HIF1A* et *EPAS1* (*HIF-2*) après inhibition par siRNA anti EGFR, dans les lignées SQ20B et CAL27. Les expressions des gènes sont relatives au Scramble, utilisé comme témoin de transfection.

L'ARN interférent utilisé est un mélange de deux ARN interférent #11 et #10 ciblant l'ARNm codant EGFR. Ceux-ci se sont révélés efficaces pour inhiber l'expression d'EGFR dans les deux lignées. A cette inhibition sont associés :

- une augmentation très importante de l'expression d'*HER2* et d'*HER3* dans la lignée SQ20B.

- peu de variation de l'expression d'*HER2* et *HER3* dans la lignée CAL27

- une légère augmentation de l'expression d'*EPAS1* (HIF-2) dans les cellules CAL27, et une importante induction de d'*EPAS1* dans la lignée SQ20B.

La lignée résistante au cetuximab (SQ20B) surexprime *HER2* et *HER3* en réponse à une inhibition d'EGFR, ce qui n'est pas le cas pour la lignée sensible (CAL27). Cette surexpression a déjà été montrée dans la littérature dans des modèles de cancers des VADS, et participe à la résistance au cetuximab^{155,156}. De plus, l'inhibition d'EGFR induit une surexpression d'*EPAS1*, faible dans la lignée CAL27, et très importante (multipliée par 6) dans la lignée SQ20B. Nous avons montré que l'association du cetuximab à la rapamycine n'induisait pas l'expression d'*EPAS1* au niveau ARN, contrairement à ce qui est observé avec l'inhibition ciblée d'EGFR par siRNA. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

- C'est **l'association de la rapamycine au cetuximab qui empêche la surexpression d'*EPAS1***. Nous avons observé dans notre manuscrit (figure 3B) une moindre induction de l'expression de HIF-2 α lorsque les cellules sont traitées avec la rapamycine en plus du cetuximab. Nous avons attribué cet effet à une inhibition protéique de HIF-2 induite par la rapamycine, car les inhibiteurs de mTOR sont aussi inhibiteurs de la traduction, mais pas de la transcription. L'association à la rapamycine ne permet donc pas à elle seule d'expliquer ces différences.

- Le cetuximab est un inhibiteur de l'activité de l'EGFR, contrairement au siRNA** qui lui inhibe la traduction de l'ARN messager en protéine. En effet, de par sa nature d'anticorps, le cetuximab peut être internalisé avec le récepteur et suivre un processus de dégradation classique. On peut imaginer que la réaction cellulaire à cet effet va être d'induire une néosynthèse d'EGFR ainsi que le recrutement d'autres récepteurs comme *HER2* ou *HER3*, pour former des hétérodimères avec *HER1*¹⁶⁰. En ce qui concerne le siRNA, il va empêcher l'expression protéique et l'expression du transcrite d'EGFR à plusieurs étapes, et de manière continue. Or, la diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire observé après traitement par cetuximab, n'empêche pas EGFR de rester actif dans les vésicules d'internalisation.

L'ensemble de nos résultats confirme un lien entre HIF-2 et EGFR. Le blocage de l'EGFR entraîne dans les lignées une augmentation de l'expression de HIF-2. Cette augmentation est relative et dépendante du mécanisme d'inhibition de l'EGFR.

Certains auteurs ont déjà montré un lien entre EGFR et HIF-2, et ont notamment rapporté une diminution de l'efficacité du sorafénib, (un inhibiteur multikinase, agissant en particulier sur VEGFR, RET, et Raf-1) associée à une accumulation de HIF-2. Selon les auteurs HIF-2 induirait l'activation de l'axe TGF- α /EGFR, qui contribuerait à un échappement thérapeutique¹⁶³. Il s'agirait donc d'une activation indirecte de l'EGFR par HIF-2 via l'induction d'un ligand. . De façon similaire, il est possible que dans notre modèle de résistance induite par le cetuximab, l'accumulation de HIF-2 induirait l'activation de la voie du TGF- α . Pour confirmer le rôle de HIF-2 dans la résistance à l'inhibition ciblée d'EGFR, des expériences complémentaires associant les siRNA anti-EGFR et un inhibiteur pharmacologique de HIF-2 sont en cours d'évaluation.

En conclusion, nous montrons que dans la lignée résistante SQ20B, l'irradiation et le cetuximab induisent l'expression de HIF-2, ce qui constitue une réponse cellulaire aux traitements, et permet de résister à ces thérapeutiques. L'ajout de la rapamycine permet de limiter cette induction et de favoriser les effets du cetuximab et de l'irradiation. L'inhibition de l'EGFR semble être à l'origine de cette induction de l'expression de HIF-2. L'inhibition de HIF-2 permet d'améliorer les effets du cetuximab et de l'irradiation dans la lignée résistante.

A partir de ces observations, nous avons voulu tester l'intérêt et la faisabilité d'une inhibition de HIF-2 pour la prise en charge thérapeutique des cancers des VADS.

Tableau 8: Récapitulatif des expériences *in vitro*

In vitro	SQ20B					CAL27									
	HIF1, ARN PROT		HIF2 ARN PROT		Voies de signalisation	Gènes cibles	Survie	HIF1, ARN PROT		HIF2 ARN PROT		Voies de signalisation	Gènes cibles	Survie	
Rapamycine		--		0	↗ERK, ↘AKT ↘ERK, ↘AKT ↘ERK, ↘AKT				--		0				
Cetuximab		--		+++		85%			--		0				
RapaCetux	+	---	0	++		105%	SLC2A1 →, VEGF-A→, EGFR→, MET≈→	-	---	0	0	≈→AKT et ↘ERK (normoxie) ≈→AKT et ↗ERK (hypoxie)	SLC2A1 ↘, VEGF-A↘, EGFR→, MET→	90%	
Irradiation	0		++++	++++	→AKT et →ERK (normoxie) ≈→AKT et ↗ERK (hypoxie)	SLC2A1 →, VEGF-A→, EGFR→, MET→	83%	-		+	≈→AKT et ≈→ERK (normoxie) ≈→AKT et ↗↗ERK (hypoxie)	SLC2A1 →, VEGF-A→, EGFR→, MET→	65%		
Rapa + Cetux + Irr	0		++++	+++	→AKT et →ERK (normoxie) ≈→AKT et ≈→ERK (hypoxie)	SLC2A1 →, VEGF-A↗, EGFR↗, MET→	53%	0		++	≈→AKT et ↘ERK (normoxie) ≈→AKT et ≈→ERK (hypoxie)	SLC2A1 →, VEGF-A↘, EGFR→, MET→	61%		
SiRNA anti HIF-1	---		0			SLC2A1 ↘, VEGF-A↘, EGFR↘, MET↘	55%	---		0				40%	
SiRNA anti HIF-2	0		----			SLC2A1 ↘↘, VEGF-A↘↘, EGFR↘↘, MET↘↘	100%	0		----					
SiRNA HIF-1 et HIF-2	---		----			SLC2A1 ↘↘, VEGF-A↘↘, EGFR↘↘, MET↘↘	52%	---		----					
SiEGFR	0		++++					+		+					

Légende : - : diminution de l'expression ; ---- diminution très importante de l'expression ; 0 aucune modification de l'expression ; + augmentation de l'expression ; ++++ augmentation très importante de l'expression.

Chapitre II : Stratégie d'inhibition du facteur HIF-2.

Peu d'inhibiteurs spécifiques de HIF-2 existent à l'heure actuelle. Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser un inhibiteur allostérique de HIF-2 α synthétisé récemment par l'équipe de R. Bruick¹⁶⁴. Nous avons complété ce travail par une évaluation de l'intérêt de poisons du fuseau comme inhibiteurs indirects de l'activité transcriptionnelle de HIF-2.

I) Stratégie d'inhibition de HIF-2 par un inhibiteur allostérique :

L'équipe de R. Bruick a synthétisé un inhibiteur spécifique de HIF-2, apparenté aux benzimidazolés, qui se fixe sur la poche PAS-B de la sous-unité α , modifie la conformation tridimensionnelle de la protéine et empêche l'interaction avec HIF- β . Ces effets biologiques ont été montrés *in vitro* sur une lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire (Hep3B) pour des concentrations supérieures ou égales à 10 μ M. Compte tenu que l'inhibition est dose dépendante, pour nos expériences nous avons choisi une dose supérieure à 100 μ M.

Dans un premier temps, afin de vérifier l'efficacité de cet inhibiteur, nous avons analysé son effet sur l'interaction entre les sous-unités HIF-1 β et HIF-2 α . par immunoprécipitation de HIF- β à partir d'extraits protéiques de la lignée SQ20B, et révélation de HIF-2 α par western blot. En parallèle, nous avons réalisé une série de tests de survie clonogéniques dans les mêmes conditions que la figure 4B et C de l'article en remplaçant les siRNA anti-HIF-2 α par l'inhibiteur allostérique de HIF-2, et les siRNA anti HIF-1 α par la combinaison rapamycine + cetuximab.

a) Analyse de l'interaction HIF-1 α /HIF-2 β par immunoprécipitation :

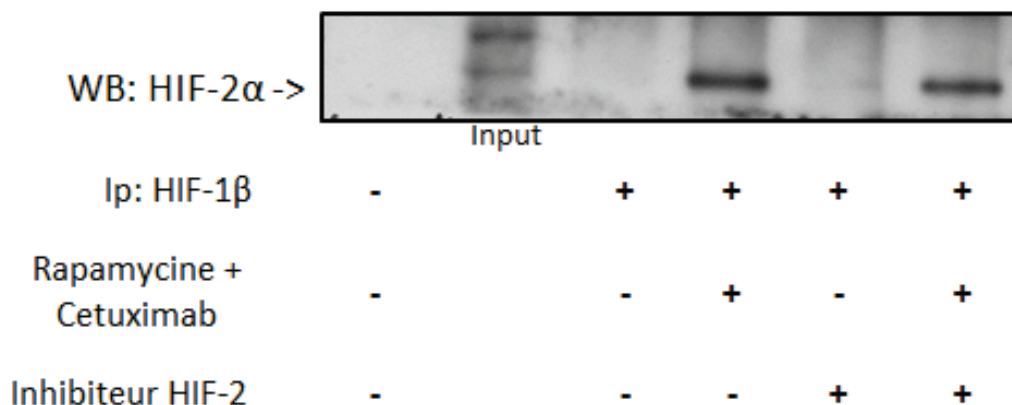


Figure 46 : Analyse de l'expression de HIF-2 α après traitement par Rapamycine + cetuximab et un inhibiteur de HIF-2. Les extraits protéiques totaux ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-HIF-1 β . Les protéines purifiées ont été révélées sur un western blot avec un anticorps anti-HIF-2 α .

- L'immunoprécipitation montre une diminution de l'expression du complexe HIF-2 lorsque l'on traite avec l'inhibiteur de HIF-2 en plus de la combinaison de drogues, versus la combinaison de drogues seule. Cependant cette diminution semble faible malgré des concentrations importantes d'inhibiteurs au regard de la publication de Scheuerman. La révélation concomitante de HIF- β nous permettra de conclure.

b) Analyse de la survie clonogénique après inhibition allostérique de HIF-2 :

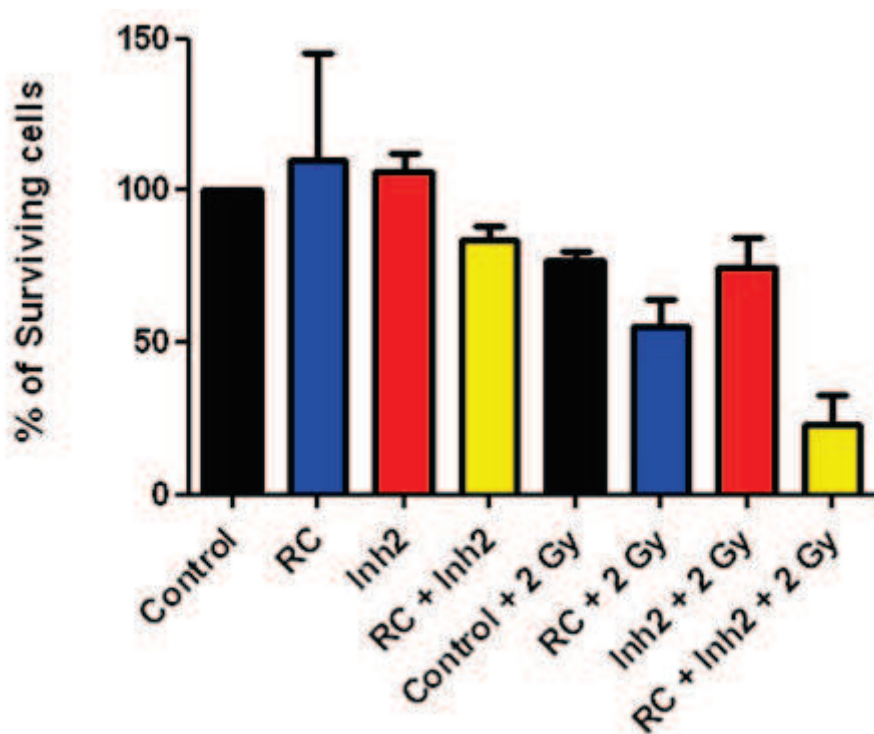


Figure 47 : Test de Survie Clonogénique de la lignée SQ20B traitée par l'inhibiteur de HIF-2, la rapamycine + cetuximab, et l'irradiation.

- Les tests de survie clonogéniques sont en adéquation avec ce que nous avons montré dans l'article. L'inhibiteur de HIF-2 seul n'a pas d'impact sur la survie clonogénique, en revanche son association aux drogues et à l'irradiation améliore leurs effets avec une survie de 23% contre environ 50% pour la combinaison Rapamycine/Cetuximab + irradiation. L'utilisation de l'inhibiteur allostérique de HIF-2 avec la combinaison de drogue permet de diminuer la fraction de survie à 83%. Compte tenu des écarts-types pour la condition Rapamycine/Cetuximab, ces résultats issus de 3 expériences indépendantes devront être confirmés pour valider l'intérêt de l'inhibition pharmacologique de HIF-2. Cette approche nous permet cependant de conclure à une tendance similaire à ce que nous avons observé avec le siRNA antiHIF-2 α .

Compte tenu de la différence d'efficacité en terme de survie clonogénique entre l'inhibiteur de HIF-2 et le siRNA, nous avons émis l'hypothèse d'une dégradation rapide du composé. Une analyse réalisée par HPLC au Laboratoire de Biochimie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg a montré la présence de deux pics distincts, suggérant l'existence d'un produit de dégradation (rapide) de la molécule. Cet inhibiteur n'ayant

par ailleurs jamais été testé dans des essais cliniques de phase précoce, nous décidés d'évaluer une autre stratégie utilisant les inhibiteurs de poisons du fuseau.

II) Stratégie d'inhibition indirecte de HIF-2 par les poisons du fuseau

Les poisons du fuseau, et en particulier les dérivés des taxanes, ont montré non seulement leur intérêt dans l'inhibition du trafic intra-cellulaire des facteurs HIFs (par interférence avec le réseau de microtubules) mais également une activité inhibitrice de leur synthèse par un mécanisme impliquant les miRNA (Carbonaro et al). Outre le paclitaxel, utilisé en routine clinique pour la prise en charge des cancers des VADS, nous avons évalué l'intérêt du mebendazole, un poison du fuseau à activité anti-parasitaire actuellement en cours d'essais dans différents types de tumeurs.

a) Avant propos :

1) Les Taxanes

L'histoire des taxanes est plutôt récente en comparaison avec les autres cytotoxiques classiques comme le cyclophosphamide, de la famille des moutardes azotées, découvert à la fin de la 2nde guerre mondiale. Les taxanes ont été découverts dans les années soixante, suite à la mise en évidence de propriétés antitumorale *in vitro* du paclitaxel, une molécule issue de l'If (Genre : *Taxus*). Trois médicaments ayant une AMM sont issus de cette famille : le paclitaxel (Taxol[®]), le docetaxel (Taxotere[®]), et le cabazitaxel (Jevtana[®]). Seuls les 2 premiers sont largement utilisés pour la prise en charge des tumeurs solides.



Figure 44: *Taxus Baccata* ou If commun

L'originalité du paclitaxel repose principalement sur son mécanisme d'action. En effet, bien qu'il existe une famille de cytotoxiques dérivés des alcaloïdes de la pervenche, et qui inhibent la polymérisation des microtubules, le paclitaxel agit en inhibant la dépolymérisation des microtubules et bloque l'entrée en mitose des cellules tumorales.

Les travaux de Carbonaro suggèrent que les taxanes pourraient perturber le trafic des sous-unités α des facteurs HIFs et leur translocation nucléaire. Leur efficacité varie largement en fonction du type de cancer, le modèle le plus résistant *in vitro* et *in vivo* étant le cancer du rein à cellules claires, où la perturbation du trafic des HIFs ne semble pas être efficace.

Dans les cancers des VADS, l'association des taxanes aux autres cytotoxiques trouve son intérêt dans des schémas de chimiothérapie d'induction (protocole TPF). Il est largement étudié dans les essais cliniques en 2^{ème} ligne de traitement des cancers réfractaires ou métastatiques.

2) Les Benzimidazoles

Les benzimidazoles sont une famille de molécules de synthèse utilisées depuis de nombreuses années. Leur nom repose sur leur structure chimique, à savoir un benzène

couplé à un imidazole. Différents composés synthétisés à partir de cette structure ont été utilisés en tant que phytosanitaire, antifongique, ou encore antiparasitaire.

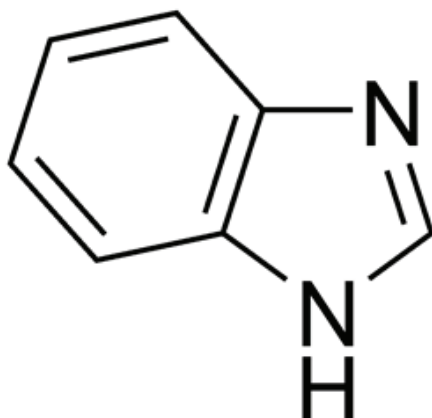


Figure 45: Structure du Benzimidazole. A partir de ce noyau, différents composés ont pu être synthétisés.

Les propriétés antiparasitaires des benzimidazoles ont été observées dans les années 1950, alors que la phénothiazine était utilisée comme anthelminthique dès le début du XX^{ème} siècle. Le chef de file de cette famille, et le 1^{er} à être produit fut le thiabendazole au début des années 1960. D'autres analogues structuraux ont par la suite été synthétisés, afin d'en réduire les effets indésirables, d'améliorer leur tolérance et leurs propriétés physico-chimiques, notamment la solubilité. Parmi ces molécules figure le mebendazole.

Le mebendazole fut découvert en 1968 par la firme Janssen. Il fait partie de la liste de l'OMS des 200 médicaments essentiels. Cette molécule est utilisée en médecine vétérinaire, mais aussi humaine comme anti parasitaire. En France, en médecine humaine, ce produit n'est plus commercialisé. On préfère l'utilisation du Flubendazole (FLUVERMAL[®]) dont le spectre et la tolérance sont quasiment identique¹⁶⁵.

Le mécanisme d'action du Mebendazole, et des antiparasitaires dérivés des benzimidazolés, repose principalement sur l'inhibition de la polymérisation des microtubules. Ce mécanisme se rapproche de ceux des poisons du fuseau mitotique utilisés en cancérologie. Néanmoins le site d'action du mebendazole est différent de ceux des vincalcoïdes. Le mebendazole se fixerait au niveau de la tubuline sur le même site d'action que la colchicine¹⁶⁶.

C'est en 2002 que sont rapportés les 1ers effets anticancéreux du mebendazole¹⁶⁷ *in vitro* et *in vivo* chez la souris sur des lignées tumorales de poumon. Ces résultats suggèrent cependant que les effets anti-tumoraux du mebendazole ne seraient pas dus exclusivement à leur action sur les microtubules^{168,169}. Depuis, le mebendazole a été testé *in vitro* et *in vivo* sur la souris, et a montré une efficacité dans d'autres modèles comme le cancer colo-rectal¹⁷⁰ ou le glioblastome¹⁷¹.

A ce jour, le potentiel radiosensibilisant de cette drogue n'a pas été évalué.

Les résultats précliniques ont conduit à des essais thérapeutiques de phase I dans les glioblastomes adultes dont les résultats seront attendus pour février 2016 (NCT01729260) et plus largement dans les tumeurs pédiatriques en 2020 (NCT01837862).

b) Résultats :

1) Effets anti-prolifératifs et calculs des EC50 :

Dans un premier temps nous avons déterminé les effets anti-prolifératifs à doses croissantes par un test à la Sulforhodamine B (SRB), L'index de prolifération a été déterminé 24h après traitement dans des conditions de normoxie. Les deux drogues (mebendazole et paclitaxel) étant insolubles dans l'eau et solubles dans le DMSO, nous avons utilisé comme témoin « véhicule » le DMSO aux mêmes doses qu'utilisées pour les drogues dans la gamme de concentration. Les concentrations de mebendazole et de paclitaxel testées varient entre 1nM et 10µM. Cette fourchette de concentration a été choisie selon les données déjà existantes dans la littérature pour le traitement d'autres lignées cellulaires. Nous avons réalisé une courbe dose réponse à allure sigmoïde afin de calculer l'EC50.

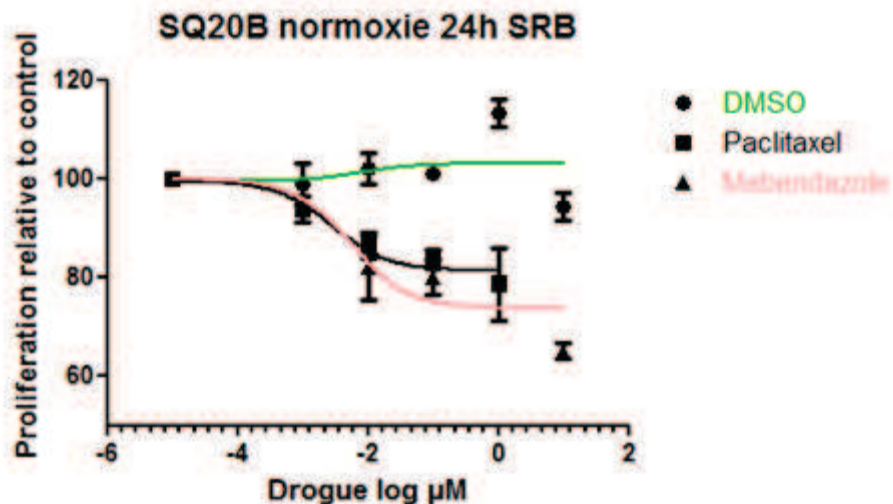


Figure 48 : Analyse de prolifération par SRB dans la lignée SQ20B 24h après traitement par des concentration croissantes de Paclitaxel et de Mebendazole. Des concentration croissantes de DMSO ont aussi été analysées comme contrôle. La fourchette de concentration varie entre 1nM et 10 μM .

- Le mebendazole et le paclitaxel sont cytotoxiques à de faibles doses. Le mebendazole semble montrer une activité proche de celle du paclitaxel, avec une EC₅₀ à 3 μM , contre 6 μM pour le mebendazole. Nous n'observons pas d'effet plateau pour les doses les plus importantes (meilleure cytotoxicité à 10 μM , soit le dernier point de concentration testée). Compte tenu des résultats obtenus, nous avons choisi les doses de 1 μM pour le paclitaxel et de 10 μM pour le mebendazole.

2) Effets des poisons du fuseau sur la localisation de HIF-2

Après avoir évalué l'effet anti-prolifératif des deux molécules, nous avons analysé leur effet sur la localisation subcellulaire de HIF-2. L'inhibition de la polymérisation/dépolymérisation des microtubules altère le trafic de la dynéine associée aux sous-unités alpha des facteurs HIFs sur le microtubule^{152,153}. Cela a été démontré pour le paclitaxel, mais pas pour le mebendazole. Les effets des deux drogues sur les microtubules étant similaires, nous avons vérifié si, à l'instar du paclitaxel, le mebendazole pouvait interférer avec le trafic de HIF-2 α et limiter sa translocation nucléaire.

Un marquage de HIF-2 α et de la β -tubuline par immunofluorescence a été réalisé sur la lignée SQ20B après exposition pendant 48h à chacune des deux molécules.

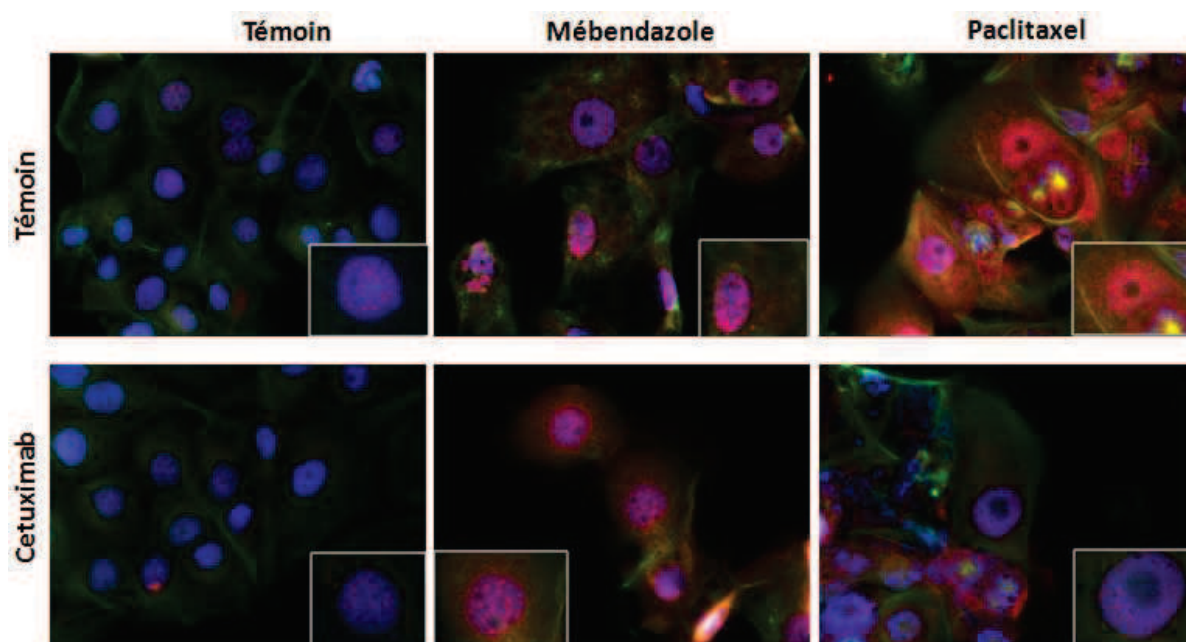


Figure 49: Analyse de l'expression de HIF-2 (rouge) et de la bêta-tubuline (vert) après traitement ou non par mébendazole 10 μ M, paclitaxel 1 μ M, et cetuximab 2,5 μ g/ml sur la lignée SQ20B en normoxie. Le grossissement est à 40X, avec la même exposition pour chacune d'entre elles.

- **A l'état basal et dans la condition traitée par le cetuximab**, nous observons une faible expression de HIF-2 α , dont une partie est localisée en zone périnucléaire. 48h après traitement par le Cetuximab, l'induction de HIF-2 n'est plus visible.
- **Le traitement par le mebendazole ou le paclitaxel** perturbe fortement le réseau de microtubules avec une expression anarchique et diffuse de la tubuline dans le cytosol. L'expression de HIF-2 semble induite après traitement par ces drogues, avec une localisation essentiellement cytosolique. Ces résultats confirment l'action de ces drogues, et en particulier du mebendazole, sur le réseau de microtubules et suggèrent une perturbation de la translocation nucléaire de HIF-2 comme l'a montré Carbonaro avec le paclitaxel. Néanmoins, ils ne permettent pas de conclure sur la formation du complexe HIF-2, ni de son activité transcriptionnelle. Une analyse du complexe HIF- β /HIF-2 α par immunoprécipitation et de l'expression des gènes cibles des HIFs par qRT-PCR est actuellement en cours et nous permettra de valider cette approche pharmacologique.

3) Effets des poisons du fuseau sur la survie clonogénique :

Afin de montrer la fonctionnalité de ces drogues, nous avons réalisé un test de survie clonogénique en combinaison avec le cetuximab +/- irradiation.

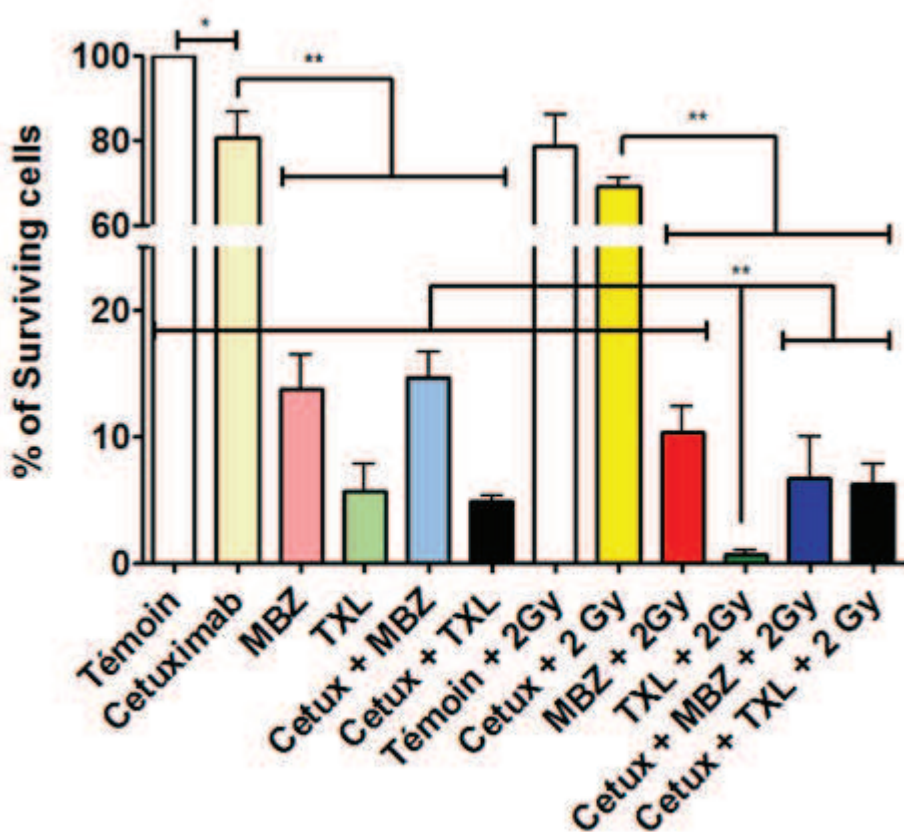


Figure 50: Test de survie clonogénique sur SQ20B après traitement par Mebendazole, Cetuximab, Paclitaxel et rayonnements ionisants (2Gy). MBZ = Mebendazole 10 μ M, TXL = Paclitaxel 1 μ M, cetux = Cetuximab 2.5 μ g/ml.

- Le mebendazole comme le paclitaxel présentent une efficacité importante avec une diminution de la fraction de survie significative en monothérapie. L'association avec le cetuximab n'a pas d'effet biologique supplémentaire par rapport au mebendazole ou au taxol en monothérapie. La combinaison du paclitaxel avec l'irradiation est la condition qui présente l'efficacité la plus importante. L'ajout de cetuximab à cette condition n'améliore pas l'efficacité du traitement par rapport à l'association paclitaxel + irradiation, qui se traduit par une survie clonogénique plus importante des cellules.

Bien que le paclitaxel et le mebendazole desorganisent le réseau de microtubule et inhibent potentiellement l'activité des complexes HIFs, nous avons observé une réponse différentielle entre les combinaisons comprenant du cetuximab associé au paclitaxel et celles comprenant des rayonnements ionisants associés au paclitaxel. Pourtant le cetuximab et l'irradiation sont tous deux inducteurs de HIF-2, on s'attendrait donc à avoir le même profil de réponse de survie clonogénique. Pour expliquer cela, nous avons formulé deux hypothèses qui sont en cours de vérification :

- i) Nous avons montré précédemment que l'induction de HIF-2 n'était pas la même selon le traitement. En effet, le cetuximab, à cette faible dose, favorise la stabilisation du complexe HIF-2, sans induction transcriptionnelle de la sous unité alpha, alors que les siRNA anti-EGFR, tout comme l'irradiation induisent l'expression du gène *EPAS1*. Il serait intéressant de savoir si à des doses plus importantes de cetuximab, l'absence d'induction d' *EPAS1* est toujours observée. Si ce n'est pas le cas, cela montrera que l'induction de HIF-2 par le cetuximab est principalement due à la stabilisation des sous-unités HIF-2 α et l'efficacité des poisons du fuseau en découlant serait moins importante.
- ii) Le mécanisme d'action des poisons du fuseau sur l'inhibition des facteurs HIFs décrit par Carbonaro suggère une inhibition la traduction protéique des ARNm codant pour HIF-1 α et HIF-2 α , et le trafic de ces sous unités vers le noyau. De plus, une cinétique réalisé au laboratoire a montré que le délai d'action du mébendazole et du paclitaxel était supérieur à 16h après traitement. Le moindre effet de la combinaison avec le cetuximab versus la combinaison avec l'irradiation peut s'expliquer par les délais d'actions du paclitaxel sur l'inhibition du trafic de HIF-2. L'association avec le cetuximab dans ce cas n'empêcherait pas le paclitaxel d'inhiber les effets délétères dus à HIF-2 induit par le cetuximab et qui interviennent à des temps précoces (cf figure 51). En ce qui concerne le mebendazole, les forts écart type entre la survie obtenu par le mebendazole associé aux rayonnements ionisant et le mebendazole + cetuximab + 2Gy ne nous permettent pas de conclure pour le moment mais suggèrent une meilleure activité inhibitrice du paclitaxel par rapport au mebendazole. L'ensemble de ces résultats suggèrent cependant que les poisons du fuseau devraient être utilisés en pré-traitement avant le cetuximab et l'irradiation compte tenu des cinétiques d'induction de HIF-2 observées *in vitro*.

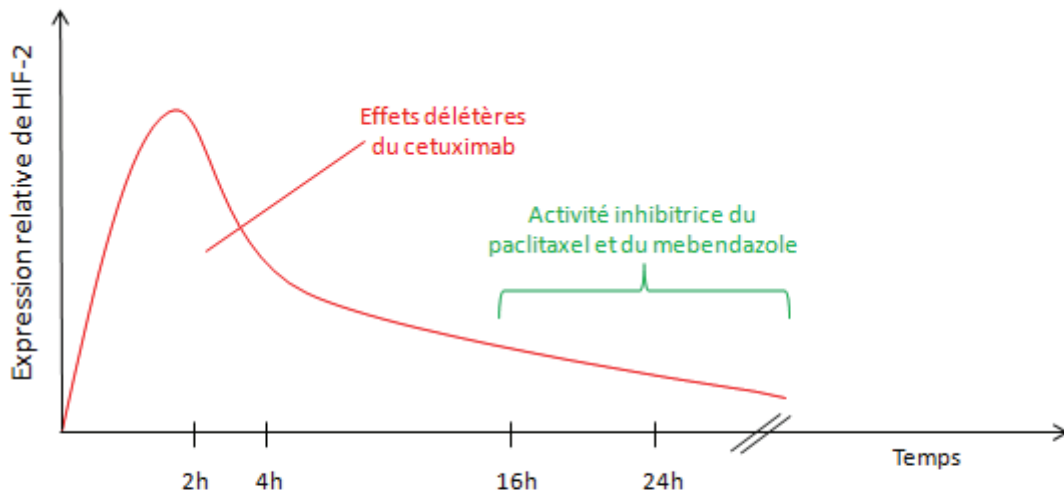


Figure 51: Hypothèse d'activité délétère précoce du cetuximab. Les effets inducteurs de HIF-2 par le cetuximab s'exercent à des temps précoces. Nous avons montré que l'association aux rayonnements ionisants potentialisent l'accumulation de HIF-2. Cette potentialisation permettrait l'induction de signaux de survie à des temps précoces et plus important, ce qui expliquerait une meilleure inhibition de la survie clonogénique avec l'association du paclitaxel aux rayonnements ionisants par rapport à la même combinaison additionnée de cetuximab.

Les stratégies développées ici ne sont qu'à un stade préliminaire, mais montrent un effet intéressant des poisons du fuseau mitotique en combinaison avec les rayonnements ionisants. Les recherches sur l'association mebendazole et cetuximab doivent être poursuivies avec :

- des concentrations plus importantes de cetuximab pour montrer ou non l'augmentation de l'induction de HIF-2 *in vitro*.

- La poursuite d'une cinétique d'inhibition avec le mebendazole ou le paclitaxel associé ou non au cetuximab et aux rayonnements ionisants, en ajoutant une condition de prétraitement par les poisons du fuseau.

- une étude *in vivo* de cette association chez des modèles murins.

PARTIE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le lien entre l'induction de HIF-2 et l'inhibition de l'EGFR.

Quelques résultats préliminaires présentés dans notre manuscrit que l'induction de HIF-2 ne serait pas uniquement dépendante du cetuximab, mais concernerait aussi les inhibiteurs de tyrosines kinases ciblant l'EGFR (erlotinib, canertinib) dans d'autres modèles cellulaires comme le cancer colorectal.

Pour mieux comprendre le lien entre l'inhibition d'EGFR et l'induction de HIF-2, nous proposons d'analyser les groupes de protéines activées suite au traitement par cetuximab. Ces groupes de protéines représenteront une signature d'un ou plusieurs événements tels que la glycolyse, la transition épithélio-mésenchymateuse, l'angiogénèse. Cette analyse se fera par une étude de l'expression des protéines totales et phosphoprotéines (forme inactive ou active) après exposition aux différents inhibiteurs de l'EGFR. Cela nous permettra d'avoir une vue d'ensemble des protéines impliqués suite aux différents traitements, et d'identifier des voies ou protéines activées. Cette stratégie permettra à terme d'identifier les événements à la base de l'induction de l'addiction oncogénique dépendante de HIF-2, et potentiellement d'identifier d'autres cibles d'intérêt thérapeutique pouvant potentiellement la contrecarrer.

Un mécanisme de résistance via HIF-2 dépendant du profil de lignée.

Notre hypothèse de départ consistait à resensibiliser des lignées résistantes via l'inhibition de l'accumulation de HIF-1, en ciblant l'axe EGFR/mTOR par le cetuximab et la rapamycine. Bien que nous y soyons parvenus, le degré de cette resensibilisation *in vitro* restait modeste suggérant un mécanisme alterne d'adaptation des cellules tumorales aux traitements. Nous avons pour la première fois mis en évidence l'induction oncogénique de HIF-2, comme mécanisme de résistance induite par l'irradiation d'une part et le cetuximab d'autre part..

Néanmoins, l'association entre HIF-2 et les phénomènes de résistances est de plus en plus décrit. Les travaux de Taniguchi en 2014¹⁷², ont notamment montré que la stabilisation de HIF-2 dans le tube digestif de souris permet une survie aux irradiations sur corps entier à 18Gy plus importante que dans les souris témoin, suggérant l'induction d'effets radioprotecteurs aux rayonnements ionisants.

Un mécanisme de résistance multi-organes.

Cette induction est peut être généralisable et pourrait être un des mécanismes de résistance des cellules tumorales quel que soit l'organe. Nous avons cité dans cette thèse les travaux de Zhao¹⁶³, qui montré un lien entre HIF-2, et l'axe TGF- α /EGFR dans la résistance au sorafénib dans un modèle de lignées tumorale de carcinome hépatocellulaire (Hep3B). Le sorafénib n'est pas un inhibiteur de l'EGFR, mais tout comme dans notre étude, les auteurs observent une induction de HIF-2 et une activation de l'axe TGF- α /EGFR.

En perspective, nous nous proposons d'étudier un plus grand nombre de lignées cellulaires et d'étudier l'induction de ce mécanisme de résistance suite aux traitements par anti-EGFR dans un premier temps, puis d'étudier si cette induction est possible avec d'autres TKI. Enfin, nous souhaitons poursuivre notre étude sur le mébendazole, un inhibiteur potentiel indirect de HIF-2, ayant une toxicité moindre que le paclitaxel.

L'association des facteurs HIFs aux phénomènes de résistance en clinique et stratégie thérapeutique.

Chez l'humain, on associe depuis quelques années les facteurs HIFs à une radiorésistance. Citons les travaux de Koukourakis et ses collaborateurs en 2001¹⁷³, 2006¹⁷⁴, et 2008¹⁷⁵. Ils ont montré que la surexpression de HIF-1 et HIF-2 dans des biopsies de tumeurs de patients porteurs de cancers des VADS était un facteur de résistance au traitement. En effet, les taux de réponse au traitement (radiochimiothérapie, chez 75 patients de stade localement avancé) étaient moins bons dans les groupes de patients dont les tumeurs surexprimaient HIF-1 ou HIF-2, que dans les autres (Analyse immunohistochemie de HIF-1 et HIF-2 sur une série rétrospective). Les taux de réponse étaient de 46% pour les patients surexprimant HIF-1, 44% pour les patients porteurs des tumeurs surexprimant HIF-2 et 86% pour les patients ne surexprimant ni HIF-1 ni HIF-2. Ils ont aussi montré dans la cohorte de patients atteints de cancers des VADS issue de l'essai CHART, dont le but était de comparer un schéma de radiothérapie standard à un schéma hyperfractionné, que la surexpression de HIF-2 associé à la surexpression de l'AC9 (mesurés par immunohistochemie), était associé à une diminution de la survie globale à 5 ans et une diminution du contrôle loco-régional à 5 ans. Néanmoins, dans une autre étude avec un schéma hypofractionné, les patients chez lesquels une surexpression de HIF-2 avait été mise en évidence dans les biopsies en amont du traitement avaient une même survie que les patients ne surexprimant pas HIF-2. Selon les auteurs, les schémas de radiothérapie

conventionnelle associée ou non à la chimiothérapie et hyperfractionnés sont moins efficaces chez les patients porteurs de tumeurs surexprimant HIF-2. Koukourakis et ses collègues ont aussi étudié les modifications de l'expression tumorale de HIF-2 liées à la radiothérapie sur une petite cohorte de 12 patients. Ils rapportent qu'après une radiothérapie conventionnelle de 20 Gy, 35% des patients surexpriment l'un des facteurs HIFs. L'augmentation de l'expression de HIF-2 concerne 40% des patients, et l'expression initiale de HIF-2 est modifiée avant et après radiothérapie dans 60% des tumeurs. Au regard de nos données, nous pensons que l'étude de l'expression de HIF-2 avant traitement ne reflète pas forcément l'induction d'expression de HIF-2 après traitement, et en ce sens ne permet pas de sélectionner une population dont on pourrait estimer la réponse au traitement. En effet, nous avons montré que l'expression de HIF-2 est induite par l'irradiation mais aussi par le cetuximab, et que l'inhibition de cette induction, permet de contrer la résistance.

L'identification de ces patients porteurs de tumeurs ayant une propension à la surexpression de HIF-2 consécutivement au traitement devra alors se faire au moyen de méthodes alternatives, plutôt que par immunohistochimie sur des biopsies. Pour cela, nous avons pour perspective de développer, en collaboration avec une équipe de chimistes, un analogue structural de l'inhibiteur de HIF-2 mentionné dans cette thèse, et porteur d'un F¹⁸. Celui-ci permettrait de visualiser par imagerie, et au cours du traitement les patients porteurs de tumeurs où l'expression d'HIF-2 est induite. Il sera nécessaire de valider cette approche en montrant :

- que le sous groupe de patients identifiés est à risque de résistance (radiothérapie, cetuximab) par analyse des données de survie et de rechute.

- la meilleure sensibilité de cette technique pronostique par rapport à une approche traditionnelle par immunohistochimie des tumeurs biopsiées.

Cette stratégie d'identification permettra alors de proposer à ces patients une thérapeutique adaptée, permettant de contrer cette résistance induite, notamment par l'ajout d'inhibiteurs de HIF-2.

Dans l'attente de ces travaux, et étant donnée les résultats obtenus *in vivo* par la combinaison rapamycine + cetuximab dans la lignée résistante au cetuximab, nous nous proposons d'élaborer en collaboration avec les oncologues médicaux du centre Paul Strauss, un essai clinique de phase I/II visant à évaluer l'efficacité de l'association de chimiothérapie avec du cetuximab, de la rapamycine en continue à faible doses, et du paclitaxel, délivré en en deuxième ligne chez des patients atteints de cancers des VADS, en rechute ou en

progression métastatique. La disponibilité des drogues et leur connaissance, nous motive à réaliser cet essai clinique au plus tôt. L'objectif sera de lever les résistances potentiellement inductibles par le cetuximab via la rapamycine et le paclitaxel, dont il a été montré *in vitro* qu'il était un inhibiteur de HIF-2 indirect.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rohwer, N. & Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **14**, 191–201 (2011).
2. Chaturvedi, A. K. *et al.* Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 4294–4301 (2011).
3. Ramqvist, T. & Dalianis, T. Oropharyngeal Cancer Epidemic and Human Papillomavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1671–1677 (2010).
4. Hammarstedt, L. *et al.* Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **119**, 2620–2623 (2006).
5. Cole, L., Polfus, L. & Peters, E. S. Examining the incidence of human papillomavirus-associated head and neck cancers by race and ethnicity in the U.S., 1995–2005. *PloS One* **7**, e32657 (2012).
6. Cojocariu, O. M., Huguet, F., Lefevre, M. & Périé, S. [Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers]. *Bull. Cancer (Paris)* **96**, 369–378 (2009).
7. Semenza, G. L. Life with Oxygen. *Science* **318**, 62–64 (2007).
8. Liang, X. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **47**, 92–97 (2011).
9. Lee, S.-S., Tsai, C.-H., Yang, S.-F., Ho, Y.-C. & Chang, Y.-C. Hypoxia inducible factor-1 α expression in areca quid chewing-associated oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* **16**, 696–701 (2010).
10. Quintiliani, M. Modification of radiation sensitivity: The oxygen effect. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **5**, 1069–1076 (1979).
11. Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y. & Dewhirst, M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* **5**, 429–441 (2004).
12. Kim, W.-Y., Oh, S. H., Woo, J.-K., Hong, W. K. & Lee, H.-Y. Targeting heat shock protein 90 overrides the resistance of lung cancer cells by blocking radiation-induced stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res.* **69**, 1624–1632 (2009).
13. Amornphimoltham, P., Patel, V., Leelahavanichkul, K., Abraham, R. T. & Gutkind, J. S. A retroinhibition approach reveals a tumor cell-autonomous response to rapamycin in head and neck cancer. *Cancer Res.* **68**, 1144–1153 (2008).
14. Bernier, J., Bentzen, S. M. & Vermorken, J. B. Molecular therapy in head and neck oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 266–277 (2009).
15. Bianco, R. *et al.* Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. *Br. J. Cancer* **98**, 923–930 (2008).
16. Herberger, B. *et al.* Simultaneous blockade of the epidermal growth factor receptor/mammalian target of rapamycin pathway by epidermal growth factor receptor inhibitors and rapamycin results in reduced cell growth and survival in biliary tract cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1547–1556 (2009).
17. Ekshyyan, O. *et al.* Comparison of radiosensitizing effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 to cisplatin in experimental models of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2255–2265 (2009).
18. Milas, L. *et al.* In Vivo Enhancement of Tumor Radioresponse by C225 Antiepidermal Growth Factor Receptor Antibody. *Clin. Cancer Res.* **6**, 701–708 (2000).
19. Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. & Ferris, R. L. Head and neck cancer. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 1695–1709 (2008).

20. Les cancers en France - Edition 2014 - Ref□: ETKFRANCE15 | Institut National Du Cancer. at <<http://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-Edition-2014>>
21. Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A. & Sidransky, D. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **345**, 1890–1900 (2001).
22. Bose, P., Brockton, N. T. & Dort, J. C. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int. J. Cancer* **133**, 2013–2023 (2013).
23. Soria, J.-C., Izzo, J., Mao, L., Hong, W. K. & Papadimitrakopoulou, V. A. Biomarqueurs de carcinogénèse des voies aériennes et place de la chimioprévention. *Bull. Cancer (Paris)* **88**, 351–61 (2001).
24. Califano, J. *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* **56**, 2488–2492 (1996).
25. Hill, C. [Epidemiology of cancer of the upper aerodigestive tract]. *Bull. Cancer (Paris)* **Suppl 5**, 5–8 (2000).
26. Hausen, H. zur. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342–350 (2002).
27. Bernard, H.-U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* **401**, 70–79 (2010).
28. Javier, R. T. & Rice, A. P. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J. Virol.* **85**, 11544–11556 (2011).
29. Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76–79 (1990).
30. Rautava, J. & Syrjänen, S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol.* **6 Suppl 1**, S3–15 (2012).
31. 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.* **100**, 261–269 (2008).
32. Kalyankrishna, S. & Grandis, J. R. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 2666–2672 (2006).
33. Temam, S. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Copy Number Alterations Correlate With Poor Clinical Outcome in Patients With Head and Neck Squamous Cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2164–2170 (2007).
34. Lee, W. R. *et al.* Anemia is associated with decreased survival and increased locoregional failure in patients with locally advanced head and neck carcinoma: a secondary analysis of RTOG 85-27. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **42**, 1069–1075 (1998).
35. Nordsmark, M. *et al.* Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **77**, 18–24 (2005).
36. Machtay, M. *et al.* Radiotherapy with or without erythropoietin for anemic patients with head and neck cancer: a randomized trial of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG 99-03). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **69**, 1008–1017 (2007).
37. Henke, M. *et al.* Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **362**, 1255–1260 (2003).
38. Maeda, K. *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* **77**, 858–863 (1996).
39. Sobin, L. H. & Fleming, I. D. TNM classification of malignant tumors, fifth edition (1997). *Cancer* **80**, 1803–1804 (1997).
40. Nerina Denaro, E. G. R. State-of-the-Art and Emerging Treatment Options in the Management of Head and Neck Cancer: News from 2013. *Oncology* **86**, 212–229 (2014).

41. Cancers de la tête et du cou - Recommandations et outils d'aide à la pratique | Institut National Du Cancer. at <<http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Recommandations-et-outils-d-aide-a-la-pratique/Cancers-de-la-tete-et-du-cou>>
42. J Guigay. XXVIIIème cours de chimiothérapie antitumorale et traitement médical du cancer. (2013).
43. Langendijk, J. A. *et al.* Risk-group definition by recursive partitioning analysis of patients with squamous cell head and neck carcinoma treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Cancer* **104**, 1408–1417 (2005).
44. Forastiere, A. A. *et al.* Long-term results of Intergroup RTOG 91–11: A phase III trial to preserve the larynx—Induction cisplatin/5-FU and radiation therapy versus concurrent cisplatin and radiation therapy versus radiation therapy. (2006).
45. Pointreau, Y. *et al.* Randomized Trial of Induction Chemotherapy With Cisplatin and 5-Fluorouracil With or Without Docetaxel for Larynx Preservation. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 498–506 (2009).
46. Lefebvre, J. L. *et al.* Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMPIN randomized phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 853–859 (2013).
47. Adkins, D. *et al.* A phase 2 trial of induction nab-paclitaxel and cetuximab given with cisplatin and 5-fluorouracil followed by concurrent cisplatin and radiation for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **119**, 766–773 (2013).
48. Kies, M. S. *et al.* Induction chemotherapy and cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: results from a phase II prospective trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 8–14 (2010).
49. Fury, M. G. *et al.* A phase 1 study of everolimus + weekly cisplatin + intensity modulated radiation therapy in head-and-neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **87**, 479–486 (2013).
50. CAPRA: Safety, efficacy, and translational biomarkers of weekly everolimus, carboplatin, and paclitaxel as induction therapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J. Clin. Oncol.* at <<http://meetinglibrary.asco.org/content/117144-132>>
51. Vermorken, J. B. *et al.* Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1116–1127 (2008).
52. Grégoire, V., Lefebvre, J.-L., Licitra, L., Felip, E. & EHNS-ESMO-ESTRO Guidelines Working Group. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **21 Suppl 5**, v184–186 (2010).
53. Guigay, J. Cetuximab, docetaxel, and cisplatin (TPEX) as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic (R/M) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): Final results of phase II trial GORTEC 2008-03. (2012).
54. Grünwald, V. *et al.* TEMHEAD: a single-arm multicentre phase II study of temsirolimus in platinum- and cetuximab refractory recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) of the German SCCHN Group (AIO). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **26**, 561–567 (2015).
55. Machiels, J.-P. *et al.* Zalutumumab plus best supportive care versus best supportive care alone in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck after failure of platinum-based chemotherapy: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **12**, 333–343 (2011).
56. Machiels, J.-P. H. *et al.* Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 583–594 (2015).

57. Vermorken, J. B. *et al.* Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **14**, 697–710 (2013).
58. Vermorken, J. B. *et al.* Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **25**, 682–688 (2014).
59. Vermorken, J. B. *et al.* Phase II study of pemetrexed in combination with cisplatin and cetuximab in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **49**, 2877–2883 (2013).
60. Bauman, J. E. *et al.* A phase II study of temsirolimus and erlotinib in patients with recurrent and/or metastatic, platinum-refractory head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **49**, 461–467 (2013).
61. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
62. Zandberg, D. P. & Strome, S. E. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* **50**, 627–632 (2014).
63. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–365 (2001).
64. Sibilial, M. *et al.* The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differ. Res. Biol. Divers.* **75**, 770–787 (2007).
65. Harari, P. M. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat. Cancer* **11**, 689–708 (2004).
66. Capdevila, J. *et al.* Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 354–363 (2009).
67. Zaczek, A., Brandt, B. & Bielawski, K. P. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol. Histopathol.* **20**, 1005–1015 (2005).
68. Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16 (2006).
69. Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A. & Riese, D. J. Functional Selectivity of EGF Family Peptide Growth Factors: Implications for Cancer. *Pharmacol. Ther.* **122**, 1–8 (2009).
70. Brand, T. M., Iida, M., Li, C. & Wheeler, D. L. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer. *Discov. Med.* **12**, 419–432 (2011).
71. Hernandez-Aya, L. F. & Gonzalez-Angulo, A. M. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The oncologist* **16**, 404–414 (2011).
72. Cully, M., You, H., Levine, A. J. & Mak, T. W. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 184–192 (2006).
73. Onishi-Haraikawa, Y. *et al.* Unique phosphorylation mechanism of Gab1 using PI 3-kinase as an adaptor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 476–482 (2001).
74. Sweeney, C. & Carraway, K. L., 3rd. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* **19**, 5568–5573 (2000).
75. Cantley, L. C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* **296**, 1655–1657 (2002).
76. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
77. Santarpia, L., Lippman, S. L. & El-Naggar, A. K. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 103–119 (2012).

78. Crews, C. M., Alessandrini, A. & Erikson, R. L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478–480 (1992).
79. Li, W. X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol.* **18**, 545–551 (2008).
80. Vogt, P. K. & Hart, J. R. PI3K and STAT3: a New Alliance. *Cancer Discov.* **1**, 481–486 (2011).
81. Dorn, G. W., 2nd & Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **115**, 527–537 (2005).
82. Koivunen, J., Aaltonen, V. & Peltonen, J. Protein kinase C (PKC) family in cancer progression. *Cancer Lett.* **235**, 1–10 (2006).
83. Ullrich, A. *et al.* Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418–425 (1984).
84. Zandi, R., Larsen, A. B., Andersen, P., Stockhausen, M.-T. & Poulsen, H. S. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell. Signal.* **19**, 2013–2023 (2007).
85. Brand, T. M., Iida, M. & Wheeler, D. L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 777–792 (2011).
86. Grandis, J. R. & Tweardy, D. J. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* **53**, 3579–3584 (1993).
87. Ang, K. K. *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* **62**, 7350–7356 (2002).
88. Chung, C. H. *et al.* Integrating epidermal growth factor receptor assay with clinical parameters improves risk classification for relapse and survival in head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 331–338 (2011).
89. Bentzen, S. M. *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 5560–5567 (2005).
90. Psyrri, A. *et al.* Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 5856–5862 (2005).
91. Sharafinski, M. E., Ferris, R. L., Ferrone, S. & Grandis, J. R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **32**, 1412–1421 (2010).
92. Ludes-Meyers, J. H. *et al.* Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6009–6019 (1996).
93. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **354**, 567–578 (2006).
94. Ang, K. K. *et al.* Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 2940–2950 (2014).
95. Kiyozuka, M., Akimoto, T., Fukutome, M., Motegi, A. & Mitsuhashi, N. Radiation-induced dimer formation of EGFR: implications for the radiosensitizing effect of cetuximab. *Anticancer Res.* **33**, 4337–4346 (2013).
96. Yang, H. *et al.* mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* **497**, 217–223 (2013).
97. Fang, Y. *et al.* PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr. Biol. CB* **13**, 2037–2044 (2003).

98. Sun, Y. & Chen, J. mTOR signaling: PLD takes center stage. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 3118–3123 (2008).
99. Lee, D.-F. & Hung, M.-C. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 3011–3014 (2007).
100. Nicklin, P. *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**, 521–534 (2009).
101. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
102. Shah, O. J. & Hunter, T. Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6425–6434 (2006).
103. Nayak, B. K. *et al.* Stabilization of HIF-2 α through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* **32**, 3147–3155 (2013).
104. Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S. & Kaeberlein, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* **493**, 338–345 (2013).
105. Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. & Hall, M. N. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 868–880 (2011).
106. Sabatini, D. M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 729–734 (2006).
107. Chi, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 325–338 (2012).
108. Hong, S. M. *et al.* Rapamycin inhibits both motility through down-regulation of p-STAT3 (S727) by disrupting the mTORC2 assembly and peritoneal dissemination in sarcomatoid cholangiocarcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* **30**, 177–187 (2013).
109. Sarbassov, D. D. *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* **22**, 159–168 (2006).
110. Goldblatt, H. & Cameron, G. INDUCED MALIGNANCY IN CELLS FROM RAT MYOCARDIUM SUBJECTED TO INTERMITTENT ANAEROBIOSIS DURING LONG PROPAGATION IN VITRO. *J. Exp. Med.* **97**, 525–552 (1953).
111. 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. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **105**, 14–20 (2012).
112. Gilles-Gonzalez, M.-A. & Gonzalez, G. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **96**, 774–783 (2004).
113. Wang, G. L. & Semenza, G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518 (1993).
114. Freeburg, P. B. & Abrahamson, D. R. Divergent expression patterns for hypoxia-inducible factor-1 β and aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter-2 in developing kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 2569–2578 (2004).
115. Koh, M. Y. & Powis, G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 364–372 (2012).
116. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 588–594 (1998).
117. Jiang, B. H. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 363–369 (2001).
118. Sermeus, A. *et al.* Hypoxia-Induced Modulation of Apoptosis and BCL-2 Family Proteins in Different Cancer Cell Types. *PLoS ONE* **7**, e47519 (2012).
119. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The oncologist* **9 Suppl 5**, 10–17 (2004).

120. Liu, X.-W. *et al.* HIF-1 α -dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia. *Pharmacol. Res.* **62**, 416–425 (2010).
121. Rohwer, N. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 α Determines Gastric Cancer Chemosensitivity via Modulation of p53 and NF- κ B. *PLoS ONE* **5**, e12038 (2010).
122. Sullivan, R. & Graham, C. H. Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1702–1713 (2009).
123. Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S. & Scott, O. C. A. The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radiotherapy. *Br. J. Radiol.* **26**, 638–648 (1953).
124. Raleigh, Dewhirst & Thrall. Measuring Tumor Hypoxia. *Semin. Radiat. Oncol.* **6**, 37–45 (1996).
125. Overgaard, J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 4066–4074 (2007).
126. Overgaard, J. *et al.* A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **46**, 135–146 (1998).
127. Padhani, A. R., Krohn, K. A., Lewis, J. S. & Alber, M. Imaging oxygenation of human tumours. *Eur. Radiol.* **17**, 861–872 (2007).
128. Calvani, M., Comito, G., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Time-dependent stabilization of hypoxia inducible factor-1 α by different intracellular sources of reactive oxygen species. *PloS One* **7**, e38388 (2012).
129. Wong, B. W., Kuchnio, A., Bruning, U. & Carmeliet, P. Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 3–11 (2013).
130. Meijer, T. W. H., Kaanders, J. H. A. M., Span, P. N. & Bussink, J. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 5585–5594 (2012).
131. Zhao, J. *et al.* The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 623–633 (2015).
132. Kizaka-Kondoh, S., Tanaka, S., Harada, H. & Hiraoka, M. The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 623–632 (2009).
133. Maxwell, P. H. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
134. Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 51 (2010).
135. Kaelin, W. G. Cancer and Altered Metabolism: Potential Importance of Hypoxia-Inducible Factor and 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 335–345 (2011).
136. Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 847–855 (2001).
137. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 207–214 (2012).
138. Hudson, C. C. *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7004–7014 (2002).
139. Serganova, I. *et al.* Molecular imaging of temporal dynamics and spatial heterogeneity of hypoxia-inducible factor-1 signal transduction activity in tumors in living mice. *Cancer Res.* **64**, 6101–6108 (2004).

140. Lui, V. W. Y. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov.* **3**, 761–769 (2013).
141. Beasley, N. J. P. *et al.* Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res.* **62**, 2493–2497 (2002).
142. Choi, H. G. *et al.* Expression of hypoxic signaling markers in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. Off. J. Eur. Fed. Oto-Rhino-Laryngol. Soc. EUFOS Affil. Ger. Soc. Oto-Rhino-Laryngol. - Head Neck Surg.* **272**, 219–228 (2015).
143. Wang, Y. *et al.* Hypoxia promotes ligand-independent EGF receptor signaling via hypoxia-inducible factor-mediated upregulation of caveolin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4892–4897 (2012).
144. Kallio, P. J. *et al.* Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.* **17**, 6573–6586 (1998).
145. Chachami, G. *et al.* Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 235–240 (2009).
146. Depping, R. *et al.* Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 394–404 (2008).
147. Liu, Y. V. *et al.* RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol. Cell* **25**, 207–217 (2007).
148. Minet, E. *et al.* Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction. *FEBS Lett.* **460**, 251–256 (1999).
149. Berchner-Pfannschmidt, U., Frede, S., Wotzlaw, C. & Fandrey, J. Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *Eur. Respir. J.* **32**, 210–217 (2008).
150. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK. *J. Biol. Chem.* **283**, 27620–27627 (2008).
151. Zheng, X. *et al.* Cell-type-specific regulation of degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha: role of subcellular compartmentalization. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4628–4641 (2006).
152. Carbonaro, M., Escuin, D., O’Brate, A., Thadani-Mulero, M. & Giannakakou, P. Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1 α protein trafficking and activity: implications for taxane therapy. *J. Biol. Chem.* **287**, 11859–11869 (2012).
153. Carbonaro, M., O’Brate, A. & Giannakakou, P. Microtubule disruption targets HIF-1alpha mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *J. Cell Biol.* **192**, 83–99 (2011).
154. Young, N. R. *et al.* Molecular phenotype predicts sensitivity of squamous cell carcinoma of the head and neck to epidermal growth factor receptor inhibition. *Mol. Oncol.* **7**, 359–368 (2013).
155. Cooper, J. B. & Cohen, E. E. W. Mechanisms of resistance to EGFR inhibitors in head and neck cancer. *Head Neck* **31**, 1086–1094 (2009).
156. Boeckx, C. *et al.* Anti-epidermal growth factor receptor therapy in head and neck squamous cell carcinoma: focus on potential molecular mechanisms of drug resistance. *The Oncologist* **18**, 850–864 (2013).
157. Kwon, D. S. *et al.* Signal transduction of MEK/ERK and PI3K/Akt activation by hypoxia/reoxygenation in renal epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 1189–1199 (2006).

158. Rohwer, N. & Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat.* **14**, 191–201 (2011).
159. Hanns, E. *et al.* Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature. *Oral Oncol.* **51**, 848–856 (2015).
160. Luo, F. R. *et al.* Correlation of pharmacokinetics with the antitumor activity of Cetuximab in nude mice bearing the GEO human colon carcinoma xenograft. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **56**, 455–464 (2005).
161. Affolter, A. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism. *Head Neck* **33**, 1448–1457 (2011).
162. Rankin, E. B. *et al.* Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13373–13378 (2014).
163. Zhao, D. *et al.* Upregulation of HIF-2 α induced by sorafenib contributes to the resistance by activating the TGF- α /EGFR pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell. Signal.* **26**, 1030–1039 (2014).
164. Scheuermann, T. H. *et al.* Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 271–276 (2013).
165. Feldmeier, H., Bienzle, U., Döhning, E. & Dietrich, M. Flubendazole versus mebendazole in intestinal helminthic infections. *Acta Trop.* **39**, 185–189 (1982).
166. Ireland, C. M., Gull, K., Gutteridge, W. E. & Pogson, C. I. The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 2680–2682 (1979).
167. Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R. & Roth, J. A. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 2963–2969 (2002).
168. Sasaki, J. *et al.* The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 1201–1209 (2002).
169. Larsen, A. R. *et al.* Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 3–13 (2015).
170. Králová, V. *et al.* Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anticancer. Drugs* **24**, 911–919 (2013).
171. Bai, R.-Y., Staedtke, V., Aprhys, C. M., Gallia, G. L. & Riggins, G. J. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* **13**, 974–982 (2011).
172. Taniguchi, C. M. *et al.* PHD inhibition mitigates and protects against radiation-induced gastrointestinal toxicity via HIF2. *Sci. Transl. Med.* **6**, 236ra64 (2014).
173. Koukourakis, M. I. *et al.* Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 3399–3403 (2001).
174. Koukourakis, M. I. *et al.* Endogenous Markers of Two Separate Hypoxia Response Pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) Are Associated With Radiotherapy Failure in Head and Neck Cancer Patients Recruited in the CHART Randomized Trial. *J. Clin. Oncol.* **24**, 727–735 (2006).
175. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Danielidis, V. & Sivridis, E. Hypoxia inducible factor (Hif1alpha and HIF2alpha) and carbonic anhydrase 9 (CA9) expression and response of head-neck cancer to hypofractionated and accelerated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* **84**, 47–52 (2008).

ANNEXES

**Stratégie de sensibilisation des tumeurs
des voies aérodigestives supérieures aux
anti-EGFR et résistance induite :
Induction de HIF-2 et opportunité
thérapeutique**

Les traitements des cancers des VADS reposent sur la chirurgie, la radiothérapie, et la chimiothérapie. Malgré ces traitements, la survie globale des patients à 5 ans est de l'ordre de 50%. Les causes d'échec thérapeutique sont dues au profil de résistance des tumeurs. Le ciblage de l'axe EGFR/mTOR/HIF-1 par une combinaison de rapalogues et d'anti-EGFR a montré son efficacité sur certaines tumeurs solides. L'objet de ce travail de thèse a été de caractériser l'impact d'une combinaison de drogues à faibles doses sur des lignées cellulaires des VADS au moyen d'une approche pharmacologique et moléculaires. Nos résultats montrent que la combinaison de la rapamycine (5nM) au cetuximab (2,5µg/ml) diminue la survie clonogénique des cellules et permet une inhibition du facteur de transcription HIF-1 α . Cette combinaison de drogue améliore l'efficacité de la radiothérapie. En revanche, l'induction de HIF-2a induite par le traitement provoque la résistance des cellules aux traitements par, et une rechute rapide des tumeurs in vivo. L'inhibition de HIF-2 permet une inhibition de la survie cellulaire d'environ 100% dans un modèle résistant.

Radiothérapie, cancers des VADS, cetuximab, EGFR, mTOR, HIF-1, HIF-2, rapamycine

Management of HNSCC relies on surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Despite these treatments, the 5 years overall survival of patient is lower than 50%. Main causes of therapeutic failure are due to the profile of resistance of tumors. The efficacy of a combination rapalogues and anti-EGFR therapies in targeting the EGFR/mTOR/HIF-1 axis in solid tumors was shown previously. In this PhD work, we have evaluated the impact of a low-dose drug combination on head and neck cancer cells lines with a pharmacological and molecular approach. We show that the combination of rapamycine (5nM) and cetuximab (2,5µg/ml) efficiently inhibits the HIF-1 transcription factor and impairs cell clonogenic survival. The efficacy of radiation therapy is improved by this drug combination. However, cell resistance to the treatment is acquired via the induction of HIF-2 in our resistant model cell line. This induction is associated with more tumor relapse in tumors mice xenograft. The inhibition of HIF-2 achieves a dramatic drop of cell clonogenic survival to < 1%.

Radiotherapy, head and neck cancer, cetuximab, EGFR, mTOR, HIF-1, HIF-2, rapamycin