



HAL
open science

Caractérisation d'un modèle cellulaire et animal orthotopique des cancers des VADS : du ciblage tumoral in vitro ou rôle de l'imagerie de fluorescence in vivo dans l'exérèse tumorale

Ihab Atallah

► **To cite this version:**

Ihab Atallah. Caractérisation d'un modèle cellulaire et animal orthotopique des cancers des VADS : du ciblage tumoral in vitro ou rôle de l'imagerie de fluorescence in vivo dans l'exérèse tumorale. Pneumologie et système respiratoire. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV064 . tel-01553298

HAL Id: tel-01553298

<https://theses.hal.science/tel-01553298>

Submitted on 3 Jul 2017

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie du développement-Oncogénèse

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Ihab Nader Tawfik ATALLAH

Thèse dirigée par **Pr Christan Adrien RIGHINI**
codirigée par **Dr Amandine HURBIN**

préparée au sein de **l'INSERM/UJF U823**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Caractérisation d'un modèle cellulaire et animal orthotopique des cancers des VADS : du ciblage tumoral *in vitro* au rôle de l'imagerie de fluorescence *in vivo* dans l'exérèse tumorale

Thèse soutenue publiquement le **30 juin 2014**,
devant le jury composé de :

Pr Emile REYT

PU-PH, CHU de Grenoble, Président

Dr Alexandre BOZEC

PH, Institut Universitaire de la Face et du Cou, Nice, Rapporteur

Pr Renaud GARREL

PU-PH, CHU de Montpellier, Rapporteur

Pr Serge MORDON

Directeur de Recherche, INSERM U703, Lille, Membre

Dr Amandine HURBIN

Chercheur, INSERM/UJF U823, Grenoble, Co-Directeur

Pr Christian Adrien RIGHINI

PU-PH, CHU de Grenoble, Directeur

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



A Gladys, ma femme, pour son soutien,

A Elise, ma fille,

Et à tous ceux qui me sont chers

« Pour un esprit scientifique, toute connaissance est une réponse à une question. S'il n'y a pas eu de question, il ne peut y avoir connaissance scientifique. Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit. »

Gaston Bachelard (1884-1962)

La formation de l'esprit scientifique

Remerciements

Au directeur de ma thèse, Monsieur le Professeur Righini. Je vous remercie de m'avoir encouragé à réaliser ce travail et de m'avoir soutenu tout le long de mon clinicat et de ma thèse. Vos conseils avisés m'ont été très précieux. J'admire votre esprit critique et votre sens d'argumentation médicale et scientifique. Vous êtes pour moi un exemple à suivre. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect et de ma reconnaissance.

À mon co-directeur de thèse, Madame le Docteur Amandine Hurbin. Je vous remercie pour votre soutien et votre encadrement. Vous étiez attentive au moindre détail de mon travail. Vous étiez toujours à l'écoute de mes interrogations. Vous m'avez aidé à surmonter les difficultés que j'ai confrontées dans mon travail de recherche. Vous m'avez appris la rigueur en recherche scientifique fondamentale. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

À Monsieur le Docteur Jean-Luc COLL, mon co-encadrant de thèse et le responsable de l'équipe 5 de l'IAB. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe. J'ai apprécié la pertinence de vos conseils et vos idées originales qui reflètent votre grande expérience en recherche scientifique.

À Monsieur le Professeur Reyt. Je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de soutenance et du comité de suivi de thèse. Je vous exprime ma reconnaissance de m'avoir libéré autant que possible de mes obligations cliniques dans le service ORL afin d'avancer dans mon travail de recherche.

À Monsieur le Professeur Schmerber. Vous êtes reconnu pour vos qualités d'expertise et chirurgicales dans le domaine de l'otologie et de l'oto-neurochirurgie. J'espère que je pourrai bénéficier de cette expérience et que vous pourrez me permettre de progresser dans ce domaine de notre spécialité.

À monsieur le Professeur Pison. Tous mes remerciements d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse. J'admire votre dynamisme.

À mon cher collègue Alexandre. Je te souhaite de tout mon cœur une grande réussite dans ta carrière.

À Clément. Je te remercie pour ton aide précieuse. Je te souhaite plein de succès pour ton avenir.

À tous les membres de l'équipe 5 et 2, spécialement, Docteur Véronique Josserand, Docteur Sandrine Dufort, Docteur Jaheli Fuenmayor, Laetitia Falcon, Pascal Perron, Maxime Henry, Julien Vollaire, Michelle Keramidas, Céline Lampreia, Mélanie Guidetti, Morgane Couvet et Anthony Lucas. Merci pour votre soutien et votre aide.

À mes collègues doctorants et étudiants en Master, Mona, Tao, Victor, Asma, Delphine, Jungyoon, Marie, Christiane, Anastassia et Pauline. Je vous souhaite la réussite dans votre carrière.

Aux internes du service ORL. Je vous remercie pour l'effort que vous faites afin d'être à la hauteur de la responsabilité qui vous est confiée. Je vous souhaite un bel avenir professionnel.

À Monsieur le Docteur Bozec. Je vous remercie d'avoir accepté d'être le rapporteur de ma thèse et de m'avoir mis en contact avec le Laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre anticancéreux Antoine Lacassagne de Nice afin d'accéder à la lignée cellulaire utilisée dans mon travail de recherche.

Je remercie Monsieur le Professeur Garrel de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteur.

À Monsieur le Professeur Mordon. Je vous remercie pour votre réponse rapide et favorable quand je vous ai sollicité en tant que membre du jury.

Je remercie la Fondation d'Entreprise Groupe Pasteur Mutualité et la Société Française d'ORL pour leurs bourses.

Je remercie la société Fluoptics et le Laboratoire d'Électronique et de Technologies de l'Information du CEA de Grenoble pour leur aide technique.

Enfin, je tiens à remercier monsieur le Docteur Didier Boturyn, responsable de l'équipe d'Ingénierie et Interaction BioMoléculaires (I2BM) de l'unité de recherche UMR CNRS-UJF 5250 de Grenoble et le Docteur Michael Claron qui a synthétisé les peptides utilisés dans mon travail. Je remercie aussi l'Institut des Biomolécules Max Mousseron CNRS UMR 5247 de Montpellier, qui nous a fourni les nanoparticules.

Avant-propos

Ce travail a été effectué à l'Institut Albert Bonniot (INSERM/UJF U823), au sein de l'équipe 5 « Thérapie ciblée, diagnostic précoce et imagerie du cancer ». Il a donné lieu aux manuscrits et communications suivants :

- Ihab Atallah, Clément Milet, Henry Maxime, Véronique Josserand, Emile Reyt, Amandine Hurbin, Jean-Luc Coll, Christian Adrien Righini. Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves the recurrence-free survival rate in a novel orthotopic animal model of HNSCC. (Article soumis à Head and Neck)
- Ihab Atallah, Clément Milet, Jean-Luc Coll, Emile Reyt, Christian Adrien Righini, Amandine Hurbin. Role Of Near-Infrared Fluorescence Imaging In Head And Neck Cancer Surgery : From Animal Models To Humans. (Article soumis à European Archives of Oto-Rhino-Laryngology)
- Paul Dorval, Ihab Atallah, Gabriele Barabino, Maxime Henry, Michele Keramidas, Fabien Stenard, Clément Milet, Christian Righini, Philippe Rizo, Stéphanie Guillermet, Véronique Josserand, Jean-Luc Coll. Miniaturized Clinical Imaging Device for Optical Surgery. Concepts and Applications of Fluorescence Imaging for Surgeons. (Livre qui sera publié par Springer)
- Ihab Atallah, Clément Milet, Henry Maxime, Véronique Josserand, Emile Reyt, Jean-Luc Coll, Christian Adrien Righini, Amandine Hurbin. La résection tumorale guidée par l'imagerie en fluorescence proche infrarouge des cancers des VADS dans un modèle animal orthotopique, améliore le taux de survie sans rechute. Journée de la recherche médicale de Grenoble, Juin 2014 (poster et communication orale suite à la sélection par le Comité d'Organisation de la Journée de la Recherche Médicale 2014 pour l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant).

- Atallah I, Righini C, Milet C, Keramidas M, Guillermet S, Hurbin A, Coll JL. Optimization of an animal model for head & neck cancer and use of fluorescent imaging in tumor resection. Journée des Utilisateurs Fluobeam, Grenoble, Juillet 2013.
- Atallah I, Righini C, Milet C, keramidas M, Guillermet S, Hurbin A, Coll J-L. Optimisation d'un modèle animal pour les cancers des VADS et apport de l'imagerie en fluorescence dans l'exérèse tumorale. Journée de la recherche médicale de Grenoble, Juin 2013 (communication affichée).

Ce travail a été également honoré de deux bourses :

- Bourse de la Fondation d'Entreprise Groupe Pasteur Mutualité pour l'utilisation de l'imagerie en fluorescence dans l'exérèse tumorale des cancers des VADS chez un modèle animal orthotopique
- Bourse de la Société Française d'ORL pour la caractérisation *in vitro* et *in vivo* des cellules de cancer des VADS CAL33 et identification de cibles thérapeutiques

Résumé

Introduction : La thérapie ciblée des cancers des VADS nécessite la mise au point de nouveaux vecteurs spécifiques. Ces vecteurs servent à acheminer des substances thérapeutiques, mais aussi ils peuvent être couplés à des fluorophores afin de les utiliser dans la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge.

Objectifs : L'objectif de notre travail est de tester de nouveaux vecteurs des cancers des VADS et d'étudier l'apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la chirurgie des cancers des VADS chez un modèle animal orthotopique que nous mettons au point.

Matériel et méthodes : La lignée cellulaire des cancers des VADS CAL33 est caractérisée *in vitro* et *in vivo*. De nouveaux vecteurs qui ciblent un ou plusieurs récepteurs des cellules CAL33 comme l'intégrine $\alpha\beta3$, l'EGFR et la NRP1, sont testés *in vitro*. Parallèlement, un modèle animal orthotopique des cancers des VADS est développé par implantation de fragments tumoraux des cellules CAL33, au niveau de la cavité buccale de la souris nude. La résection des tumeurs orthotopiques est guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge, après injection systémique du peptide RAFT-c[RGD]₄ couplé à un fluorophore. Ce peptide cible l'intégrine $\alpha\beta3$ et est préalablement testé *in vivo* sur les cellules CAL33.

Résultats : Nos résultats préliminaires montrent que certaines molécules bispécifiques présentent une liaison accrue *in vitro* aux cellules CAL33. Par ailleurs, la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$, présente un impact positif sur la survie sans rechute dans notre modèle orthotopique, à travers la détection de reliquats tumoraux qui pourraient passer inaperçus si l'exérèse tumorale avait été réalisée exclusivement d'une façon macroscopique. Elle permet aussi de détecter les adénopathies métastatiques.

Conclusion : L'imagerie de fluorescence proche infrarouge améliore la qualité de l'exérèse tumorale dans notre modèle orthotopique optimisé des cancers des VADS. Cette étape préclinique est indispensable avant de tester cette technique chez l'être humain.

Mots clés : cancers des VADS, vecteur spécifique, modèle animal orthotopique, imagerie de fluorescence proche infrarouge, intégrine $\alpha\beta3$, RAFT-c[RGD]₄

Abstract

Characterization of a cellular model and an orthotopic animal model of HNSCC: from *in vitro* tumor targeting to *in vivo* fluorescence imaging-guided tumor resection

Introduction: Targeted therapy of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) requires the development of novel specific vectors that can deliver therapeutic molecules. These vectors could also be coupled to fluorophores to be used in near infrared fluorescence imaging-guided surgery.

Objectives: The aim of our work is to test new targeted vectors of HNSCC and to study the role of the near infrared fluorescence imaging-guided surgery in HNSCC resection in a novel orthotopic animal model that we develop.

Materials and Methods: The HNSCC cell line CAL33 is characterized *in vitro* and *in vivo*. Novel vectors that target one or more receptors of this cell line such as $\alpha\beta3$ integrin, EGFR and NRP1, are tested *in vitro*. Meanwhile, an orthotopic animal model of HNSCC is developed by implanting tumor fragments of CAL33 cells, in the oral cavity of nude mice. Surgical resection of orthotopic tumors is guided by the near infrared fluorescence imaging after systemic injection of RAFT-c[RGD]₄ peptide coupled with a fluorophore. This peptide targets $\alpha\beta3$ integrin and is previously tested *in vitro*.

Results: Our preliminary results show that bispecific vectors would present an increased binding to CAL33 cells *in vitro*. On the other hand, near infrared fluorescence imaging-guided surgery has a positive impact on the recurrence-free survival rate in our orthotopic model, by detecting fluorescent cancer foci that could remain unidentified if resection was performed exclusively under visual guidance. Our results show also that near infrared fluorescence imaging can also help to detect metastatic lymph nodes.

Conclusion: Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves the quality of tumor resection in our optimized orthotopic animal model of HNSCC. This preclinical stage is essential before testing this novel technique in humans.

Keywords: HNSCC, specific vector, near-infrared fluorescence imaging, orthotopic animal model, $\alpha\beta3$ integrin, RAFT-c[RGD]₄

Table des matières

Remerciements	4
Avant-propos	7
Résumé	9
Abstract	10
Table des matières	11
Tableau des figures.....	13
Liste des abréviations	15
Chapitre 1 : Introduction	17
1.1. Les cancers des VADS	17
1.1.1. Traitement des cancers des VADS.....	19
1.1.2. Les nouvelles cibles thérapeutiques des cancers des VADS.....	25
1.2. Les modèles animaux des cancers des VADS	37
1.3. L'imagerie optique <i>in vivo</i>	39
1.3.1. Principes de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge	39
1.3.2. Principes de l'imagerie optique en bioluminescence	41
1.3.3. Apport de l'imagerie optique de fluorescence proche infrarouge dans la chirurgie des cancers des VADS	42
1.4. Objectifs de notre travail de recherche.....	60
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.....	62
2.1. Cellules et culture cellulaire	62
2.2. Western blot et immuno-détection	62
2.3. Cytométrie en flux.....	64
2.4. Ciblage moléculaire.....	65
2.4.1. Ciblage de l'intégrine $\alpha\beta 3$	65
2.4.2. Ciblage de l'EGFR	66
2.4.3. Ciblage de la neuropiline.....	68
2.5. Développement de tumeurs <i>in vivo</i>	69
2.5.1. Développement de tumeurs sous-cutanées et intramusculaires	70

2.5.2.	Mise au point d'un nouveau modèle animal orthotopique des cancers des VADS	70
2.6.	Histologie et immunohistochimie des tumeurs	75
2.6.1.	Coloration hématoxyline & éosine (H&E).....	75
2.6.2.	Immunohistochimie.....	75
2.7.	Ciblage tumoral <i>in vivo</i> et imagerie optique	76
2.7.1.	Imagerie en bioluminescence	76
2.7.2.	Imagerie de fluorescence.....	77
Chapitre 3 :	Résultats	81
3.1.	Caractérisation <i>in vitro</i> de la lignée cellulaire CAL33.....	83
3.2.	Ciblage cellulaire.....	84
3.2.1.	Résultats du ciblage de l'intégrine $\alpha\beta 3$	84
3.2.2.	Résultats du ciblage de l'EGFR	85
3.2.3.	Résultats du ciblage de la NRP1	87
3.3.	Tumeurs CAL33 sous-cutanées et intramusculaires	89
3.3.1.	Croissance tumorale <i>in vivo</i> des cellules CAL33	90
3.3.2.	Ciblage de l'intégrine $\alpha\beta 3$ <i>in vivo</i>	92
3.4.	Développement d'un nouveau modèle animal orthotopique des cancers des VADS ..	94
3.4.1.	Développement tumoral intralingual.....	94
3.4.2.	Développement tumoral intrajugal.....	95
3.4.3.	Caractérisation des tumeurs <i>in vivo</i>	97
3.4.4.	Développement de métastases ganglionnaires	99
3.5.	Apport de l'imagerie de fluorescence dans la chirurgie des cancers des VADS ...	101
3.5.1.	Apport dans la résection tumorale.....	101
3.5.2.	Apport dans la chirurgie ganglionnaire	128
Chapitre 4 :	Discussion	130
Chapitre 5 :	Conclusion et perspectives	137
Bibliographie	138

Tableau des figures

Figure 1 : Localisations des cancers des VADS	17
Figure 2 : Structure et fonction de l'EGFR.	26
Figure 3 : Signalisation de l'EGFR et mécanismes d'action des anti-EGFR.	27
Figure 4 : Structure des neuropilines.....	30
Figure 5 : Le peptide ATWLPPR.....	31
Figure 6 : Changement conformationnel de l'intégrine $\alpha\beta3$	32
Figure 7 : Mécanismes d'internalisation des intégrines	33
Figure 8 : Clustering des récepteurs par un ligand polyvalent.....	35
Figure 9 : Structure du RAFT-c[RGD] ₄	36
Figure 10 : Types des nanovecteurs	37
Figure 11 : Principes de l'imagerie optique de fluorescence	41
Figure 12 : Principe de l'imagerie optique en bioluminescence.	42
Figure 13 : Structure du RAFT RAFT-c[RGD] ₄ et du RAFT-c[RAA] ₄	66
Figure 14 : Structure du GE11 et du RAFT-c[RGD] ₄ -(PEG)(11)-GE11.	67
Figure 15 : Représentation schématique de la liaison cellulaire de la molécule bispécifique RAFT-c[RGD] ₄ -(PEG)(11)-GE11.....	67
Figure 16 : Structure de l'ATWLPPR, du RAFT-c[RGD] ₄ -PEG(11)-ATWLPPR , du RAFT- c[RGD] ₄ -PEG(24)-ATWLPPR et du RAFT-c[RGD] ₄ -RAFT-[ATWLPPR] ₄	68
Figure 17 : Etapes de synthèse des nanoparticules bispécifiques qui ciblent la NRP1 et l'intégrine $\alpha\beta3$	69
Figure 18 : Implantation des tumeurs orthotopiques.....	72
Figure 19 : Explantation des tumeurs orthotopiques.....	73
Figure 20 : Photo de l'appareil IVIS Kinetic	77
Figure 21 : Spectre d'absorbance et d'émission de l'AngioStamp™ 800	78
Figure 22 : Caméra d'imagerie de fluorescence proche infrarouge : FluoSTIC	79
Figure 23 : Caméra d'imagerie de fluorescence proche infrarouge : FluoStick™	79
Figure 24 : Schéma résumé des résultats	82
Figure 25 : Caractérisation <i>in vitro</i> par western blot des cellules CAL33	83
Figure 26 : Résultat du marquage en cytométrie en flux par l'anticorps anti-intégrine $\alpha\beta3$.	84
Figure 27 : Etude de l'adhésion du RAFT-c[RGD] ₄	85

Figure 28 : Cytométrie en flux : ciblage des cellules CAL33 par le GE11 couplé ou non au RAFT-c[RGD] ₄	86
Figure 29 : Effet des peptides bispécifiques qui ciblent l'EGFR et l'intégrine $\alpha v\beta 3$, sur la phosphorylation de l'EGFR.	87
Figure 30 : Liaison de l'ATWLPPR couplé ou non au RAFT-c[RGD].....	88
Figure 31 : Liaison des nanoparticules.....	89
Figure 32 : Bioluminescence des tumeurs sous-cutanées	90
Figure 33 : Croissance tumorale sous-cutanée et intramusculaire	92
Figure 34 : Imagerie de fluorescence des tumeurs sous-cutanées.....	93
Figure 35 : Tumeurs intralinguales : bioluminescence et fluorescence	95
Figure 36 : Tumeur orthotopique développée	96
Figure 37 : Suivi en bioluminescence des tumeurs orthotopiques.	96
Figure 38 : Image histologique (H&E) d'une tumeur développée à partir des cellules CAL33	97
Figure 39 : Caractérisation <i>in vivo</i> de la lignée cellulaire CAL33	98
Figure 40 : Immunohistochimie des tumeurs orthotopiques.....	98
Figure 41 : Imagerie de fluorescence des tumeurs orthotopiques	99
Figure 42 : Détection des adénopathies métastatiques.....	100
Figure 43 : Analyse histologique des ganglions (H&E)	100
Figure 44 : Apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la chirurgie ganglionnaire des cancers des VADS	129

Liste des abréviations

4NQO : 4-nitroquinoline 1-oxyde

5-FU : 5-fluorouracile

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARN : acide ribonucléique

CCD : charge coupled device

Cy5 : cyanine 5

DMBA : 7,12-diméthylbenz[a]anthracène

EGFR : epidermal growth factor receptor

EPR : enhanced permeability and retention effect

GLUT-1 : glucose transporter 1

H&E : hématoxyline-éosine

HPV : human papilloma virus

ICG : vert d'indocyanine

l'IGF1-R : insulin like growth factor-1 receptor

NRP1 : neuropiline 1

NRP2 : neuropiline 2

NRPs : neuropilines

PEG : polyéthylène glycol

PFA : Paraformaldehyde

PKC α : protein kinase C-alpha

PlGF : placental growth factor

QRT-PCR : quantitatif reverse transcriptase - polymerase chain reaction

RAFT-c[RGD]₄: Regioselectively Addressable Functionalized Template-arginine-glycine-aspartic acid

RGD : la séquence tripeptidique (Arginine – Glycine – Acide aspartique)

SEMA : sémaphorine

TEP-scanner : tomographie par émission de positons couplée à un scanner

TGF : transforming growth factor

TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate

VADS : voies aérodigestives supérieures

VEGF : vascular endothelial growth factor

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Les cancers des VADS

Les tumeurs des voies aérodigestives supérieures (VADS) se divisent en trois groupes : les tumeurs naso-sinusiennes, les tumeurs des glandes salivaires et les tumeurs de la cavité buccale, du pharynx et du larynx (Figure 1). Ce sont les tumeurs du troisième groupe qui sont les plus fréquentes. Dans plus de 90% de cas, les tumeurs de ce groupe sont des tumeurs malignes épithéliales de type carcinome malpighien. Selon la Haute Autorité de Santé, les cancers des VADS se situent au cinquième rang des cancers les plus fréquents en France, tout sexe confondu, avec près de 20 000 nouveaux cas par an et une mortalité estimée à près de 5000 décès par an. Au niveau mondial, on compte près de 650 000 nouveaux cas chaque année avec plus de 350 000 décès (Boing et Antunes, 2011; Mehanna et al., 2011). Cette incidence, au contraire de ce qui est constaté en France, est en augmentation.

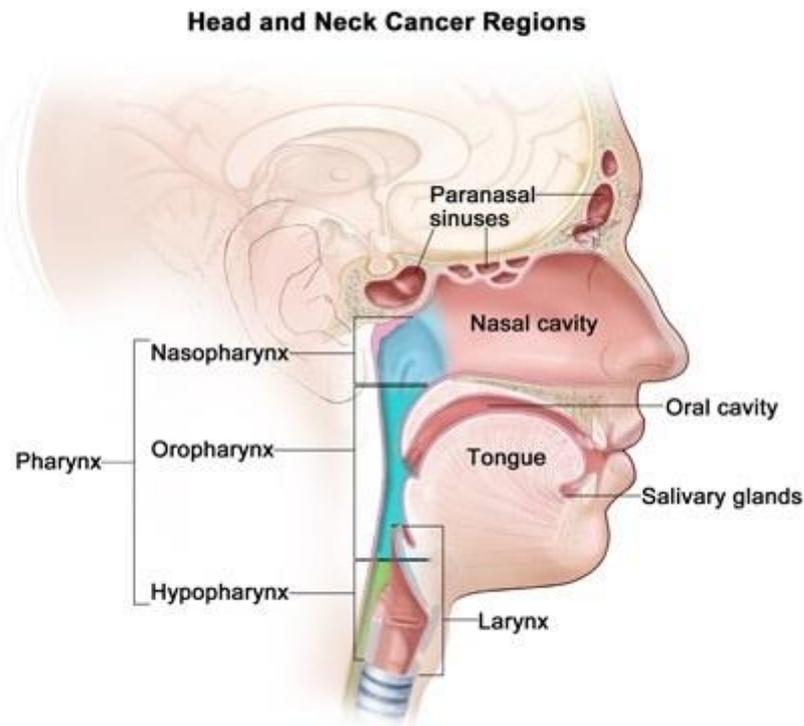


Figure 1 : Localisations des cancers des VADS (d'après National Cancer Institute, 2013)

Les facteurs de risque principaux des cancers des VADS sont la consommation tabagique et alcoolique (Mehanna et al., 2011). Ces deux facteurs de risque sont reconnus depuis longtemps et agissent d'une manière dose-dépendante. Cependant, le HPV (Human Papilloma Virus) et plus spécifiquement le type 16, pourrait avoir un rôle dans la cancérogenèse des cancers de l'oropharynx surtout chez les jeunes adultes, tout particulièrement au niveau des amygdales palatines et à moindre degré au niveau de la base de langue (Neufcoeur et al., 2009).

Les cancers des VADS sont initialement paucisymptomatiques. Les signes le plus souvent rapportés sont : une gêne pharyngée, une douleur pharyngée spontanée ou à la déglutition de la salive et/ou des aliments (odynophagie), une otalgie réflexe, une dysphagie, une dysphonie et une dyspnée de type laryngée. Leur persistance et leur caractère unilatéral doivent alerter et conduire à réaliser un examen clinique ORL surtout chez les sujets à risques. Plus rarement, les cancers des VADS se révèlent par une adénopathie cervicale métastatique d'apparence primitive alors que le patient ne présente aucun signe fonctionnel suspect (Argiris et al., 2008; Hans et Brasnu, 2010). On parle alors d'adénopathie prévalente.

Devant une suspicion d'un cancer des VADS, un examen clinique complet des VADS doit être réalisé en ayant recours de façon systématique à une nasofibroscopie qui permettra, entre autre, d'examiner de façon précise le rhinopharynx (le cavum) et pallier le réflexe nauséux qui peut être un véritable obstacle à un examen clinique de bonne qualité. Une fois cet examen clinique effectué, l'examen endoscopique doit être réalisé à titre systématique. Il est réalisé sous anesthésie générale et il doit permettre de prélever un fragment de tumeur (biopsie) afin de confirmer le diagnostic. Cet examen est aussi indispensable pour évaluer l'extension locorégionale et dépister une tumeur synchrone des VADS qui peut être présente dans 10 à 15 % des cas.

Le bilan radiologique fait partie intégrante du bilan initial des cancers des VADS. Il doit permettre d'apprécier l'extension tumorale locale et régionale et d'analyser l'ensemble des aires ganglionnaires cervicales. Ce bilan doit être réalisé avant l'examen endoscopique avec biopsie afin de ne pas interférer avec les images créées par la ou les biopsies réalisées. Le scanner cervical est l'examen demandé en première intention pour les cancers du larynx et de l'hypopharynx. L'IRM avec injection de gadolinium apparaît nettement supérieure au scanner

pour l'évaluation de l'extension des tumeurs de l'oropharynx et de la cavité buccale. La TEP-scanner (tomographie par émission de positons couplée à un scanner) n'est pas indiquée à titre systématique, mais elle est discutée en cas de risque élevé de métastases, notamment chez les patients atteints d'un cancer de stade avancé pour rechercher des métastases viscérales. Cet examen a également un intérêt important dans le bilan des adénopathies cervicales métastatiques d'apparence primitive à la recherche d'une fixation anormale pharyngée suspecte de correspondre au cancer primitif (Argiris et al., 2008; Hans et Brasnu, 2010).

Le bilan préthérapeutique aboutit à une classification TNM (tumeur, ganglions, métastases) qui est un facteur pronostique majeur et la clef de voûte des indications thérapeutiques. Les décisions thérapeutiques des cancers des VADS impliquent la collaboration de plusieurs spécialistes ; le chirurgien ORL, l'onco-radiothérapeute, l'oncologue médical, le radiologue et le chirurgien plasticien. Le site, le stade et la résecabilité de la tumeur ainsi que les comorbidités du patient sont pris en compte lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire afin de proposer un traitement adapté. Le traitement des cancers des VADS a comme premier objectif de contrôler localement la maladie tout en minimisant le plus possible les séquelles thérapeutiques.

Les cancers des VADS présentent, tous stades confondus, un taux de survie en moyenne entre 30 et 40 % à cinq ans (Cojocariu et al., 2009; Poissonnet et al., 2007). Pour les stades avancés, la survie sans rechute reste inférieure à 50 % à trois ans malgré des progrès indéniables en matière de chirurgie, de radiothérapie et de chimiothérapie (Thariat et al., 2013).

Les récents progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la genèse et le développement des cancers ont permis le développement de nouvelles thérapeutiques des cancers des VADS.

1.1.1. Traitement des cancers des VADS

Actuellement, le traitement des cancers des VADS repose sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, tandis qu'apparaît la perspective de leur adjoindre les thérapies ciblées. Le traitement des cancers des VADS à un stade localement avancé, mais accessible fait appel à plusieurs de ces techniques diversement associées. Les associations optimales sont loin d'être

établies actuellement, d'autant que la diversité des localisations topographiques tumorales complique l'établissement de protocoles évaluant de façon pertinente les différentes stratégies disponibles

1.1.1.1. Le traitement chirurgical des cancers des VADS

La chirurgie est le traitement de référence des cancers des VADS. Elle intéresse la tumeur primitive et les aires ganglionnaires cervicales. La voie d'abord et le geste chirurgical réalisés dépendent de la localisation de la tumeur et de ses extensions et fait souvent appel à des techniques de chirurgie réparatrice plus ou moins complexes. L'extension anatomique de la tumeur est un facteur limitant de la chirurgie qui vise le plus possible à diminuer les conséquences fonctionnelles de la résection tumorale afin de préserver les fonctions des VADS, qui sont la respiration par les voies naturelles, la phonation et la déglutition (Poissonnet et al., 2007; Saint-Guily et Périé, 2006). La limitation des séquelles fonctionnelles est réalisée par la préservation d'un tissu fonctionnel non tumoral et/ou en utilisant des techniques fiables de reconstruction adaptées à chaque type d'exérèse. Les techniques de réparation font appel à des procédés comme les sutures simples, les greffes cutanées et les lambeaux cutanés ou myocutanés locorégionaux pédiculés ou libres. Ces deux derniers autorisent l'exérèse d'un volume tumoral assez important (Poissonnet et al., 2007).

La chirurgie des cancers des VADS doit permettre l'exérèse complète de la lésion avec des marges de sécurité suffisantes. Cela rappelle l'importance de la qualité de l'exérèse chirurgicale sur le plan pronostique. En effet, le caractère tumoral des limites d'exérèse chirurgicale a un impact péjoratif sur le pronostic, et plus spécifiquement sur la survie sans récurrence locorégionale (Vincent et al., 2012). En plus de la résection tumorale et compte tenu du taux d'envahissement ganglionnaire dans les cancers des VADS qui peut même atteindre 30 % à 40 % chez les patients ne présentant pas d'adénopathie clinique (cN0), un évidement ganglionnaire cervical de principe, est préconisé, dans un but diagnostique et thérapeutique. Une approche plus récente se propose de limiter la chirurgie ganglionnaire au seul but diagnostique en ne prélevant que les ganglions sentinelles sensés être représentatifs de l'atteinte des ganglions cervicaux. Dans cette technique qui est en cours de validation dans les cancers des VADS, un radio-traceur est injecté en péri-tumorale et suivi en imagerie nucléaire afin de détecter le premier relai ganglionnaire qui est prélevé et analysé en examen anatomopathologique pour confirmer ou non l'atteinte ganglionnaire. D'autres techniques

d'analyse plus rapides que l'examen histologique et qui permettent de détecter des micrométastases, sont en cours de développement, notamment l'analyse par QRT-PCR (quantitatif reverse transcriptase polymerase chain reaction) des ganglions sentinelles en ciblant certaines cytokératines (Garrel et al., 2006; Hamakawa et al., 2000).

Dans la pratique chirurgicale, les marges d'exérèse des cancers des VADS sont définies macroscopiquement par l'opérateur. La palpation est aussi indispensable pendant l'exérèse tumorale surtout au niveau de la partie profonde de la tumeur afin de passer à distance de la lésion. Ensuite, le chirurgien réalise la résection de la lésion avec des marges de sécurité de 0,5 à 1 cm, mais ces marges ne sont pas unanimement reconnues et dépendent également de la localisation tumorale. En plus de la résection macroscopique par le chirurgien, un examen anatomopathologique extemporané est effectué pour analyser des recoupes réalisées à la circonférence de l'exérèse plus ou moins au niveau du lit chirurgical. Cette analyse permet de savoir si les recoupes sont indemnes ou non de l'envahissement tumoral. Dans certains cas, il existe une discordance entre l'examen anatomopathologique extemporané et définitif. Ce dernier pourrait montrer que la résection tumorale n'a pas été réalisée en zone saine, ce qui impose une reprise chirurgicale ou une radiothérapie complémentaire. En plus, l'examen anatomopathologique est une analyse qui prend du temps (environ 30 minutes) et dans certains cas compliqués, l'opérateur pourrait avoir recours à plusieurs analyses extemporanées pendant la même intervention ce qui prolonge la durée de l'anesthésie générale. En conséquence, il pourrait exister une augmentation de la morbidité opératoire et postopératoire. Finalement, se pose le problème de l'exérèse *in sano* au niveau du lit tumoral avec toutes les difficultés de réaliser des prélèvements qui représentent la totalité du lit tumoral pour l'envoi en analyse anatomopathologique extemporané (Meier et al., 2005; Ord et Aisner, 1997). C'est dans ces cas où on peut trouver toute l'utilité d'une imagerie peropératoire en temps réel, spécifique aux cancers des VADS et qui pourrait guider le chirurgien pendant la résection tumorale afin de réaliser une exérèse complète sans avoir recours à l'examen anatomopathologique extemporané.

1.1.1.2. Rôle de la radiothérapie dans le traitement des cancers des VADS

La radiothérapie a un rôle important dans le traitement des cancers des VADS. Elle est considérée comme un traitement locorégional. En effet, elle agit directement sur la zone

cancéreuse et sa périphérie ainsi que sur les aires ganglionnaires du drainage lymphatique régional. Elle peut constituer une alternative valable à la chirurgie dans les stades précoces de la maladie en cas de contre-indication ou de refus de la chirurgie. Dans les stades avancés avec une tumeur et/ou une adénopathie inextirpable, elle est considérée, avec la chimiothérapie, comme le traitement de référence. Le traitement par radiothérapie implique un compromis entre la nécessité d'irradier suffisamment le tissu cancéreux pour permettre le contrôle local de la maladie et la volonté d'irradier au minimum les tissus sains voisins comme la moelle épinière, la peau, les muqueuses, les glandes salivaires, les globes oculaires, les nerfs optiques et l'encéphale afin de diminuer les séquelles thérapeutiques comme la radiomucite et la radio-épithélite qui peuvent nécessiter la mise en place d'une alimentation entérale provisoire. Ces deux complications sont habituellement réversibles mais leur intensité peut parfois imposer l'arrêt du traitement ce qui est considéré comme un facteur pronostique péjoratif pour le contrôle de la maladie et la survie. Les complications chroniques de radiothérapie sont la xérostomie, l'induration tégumentaire cervicale et les troubles de déglutition. Elles surviennent à partir de la sixième semaine après la fin du traitement. Les complications dentaires doivent être prévenues par la remise en état avant le traitement et par des soins quotidiens sous forme des bains de bouche, et des gouttières fluorées à vie afin d'éviter l'ostéoradionécrose. Parmi les complications tardives de la radiothérapie, nous pouvons citer le trismus, la sténose pharyngée et/ou laryngée, la nécrose laryngée et la myélite post-radique. La toxicité de la radiothérapie peut être majorée par une chimiothérapie concomitante (Bensadoun et Pinel, 2012; Poissonnet et al., 2007).

La radiothérapie est aussi utilisée en postopératoire chez les patients chez qui l'analyse histopathologique de la pièce opératoire montre des éléments histopronostiques péjoratifs comme la présence de plusieurs adénopathies envahies et/ou en rupture capsulaire et la mise en évidence d'embolies vasculaires tumorales et/ou d'engainements tumoraux péri-nerveux au sein de la tumeur, et d'une marge d'exérèse limite ou envahie. Le rôle de la radiothérapie dans ces situations est de diminuer les risques de rechute locale après la chirurgie (Argiris et al., 2008; Le Tourneau et al., 2008; Saint-Guily et Périé, 2006; Vincent et al., 2012).

Malgré l'efficacité de la radiothérapie, elle présente, comme nous l'avons cité, plusieurs effets secondaires. Pour cette raison, des nouvelles molécules spécifiques aux cancers sont en cours de développement. Elles permettent, après administration systémique, de se fixer au sein de la

tumeur et agissent comme un radio-sensibilisant grâce à leur forte interaction avec les ondes ionisantes de la radiothérapie. En conséquence, ces molécules pourraient augmenter l'efficacité de la radiothérapie tout en diminuant la dose de radiation administrée au patient et par la suite réduire les effets indésirables (Le Duc et al., 2011; Mousavie Anijdan et al., 2013).

1.1.1.3. La chimiothérapie

La chimiothérapie peut être utilisée toute seule ou en association avec la radiothérapie dans le traitement des cancers des VADS. Elle tente d'améliorer le contrôle local et la survie selon plusieurs modalités : en induction, adjuvante ou concomitante à la radiothérapie.

La chimiothérapie d'induction (ou néoadjuvante) se définit comme une chimiothérapie débutant un traitement qui sera ensuite complété en fonction de la réponse à cette chimiothérapie par une radiothérapie et plus rarement par une chirurgie. On parle de chimiothérapie à but de préservation d'organe, qui a été initialement proposée dans le cas où une tumeur laryngée et/ou hypopharyngée nécessitait une laryngectomie totale. Cette chimiothérapie était et continue à être faite dans le but d'éviter une laryngectomie totale chez les patients très bons répondeurs à la chimiothérapie (≥ 80 % de réduction du volume tumoral initial). Elle a montré un intérêt dans la préservation laryngée des cancers avancés du larynx et de l'hypopharynx, avec une bonne corrélation entre la chimiosensibilité et la radiosensibilité, en permettant des taux de larynx préservés non opérés de l'ordre de 40 à 60 % à survie inchangée (Leon et al., 2005; Pignon et al., 2005; Poissonnet et al., 2007).

Il est important de noter que la chimiothérapie adjuvante seule ne trouve aucune indication dans le traitement des cancers des VADS. Par ailleurs, la chimiothérapie adjuvante ou concomitante à la radiothérapie repose sur l'interaction qui existe entre les deux traitements. En effet, chacune des deux modalités potentialise l'effet de l'autre par différents mécanismes. Un de ces mécanismes est de rendre les cellules cancéreuses plus radiosensibles grâce à l'amélioration de l'oxygénation cellulaire et le blocage du cycle cellulaire qui sont les effets de la chimiothérapie. L'association des deux modalités sert aussi à retarder la résistance de la tumeur aux traitements. Malheureusement, cette sensibilisation réciproque se fait également au prix de toxicités aiguës et chroniques plus importantes (Espitalier et al., 2012).

Actuellement, les protocoles de chimiothérapie utilisés dans la prise en charge des cancers des VADS reposent sur des associations de cytotoxiques de classes différentes, permettant ainsi d'augmenter la chimiosensibilité. L'arsenal thérapeutique constitué de deux molécules majeures depuis plus de 20 ans, le 5-FU (5-fluorouracile) et le cisplatine qui un sel de platine, a été renforcé par l'avènement récent des taxanes (Argiris et al., 2008; Espitalier et al., 2012; Hans et Brasnu, 2010). Le 5-FU est un antimétabolite analogue des bases pyrimidiques, capable de s'intégrer au sein de l'ARN (acide ribonucléique) et l'ADN (acide désoxyribonucléique) à la place de la thymine ou de l'uracile. Sa principale action antitumorale repose sur sa capacité à inhiber la thymidylate synthétase qui une enzyme essentielle au métabolisme des bases pyrimidiques. Cette action est potentialisée par l'association à l'acide folique. Les sels de platine appartiennent à la classe thérapeutique des alkylants. Ils agissent par la formation d'adduits intra ou interbrins sur l'ADN. La stimulation des systèmes de réparation cellulaire qui en découlent va ensuite orienter les cellules endommagées vers l'apoptose. Les taxanes sont des alcaloïdes de l'if (un arbuste ornemental) qui agissent en inhibant la dépolymérisation des microtubules de tubuline. Ils font partie des molécules classées parmi les poisons du fuseau et agissent essentiellement en phase S du cycle cellulaire (Espitalier et al., 2012).

La toxicité de la chimiothérapie s'explique par sa diffusion systémique et son incapacité à ne détruire que des cellules tumorales. Certains effets secondaires sont propres à une molécule, d'autres communs à toutes les classes thérapeutiques et liés à la destruction des tissus sains à renouvellement rapide. Parmi les effets secondaires des molécules de chimiothérapie des cancers des VADS, on peut citer la toxicité hématologique qui prédomine sur la lignée granulocytaire et expose le patient à des complications infectieuses potentiellement graves. La toxicité digestive peut se manifester par des diarrhées sévères, des colites nécrotiques et des perforations intestinales. La toxicité neurologique peut se traduire par une polyneuropathie sensitive distale ou une atteinte cochléaire. Il existe aussi une toxicité rénale et cardiaque. Finalement, la toxicité cutanéomuqueuse peut se manifester par une éruption maculopapuleuse, érythémateuse, souvent douloureuse et suivie d'une desquamation des mains et des pieds et qui pourrait être associée à une onychodystrophie (Espitalier et al., 2012; Kramer et al., 2005) .

En conséquence, les indications théoriques de chimiothérapie doivent toujours être adaptées à l'état général et aux comorbidités souvent fréquentes des patients pour limiter ces toxicités (Tohnai et al., 1990).

1.1.2. Les nouvelles cibles thérapeutiques des cancers des VADS

Notre connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse a fait d'énormes progrès et nous disposons à l'heure actuelle d'une vision globale, certes imparfaite, mais néanmoins détaillée et opérationnelle de l'oncogenèse. Les aberrations génétiques et les dérégulations des voies de signalisation intracellulaires responsables de cette oncogenèse constituent d'éventuelles cibles thérapeutiques. Ainsi, une nouvelle classe thérapeutique est apparue : les thérapies ciblées. Dans les cancers des VADS, cette classe comprend deux grands types de molécules : les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de la tyrosine kinase. La surexpression de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) par les carcinomes malpighiens des cancers des VADS a permis aux anticorps anti-EGFR comme le cétuximab, de trouver progressivement leurs indications dans le traitement.

1.1.2.1. L'EGFR

L'EGFR est exprimé par 80 % à 90 % des carcinomes malpighiens des VADS. Il joue un rôle particulièrement important dans la transduction du signal régulant les fonctions cellulaires majeures telles que la survie et la prolifération. Le récepteur est activé par les facteurs de croissance tels que l'EGF et le TGF (transforming growth factor) et déclenche, par l'intermédiaire de la voie tyrosine kinase, le recrutement d'effecteurs intracellulaires activant les voies de survie et de prolifération (Figure 2) (Delbaldo et al., 2003; Dreyer et al., 2009; Espitalier et al., 2012).

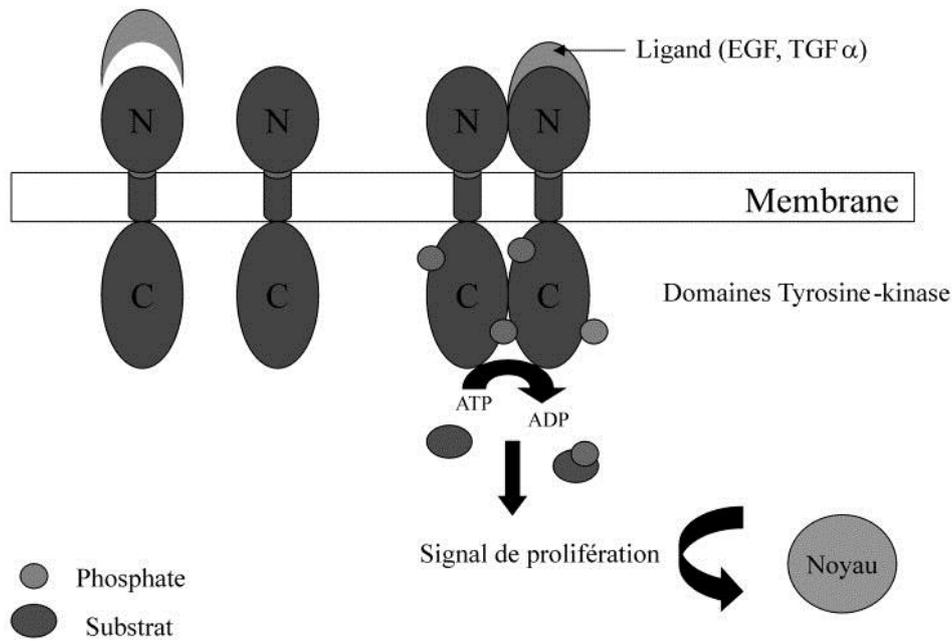


Figure 2 : Structure et fonction de l'EGFR. Les 3 régions sont : domaine N-terminale extracellulaire, domaine transmembranaire, domaine C-terminale intracellulaire. La fixation du ligand permet la dimérisation du récepteur, son autophosphorylation et la transphosphorylation d'un substrat conduisant le signal de prolifération au noyau (Delbaldo et al., 2003).

Les anticorps anti-EGFR se fixent sur la partie extracellulaire de l'EGFR et entrent en compétition avec la fixation du ligand. Ceci entraîne un blocage de la dimérisation et de l'autophosphorylation et par conséquent une inhibition des voies de transduction du signal. En conséquence, la prolifération cellulaire est inhibée à divers degrés et des actions pro-apoptotiques et anti-angiogéniques par activation de la voie extrinsèque de l'apoptose d'une part, et par inhibition de la sécrétion du VEGF (vascular endothelial growth factor) d'autre part, sont mises en œuvre. Quant aux inhibiteurs de la tyrosine kinase comme le géfitinib et l'erlotinib, ils bloquent l'autophosphorylation et la cascade des signaux intracellulaires (Figure 3).

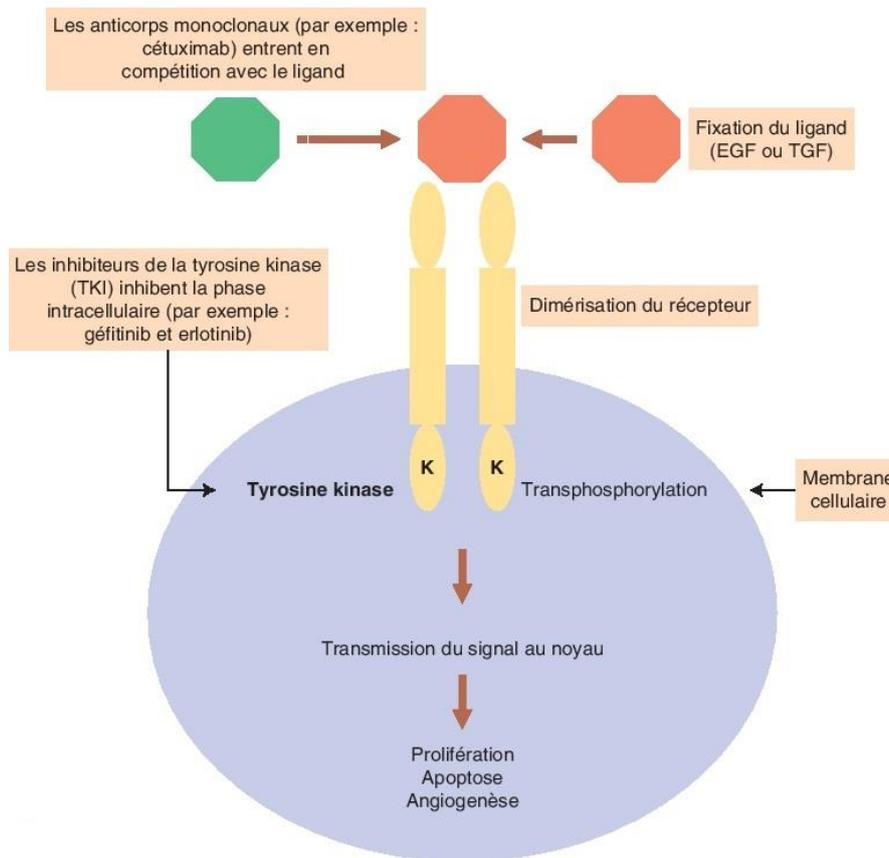


Figure 3 : Signalisation de l'EGFR et mécanismes d'action des anti-EGFR (Espitalier et al., 2012).

Un deuxième avantage fondamental des anticorps anti-EGFR est la possibilité de ciblage de la cellule tumorale par le système immunitaire à travers une réponse immune anti-tumorale de l'hôte, impliquant une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (Ciardiello et Tortora, 2008; Zalcman, 2007).

Le cétuximab en association avec la radiothérapie et la chimiothérapie a été particulièrement exploré dans les carcinomes malpighiens des VADS. En pratique clinique, l'association radiothérapie plus cétuximab est utilisée chez les patients contre-indiqués pour une chimiothérapie et donc préférée à une radiothérapie exclusive. Le cétuximab est également proposé chez les patients en situation de récurrences locorégionales ou métastatiques en association avec une chimiothérapie à base de sels de platine (Espitalier et al., 2012).

D'autres nouvelles molécules qui ciblent l'EGFR, sont en cours de développement. Parmi ces molécules, citons le GE11 qui a été identifié comme ligand spécifique de l'EGFR. Ce peptide possède une activité mitotique moins importante que celle de l'EGF. Il est internalisé dans les

cellules qui surexpriment l'EGFR. Pour cette raison, des travaux sont en cours afin de tester si ce peptide ferait preuve d'efficacité à délivrer des thérapies d'une façon ciblées aux cellules cancéreuses (Li et al., 2005).

1.1.2.2. L'IGF1R

Face à un traitement par des molécules anti-EGFR, de nombreux autres récepteurs partenaires capables d'interagir de façon directe ou indirecte avec l'EGFR, peuvent transmettre des signaux de type survie et prolifération cellulaires afin de résister à l'apoptose. Parmi ces interactions, a été décrite l'hétérodimérisation avec le récepteur de l'IGF1-R (insulin like growth factor-1 receptor) (Busser et al., 2010; Morgillo et al., 2006). Des thérapies qui ciblent à la fois l'EGFR et l'IGF1R pourraient empêcher ces mécanismes de résistance de se mettre en place et par la suite elles permettront d'accroître l'efficacité thérapeutique.

1.1.2.3. La vascularisation tumorale

Un autre domaine assez important de la thérapie ciblée et qui est en cours de développement, est le ciblage de la vascularisation tumorale. En effet, en l'absence d'angiogenèse, une tumeur ne peut correctement se développer. Cette angiogenèse est stimulée par des facteurs de croissance pro-angiogéniques générés par la cellule tumorale, comme le VEGF qui joue un rôle essentiel dans la formation de néovaisseaux. Le ciblage de ce facteur de croissance ou de ses récepteurs constitue donc une voie de recherche intéressante dans le traitement des cancers des VADS (Hicklin et Ellis, 2005). Les molécules anti-angiogéniques actuellement disponibles sur le marché sont le bévacizumab, le sunitinib et le sorafénib. Elles sont utilisées à présent chez les patients atteints d'un cancer avancé du côlon, du rein, du foie, du sein ou du poumon (Billemont et al., 2007).

1.1.2.4. Les neuropilines

Les neuropilines (NRPs) sont considérées aussi comme des cibles thérapeutiques des cancers. Elles ont un rôle important dans la néoangiogenèse et la métastase tumorale. Les neuropilines 1 et 2 (NRP1 et NRP2) sont des récepteurs membranaires capables de lier deux ligands différents, les sémaphorines de classe 3 (SEMA3F) et les VEGFs. Selon le ligand, les réponses cellulaires seront différentes. Les neuropilines sont composées d'un court domaine intracytoplasmique de 40 acides aminés, d'un domaine transmembranaire et de trois domaines

extramembranaires impliqués dans les interactions cellulaires (Figure 4). La présence des NRPs a été démontrée dans les cellules cancéreuses avec des spécificités selon l'origine. La NRP1 est exprimée dans les carcinomes de la prostate, du sein, de la vessie, du rein, du colon, du pancréas, de l'ovaire, des poumons et des VADS alors que les tumeurs neuronales et les mélanomes expriment la NRP2 (Bagri et al., 2007; Ellis, 2006; Jia et al., 2010; Prud'homme et Glinka, 2012). L'expression combinée des deux NRPs semble corrélée avec un mauvais pronostic. Plusieurs isoformes du VEGF peuvent se lier aux NRPs. L'activation des NRPs augmente la néoangiogenèse, la perméabilité vasculaire et le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses (Prud'homme et Glinka, 2012) (Figure 4).

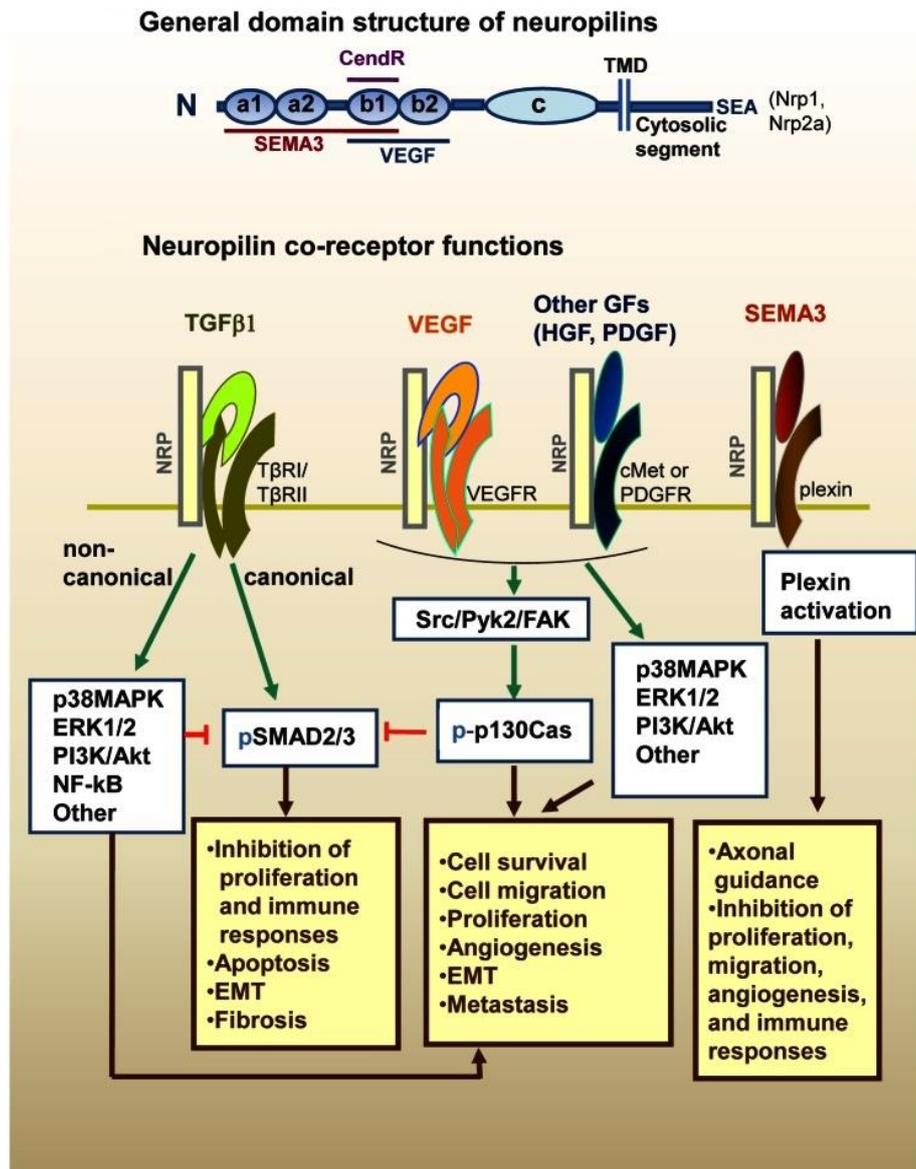


Figure 4 : Structure des neuropilines et modèle hypothétique d'interaction avec les multiples facteurs de croissance (Prud'homme et Glinka, 2012).

Des molécules sont en cours de développement pour cibler les NRPs. Parmi ces molécules, nous pouvons citer l'ATWLPPR qui est un peptide (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH) identifié initialement comme spécifique du VEGFR-2, mais reconnaissant en fait la NRP1 (Figure 5) (Starzec et al., 2007; Thomas et al., 2008; Tirand et al., 2006).

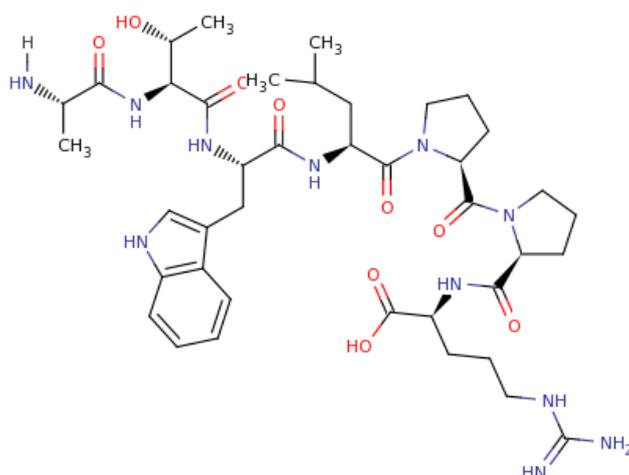


Figure 5 : Le peptide ATWLPPR (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH)

En plus des ligands des neuropilines, certains anticorps ciblant les neuropilines ont été développés, notamment le MNRP1685A qui est un anticorps monoclonal anti-NRP1. Il inhibe la NRP1 et a été testé en association avec le bévaccinum chez l'homme avec une bonne tolérance malgré quelques réactions d'hypersensibilité (Loriot, 2010; Weekes et al., 2011; Xin et al., 2012).

1.1.2.5. Les intégrines

Une cible thérapeutique prometteuse en oncologie est la famille des intégrines. Les intégrines sont des récepteurs cellulaires qui reconnaissent certains constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Elles sont également impliquées dans le transfert des signaux à partir de la membrane plasmique, via leur rattachement au cytosquelette. Les intégrines régulent de nombreuses fonctions dont la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou la cicatrisation. Ce sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités transmembranaires α et β associées ensemble pour former 24 intégrines différentes. Les intégrines sont fortement exprimées sur certains types de cellule : les fibroblastes, les plaquettes, les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales néoformées. Leur expression au niveau de ces dernières fait que les intégrines sont donc en contact avec la circulation. L'intégrine $\alpha\beta3$ est parmi les intégrines les plus étudiées. Elle est surexprimée lors de la néoangiogenèse au niveau des cellules endothéliales (Danhier et al., 2012; Hood et Cheresh, 2002). Il est à noter que les vaisseaux quiescents des tissus sains

n'expriment pas ou très faiblement cette intégrine. Par ailleurs, certaines cellules tumorales y compris les cancers des VADS, surexpriment cette intégrine (Danhier et al., 2012; Fabricius et al., 2011; Keereweer et al., 2012; Lu et al., 2009; Takayama et al., 2009).

L'intégrine $\alpha\beta_3$, comme les autres intégrines, est formée de deux sous-unités α et β . Chaque sous-unité est formée d'une région cytoplasmique courte dépourvue d'activité enzymatique et d'une région transmembranaire. Quant à la partie extra-cellulaire, elle présente une structure en « V » où chaque sous-unité est repliée. Cette conformation correspond à un état physiologique de faible affinité. La liaison d'un ligand induit un changement de conformation de l'intégrine qui se déploie présentant ainsi un état physiologique de haute affinité (Askari et al., 2009; Dufort, 2010) (Figure 6). Ce déploiement augmente l'affinité de l'intégrine pour ses ligands. La liaison du ligand conduit ensuite à une forme activée du récepteur, pour laquelle les domaines cytoplasmiques sont éloignés (Dufort, 2010; Hodivala-Dilke et al., 2003; Luo et Springer, 2006).

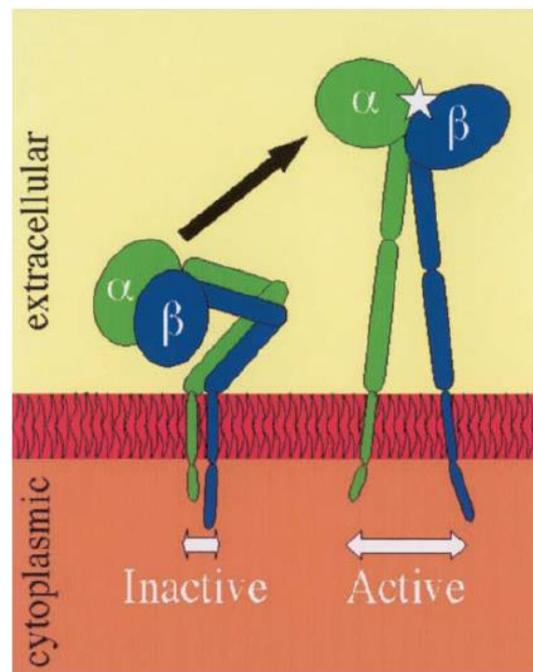


Figure 6 : Changement conformationnel de l'intégrine $\alpha\beta_3$. A l'état inactif, le domaine extracellulaire est plié ou courbé. Les régions cytoplasmiques sont à proximité l'une de l'autre. A l'état actif, les domaines extracellulaires se redressent, exposant ainsi le domaine RGD de liaison (étoile). Simultanément, les régions cytoplasmiques s'éloignent l'une de l'autre (Hodivala-Dilke et al., 2003).

Les intégrines fixent et internalisent divers ligands. Cette internalisation est médiée par deux mécanismes qui sont l'endocytose clathrine-dépendante et clathrine-indépendante. Dans le premier mécanisme, une fois activée par le ligand, la région cytoplasmique de l'intégrine se lie grâce à des complexes protéiques à la clathrine. Les molécules de clathrine se polymérisent les unes avec les autres et ceci entraîne l'invagination de la membrane, sa vésicularisation et enfin le détachement et la migration de la vésicule vers l'intérieur de la cellule (Figure 7) (Caswell et Norman, 2008; Caswell et al., 2009). Ensuite, les clathrines se détachent de la paroi de la vésicule. Dans l'endocytose clathrine-indépendante, c'est la composition lipidique de la membrane cellulaire, qui permet la formation des vésicules. En effet, dans ce type d'endocytose, les cavéolines qui sont des protéines membranaires, forment des oligomères produisant ainsi des petites invaginations de la membrane nommées « caveolae ». Ces invaginations se détachent de la membrane cellulaire avec les intégrines liées à leurs ligands, grâce à plusieurs intervenants, notamment la PKC α (proteïn kinase C-alpha) et la dynamine qui est une protéine localisée au collet des cavéoles (Figure 7) (Caswell et Norman, 2008; Caswell et al., 2009).

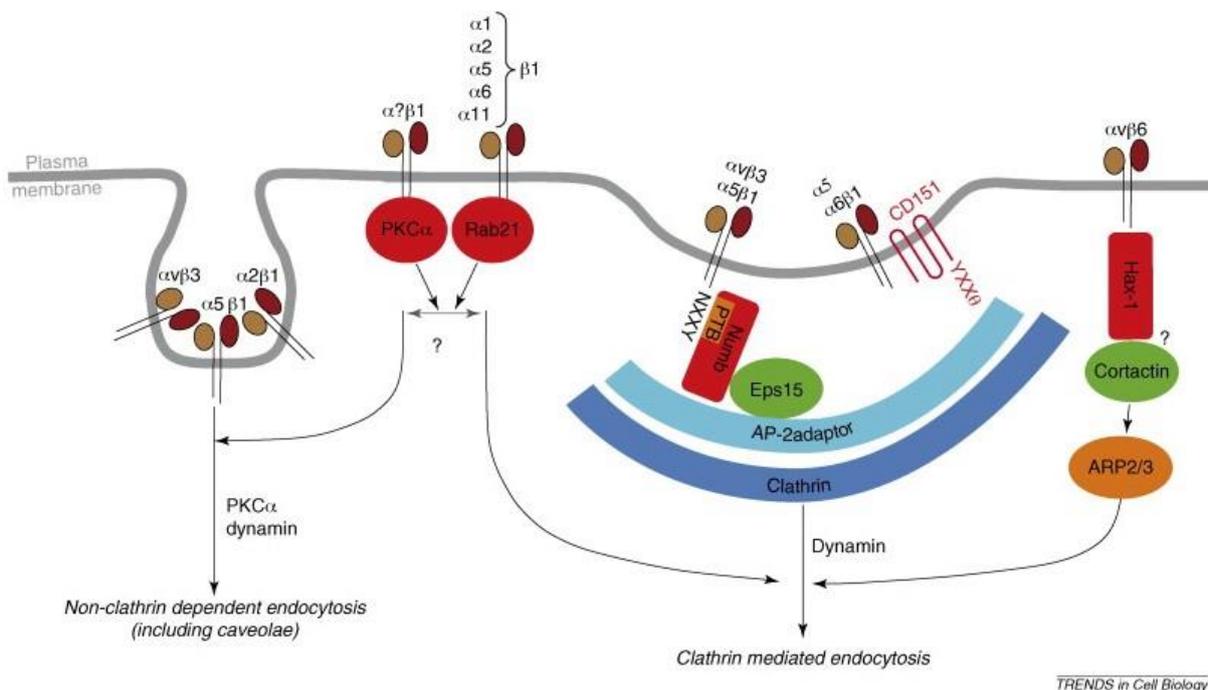


Figure 7 : Mécanismes d'internalisation des intégrines. Les protéines associées à la région cytoplasmique des intégrines sont montrées en rouge. Les protéines effectrices sont montrées en vert. La partie droite du diagramme montre l'endocytose clathrine-dépendante. Les polymères de clathrine ainsi que les protéines adaptatrices sont montrées en bleu. La partie centrale du diagramme représente les associations physiques des intégrines qui régulent l'internalisation, sans déterminer si l'endocytose se réalise par un mécanisme dépendant ou non dépendant de la clathrine. Le côté gauche du diagramme représente l'internalisation des intégrines par le mécanisme indépendant de la clathrine. Il est connu que les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha 2\beta 1$ peuvent entrer dans les caveolae par ce mécanisme et que la PKC α et la dynamine sont impliquées dans ce processus. (Caswell et Norman, 2008)

En conséquence, les intégrines pourraient être considérées comme des cibles importantes des vecteurs qui permettent de délivrer de façon spécifique des biomolécules (ADN, peptides, siRNA, traitements cytotoxiques et des fluorophores) pour l'imagerie, le diagnostic et la thérapie des cancers, notamment les cancers des VADS.

La séquence tripeptidique RGD (Arginine – Glycine – Acide aspartique) est un motif commun présent dans la plupart des protéines de la matrice extracellulaire. Environ la moitié des intégrines y compris l'intégrine $\alpha\beta_3$, reconnaissent et interagissent avec leurs substrats protéiques via le motif RGD (Hodivala-Dilke et al., 2003). Le cilengitide est un pentapeptide cyclique comprenant la séquence RGD. Il cible les intégrines $\alpha\beta_3$ et $\alpha\beta_5$ inhibant ainsi leurs diverses implications dans la carcinogénèse. Ce peptide possède une activité anti-angiogénique liée à l'inhibition de ces intégrines. Il empêche la liaison des intégrines avec la matrice extracellulaire provoquant ainsi le détachement des cellules endothéliales et tumorales et la désorganisation de leur cytosquelette et de leurs jonctions serrées. Il induit également l'apoptose dans ces cellules (Leblond et al., 2011). Actuellement, des études sont en cours de réalisation afin d'évaluer l'association du cilengitide au protocole cisplatine, 5-FU, cétuximab chez les patients présentant une rechute tumorale ou des métastases des cancers des VADS (Lefebvre, 2012; Magné et al., 2012).

1.1.2.6. Le ciblage polyspécifique

De nombreux travaux ont été réalisés ou sont en cours de réalisation afin de synthétiser des ligands multivalents qui peuvent se lier à plusieurs récepteurs cellulaires surexprimés par les cellules cancéreuses. L'intérêt de ces ligands est de cibler d'une façon plus spécifique ces cellules. La présentation d'un ligand multivalent modifie la proximité et la présentation des récepteurs sur la surface cellulaire. Ce processus est facilité grâce à la fluidité de la bicouche lipidique qui permet de mettre en place un mécanisme dynamique d'agrégation des récepteurs, appelé « clustering » (Figure 8) (Gestwicki et al., 2002; Simons et Ikonen, 1997).

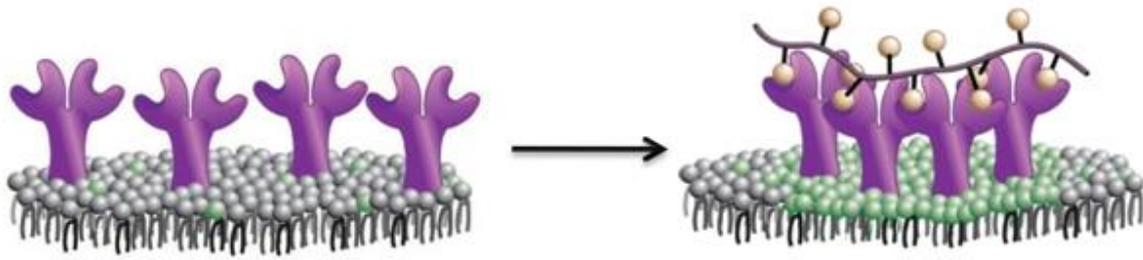


Figure 8 : Clustering des récepteurs par un ligand polyvalent (Claron, 2013).

Ce mécanisme peut alors modifier et affecter les fonctions premières des récepteurs et ainsi activer des phénomènes tels que l'endocytose du système ligand-récepteur. De nombreux composés, ont ainsi été développés pour la présentation de ligands de manière multivalente. L'affinité de ces derniers envers leurs récepteurs dépend de multiples facteurs comme le châssis moléculaire utilisés, le nombre de ligands que l'on veut attacher, la taille des ligands ainsi que leurs poids moléculaires et enfin l'espacement entre les ligands (Claron, 2013; Lingwood et al., 2009).

Le «RAFT-c[RGD]₄» (Regioselectively Addressable Functionalized Template-arginine-glycine-aspartic acid) est une molécule qui cible l'intégrine $\alpha v \beta 3$ sur les néovaisseaux et les cellules tumorales grâce à quatre séquences cycliques RGD. L'avantage de ce peptide est qu'il peut être couplé à d'autres molécules qui ciblent d'autres récepteurs afin de réaliser un composé polyspécifique qui cible plusieurs récepteurs à la fois. En plus, le RAFT-c[RGD]₄ sert à vectoriser aux cellules cancéreuses, des molécules thérapeutiques ou d'imagerie (Bozon, 2013; Sancey et al., 2007; Sancey et al., 2009). Pour les molécules de marquage ou d'imagerie, il est indispensable de les rattacher au RAFT-c[RGD]₄ avec un lien stable *in vivo*. Par ailleurs, il est souhaitable de relier les molécules cytotoxiques par un lien chimique labile dans les conditions intracellulaires afin qu'elles puissent, une fois désolidarisées du système de vectorisation, atteindre leur cible intracellulaire et exercer leur activité cytotoxique. Pour cette raison, des travaux ont démontré l'intérêt d'introduire des liaisons disulfures qui sont sensibles aux environnements réducteurs, entre le RAFT-c[RGD]₄ et la drogue pour le relargage intracellulaire de l'activité thérapeutique (Figure 9). Ceci permet donc d'utiliser le RAFT-c[RGD]₄ pour vectoriser une drogue normalement trop toxique pour être utilisable chez l'homme par voie systémique (Garanger, 2005; Garanger et al., 2005; Jin et al., 2007; Jin et al., 2006; Sancey et al., 2007; Sancey et al., 2009).

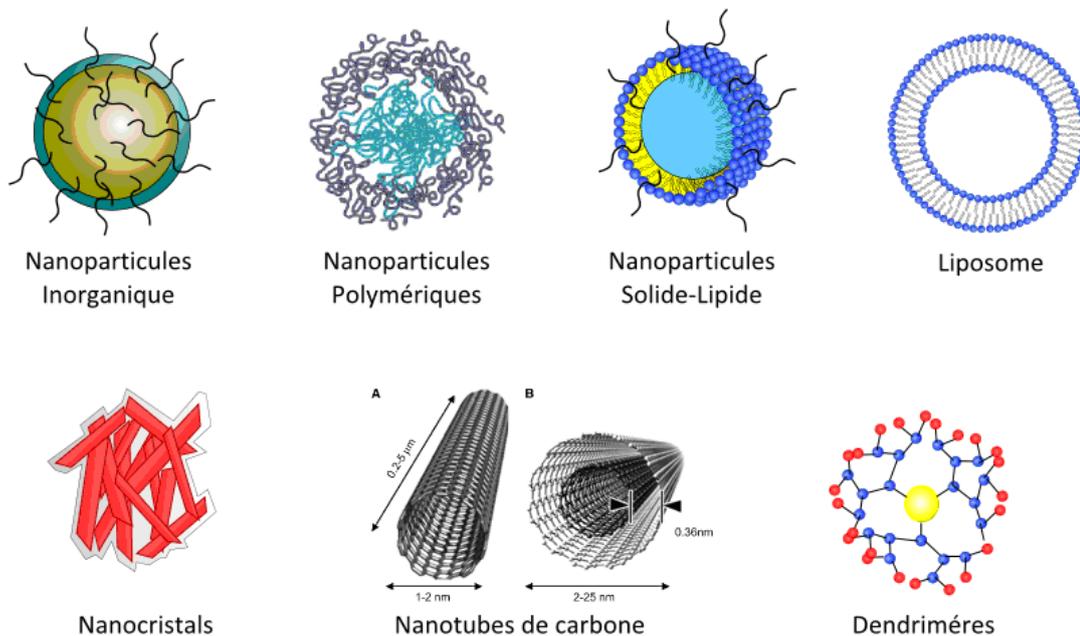


Figure 10 : Types des nanovecteurs (Faraji et Wipf, 2009)

Leurs fonctions sont de protéger le principe actif à acheminer en limitant sa dégradation au cours du transport et de le délivrer uniquement à l'intérieur de la cellule à traiter. Elles sont pour la majorité synthétisées par voie chimique et possèdent ainsi des caractéristiques très différentes. Elles sont classées en plusieurs catégories : les polymères, les particules polymériques, les nanotubes de carbone, les nanoparticules inorganiques, les dendrimères et les liposomes. Selon la nature du nanovecteur, le composé à délivrer peut être soit directement greffé à la surface, soit encapsulé à l'intérieur du nanovecteur (Claron, 2013; Faraji et Wipf, 2009).

1.2. Les modèles animaux des cancers des VADS

Le développement et l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques ou de nouvelles techniques chirurgicales pour le traitement des cancers y compris les cancers des VADS, nécessitent un modèle animal approprié qui doit être reproductible, représentatif de la maladie et qui peut récapituler le processus tumoral afin d'améliorer la connaissance des mécanismes de carcinogénèse, du diagnostic et du suivi.

La souris est l'une des espèces animales la plus souvent utilisée dans la recherche biomédicale par ce qu'elle est de petite taille, ce qui la rend facile à manipuler et entretenir. En plus, elle est relativement peu coûteuse par rapport aux autres espèces animales. Plusieurs modèles des cancers des VADS chez la souris, ont été décrits dans la littérature. Le modèle le plus élémentaire consiste à l'implantation sous-cutanée de cellules tumorales. Par ailleurs, il existe plusieurs modèles orthotopiques des cancers des VADS, qui ont été développés chez la souris. L'avantage de ces derniers par rapport aux modèles sous-cutanés, est qu'ils optimisent le milieu du développement tumoral en offrant la possibilité de développer des interactions spécifiques entre les cellules cancéreuses et leur environnement natif. Ces interactions influencent sur les caractéristiques moléculaires, pathologiques et cliniques des tumeurs orthotopiques, les rendant ainsi représentatives des cancers des VADS chez l'être humain (Cabanillas et al., 2005; Kim, 2009; Lu et al., 2006).

Plusieurs méthodes ont été développées afin d'établir des modèles animaux orthotopiques des cancers des VADS. Une de ces méthodes est basée sur l'application locale répétitive au niveau de la cavité buccale, des agents carcinogènes, tels que le DMBA (7,12-diméthylbenz[a]anthracène), le 4NQO (4-nitroquinoline 1-oxyde), le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate), le benzo[a]pyrène, la 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone et la nitrosornicotine. L'avantage de ces modèles induits chimiquement est que les tumeurs peuvent se développer chez des souris immunocompétentes, cependant leur inconvénient principal est la faible reproductivité et la durée assez longue (12 à 34 semaines) pour le développement des tumeurs, les rendant ainsi inutilisables pour tout essai thérapeutique. En outre, vu la croissance superficielle des tumeurs développées, ces modèles ne sont pas représentatifs des cancers infiltrants des VADS (Aubry et al., 2008; Cabanillas et al., 2005; Kim, 2009; Lu et al., 2006).

Il existe aussi de modèles des souris transgéniques des cancers des VADS. Dans ces modèles, l'oncogène K-ras G12D est surexprimé dans la muqueuse buccale sous le contrôle des promoteurs qui sont la kératine 5 (K5) ou la kératine 14 (K14) afin de développer des carcinomes malpighiens (Caulin et al., 2004; Vitale-Cross et al., 2004). Ces modèles transgéniques semblent reproduire certaines caractéristiques cliniques des cancers des VADS. Cependant, il faut prendre en considération qu'il n'existe pas un seul gène qui est

principalement associé au processus de cancérogène chez l'être humain. En plus, la fréquence des mutations de K- ras dans les carcinomes malpighiens est relativement faible (Kim, 2009).

Finalement, l'un des moyens les plus importants de développer des cancers des VADS chez les souris, est la xénogreffe orthotopique des carcinomes malpighiens. Elle est réalisée par l'injection des cellules cancéreuses au niveau de la langue ou au niveau du plancher buccal chez la souris nude immunodéficiente, permettant ainsi le développement de tumeurs humaines sans phénomène de rejet (Bozec et al., 2007; Bozec et al., 2009). Bien que ce modèle soit le plus proche de la physiopathologie humaine, son inconvénient majeur est que les animaux doivent être euthanasiés au bout de 10 à 12 jours après l'implantation. En effet, la croissance tumorale rapide empêche une alimentation correcte nécessitant le sacrifice de l'animal. Parfois, cette courte durée avec des tumeurs *in situ* ne permet pas l'évaluation à long terme l'efficacité de certains nouveaux traitements.

1.3. L'imagerie optique *in vivo*

Au cours des dix dernières années, l'imagerie directe de cellules vivantes, est devenue un outil fondamental pour étudier des processus biologiques. Ainsi, les techniques optiques telles que la bioluminescence et la fluorescence offrent la possibilité d'un suivi spatio-temporel en temps réel des processus biologiques de façon non invasive directement au sein d'un organisme vivant en utilisant les photons comme source d'information.

1.3.1. Principes de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge

Les photons d'une source lumineuse peuvent être absorbés par un atome ou une molécule. Ces deux derniers passent de leur état fondamental à un état excité. Cette absorption de lumière se fait de façon extrêmement rapide. La relaxation à l'état singulet excité de plus faible énergie, appelée conversion interne, se produit par échange thermique avec le milieu environnant. Chaque molécule perd son énergie soit de façon radiative en émettant un photon ce qui constitue la fluorescence qui se produit en un temps de l'ordre de la nanoseconde, soit de façon non radiative en transformant cette énergie en énergie de rotation ou de vibration. Toute substance chimique capable d'émettre une fluorescence après excitation photonique, est

appelée fluorophore. Chez les êtres vivants, ces fluorophores peuvent être endogènes faisant partie de la composition tissulaire provoquant ainsi une autofluorescence. Plus fréquemment, ils sont synthétisés et appelés ainsi des fluorophores exogènes. Ces derniers pourraient être couplés à des molécules qui ciblent spécifiquement un récepteur tissulaire afin de réaliser une imagerie récepteur-spécifique. Dans ce cas, ils sont appelés des sondes fluorescentes ou des traceurs fluorescents. L'application de l'imagerie de fluorescence chez l'être vivant se heurte avec l'opacité tissulaire. En effet, en traversant les tissus, la lumière est essentiellement atténuée par l'eau et l'hémoglobine. Cette dernière atténue toutes les longueurs d'onde inférieures à 650-700 nm sachant que le spectre visible de la lumière se situe entre 390 nm (violet) et 780 nm (rouge). Quant à l'eau, elle est transparente pour la lumière visible et le très proche infrarouge, mais atténue très fortement les longueurs d'ondes supérieures à 900 nm. En conséquence, il existe une bande de longueurs d'onde à la limite entre le rouge profond et le proche infrarouge et qui est située entre 650-900 nm où la transparence des tissus est maximale. Pour cette raison, les sondes fluorescentes émettant dans le proche infrarouge sont préférentiellement utilisées.

Le signal fluorescent émis est capté par une caméra CCD (charge coupled device) qui assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique, et qui est équipée de filtres capables de séparer le rayonnement d'excitation diffusé et les photons réfléchis directement par l'animal, des signaux de fluorescence émis par les traceurs fluorescents (Figure 11). En effet, ces filtres laissent uniquement passer les longueurs d'onde supérieures à 665 ou 690 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation comprise entre 633 ou 660 nm (Dufort, 2010; Gioux et al., 2010; Le Masne De Chermont, 2007; Ntziachristos, 2006).

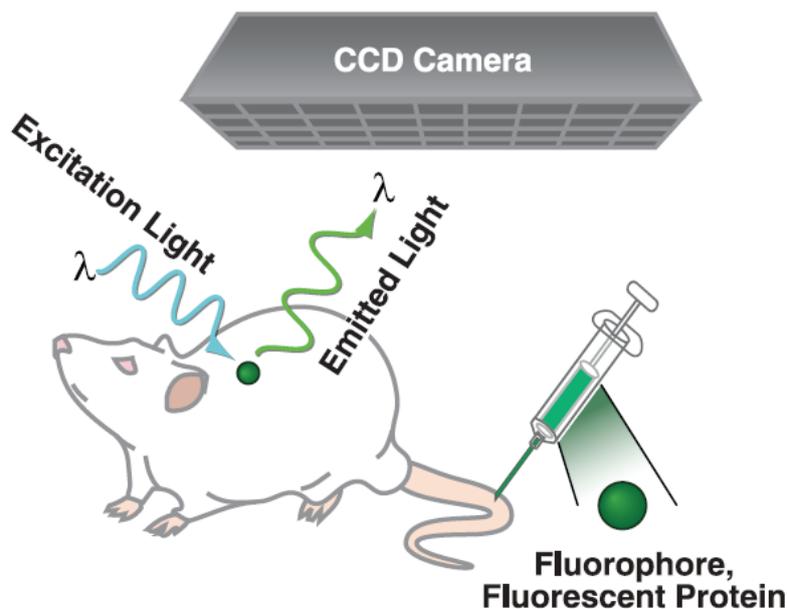


Figure 11 : Principes de l'imagerie optique de fluorescence. Suite à l'administration d'un fluorophore, une lumière d'excitation de longueur d'onde appropriée est utilisée pour éclairer l'animal. Cela conduit à une excitation du fluorophore et l'émission consécutive d'une lumière. Cette lumière, détectée par une caméra CCD, est collectée, analysée et convertie en une image qui localise l'emplacement de cette lumière émise (James et Gambhir, 2012)

1.3.2. Principes de l'imagerie optique en bioluminescence

La bioluminescence se caractérise par l'émission spontanée de photons par une substance ayant absorbé de l'énergie au cours d'une excitation par une réaction enzymatique. La bioluminescence ne nécessite pas d'excitation lumineuse externe (Figure 12). Elle permet donc d'obtenir des signaux non parasités par l'autofluorescence. En conséquence, le gain en rapport signal sur bruit est donc important. Il existe de nombreux systèmes bioluminescents. Chaque système se caractérise par un couple enzyme-substrat particulier avec généralement comme co-substrat l'ATP ou l'oxygène. Parmi les systèmes les plus utilisés, est celui de la luciférase-luciférine dans lequel la lumière est émise lors de la catalyse par l'enzyme luciférase de son substrat la luciférine. L'imagerie en bioluminescence a de nombreuses applications. Il est par exemple possible de faire surexprimer la luciférase par les cellules cancéreuses, qui seront alors implantées chez un animal et exprimeront ainsi la luciférase *in vivo*. Lors de l'injection de luciférine, la tumeur produira alors une quantité de lumière proportionnelle au nombre de cellules présentes. Ce marquage tumoral permet de visualiser et

de quantifier l'évolution d'une tumeur et suivre l'efficacité d'un traitement de façon longitudinale (James et Gambhir, 2012; Le Masne De Chermont, 2007).

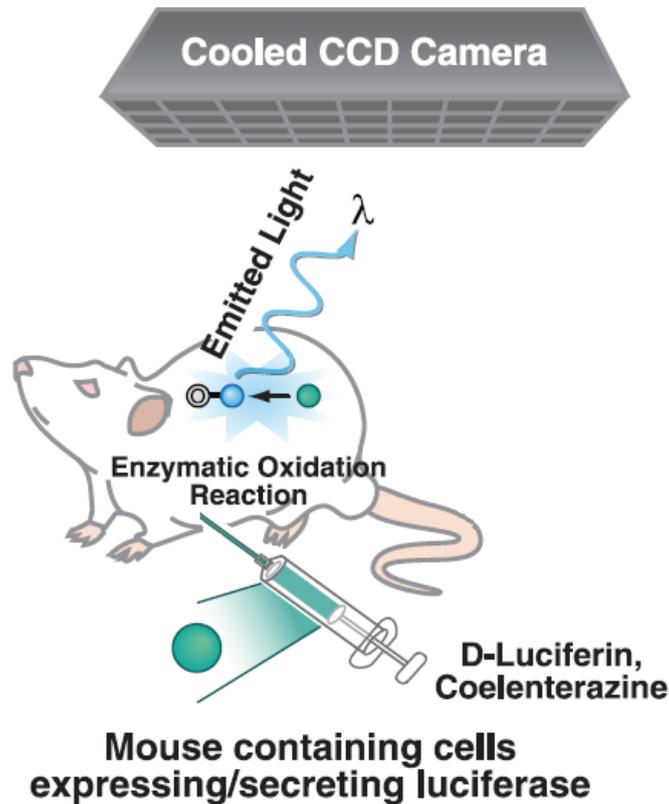


Figure 12 : Principe de l'imagerie optique en bioluminescence. Des cellules dans le modèle animal expriment un enzyme spécifique (la luciférase). Le substrat approprié (la luciférine) est ensuite administré à l'animal. Une lumière est produite suite à une réaction d'oxydation enzymatique dans laquelle la luciférase métabolise son substrat la luciférine. La lumière émise est ensuite détectée par une caméra CCD refroidie. Une image est ainsi produite (D'après James et Gambir, 2012).

1.3.3. Apport de l'imagerie optique en fluorescence proche infrarouge dans la chirurgie des cancers des VADS

La résection complète des cancers des VADS avec des marges chirurgicales saines, améliore le pronostic et diminue le taux de récurrence comme nous l'avons indiqué ci-dessus. La chirurgie des cancers des VADS guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge est un domaine qui évolue rapidement et qui représente un outil précieux pour la détection et la résection tumorale.

Dans le manuscrit suivant qui a été soumis à *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, nous présentons une revue de la littérature du rôle de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la chirurgie des cancers des VADS.

European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck
ROLE OF NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IMAGING IN HEAD AND NECK
CANCER SURGERY: FROM ANIMAL MODELS TO HUMANS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	EAOR-D-14-00616
Full Title:	ROLE OF NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IMAGING IN HEAD AND NECK CANCER SURGERY: FROM ANIMAL MODELS TO HUMANS
Article Type:	Review Article (Original Article)
Keywords:	Head and Neck Cancer; near-infrared fluorescence imaging; surgical margin; sentinel lymph nodes; fluorescent probes; orthotopic animal models
Corresponding Author:	Ihab Atallah, MD-MSc FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Ihab Atallah, MD-MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Ihab Atallah, MD-MSc Clément Milet Jean-Luc Coll, PhD Emile Reyt, MD Christian Adrien Righini, MD-PhD Hurbin Amandine, PhD

Nous discutons les études les plus importantes qui ont été menées jusqu'à présent pour tester le rôle de ce type d'imagerie dans le traitement des cancers des VADS dans les modèles animaux et chez l'être humain. Nous présentons également les molécules et les systèmes d'imagerie qui ont fait preuve d'efficacité préclinique et clinique dans la chirurgie des cancers des VADS. Des molécules ciblant l'EGFR comme le cétuximab, le panitumumab et l'EGF ont été couplées à des fluorophores et ont montré des résultats intéressants dans la délimitation tumorale *in vivo* et la détection des métastases ganglionnaires dans les modèles animaux. D'autres récepteurs ont été aussi ciblés par l'imagerie de fluorescence comme le récepteur de glucose GLUT-1 (glucose transporter 1), le VEGF et la transferrine qui sont surexprimés dans les cancers des VADS. D'autres molécules fluorescentes non spécifiques ont été aussi

employées dans la chirurgie des cancers des VADS non seulement chez les modèles animaux, mais aussi chez l'être humain. Parmi ces molécules est l'ICG (le vert d'indocyanine) qui est capté par l'effet EPR (enhanced permeability and retention effect) au sein de la tumeur et des ganglions métastatiques. Ce fluorophore a permis la détection des ganglions sentinelles et métastatiques et la délimitation tumorale. Cependant, il n'y a pas eu de vraie étude sur les marges d'exérèse tumorale.

L'imagerie de fluorescence proche infrarouge est un outil prometteur de la chirurgie des cancers des VADS. Elle donne un contraste entre le tissu sain et le tissu cancéreux permettant ainsi de guider en temps réel l'opérateur pendant l'exérèse tumorale. Chez l'être humain, elle montre de résultats encourageants. Toutefois, le développement des traceurs fluorescents spécifiques aux cancers des VADS à usage clinique dépend des démarches réglementaires qui doivent être réalisées afin qu'ils obtiennent l'autorisation de l'utilisation chez l'être humain. Une fois que ces traceurs sont approuvés cliniquement, ils permettront une amélioration significative des techniques chirurgicales telles que l'optimisation des marges d'exérèse tumorale, la détection des foyers cancéreux résiduels et l'identification des ganglions métastatiques.

ROLE OF NEAR-INFRARED FLUORESCENCE IMAGING IN HEAD AND NECK CANCER SURGERY: FROM ANIMAL MODELS TO HUMANS

Authors: Ihab Atallah, MD-Msc¹⁻³; Clément Milet^{1,2}; Jean-Luc Coll, PhD^{1,2}; Emile Reyt, MD^{2,3}; Christian Adrien Righini, MD-PhD¹⁻³ *; Amandine Hurbin PhD^{1,2}*

*These authors contributed equally to this work

Affiliation of authors:

1. INSERM U823, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France
2. Joseph Fourier University, 621 Avenue Centrale, 38041 Saint-Martin-d'Hères, France
3. Grenoble University Hospital, Cs 10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

Abstract

Complete resection of head and neck cancers with negative surgical margins improves the prognosis of the disease and decreases the recurrence rate. Near-infrared fluorescence-guided surgery of head and neck cancer is a rapidly evolving field that represents an invaluable tool for tumour detection and resection.

Here, we present a literature review of the principles of near-infrared fluorescence imaging and its use in head and neck cancer surgery. We discuss important studies in both animal models and humans that have been carried out up to this point. We also outline the important fluorescent molecules and devices used in head and neck fluorescence imaging-guided surgery.

Although near-infrared fluorescence-guided surgery for head and neck cancers showed efficacy in animal models, its use in humans is limited by the small number of fluorescent probes that are approved for clinical use. However, it is considered as a novel surgical aid that helps delineate tumour margins preoperatively and could spare patients from the added morbidity that is associated with additional surgery or chemoradiation. In addition, it is a useful tool to detect sentinel lymph nodes as well as metastatic lymph nodes.

Keywords:

Head and neck cancer; near-infrared fluorescence imaging; surgical margin; sentinel lymph nodes; fluorescent probes; orthotopic animal models

Introduction

Worldwide, there are 600,000 new cases of head and neck cancer and 300,000 deaths each year [1]. Surgery is considered one of the main treatments for head and neck cancers and it has the best overall survival rate compared to radiotherapy and chemotherapy. Complete resection of the tumour tissue, detection of lymph nodes metastases and preservation of healthy tissue during head and neck cancer surgery are major issues that strongly influence the patient prognosis. Additionally, these factors affect the functional and physiological integrity of the head and neck region with considerable impacts on multiple facets of patient life [2].

The development of near-infrared optical fluorescent techniques for diagnosis, treatment and follow-up of head and neck cancer is a growing field that provides real-time information regarding the presence, location and dimensions of the cancer tissue and/or metastasis through creation of a specific contrast between normal and cancer tissue. This contrast could be the result of tumour-induced morphologic and biochemical alterations that alter optical properties of tissues and lead to tumour-specific auto-fluorescence [3]. Furthermore, fluorescence can be achieved through targeting head and neck tumours by fluorescent probes that bind to specific receptors on cancer cells.

Orthotopic xenograft animal models were used to test novel applications of near-infrared fluorescence imaging-guided surgery for head and neck cancers. Multiple studies were also performed in humans to evaluate the role of near-infrared fluorescence imaging guided surgery for head and neck tumours detection and resection. Several different fluorescent probes have been proposed to target head and neck cancers cells in animal models using near-infrared fluorescent imaging. For clinical translation of these results, however, very expensive and long lasting safety and reglementary issues should be addressed for each probe. Here, we present an overview of the use of near-infrared fluorescence imaging in head and neck cancer surgery in animal models and its clinical applications in humans. We also outline the most important fluorescent molecules and devices used in head and neck fluorescence imaging-guided surgery.

Principles of *in vivo* near-infrared fluorescence imaging

Fluorescence is a process by which molecules absorb the excitation light and re-emit light of a longer wavelength after a brief interval of time. Light is produced from a spectrally resolved light source such as filtered broadband source, light-emitting diode, or laser diode. The light emitted from the excited fluorophore is then captured by a charge-coupled device camera, with special care taken to filter the huge excess of photons coming from the excitation light. Near-infrared fluorescence imaging focuses on the detection of exogenous contrast agents that emit fluorescence between 700 and 900 nm. Because light is poorly absorbed by living tissues in this spectral window, near-infrared imaging can provide real time detection of exogenous fluorescent contrast agents at depths that usually do not exceed 1 cm [4-5]. In parallel, endogenous fluorescence (autofluorescence) imaging can also be of interest. In fact, variations in the levels and depth of endogenous fluorophores can be present in cancer-induced biochemical changes, such as increases in NADH, decreases in FAD concentration, and altered elastin and keratin compositions. It can be also related to the shielding of the autofluorescence of the extracellular matrix that occurs during the thickening of epithelial tissues, which occurs during tumour development. Consequently, autofluorescence profiles are of specific interest because changes in metabolic activity and cellular interactions could be reflected by spectral alteration in the fluorescence signal [6-7]. Autofluorescence in head and neck cancer is mainly used to guide biopsies and to detect suspicious precancerous lesions, whereas exogenous near-infrared induced fluorescence is used in tumour resection and metastasis detection [3,8-9].

Head and neck cancer near-infrared fluorescent contrast agents

Multiple strategies have been proposed for head and neck fluorescence imaging-guided surgery. For clinical translation of these strategies, pharmacokinetic studies must be performed for each fluorophore or fluorophore conjugate that targets specific receptors in cancer tissue. Indocyanine green (ICG) was one of the first fluorescent dyes tested for fluorescence imaging-guided surgery. ICG is an untargeted dye that clears from the tumour at a different rate than from the surrounding tissue. Because of its passive lymphatic drainage, and of its passive diffusion after extravasation, ICG has already shown promise for sentinel lymph node detection by passive targeting through its enhanced permeability and retention effect. However, its value for delineation of head and neck tumour margins is limited because

it is considered as a blood pool agent that is not inherently specific for any tumour receptor [10,5,11-14]. For these reasons, a targeted probe would provide real-time, intra-operative distinction of the molecular edge between cancer and adjacent normal tissue. The benefit would be to potentially decreasing the incidence of a positive surgical tumour margin.

For clinical translation, an optimal targeted fluorescent probe should have good distribution, high affinity towards its target and a fast clearance from the bloodstream, to allow efficient accumulation at the tumour and rapid acquisition of images with high contrast [9,5,10]. One of the most important targets of fluorescent probes is EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) which is overexpressed in 80–90% of head and neck squamous cell carcinoma cases [15]. The Cetuximab antibody labelled with a near-infrared fluorophore is commonly used in head and neck fluorescence imaging-guided surgery. It is a recombinant, human/mouse chimeric monoclonal antibody that binds specifically to the extracellular domain of the human EGFR and is widely used in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma, combined with other chemotherapeutic agents [16,15]. Panitumumab is another probe that targets EGFR. It is a recombinant, fully humanized monoclonal antibody that has the advantage of presenting lower risk of eliciting an immune response in humans than Cetuximab [16-17]. EGFR antibodies have also been conjugated with quantum dots, which are semiconductor nanocrystals (diameter 1–10 nm). When coupled with fluorophores, quantum dots present the advantage of producing near-infrared fluorescence with strong tissue penetrating ability, low absorbance by *in vivo* tissue, high light stability, high fluorescence quantum yield and minimal interference from normal tissue autofluorescence, but they cannot be used for human applications because of their chemical composition [17-18]. Panitumumab and Cetuximab are conventional antibodies that show slow blood clearance, high accumulation in the liver and limited tumour penetration. Consequently, nanobodies, which are smaller functional antigen-binding fragments (15 kDa) derived from heavy chain antibodies, have been explored. They show highly specific binding to EGFR and ensure efficient distribution and tissue penetration, as well as rapid clearance from the body. When combined with fluorophores, they retain the ability to delineate head and neck tumours and lymph node metastases in head and neck cancer fluorescence imaging-guided surgery [19,9]. Finally, EGFR can be targeted by fluorophore-labeled recombinant human EGF, but this presents the risk of EGFR receptor activation that promotes the malignant phenotype [20].

Another target for fluorescent probes used in head and neck cancer fluorescence imaging-guided surgery, is $\alpha\beta3$ integrin, which plays an important role in cancer-associated angiogenesis, cell proliferation, migration and metastasis. It is widely expressed on neoendothelial cells and in some tumors including head and neck squamous cell carcinoma [21-23]. RAFT-c(-RGDfK-)₄ (regioselectively addressable functionalized template-arginine-glycine-aspartic acid) is a peptide-like scaffold that holds four cyclo(-RGDfK-) (cRGD) motifs. It was shown that this molecule targets $\alpha\beta3$ integrin *in vitro* and *in vivo* and could be coupled with multiple fluorophores [24-29]. Like EGFR antibodies, RGD could also be coupled with quantum dots as an alternative way to target $\alpha\beta3$ integrin in head and neck cancer fluorescence imaging-guided surgery [18].

Finally, other probes showed interesting results in head and neck cancer targeting such as fluorescent deoxyglucose probes that detect increased glucose uptake by the glucose transporter 1 (GLUT-1), which shows upregulation in head and neck cancer [20,30]. VEGF was also a target of fluorescent probes comprising bevacizumab, which is an anti-VEGF antibody, that was conjugated to optically active fluorophores and resulted in adequate disease detection in the surgical setting [31]. Lastly, transferrin receptor, which is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma, was targeted using a near-infrared fluorescent transferrin conjugate that was able to identify and delineate head and neck tumours in mice [32].

Although head and neck cancer-specific targeting remains a challenge, numerous commercial near-infrared fluorophores exist. They are largely based on the cyanine chemical structure with specific modifications by each manufacturer. Porphyrins, squaraine, boron dipyrromethane, benzo[c]heterocycles and xanthenes are also known classes of near-infrared fluorophores. Fluorophores can be readily conjugated to a protein or ligand of interest for specific *in vivo* targeting through conjugation at a lysine residue or N-terminal [33,10,5].

Imaging systems used in head and neck cancer fluorescence-guided surgery

In addition to fluorescent contrast agents, a suitable camera system has to be developed for each application. Several near-infrared fluorescence imaging devices are now available for pre-clinical and clinical studies of head and neck fluorescence imaging-guided surgery. The FLARE™ (Frangioni Lab, Beth Israel Deaconess Medical Center, MA, USA) imaging system

was used in animal studies, and the Mini-FLARE™ system, which is an optimized version for clinical studies, was used to guide sentinel lymph nodes fluorescent detection [9,14]. The Photodynamic Eye camera system (Hamamatsu, Germany) also showed the ability to detect lymph drainage pattern and sentinel lymph nodes in humans [12]. The HyperEye Medical System (Mizuho Medical Co, Ltd, Tokyo, Japan) has been used in fluorescent tumour delineation in humans after systemic administration of ICG, but no histological studies were performed on tumour margins [34]. SPY imaging system (Novadaq, Ontario, Canada) is another device used to image and guide head and neck cancer resection in orthotopic animal models [18-19]. Finally, the FluoSTIC preclinical device and the promising novel commercial fluorescence imaging system version, Fluostick™ (Fluoptics, Grenoble, France), are hand-held near-infrared cameras that have been miniaturized and optimized for oral oncologic procedures in humans [4].

Use of near-infrared fluorescence imaging in head and neck cancer surgery in animal models

Like any novel treatment, head and neck cancer near-infrared fluorescence imaging-guided surgery was first tested in animals before humans. Mice were the animal of choice to test this novel surgical aid because they are small in size, easy to handle and relatively inexpensive. Athymic nude mice were most commonly used because they are considered a suitable host for the development of implanted human head neck cancer cells. In addition, their hairlessness decreases the attenuation of the fluorescence signal emission [35]. Multiple subcutaneous and orthotopic mouse models of head and neck cancer were developed. The advantage of orthotopic models is that they provide specific interactions between cancer cells and their native environment. This can consequently influence molecular, pathologic and clinical features of orthotopic tumours that become representative of human head and neck tumours [36-38].

Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery showed promising results for intraoperative fluorescence demarcation of head and neck tumours in both orthotopic and subcutaneous cell line xenografts. Tumour resections were performed under real-time guidance of fluorescence imaging, and there was an adequate correlation between the fluorescence signal and tumour extension on analysis of histological sections [39-40,9,41,31,16,42,20]. Moreover, near-infrared fluorescence imaging in the surgical bed

helped to identify fluorescent cancer residues that could remain unidentified if resection was performed exclusively under visual guidance. This had a positive impact on the recurrence-free survival rate of mice in comparison with mice that underwent tumour resection without any aid of fluorescence imaging (figure 1) (Atallah et al., submitted). Furthermore, the use of optical imaging for detection of cervical lymph node metastases showed important value in orthotopic mouse models in which squamous cell carcinoma metastases were found on histological sections in all cervical lymph nodes that showed a fluorescence signal [20,9,40-41,39,16]. In addition, no tumour was found in the negative lymph nodes on haematoxylin–eosin or immunohistochemical staining analysis [20]. Lastly, fluorescence imaging was used to detect distant pulmonary head and neck squamous cell carcinoma metastases. This could be considered an important tool in the management of head and neck cancers because distant metastasis is a contraindication to surgical therapy [16].

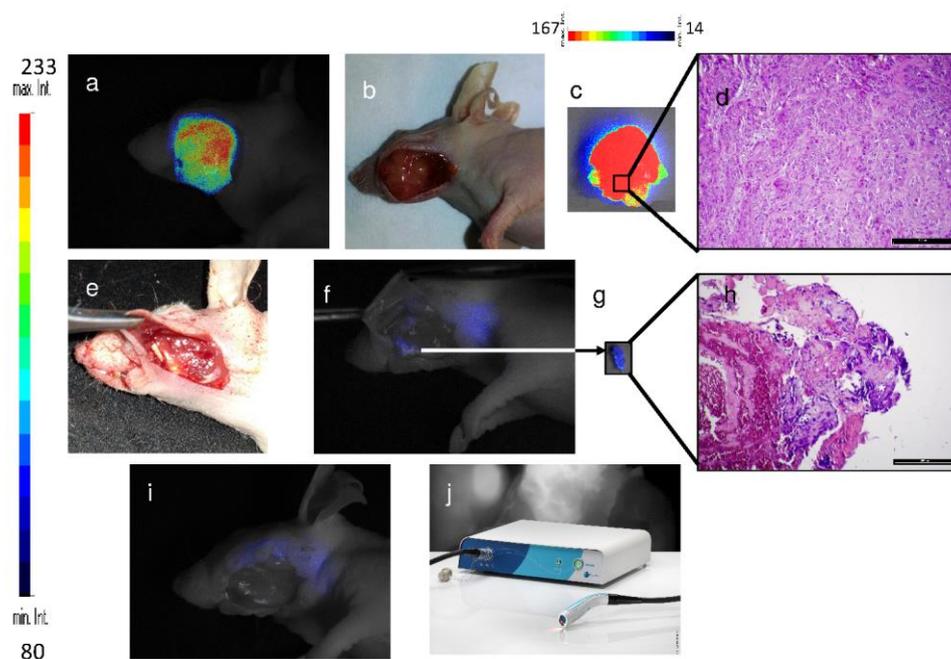


Fig. 1 Orthotopic tumour resection with the aid of a FluoStick™ Clinical System device after systemic injection of the AngioStamp™ fluorescent agent. a) In vivo fluorescence imaging of the tumour. b) In vivo macroscopic appearance of the tumour. c) Ex vivo fluorescence imaging of the tumour after macroscopic resection without the aid of fluorescence imaging. d) Hematoxylin-eosin (H.E.) staining of the orthotopic tumour showing a moderately differentiated squamous cell carcinoma with disorganized architecture, hyperchromatic nuclei, pleomorphism, increased mitotic activity and a greatly altered nuclear-cytoplasmic ratio. Microscopic images were acquired under 10x magnification. e) Surgical bed after macroscopic tumour resection showing no residual macroscopic disease. f) Fluorescence imaging of the surgical bed showing a fluorescent focus that was resected under fluorescence imaging guidance. g) Ex vivo fluorescence of the fluorescent residue. h) H.E. staining of the

fluorescent residue revealed foci of squamous cell carcinoma (asterisks) that could remain unidentified if resection was performed exclusively under visual guidance. Microscopic images were acquired under 10x magnification. i) No residual fluorescent signal observed in the surgical bed after removal of the fluorescent tissue. j) The FluoStick™ Clinical System device

Current practice and perspectives of near-infrared fluorescence imaging use in head and neck cancer surgery in humans

One of the first applications of head and neck cancer near-infrared fluorescence imaging-guided surgery in humans was sentinel lymph node biopsy after peri-tumoural injection of unconjugated ICG. This showed results that are equivalent to radioactive tracers, without the disadvantages of the lack of real-time intraoperative visual information and the need for a nuclear physician [43,12-13]. Moreover, premixing ICG with human serum albumin (HSA) to generate ICG:HSA complexes improved the fluorescent properties and retention in the sentinel lymph node owing to an increased hydrodynamic diameter (figure 2) [44,14]. ICG was also used to delineate head and neck tumors and lymph node metastases in humans 30 to 60 minutes after intravenous administration [34]. All tumours and lymphatic metastases displayed bright fluorescence emissions that clearly contrasted with the normal structures. Fluorescence imaging was very useful to detect metastatic lymph nodes that were not palpable, and not visible macroscopically, in the retropharyngeal space [34]. Precautions have to be taken in tumor margin demarcation using ICG because accumulation of ICG may not be limited to cancerous tissues. In fact, ICG would also be expected to accumulate in inflammatory tissues and areas of surgical trauma that could partly hamper specificity in the initial phase of enhanced permeability and retention effect. However, these effects occur at much lower levels and retention in tumors is greatly increased owing to defective architecture of lymphatic drainage [45-46]. Autofluorescence has also been used to define tumor margins, but the study was performed on punch biopsies of several sites from *ex vivo* human specimens. Sensitivity and specificity of the discrimination of normal tissue from cancerous tissue were evaluated by correlating histopathologic diagnosis with visual impression and were 91% and 86%, respectively [6].

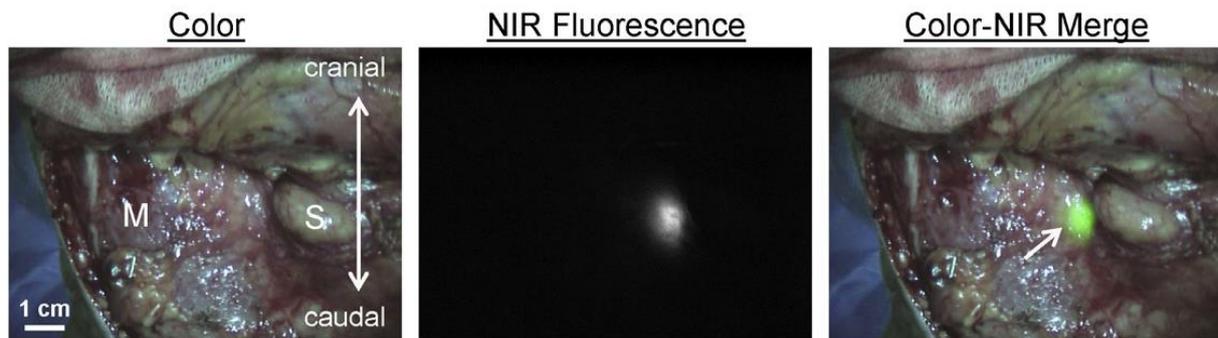


Fig. 2 Sentinel lymph node mapping using NIR fluorescence imaging in oropharyngeal cancer patients: Peritumoural injection of 1.6 mL of 500-IM ICG:HSA identifies a SLN (arrow) in an oropharyngeal cancer patient. M = sternocleidomastoid muscle and S = submandibular gland. Figure reproduced, with permission, from Elsevier ©. Van der Vorst et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2013, 9 (1):15-19

The use of head and neck cancer near-infrared fluorescence imaging-guided surgery in humans is limited by the small number of fluorescent probes that are approved for clinical use. Although ICG is considered a blood pool agent that is not inherently specific for any tumour, it is the only near-infrared fluorescent agent that has been used in clinical applications of head and neck cancer surgery because it is EMA (European Medicines Agency) and FDA (US Food and Drug Administration) approved as a near-infrared fluorescent contrast agent. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical toxicity studies have to be performed to analyze additional fluorescent probes that have shown efficient targeting of head and neck cancers in animal models. Owing to the complexity of the clinical translation process, we believe that repurposing of fluorescent molecules such as ICG and specific head and neck cancer-targeting probes such as anti-EGFR antibodies, which are already approved for clinical use, is a safe and cost-efficient way to develop new clinically approved fluorescent probes. In addition, more fluorescence imaging devices optimized for both open and endoscopic head and neck cancer surgery have to be developed.

Conclusion

Technological developments of near-infrared fluorescence imaging-guided cancer surgery have led to promising preclinical and clinical results. In head and neck cancer surgery, it is considered an invaluable tool to delineate tumours and to detect metastasis in animal models because of the real-time feedback and the contrast that it offers. In humans, it also showed encouraging results, but further development depends on the regulatory approval of near-infrared optical devices and fluorescent targeted probes for clinical use. It will certainly lead

to significant improvements in the surgical techniques regarding optimization of tumour margins, detection of residual disease and identification of lymph node metastases.

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Mehanna H, Paleri V, West CM, Nutting C (2011) Head and neck cancer-part 1: epidemiology, presentation, and preservation. *Clin Otolaryngol* 36 (1):65-68. doi:10.1111/j.1749-4486.2010.02231.x
2. Payakachat N, Ounpraseuth S, Suen JY (2013) Late complications and long-term quality of life for survivors (>5 years) with history of head and neck cancer. *Head Neck* 35 (6):819-825. doi:10.1002/hed.23035
3. Swinson B, Jerjes W, El-Maaytah M, Norris P, Hopper C (2006) Optical techniques in diagnosis of head and neck malignancy. *Oral Oncol* 42 (3):221-228. doi:S1368-8375(05)00133-8 [pii] 10.1016/j.oraloncology.2005.05.001
4. Gioux S, Coutard JG, Berger M, Grateau H, Josserand V, Keramidas M, Righini C, Coll JL, Dinten JM (2012) FluoSTIC: miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt* 17 (10):106014. doi:1378602 [pii] 10.1117/1.JBO.17.10.106014
5. Gioux S, Choi HS, Frangioni JV (2010) Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging* 9 (5):237-255
6. Svistun E, Alizadeh-Naderi R, El-Naggar A, Jacob R, Gillenwater A, Richards-Kortum R (2004) Vision enhancement system for detection of oral cavity neoplasia based on autofluorescence. *Head Neck* 26 (3):205-215. doi:10.1002/hed.10381
7. Poh CF, Ng SP, Williams PM, Zhang L, Laronde DM, Lane P, Macaulay C, Rosin MP (2007) Direct fluorescence visualization of clinically occult high-risk oral premalignant disease using a simple hand-held device. *Head Neck* 29 (1):71-76. doi:10.1002/hed.20468
8. Jayaprakash V, Sullivan M, Merzianu M, Rigual NR, Loree TR, Popat SR, Moysich KB, Ramananda S, Johnson T, Marshall JR, Hutson AD, Mang TS, Wilson BC, Gill SR, Frustino J, Bogaards A, Reid ME (2009) Autofluorescence-guided surveillance for oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2 (11):966-974. doi:2/11/966 [pii] 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0062

9. van Driel PB, van der Vorst JR, Verbeek FP, Oliveira S, Snoeks TJ, Keereweer S, Frangioni JV, van Bergen En Henegouwen PM, Vahrmeijer AL, Lowik CW (2013) Intraoperative fluorescence delineation of head and neck cancer with a fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Int J Cancer*. doi:10.1002/ijc.28601
10. Gibbs SL (2012) Near infrared fluorescence for image-guided surgery. *Quant Imaging Med Surg* 2 (3):177-187. doi:10.3978/j.issn.2223-4292.2012.09.04 qims-02-03-177 [pii]
11. Hussain T, Nguyen QT (2013) Molecular imaging for cancer diagnosis and surgery. *Adv Drug Deliv Rev*. doi:S0169-409X(13)00203-2 [pii] 10.1016/j.addr.2013.09.007
12. Bredell MG (2010) Sentinel lymph node mapping by indocyanin green fluorescence imaging in oropharyngeal cancer - preliminary experience. *Head Neck Oncol* 2:31. doi:1758-3284-2-31 [pii] 10.1186/1758-3284-2-31
13. Nakamura Y, Fujisawa Y, Maruyama H, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F (2013) Improvement of the sentinel lymph node detection rate of cervical sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green in head and neck skin cancer. *J Dermatol* 40 (6):453-457. doi:10.1111/1346-8138.12158
14. van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, Keereweer S, Jansen JC, van der Velden LA, Langeveld AP, Hutteman M, Lowik CW, van de Velde CJ, Frangioni JV, Vahrmeijer AL (2013) Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 49 (1):15-19. doi:S1368-8375(12)00245-X [pii] 10.1016/j.oraloncology.2012.07.017
15. Gleysteen JP, Duncan RD, Magnuson JS, Skipper JB, Zinn K, Rosenthal EL (2007) Fluorescently labeled cetuximab to evaluate head and neck cancer response to treatment. *Cancer Biol Ther* 6 (8):1181-1185. doi:4379 [pii]
16. Gleysteen JP, Newman JR, Chhieng D, Frost A, Zinn KR, Rosenthal EL (2008) Fluorescent labeled anti-EGFR antibody for identification of regional and distant metastasis in a preclinical xenograft model. *Head Neck* 30 (6):782-789. doi:10.1002/hed.20782
17. Yang K, Zhao C, Cao YA, Tang H, Bai YL, Huang H, Zhao CR, Chen R, Zhao D (2012) In vivo and in situ imaging of head and neck squamous cell carcinoma using near-infrared fluorescent quantum dot probes conjugated with epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in mice. *Oncol Rep* 27 (6):1925-1931. doi:10.3892/or.2012.1705

18. Huang H, Bai YL, Yang K, Tang H, Wang YW (2013) Optical imaging of head and neck squamous cell carcinoma in vivo using arginine-glycine-aspartic acid peptide conjugated near-infrared quantum dots. *Onco Targets Ther* 6:1779-1787. doi:10.2147/OTT.S53901 ott-6-1779 [pii]
19. Oliveira S, van Dongen GA, Stigter-van Walsum M, Roovers RC, Stam JC, Mali W, van Diest PJ, van Bergen en Henegouwen PM (2012) Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging* 11 (1):33-46
20. Keereweer S, Kerrebijn JD, Mol IM, Mieog JS, Van Driel PB, Baatenburg de Jong RJ, Vahrmeijer AL, Lowik CW (2012) Optical imaging of oral squamous cell carcinoma and cervical lymph node metastasis. *Head Neck* 34 (7):1002-1008. doi:10.1002/hed.21861
21. Fabricius EM, Wildner GP, Kruse-Boitschenko U, Hoffmeister B, Goodman SL, Raguse JD (2011) Immunohistochemical analysis of integrins alphavbeta3, alphavbeta5 and alpha5beta1, and their ligands, fibrinogen, fibronectin, osteopontin and vitronectin, in frozen sections of human oral head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Ther Med* 2 (1):9-19. doi:10.3892/etm.2010.171 etm-02-01-0009 [pii]
22. Beer AJ, Grosu AL, Carlsen J, Kolk A, Sarbia M, Stangier I, Watzlowik P, Wester HJ, Haubner R, Schwaiger M (2007) [18F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 13 (22 Pt 1):6610-6616. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0528 [pii]
23. Li P, Liu F, Sun L, Zhao Z, Ding X, Shang D, Xu Z, Sun C (2011) Chemokine receptor 7 promotes cell migration and adhesion in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck by activating integrin alphavbeta3. *Int J Mol Med* 27 (5):679-687. doi:10.3892/ijmm.2011.628
24. Jin ZH, Josserand V, Razkin J, Garanger E, Boturyn D, Favrot MC, Dumy P, Coll JL (2006) Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)4. *Mol Imaging* 5 (3):188-197
25. Jin ZH, Josserand V, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Favrot MC, Coll JL (2007) In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer* 6:41. doi:10.1186/1476-4598-6-41 [pii]

26. Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C, Vuillez JP (2007) In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer ^{99m}Tc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34 (12):2037-2047. doi:10.1007/s00259-007-0497-z
27. Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot MC, Coll JL (2005) New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* 12 (6):1168-1175. doi:S1525-0016(05)00279-0 [pii]
10.1016/j.ymthe.2005.06.095
28. Wenk CH, Ponce F, Guillermet S, Tenaud C, Boturyn D, Dumy P, Watrelot-Virieux D, Carozzo C, Josserand V, Coll JL (2013) Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti-alpha_vβ₃ integrin molecular probe. *Cancer Lett* 334 (2):188-195. doi:S0304-3835(12)00646-5 [pii]
10.1016/j.canlet.2012.10.041
29. Keramidas M, Josserand V, Righini CA, Wenk C, Faure C, Coll JL (2010) Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* 97 (5):737-743. doi:10.1002/bjs.6986
30. Xie BW, Mol IM, Keereweer S, van Beek ER, Que I, Snoeks TJ, Chan A, Kaijzel EL, Lowik CW (2012) Dual-wavelength imaging of tumor progression by activatable and targeting near-infrared fluorescent probes in a bioluminescent breast cancer model. *PLoS One* 7 (2):e31875. doi:10.1371/journal.pone.0031875
PONE-D-11-16502 [pii]
31. Withrow KP, Newman JR, Skipper JB, Gleysteen JP, Magnuson JS, Zinn K, Rosenthal EL (2008) Assessment of bevacizumab conjugated to Cy5.5 for detection of head and neck cancer xenografts. *Technol Cancer Res Treat* 7 (1):61-66. doi:d=3032&c=4249&p=16390&do=detail [pii]
32. Shan L, Hao Y, Wang S, Korotcov A, Zhang R, Wang T, Califano J, Gu X, Sridhar R, Bhujwala ZM, Wang PC (2008) Visualizing head and neck tumors in vivo using near-infrared fluorescent transferrin conjugate. *Mol Imaging* 7 (1):42-49
33. Keereweer S, Sterenborg HJ, Kerrebijn JD, Van Driel PB, Baatenburg de Jong RJ, Lowik CW (2012) Image-guided surgery in head and neck cancer: current practice and future directions of optical imaging. *Head Neck* 34 (1):120-126. doi:10.1002/hed.21625
34. Yokoyama J, Fujimaki M, Ohba S, Anzai T, Yoshii R, Ito S, Kojima M, Ikeda K (2013) A feasibility study of NIR fluorescent image-guided surgery in head and neck cancer based on

the assessment of optimum surgical time as revealed through dynamic imaging. *Onco Targets Ther* 6:325-330. doi:10.2147/OTT.S42006

ott-6-325 [pii]

35. Sharkey FE, Fogh J (1984) Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 3 (4):341-360

36. Kim S (2009) Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2 (2):55-60. doi:10.3342/ceo.2009.2.2.55

37. Lu SL, Herrington H, Wang XJ (2006) Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 28 (10):945-954. doi:10.1002/hed.20397

38. Cabanillas R, Secades P, Rodrigo JP, Astudillo A, Suarez C, Chiara MD (2005) [Orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 56 (3):89-95

39. Heath CH, Deep NL, Sweeny L, Zinn KR, Rosenthal EL (2012) Use of panitumumab-IRDye800 to image microscopic head and neck cancer in an orthotopic surgical model. *Ann Surg Oncol* 19 (12):3879-3887. doi:10.1245/s10434-012-2435-y

40. Day KE, Sweeny L, Kulbersh B, Zinn KR, Rosenthal EL (2013) Preclinical comparison of near-infrared-labeled cetuximab and panitumumab for optical imaging of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Imaging Biol* 15 (6):722-729. doi:10.1007/s11307-013-0652-9

41. Keereweer S, Mol IM, Kerrebijn JD, Van Driel PB, Xie B, Baatenburg de Jong RJ, Vahrmeijer AL, Lowik CW (2012) Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer. *J Surg Oncol* 105 (7):714-718. doi:10.1002/jso.22102

42. Rosenthal EL, Kulbersh BD, King T, Chaudhuri TR, Zinn KR (2007) Use of fluorescent labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther* 6 (4):1230-1238. doi:6/4/1230 [pii] 10.1158/1535-7163.MCT-06-0741

43. Brouwer OR, Klop WM, Buckle T, Vermeeren L, van den Brekel MW, Balm AJ, Nieweg OE, Valdes Olmos RA, van Leeuwen FW (2012) Feasibility of sentinel node biopsy in head and neck melanoma using a hybrid radioactive and fluorescent tracer. *Ann Surg Oncol* 19 (6):1988-1994. doi:10.1245/s10434-011-2180-7

44. Ohnishi S, Lomnes SJ, Laurence RG, Gogbashian A, Mariani G, Frangioni JV (2005) Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping. *Mol Imaging* 4 (3):172-181

45. Sandanaraj BS, Gremlich HU, Kneuer R, Dawson J, Wacha S (2010) Fluorescent nanoprobe as a biomarker for increased vascular permeability: implications in diagnosis and treatment of cancer and inflammation. *Bioconjug Chem* 21 (1):93-101. doi:10.1021/bc900311h
46. Maeda H (2010) Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem* 21 (5):797-802. doi:10.1021/bc100070g

1.4. Objectifs de notre travail de recherche

Nous avons vu dans cette introduction que le traitement des cancers des VADS repose sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cependant, les deux dernières manquent de spécificité de ciblage tumorale même avec l'adjonction de la thérapie ciblée. Concernant la chirurgie, elle se heurte aux problèmes des marges d'exérèse tumorale et aux difficultés de la résection tumorale complète surtout au niveau de la partie profonde de la tumeur. Pour ces raisons, il existe un intérêt à développer des composés plus spécifiques aux cancers des VADS qui permettraient de délivrer des molécules thérapeutiques d'une façon ciblée à ces cancers. En plus, il est intéressant d'étudier l'apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la résection des cancers des VADS et son rôle dans l'optimisation des marges d'exérèse.

L'objectif de notre travail est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles des cancers des VADS et d'étudier l'apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la résection tumorale des cancers des VADS.

Ce travail de recherche est réalisé au sein de l'équipe 5 (Thérapie Ciblée, Diagnostic Précoce et Imagerie du Cancer) de l'Institut Albert Bonniot (INSERM/UJF U823) qui travaille depuis plusieurs années en collaboration avec le C.H.U. de Grenoble, sur l'identification de cibles diagnostiques et thérapeutiques, et le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les cancers du poumon et des VADS. Des travaux antérieurs de l'équipe en collaboration avec l'équipe d'Ingénierie et Interaction BioMoléculaires (I2BM) de l'unité de recherche UMR CNRS-UJF 5250 et la société Fluoptics de Grenoble ont permis la mise au point et l'optimisation de vecteurs non-viraux qui ciblent l'intégrine $\alpha\beta_3$ qui est exprimé au sein des cancers. En plus, notre équipe collabore avec l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UM1 UM2 CNRS UMR 5247 de Montpellier, afin de tester des nouveaux composés qui ciblent les cancers.

Afin de réaliser ces objectifs, nous commençons par une caractérisation *in vitro* d'un modèle cellulaire des cancers des VADS. Les résultats de cette caractérisation amènent à tester de molécules synthétisées par les chimistes des unités de recherche UMR CNRS-UJF 5250 et

CNRS UMR 5247. Ces molécules sont spécifiques aux récepteurs exprimés par notre lignée cellulaire. Dans un premier temps, l'adhésion de ces molécules aux cellules est testée en cytométrie en flux. Les nouvelles molécules qui font preuve d'une liaison importante aux cellules en cytométrie en flux, sont testées en western blot pour étudier leur(s) effet(s) éventuel(s) sur les récepteurs concernés. Parallèlement, un modèle animal orthotopique des cancers des VADS est mis au point pour tester la (les) molécule(s) qui a (ont) des résultats prometteurs *in vitro*. Les cellules cancéreuses sont initialement implantées en sous-cutané chez la souris nude afin de caractériser *in vivo* la croissance tumorale de notre lignée cellulaire. Ensuite, des implantations orthoptiques au niveau de la cavité buccale des souris nudes sont réalisées. Les tumeurs développées sont explantées et analysées en western blot et en immuno-histochimie afin de confirmer si elles possèdent le même profil des récepteurs exprimés *in vitro*. La (les) molécule(s), couplée(s) à des fluorophores, qui fait (font) preuve d'efficacité *in vitro* est (sont) testée(s) dans le modèle orthotopique afin d'étudier, par l'imagerie optique de fluorescence proche infrarouge, leur fixation *in vivo* aux tumeurs. L'exérèse tumorale est ensuite réalisée macroscopiquement et avec l'aide de l'imagerie de fluorescence. La qualité histologique de l'exérèse est étudiée pour déterminer s'il existe une amélioration de la résection tumorale guidée par l'imagerie optique *in vivo*. Des études de survie sans rechute sont aussi réalisées pour comparer l'effet de l'exérèse macroscopique et l'exérèse guidée par l'imagerie de fluorescence sur le taux de la rechute tumorale.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1. Cellules et culture cellulaire

Dans nos manipulations, nous utilisons la lignée cellulaire des cancers des VADS CAL33. Cette lignée nous a été fournie gracieusement par le Laboratoire d'Oncopharmacologie du Centre anticancéreux Antoine Lacassagne à Nice. Elle a été établie en 1983 à partir d'un échantillon tissulaire prélevé avant le traitement d'une lésion de type carcinome malpighien moyennement indifférencié de la cavité buccale chez un patient de 69 ans (Gioanni et al., 1988). Ces cellules expriment d'une façon stable le gène de la luciférase grâce à une transfection lentivirale.

Nous utilisons également les cellules H358 (cancer bronchique non à petites cellules) comme une lignée cellulaire contrôle. En effet, le profil d'expression des récepteurs de ces cellules a été déjà étudié et confirmé dans notre laboratoire.

Les deux lignées cellulaires sont maintenues en culture monocouche dans du milieu DMEM pour la lignée CAL33 et RPMI pour la lignée H358, supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (v / v) dans un incubateur humidifié (Sanyo, Japon) à 37 °C dans une atmosphère avec une concentration de CO₂ de 5 %. Le passage cellulaire est réalisé deux fois par semaine.

2.2. Western blot et immuno-détection

Pour la caractérisation *in vitro* des cellules CAL33, les cellules à 60-80 % de confluence sont recueillies et centrifugées afin d'obtenir un culot cellulaire. Ensuite, le culot est remis en suspension dans le tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (PBS, NP40 1%, SDS 0,1 %, PMSF 10 µg/ml, EDTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaPPi 5 mM, NaF 10 mM, aprotinine 0,5 µl/ml). Afin de solubiliser les protéines membranaires, la suspension cellulaire est agitée et incubée pendant 30 min à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est récolté et son contenu en protéines est dosé.

Pour la caractérisation *in vivo* des tumeurs développées à partir de la lignée cellulaire CAL33, celles-ci, une fois explantées, sont broyées mécaniquement pendant 5 minutes dans 300 µl de tampon de lyse RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Les échantillons sont ensuite vortexés et placés à 4°C pendant 30 minutes. Après 20 minutes de centrifugation à 13200 rpm, le surnageant est récupéré et soit dosé en protéine et analysé en western blot immédiatement, soit congelé à -80 °C pour une analyse ultérieure.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry à l'aide du kit Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-Seine, France). Une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'albumine bovine sérique (BSA) diluée dans de l'eau ultra-pure. La prise d'essai pour la gamme de BSA ou les échantillons à doser est de 2 µl. Les dosages sont réalisés en duplicates. La densité optique (DO) de chaque puits est mesurée à 630 nm avec un lecteur de microplaque (Beckman Coulter, Roissy, France). La concentration moyenne en protéines est alors déterminée à partir de la courbe standard $DO_{630} = f(\text{concentration en protéines})$, établies d'après les valeurs obtenues avec la gamme étalon de BSA.

Après ajustement des quantités de protéines, les échantillons protéiques sont mélangés à un tampon contenant du SDS 2 % (Sodium Dodecyl Sulfate), du beta-mercaptoéthanol et du bleu de Bromophénol. Ils sont ensuite dénaturés par chauffage à 95°C. Après dénaturation, la séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique dans un tampon de migration (Tris 50 mM - Glycine 0,2 M - SDS 0,1 %) à 110 volts pendant au moins 1 h dans un gel à 10 % ou 7 % de polyacrylamide. Avant le transfert, les membranes de PVDF (Polyvinylidène Difluoride) sont incubées dans le tampon de transfert (Tris 25 mM - Glycine 192 mM - éthanol 20 %). Le transfert s'effectue ensuite dans le tampon de transfert à 30 volts pendant 1 h.

Après le transfert, les membranes sont rincées dans du TBS-Tween20 0,05 % (TBST), puis incubées dans une solution de blocage (TBST-lait écrémé déshydraté ou BSA à 5%) pendant 1 h à température ambiante. Les membranes sont ensuite mises sous agitation durant la nuit à 4°C dans les solutions d'anticorps spécifiques (Tableau 1) dilués (dans le même tampon que pour la saturation). A l'issue de la réaction avec l'anticorps primaire, les membranes sont lavées à plusieurs reprises avec le tampon TBST 0,1%, puis mises en contact pour 1h à température ambiante avec les solutions d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase. Les

complexes immuns sont révélés par utilisation du Kit ECL (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France) et la détection de la chimiluminescence est réalisée avec un film autoradiographique ultrasensible (Genesee Scientific, San Diego, USA) exposé pendant des temps allant de 5 secondes à 30 minutes.

Les résultats sont quantifiés en se servant du logiciel ImageJ 1.46r et le ratio EGFR phosphorylé/EGFR est calculé et représenté graphiquement.

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés dans la caractérisation des cellules CAL33

Type d'anticorps	Référence	Fournisseur	Dilution
Anti-EGFR	EGFR (1005): sc-03	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
Anti-IGF1R	IGF-IR β (C-20): sc-713	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
Anti-NRP1	Anti-Neuropilin 1 antibody [EPR3113] (ab81321)	Abcam Inc.	1 : 1000
Anti-NRP2	Neuropilin-2 (C-9): sc-13117	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 1000
Anti-Phospho-EGFR	Tyr1068, D7A5, XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc	1 : 1000

2.3. Cytométrie en flux

Afin de rechercher l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ par les cellules CAL33, nous utilisons la cytométrie en flux. Les cellules sont trypsinées puis suspendues et rincées au PBS à 4°C. Elles sont ensuite centrifugées puis fixées au PFA 2% pendant 10 à 15 min. Une autre fois, elles sont rincées au PBS à 4°C puis au PBS contenant 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ (Ca²⁺/Mg²⁺). 1 million de cellules sont suspendues dans 500ul de PBS avec 20 μ l d'anticorps dirigés contre l'intégrine $\alpha\beta3$ (PE Mouse Anti-Human CD51/CD61, BD Pharmingen™), puis incubées sur la glace pendant 1h. On réalise ensuite un rinçage au PBS deux fois puis on resuspend les cellules dans du PBS. Finalement, l'analyse des échantillons est réalisée grâce au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences).

Le protocole de cytométrie en flux pour tester la liaison *in vitro* des différents peptides et des nanoparticules aux cellules CAL33 (cf. partie 2.4.), est le même protocole décrit ci-dessus sauf que les cellules ne sont pas fixées au PFA et l'incubation avec les peptides et les nanoparticules est réalisée à une température de 37°C.

2.4. Ciblage moléculaire

Toutes les molécules peptidiques qui sont testées pour étudier le ciblage spécifique des récepteurs exprimés par les cellules CAL33, sont synthétisées par les chimistes de l'équipe d'Ingénierie et Interaction BioMoléculaires (I2BM) de l'unité de recherche UMR CNRS-UJF 5250. Certaines molécules sont fournies d'emblée couplées à des fluorophores, d'autres molécules ne sont couplées à des fluorophores que lorsque les manipulations imposent l'analyse en cytométrie en flux ou en imagerie optique.

2.4.1. Ciblage de l'intégrine $\alpha\beta3$

Le RAFT-c[RGD]₄ est un châssis moléculaire constitué d'un décapeptide cyclique présentant deux domaines indépendants permettant de séparer les deux fonctions du vecteur. Sur un domaine, la fonction de ciblage est assurée par la présentation multivalente du ligand -cRGD spécifique de l'intégrine $\alpha\beta3$. Le second domaine du vecteur supporte les molécules d'intérêt à vectoriser comme les agents de détection pour l'imagerie ou les agents thérapeutiques. Nous utilisons le RAFT-c[RGD]₄ couplé à la cyanine 5 (Cy5), qui est un fluorophore, afin d'étudier par cytométrie en flux la liaison du RAFT-c[RGD]₄ aux cellules CAL33 (Figure 13 A).

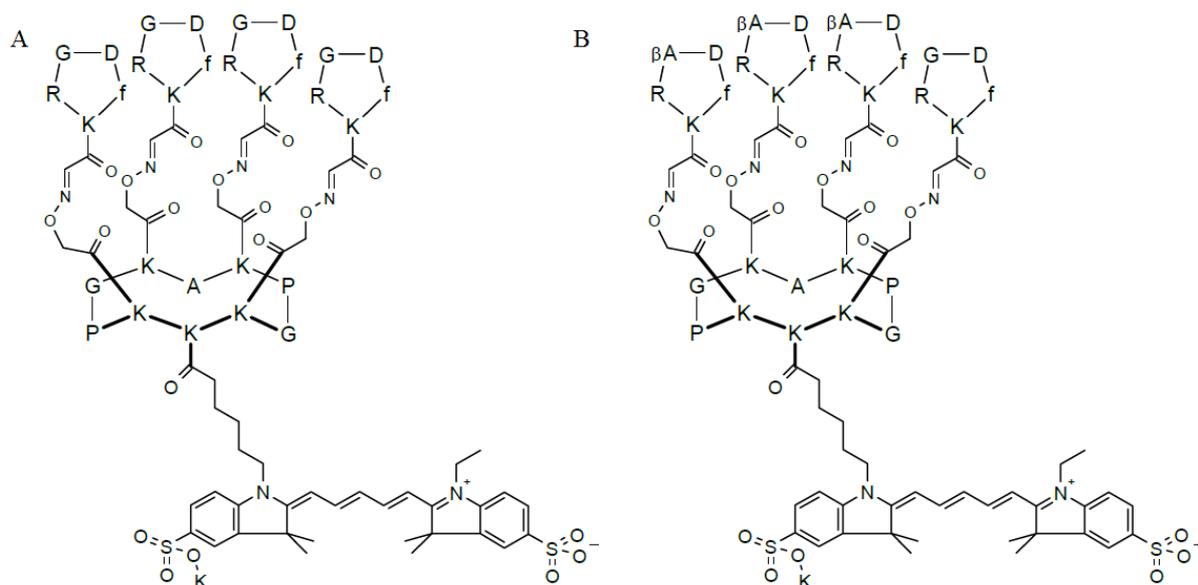


Figure 13 : Structure du RAFT RAFT-c[RGD]₄ (A) et du RAFT-c[RAD]₄ (B) . Les deux peptides sont couplés à la Cy5.

Dans nos manipulations le RAFT-c[RGD]₄ est comparé à une molécule contrôle non spécifique : le RAFT-c[RAD]₄ qui présente la même structure que le RAFT-c[RGD]₄ sauf au niveau du motif cible RGD où la glycine est remplacée par une β -alanine (Figure 13 B). Le remplacement de la glycine par la β -alanine est connu pour abolir entièrement la reconnaissance du peptide pour sa cible l'intégrine $\alpha\beta3$.

2.4.2. Ciblage de l'EGFR

Nous utilisons le peptide GE11 afin de cibler l'EGFR. Le GE11 a été identifié comme un nouveau ligand capable de se lier efficacement et spécifiquement à l'EGFR (Li et al., 2005). Il est composé d'une séquence d'acides aminés YHWYGYTPQNVI. Il est internalisé dans les cellules surexprimant l'EGFR et est capable de vectoriser des fluorophores sur la cellule cible et de les faire pénétrer à l'intérieur de celle-ci par endocytose. Le GE11 est couplé à la Cy5 (Figure 14 A). Dans le but de réaliser un vecteur bispécifique, le GE11 a été aussi couplé au RAFT-c[RGD]₄ avec un espaceur de 11 polyéthylène glycol (PEG) afin de réaliser une molécule RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 (Figure 14 B) qui est capable de se lier à la fois à l'EGFR et à la fois à l'intégrine $\alpha\beta3$ (Figure 15).

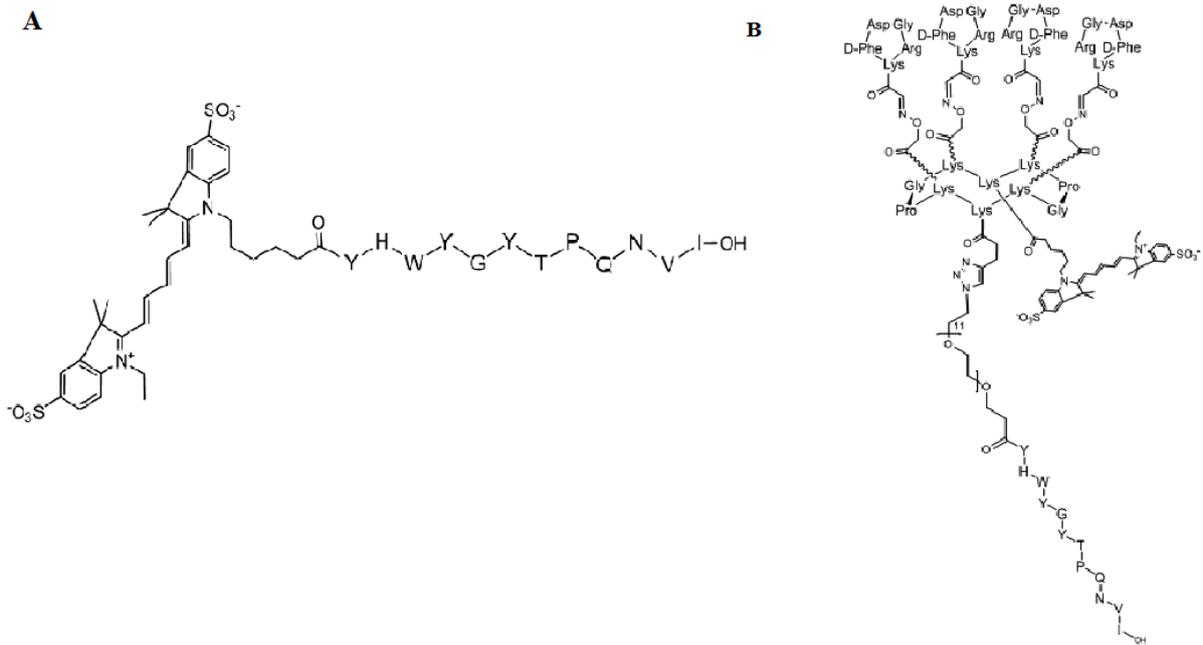


Figure 14 : Structure du GE11 (A) et du RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11. Les deux peptides sont couplés à la Cy5 (Claron, 2013).

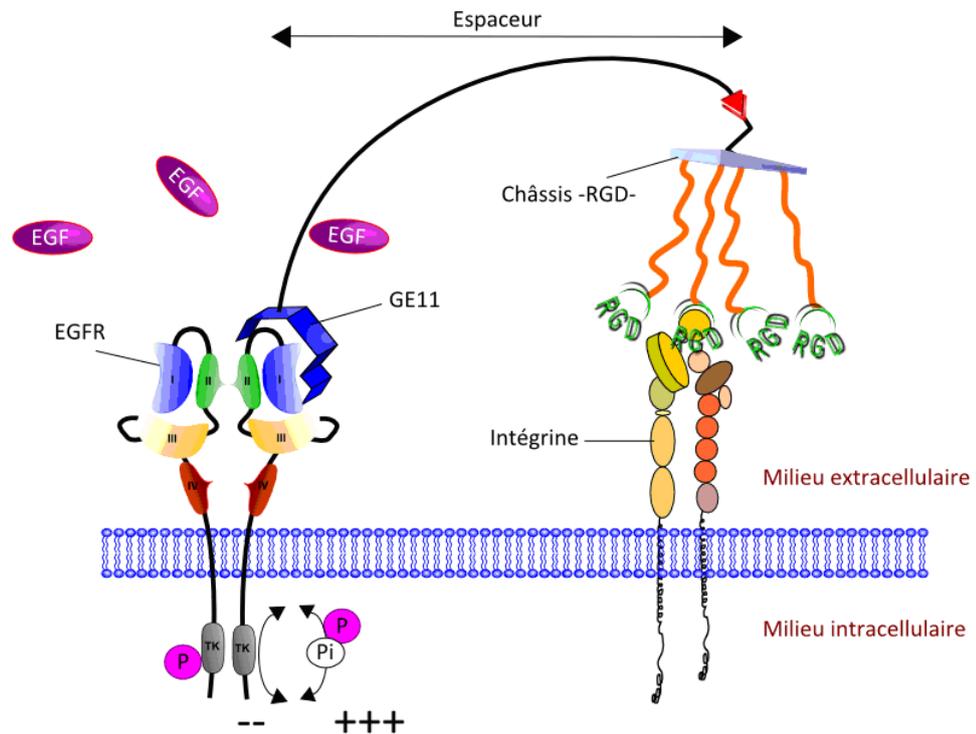


Figure 15 : Représentation schématique de la liaison cellulaire de la molécule bispécifique RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 à l'intégrine $\alpha\beta 3$ et l'EGFR (Claron, 2013).

2.4.3. Ciblage de la neuropiline

2.4.3.1. Peptides

Le peptide ATWLPPR est une séquence d'acides aminés qui se lie spécifiquement à la NRP1 (Starzec et al., 2007), et est couplé à la Cy5 (Figure 16 A). Comme pour le GE11, des composés ciblant à la fois l'intégrine $\alpha\beta3$ et la NRP1 sont synthétisés (Figure 16 B-D). Dans ces composés, l'ATWLPPR est lié au RAFT-c[RGD]₄ soit par un espaceur 11 PEG ou 24 PEG (Figure 16 B et C). L'intérêt de varier la longueur des liaisons est d'étudier *in vitro* l'influence de ces modifications sur l'adhésion des peptides aux cellules.

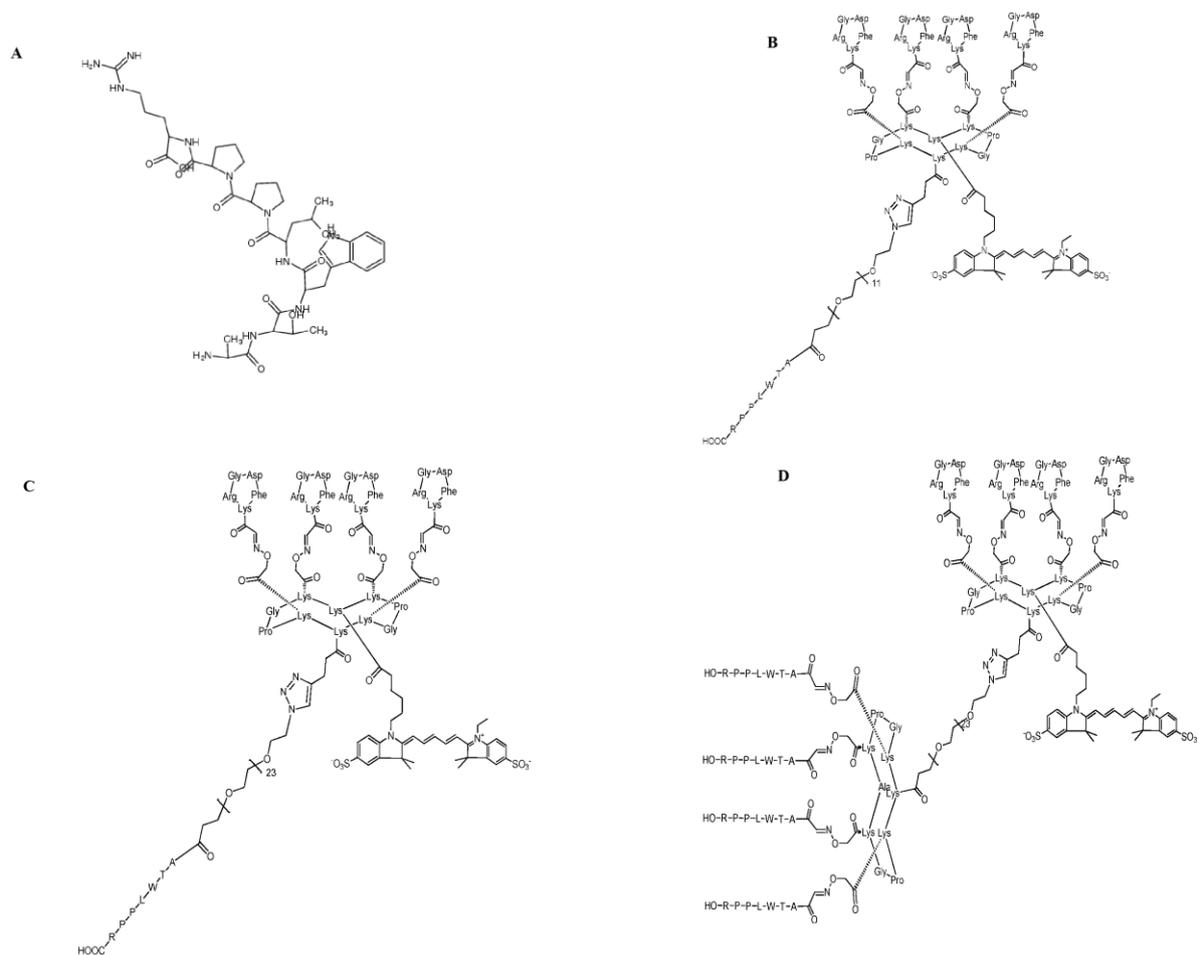


Figure 16 : Structure de l'ATWLPPR (A), du RAFT-c[RGD]₄-PEG(11)-ATWLPPR (B), du RAFT-c[RGD]₄-PEG(24)-ATWLPPR (C) et du RAFT-c[RGD]₄-RAFT-[ATWLPPR]₄ (D). Les 4 peptides sont couplés à la Cy5 (Claron, 2013).

Enfin, un composé multivalent présentant quatre peptides ATWLPPR couplés au RAFT-c[RGD]₄, a été synthétisé dans le but d'avoir une adhésion accrue de ce composé aux récepteurs (Figure 16 D).

2.4.3.2. Nanoparticules

Des nanoparticules qui ciblent la NRP1 et l'intégrine $\alpha\beta3$ nous sont fournies par l'équipe du CNRS UMR 5247. Elles ont un diamètre de 40 nm et contiennent comme molécule fluorescente, la fluorescéine. Différents ratios d'ATWLPPR et de RGD sont greffés sur ces nanoparticules afin de les rendre bispécifiques (Figure 17).

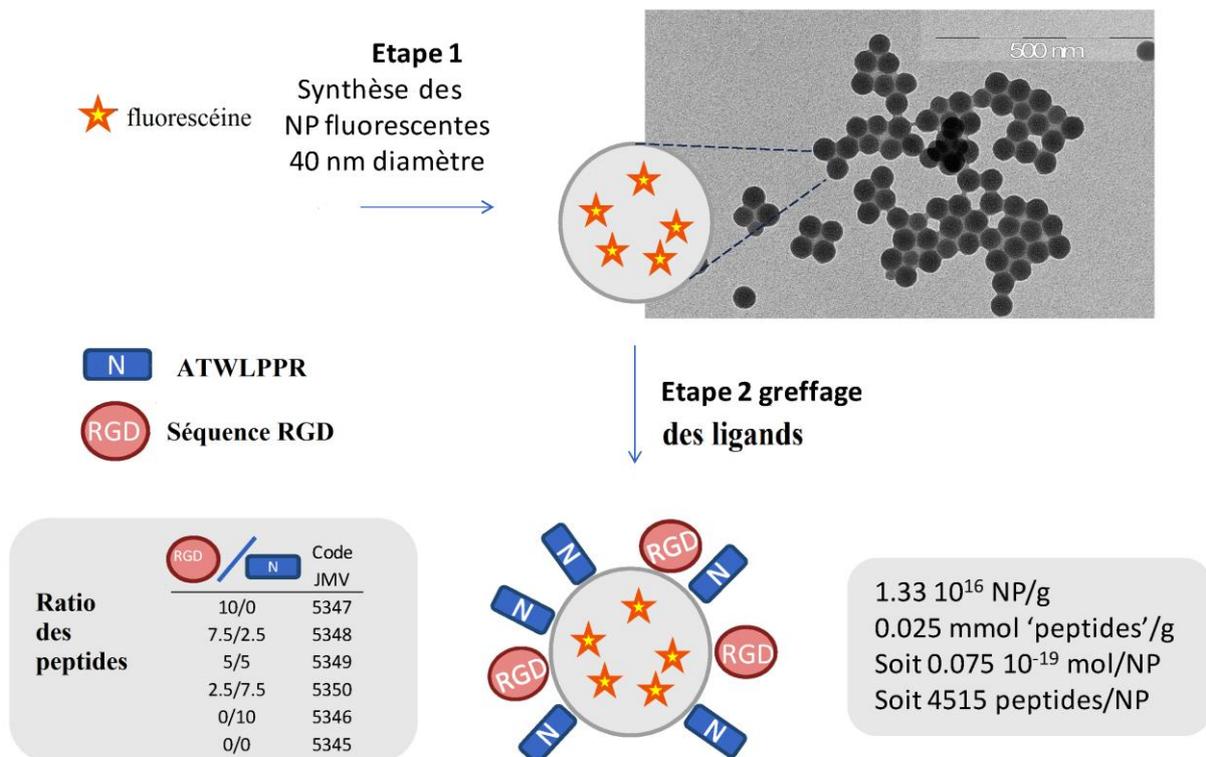


Figure 17 : Etapes de synthèse des nanoparticules bispécifiques qui ciblent la NRP1 et l'intégrine $\alpha\beta3$.

2.5. Développement de tumeurs *in vivo*

L'espèce animale utilisée dans notre travail de recherche est la souris nude femelle âgée de 5 à 6 semaines provenant de l'élevage Janvier (Le Genest, Saint-Isle, France). Notre protocole expérimental a été validé par le comité d'éthique en expérimentation animale de

Grenoble. Nos manipulations respectent les dispositions de la directive du Conseil des Communautés Européennes n° 86/609/CEE du 24 novembre 1986 concernant la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques.

2.5.1. Développement de tumeurs sous-cutanées et intramusculaires

Afin de caractériser la croissance tumorale *in vivo* de la lignée CAL33, nous réalisons des injections de ces cellules (1 à 10 millions de cellules CAL33 dans 200 µl de PBS) en sous-cutané au niveau du flanc de la souris. Les souris sont placées sous anesthésie gazeuse (isoflurane 4 % pour l'induction et 1.5 % pour le maintien). Nous réalisons aussi des implantations intramusculaires des copeaux tumoraux de 0,5 à 1 mm obtenus à partir des tumeurs CAL33 sous-cutanées.

Les souris sont observées quotidiennement. 2 à 3 fois par semaine, elles sont pesées et le volume tumoral est mesuré au pied à coulisse sous anesthésie gazeuse. Si une perte de poids supérieure à 15 % est observée ou si l'animal montre des signes de souffrance (isolement, prostration...), l'euthanasie de l'animal est réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse. De même, l'euthanasie est réalisée si des signes de nécrose cutanée à la surface de la tumeur apparaissent et/ou si le volume tumoral atteint 1000 mm³.

2.5.2. Mise au point d'un nouveau modèle animal orthotopique des cancers des VADS

2.5.2.1. Implantation tumorale

La souris est anesthésiée chimiquement par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine et médétomidine (pour 10 g de souris : 100 µl de mélange de kétamine 100 mg/kg et médétomidine 100 µg/kg). Un fragment tumoral de 0,5 à 1 mm obtenu à partir des tumeurs développées après implantation sous-cutanée, est implanté au niveau de la joue à travers une incision millimétrique jugale interne qui est suturée par un point de fil résorbable de type Vicryl 5-0 (Figure 18). Une injection sous-cutanée de buprénorphine (0.1 mg/kg) est réalisée avant le réveil pour diminuer les douleurs postopératoires. Les souris sont replacées dans leurs

cages et se réveillent spontanément. Elles sont particulièrement surveillées pendant cette phase de réveil.

Dans le but de comparer la survie de notre modèle orthotopique par implantation des copeaux tumoraux à la survie du modèle orthotopique par injection cellulaire décrit dans la littérature, nous décidons de réaliser aussi des injectons intralinguales de cellules CAL33 (0.5×10^6 cellules) chez certaines souris, sous anesthésie gazeuse.

Après l'implantation tumorale, les souris sont observées quotidiennement et pesées 3 fois par semaine. Elles bénéficient régulièrement d'une imagerie en bioluminescence afin de suivre le développement tumoral (cf. partie 2.7.1.). Si l'animal a des difficultés pour se nourrir, si une perte de poids supérieure à 15 % est observée ou si l'animal montre des signes de souffrance (isolement, prostration...), l'euthanasie de l'animal est réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse.

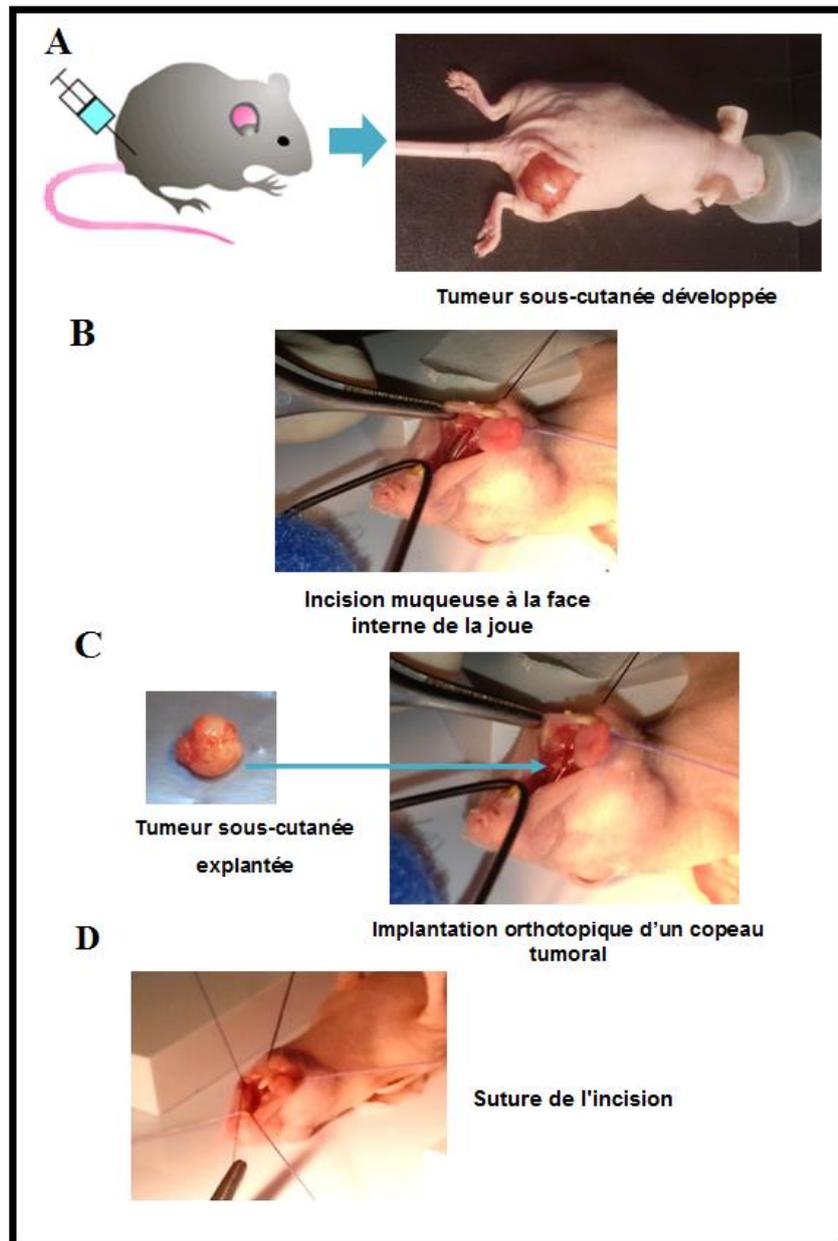


Figure 18 : Implantation des tumeurs orthotopiques. Les cellules CAL33 sont implantées en sous-cutané par injection chez la souris nude (A). Incision au niveau de la face jugale interne (B). Des copeaux tumoraux obtenus à partir des tumeurs sous cutanées explantées ont été implantés en intrajugal (C). Suture de l'incision (D).

2.5.2.2. Explantation des tumeurs orthotopiques tumorale

Une fois la tumeur orthotopique développée, la souris est anesthésiée chimiquement. Une incision au niveau de la face externe de la joue est réalisée. L'approche chirurgicale externe pour la résection tumorale, est adoptée afin d'obtenir un champ opératoire large qui permet la dissection et la résection aisée (Figure 19). Les souris sont randomisées en deux groupes.

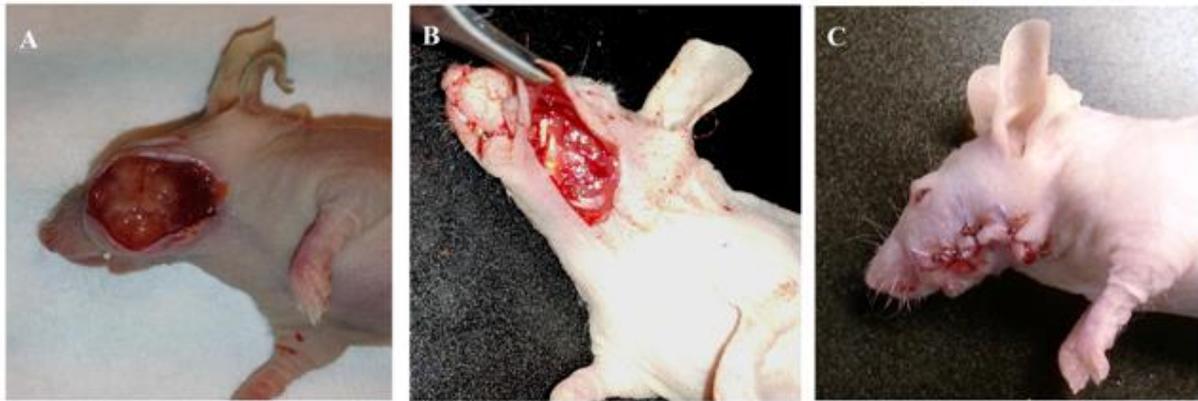


Figure 19 : Explantation des tumeurs orthotopiques. Incision à la face externe de la joue (A). Exérèse de la tumeur (B). Suture de l'incision (C).

Dans le premier groupe, la résection tumorale est réalisée macroscopiquement : la tumeur est réséquée en totalité en un seul temps opératoire. Dans le deuxième groupe, la résection tumorale est guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge après injection intraveineuse de l'AngioStamp™ 800. Cette molécule fluorescente est décrite dans la section de l'imagerie de fluorescence (cf. partie 2.7.2.).

La tumeur est exposée et imagée par la sonde d'imagerie de fluorescence proche infrarouge. Volontairement, dans un premier temps, 90% de la tumeur est réséqué macroscopiquement sans guidage par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge. 10% du tissu tumoral est donc épargné en périphérie de la tumeur afin d'étudier la capacité de l'imagerie de fluorescence à détecter des petits foyers cancéreux. Ensuite, ce tissu tumoral résiduel est excisé sous contrôle visuel afin d'obtenir une résection tumorale macroscopique complète. Le lit chirurgical est contrôlé par l'imagerie de fluorescence. Tout tissu fluorescent résiduel laissé en place involontairement, est réséqué sous contrôle de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge. Des prélèvements de tissu contrôle non fluorescent sont aussi réalisés au niveau du lit chirurgical. La tumeur orthotopique, les reliquats fluorescents et le tissu contrôle sont analysés histologiquement (cf. partie 2.6.).

Après l'explantation tumorale, nous suturons l'incision avec un fil résorbable de type Vicryl 5-0. Une injection sous-cutanée de buprénorphine (0.1 mg/kg) est réalisée avant le réveil pour diminuer les douleurs postopératoires. Les souris sont replacées dans leurs cages et se

réveillent spontanément. Elles sont particulièrement surveillées pendant cette phase de réveil parce que des complications comme un éventuel hématome ou un saignement, peuvent survenir à cette phase.

2.5.2.3. Suivi post-résection tumorale

Après l'explantation tumorale, les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 à 3 fois par semaine. Elles bénéficient régulièrement d'une imagerie en bioluminescence (cf. partie 2.7.1.) afin de détecter l'apparition de rechute tumorale ou de métastase ganglionnaire infracliniques.

Dans une première série, les souris sont suivies pendant 2 mois post-explantation afin d'étudier l'effet de la résection tumorale guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge (cf. partie 2.7.2.), sur le taux de la rechute tumorale précoce.

Dans une deuxième série, les souris sont suivies pendant 4 mois post-explantation afin de détecter les rechutes tumorales tardives et les métastases ganglionnaires. Dans cette série, le rôle de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la détection des métastases ganglionnaires est aussi étudié.

Les souris sont sacrifiées à la fin de la période de suivi ou si elles développent avant la fin de suivi, une rechute tumorale ou des métastases ganglionnaires cliniques ou infracliniques. Ces dernières sont détectées par l'imagerie en bioluminescence. La perte de poids supérieure à 15% est aussi parmi les critères qui imposent le sacrifice de la souris. En post-mortem, la rechute tumorale est réséquée ainsi que les ganglions métastatiques et non métastatiques pour une analyse histologique (cf. partie 2.6.). Les poumons et le foie sont examinés pour détecter d'éventuelles métastases à distance.

2.6. Histologie et immunohistochimie des tumeurs

2.6.1. Coloration hématoxyline & éosine (H&E)

L'étude de l'architecture tumorale et la recherche de cellules tumorales au sein des reliquats fluorescents ou des ganglions, sont réalisées sur des coupes histologiques avec une coloration H&E.

Les échantillons sont fixés dans du PFA 4 %, déshydratés dans des bains croissants d'alcool successifs puis inclus en paraffine et coupés au microtome à une épaisseur de 7 μm . Les coupes sont déparaffinées dans des bains de xylène, puis réhydratées dans des bains décroissants d'alcool et colorées dans l'hématoxyline pendant 4 minutes et rincées à l'eau courante, puis colorées dans l'éosine pendant 2 minutes et rincées une deuxième fois à l'eau courante. Les coupes colorées sont fixées à l'éthanol 100% puis au xylène, et montées sur une lame pour un examen histologique qui est réalisé au microscope BX41 Olympus. Tout foyer tumoral identifié au sein des reliquats fluorescents, est mesuré en utilisant le logiciel ImageJ 1.46r.

2.6.2. Immunohistochimie

Afin de rechercher l'expression des hétérodimères des sous-unités αv et β3 de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, nous avons recours à l'immunohistochimie.

Les échantillons sont inclus dans du Tissue-Tek® O.C.T.™ (Optimal Cutting temperature) et congelés dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Ensuite, les échantillons sont découpés au cryostat à une épaisseur de 8 μm et stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les coupes sont décongelées à température ambiante, et fixées dans l'acétone. Elles sont ensuite incubées avec le Kit M.O.M. immuno-détection (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA) afin de masquer les antigènes de la souris et éviter d'avoir une coloration non spécifique lors du rajout de l'anticorps secondaire qui est un anticorps anti-souris. Ensuite, les coupes sont incubées avec un anticorps monoclonal anti-intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ humain (synthétisés chez la souris, clone MAB1976, 1:500 ; Millipore). La coloration est réalisée en utilisant la DAB

(diaminobenzidine) liquide et un kit de substrat chromogène (Dako, North America, Inc., CA). Les noyaux sont colorés avec l'hématoxyline. Les coupes sont montées sur une lame pour un examen au microscope BX41 Olympus.

2.7. Ciblage tumoral *in vivo* et imagerie optique

Dans nos travaux, nous utilisons deux types d'imagerie optique *in vivo* : l'imagerie en bioluminescence et l'imagerie de fluorescence proche infrarouge.

2.7.1. Imagerie de bioluminescence

Les cellules CAL33 expriment de manière stable le gène de la luciférase. Nous mesurons la quantité de luminescence émise après injection de luciférine, qui est proportionnelle au nombre de cellules CAL33 présentes.

Cinq minutes avant l'imagerie de bioluminescence, la souris reçoit une injection intrapéritonéale de luciférine (150 mg/kg). Ensuite, elle est placée sous anesthésie gazeuse (isoflurane à 4% pour l'induction et 1.5 % d'isoflurane pour le maintien) grâce un circuit anesthésique relié aux dispositifs IVIS Kinetic (Caliper Life Sciences) ou OrcaIIBT-512G (Hamamatsu, Massy, France) dans lesquels l'acquisition de l'imagerie en bioluminescence est réalisée (Figure 20). Les données semi-quantitatives sont recueillies, à partir des images de bioluminescence, après délimitation des régions d'intérêt de la zone dans laquelle nous voulons quantifier la bioluminescence. Les résultats sont exprimés sous forme de nombre de photons par seconde.

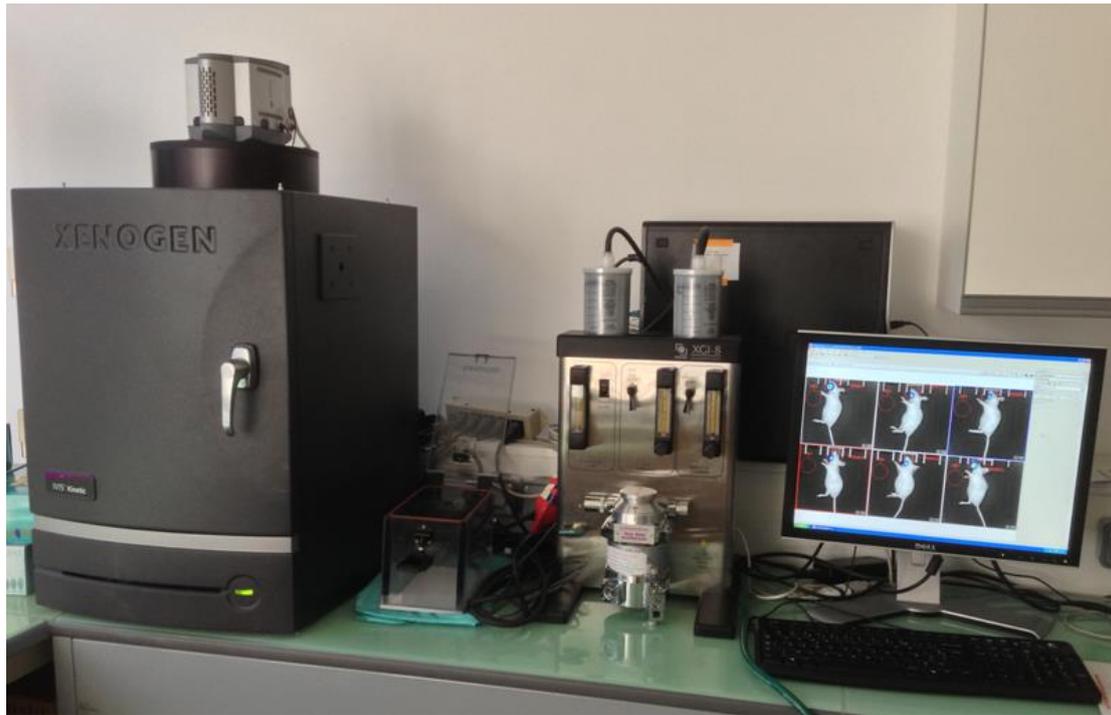


Figure 20 : Photo de l'appareil IVIS Kinetic (Caliper Life Sciences). Ce système peut effectuer à la fois de l'imagerie de bioluminescence et de fluorescence. Le système comprend une caméra CCD hautement sensible pour l'amélioration du signal et la réduction du temps d'exposition permettant ainsi une cinétique rapide. Le système est relié à un circuit d'anesthésie gazeuse pour maintenir l'animal sous anesthésie générale pendant l'acquisition des images.

2.7.2. Imagerie de fluorescence

Deux traceurs fluorescents sont utilisés dans nos manipulations. Les traceurs sont injectés par voie intraveineuse dans la queue de la souris, sous anesthésie gazeuse, à la dose de 10 nmol par souris, 16 à 24 heures avant l'acquisition de la fluorescence.

Le premier traceur est le RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700 qui est un RAFT-c[RGD]₄ couplé au fluorophore « Alexa Fluor 700 ». Il est utilisé pour caractériser la dynamique de captation *in vivo* du traceur par les tumeurs développées à partir de la lignée cellulaire CAL33. Cette dynamique est étudiée en se servant de l'appareil IVIS Kinetic (Caliper Life Sciences) ou OrcaIBT-512G (Hamamatsu, Massy, France) qui sont adaptés à l'absorbance maximale et l'émission maximale de l'Alexa Fluor 700 et qui sont respectivement 702 nm et 723 nm.

Le deuxième traceur est l'AngioStamp™ 800 (Fluoptics, Grenoble, France). C'est aussi un RAFT-c[RGD]₄ couplé à un fluorophore. Il se lie spécifiquement à l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Il montre une absorbance maximale à 781 nm et une émission maximale à 794 nm (Figure 21).

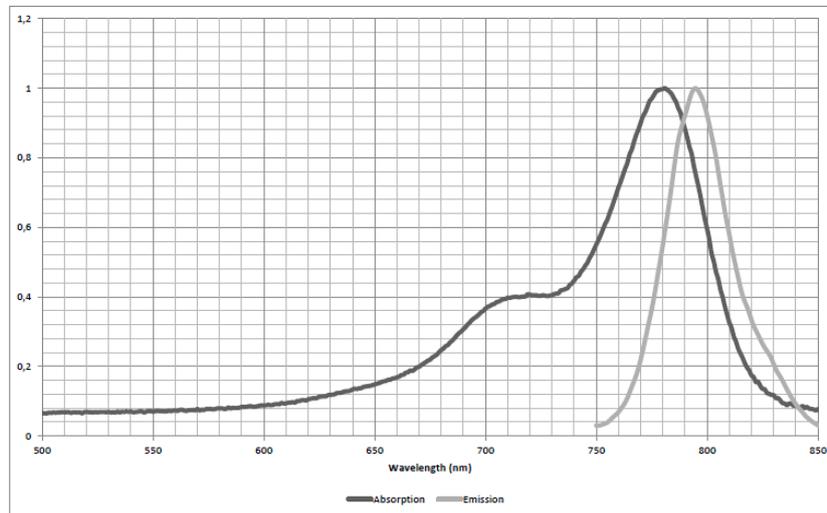


Figure 21 : Spectre d'absorbance et d'émission de l'AngioStamp™ 800 (Fluoptics, Grenoble, France)

Le signal fluorescent émis par l'AngioStamp™ 800 est aussi acquis par une caméra d'imagerie de fluorescence proche infrarouge. Nous utilisons deux caméras adaptées au spectre d'absorbance et d'émission de l'AngioStamp™ 800. La première est nommée « FluoSTIC » et est conçue par le Laboratoire d'Electronique et de Technologies de l'Information du CEA de Grenoble (CEA-Leti) (Gioux et al., 2012) (Figure 22). Elle permet de visualiser la fluorescence dans la bande spectrale 770-850 nm, pour une excitation à 740 nm. Elle est dotée d'un éclairage « blanc » filtré qui évite de travailler dans l'obscurité complète. Des manipulations peuvent être pratiquées sous la sonde simultanément à l'observation de la fluorescence.

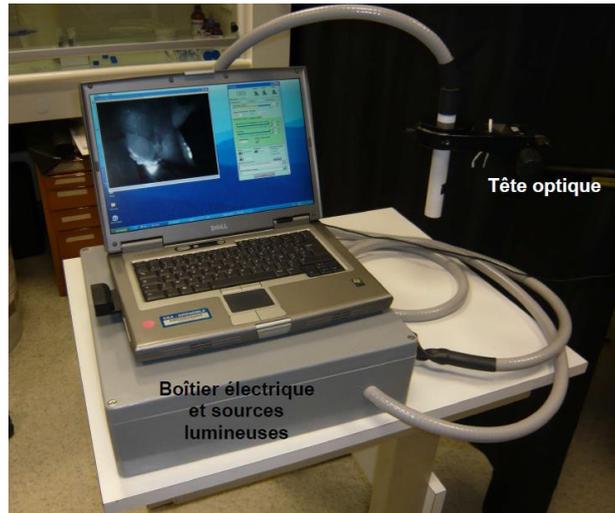


Figure 22 : Caméra d'imagerie de fluorescence proche infrarouge : FluoSTIC (CEA-Leti, Grenoble)

L'autre caméra est la FluoStick™ (Fluoptics, Grenoble, France) (Figure 23). Elle est la version commerciale de la FluoSTIC. Le FluoStick™ est un système d'imagerie de petit diamètre destiné à l'imagerie de fluorescence peropératoire pour des fluorophores ayant un maximum d'absorbance vers 770 nm et un maximum d'émission vers 820 nm. Comme le FluoSTIC, le système est conçu en deux parties : un boîtier de contrôle qui est relié au PC de contrôle par un câble USB et une tête optique qui est reliée au boîtier de contrôle par un câble de quatre mètres de longueur.



Figure 23 : Caméra d'imagerie de fluorescence proche infrarouge : FluoStick™ (Fluoptics, Grenoble, France)

Les deux caméras sont des systèmes d'imagerie de luorescence proche infrarouge, miniaturisés et adaptés spécifiquement aux applications futures dans la chirurgie des cancers des VADS.

Chapitre 3 : Résultats

Dans ce chapitre, nous exposons les résultats de la caractérisation de la lignée cellulaire des cancers des VADS CAL33 ainsi que les résultats des essais de nouvelles molécules de ciblage spécifique. Ensuite, nous présentons, les résultats de nos travaux qui ont abouti à la mise au point d'un nouveau modèle orthotopique des cancers des VADS. Finalement, l'apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la résection tumorale, la survie sans rechute et la détection des métastases ganglionnaires, dans notre modèle orthotopique, seront présentés. Le schéma ci-dessous résume les résultats de nos travaux (Figure 24).

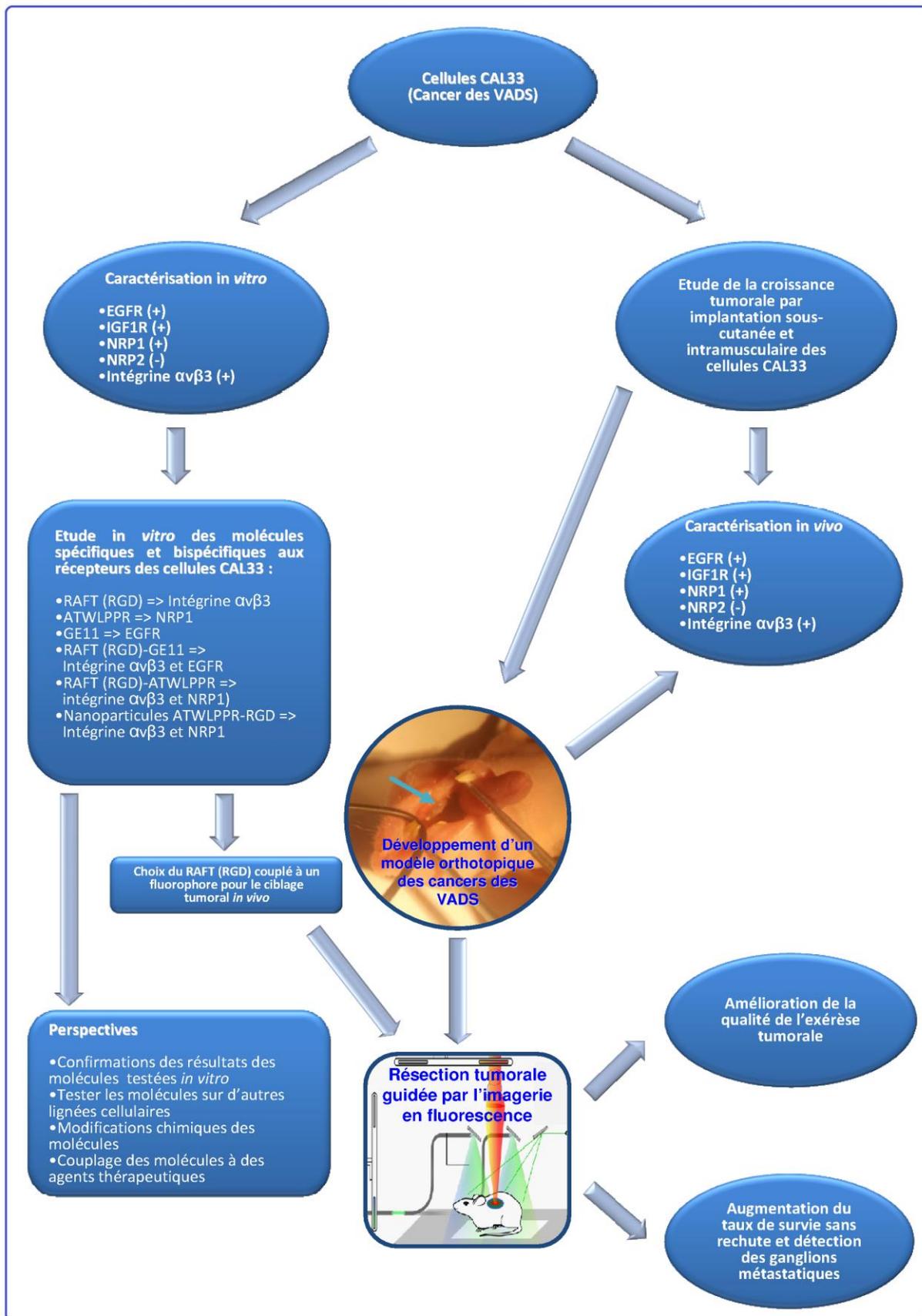


Figure 24 : Schéma résumé des résultats

3.1. Caractérisation *in vitro* de la lignée cellulaire CAL33

Nous avons analysé par western blot l'expression de l'EGFR, l'IGF1R et la NRP1 dans les cellules CAL33 *in vitro*. Les résultats montrent que les cellules CAL33 expriment fortement l'EGFR, l'IGF1R et la NRP1 et sont confirmés en comparant les bandes du western blot des CAL33 aux bandes de la lignée contrôle (H358) dont la caractérisation a été déjà réalisée et confirmée dans notre laboratoire (Figure 25).

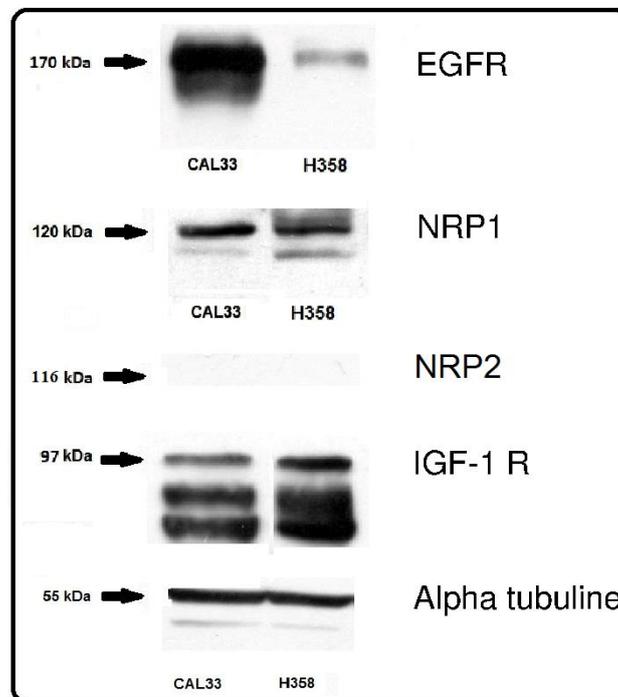


Figure 25 : Caractérisation *in vitro* par western blot des cellules CAL33. Les cellules H358 sont utilisées comme une lignée cellulaire contrôle.

La présence de l'intégrine $\alpha\beta3$ *in vitro* a été étudiée par cytométrie en flux avec un anticorps anti-intégrine $\alpha\beta3$. Les résultats montrent que les cellules CAL33 expriment l'intégrine $\alpha\beta3$ *in vitro* (Figure 26).

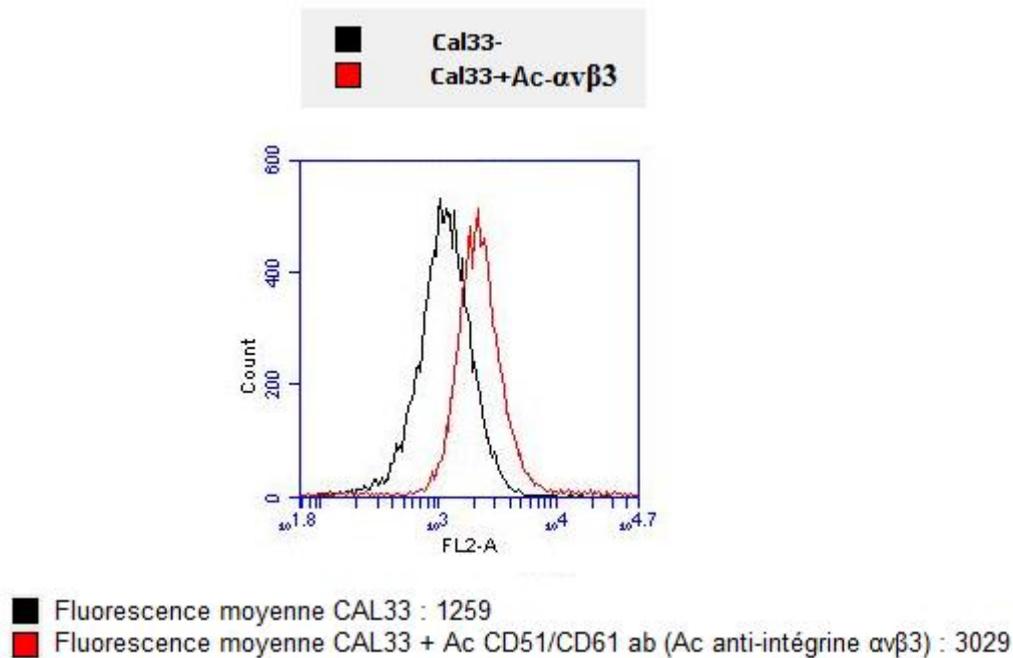


Figure 26 : Résultat du marquage en cytométrie en flux par l'anticorps anti-intégrine $\alpha v\beta 3$. L'anticorps se lie aux cellules CAL33 témoignant une expression positive de l'intégrine $\alpha v\beta 3$.

3.2. Ciblage cellulaire

Dans cette partie, nous présentons les résultats du ciblage tumoral des cellules CAL33 *in vitro* par les molécules ciblant l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (RAFT-c[RGD]₄) ou des dérivés bi-fonctionnels spécifiques à la fois de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et d'un récepteur exprimé par la lignée cellulaire CAL33 (dérivés du RAFT-c[RGD]₄ ou nanoparticules, cf. matériel et méthodes).

3.2.1. Résultats du ciblage de l'intégrine $\alpha v\beta 3$

La liaison du RAFT-c[RGD]₄ et du RAFT-c[RAD]₄ est étudié en cytométrie en flux à une concentration de 1 μ M. Cette concentration est choisie grâce à l'expérience de notre laboratoire dans l'utilisation de ces peptides qui ont été déjà testés sur d'autres lignées cellulaires. Les résultats montrent que le RAFT-c[RGD]₄ présente une adhésion spécifique au cellules CAL33 qui expriment l'intégrine $\alpha v\beta 3$ par rapport au peptide contrôle non spécifique, le RAFT-c[RAD]₄ (Figure 27).

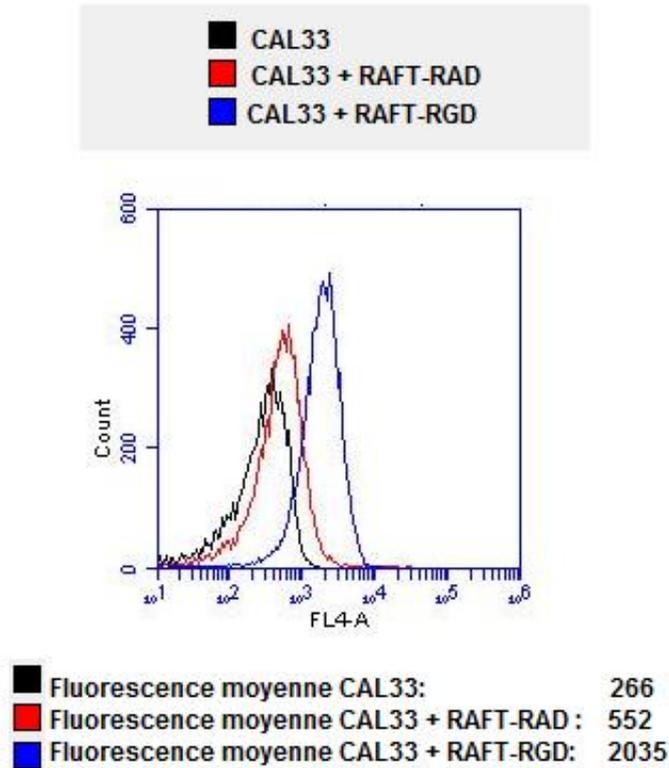


Figure 27 : Etude de l'adhésion du RAFT-c[RGD]₄ qui cible l'intégrine $\alpha\beta_3$ et du RAFT-c[RAD]₄ (peptide non spécifique), aux cellules CAL33 qui expriment l'intégrine $\alpha\beta_3$. Les résultats montrent une liaison spécifique du RAFT-c[RGD]₄.

3.2.2. Résultats du ciblage de l'EGFR

L'adhésion des peptides qui ciblent l'EGFR (GE11) ou à la fois l'EGFR et l'intégrine $\alpha\beta_3$ (RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11) des cellules CAL33, est testée en cytométrie en flux à la concentration de 1 μM . Les résultats montrent que le RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 présente la liaison la plus importante aux cellules CAL33 (Figure 28).

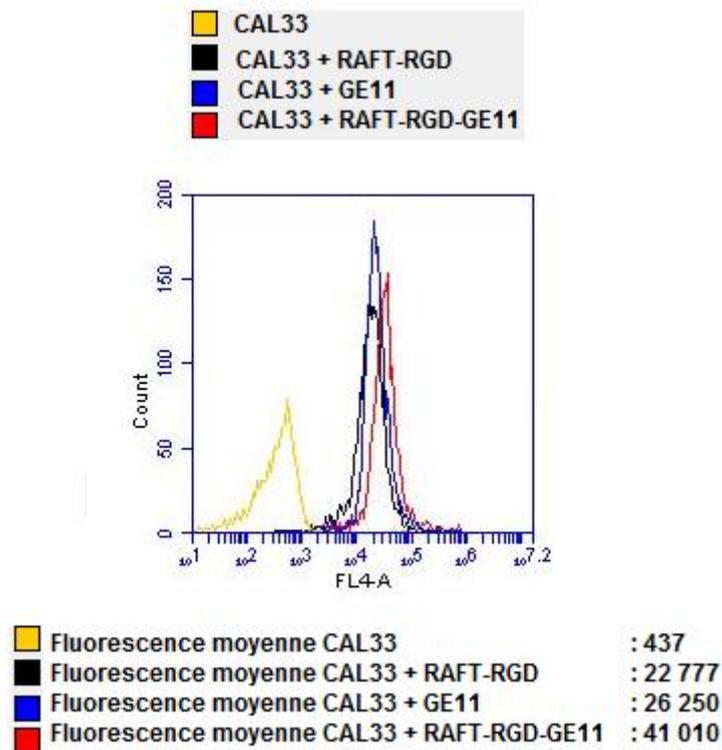


Figure 28 : Cytométrie en flux : ciblage des cellules CAL33 par le GE11 couplé ou non au RAFT-c[RGD]₄. Comparaison entre l'adhésion du RAFT-c[RGD]₄, GE11 et RAFT-c[RGD]₄-GE11 aux cellules CAL33.

Nous avons étudié l'effet des peptides spécifiques de l'EGFR incubés pendant 30 min à 37 °C à une concentration de 500 nM, sur l'activation de l'EGFR *in vitro* par western blot, en présence ou non de l'EGF (50 ng/ml) simultanément avec les peptides ou après 20 min de contact avec les peptides. Le cétuximab est utilisé comme un contrôle. En effet, il est connu par ses effets de blocage et d'inhibition de la phosphorylation de l'EGFR.

Les résultats préliminaires montrent que le RAFT-c[RGD]₄ et le RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 activent l'EGFR (ratio pEGFR/EGFR x2), et le GE11 seul ou le RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 ne bloquent pas l'activation de l'EGFR induite par l'EGF, contrairement au cétuximab, suggérant une activation importante de l'EGFR en présence du RAFT-c[RGD]₄-GE11 (Figure 29).

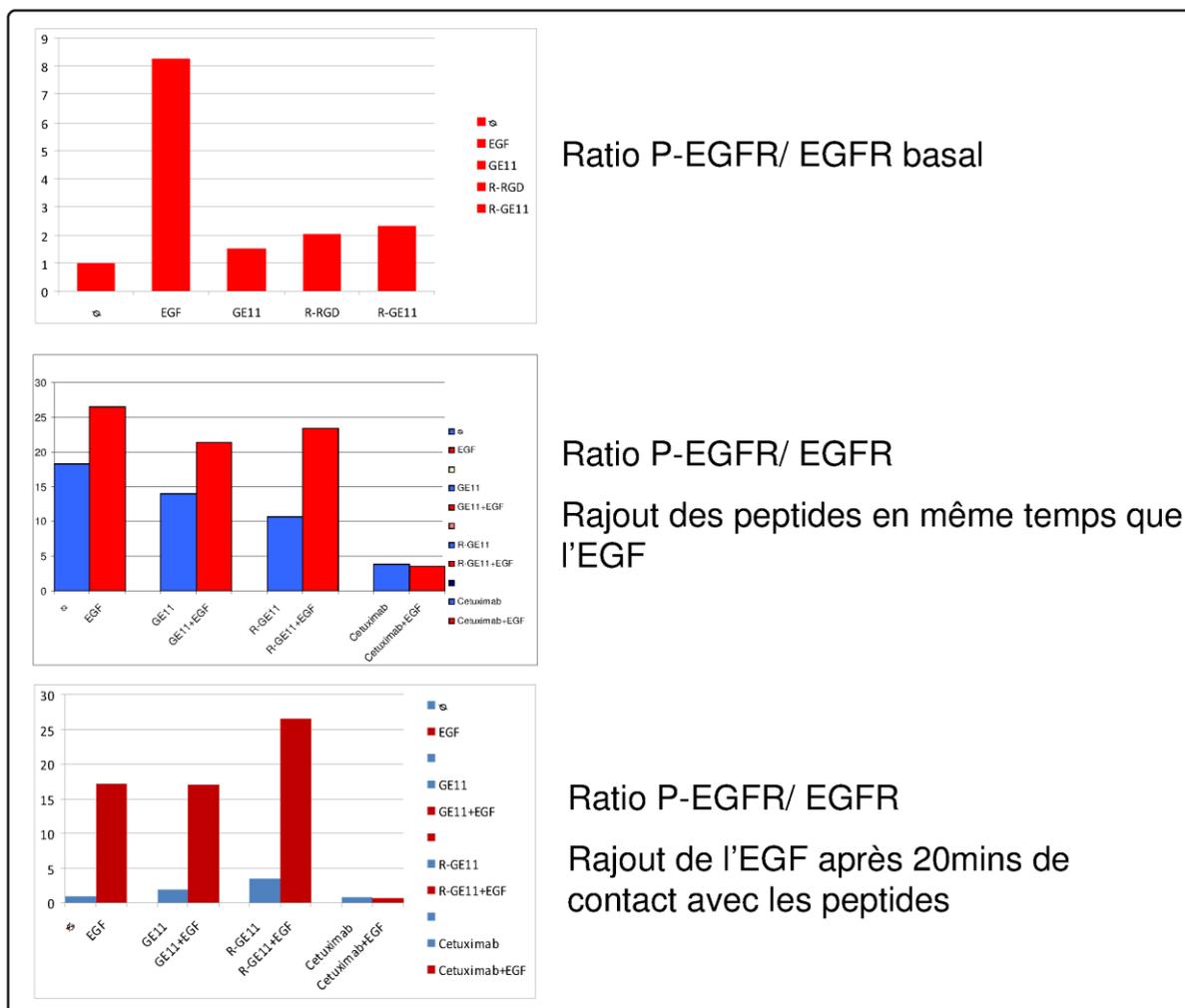


Figure 29 : Effet des peptides bispécifiques qui ciblent l'EGFR et l'intégrine $\alpha\beta3$, sur la phosphorylation de l'EGFR.

Ces résultats doivent être confirmés avant l'utilisation du RAFT-c[RGD]₄-GE11 dans le ciblage tumoral *in vivo*. En effet, l'activation de l'EGFR par ce peptide, si elle est confirmée, risquerait d'augmenter la prolifération cellulaire tumorale ce qui pourrait empêcher son utilisation même s'il présente une liaison accrue *in vitro* aux cellules tumorales par rapport aux autres peptides.

3.2.3. Résultats du ciblage de la NRP1

3.2.3.1. Peptides

L'adhésion des peptides qui ciblent la NRP1 ou à la fois la NRP1 et l'intégrine $\alpha\beta3$ des cellules CAL33, est testée en cytométrie en flux à la concentration de 1 μM , 5 μM et 10 μM .

Nous constatons un effet dose-dépendant pour tous les peptides testés (Figure 30). A la concentration de 1 μM et surtout 5 μM , les cellules sont plus marquées avec le RAFT-c[RGD]₄-RAFT-[ATWLPPR]₄. A la concentration de 10 μM , le marquage ne semble pas significativement différent de celui obtenu avec le RAFT-c[RGD]₄. L'ATWLPPR et le RAFT-c[RGD]₄-PEG(24)-ATWLPPR semblent moins marquer les cellules.

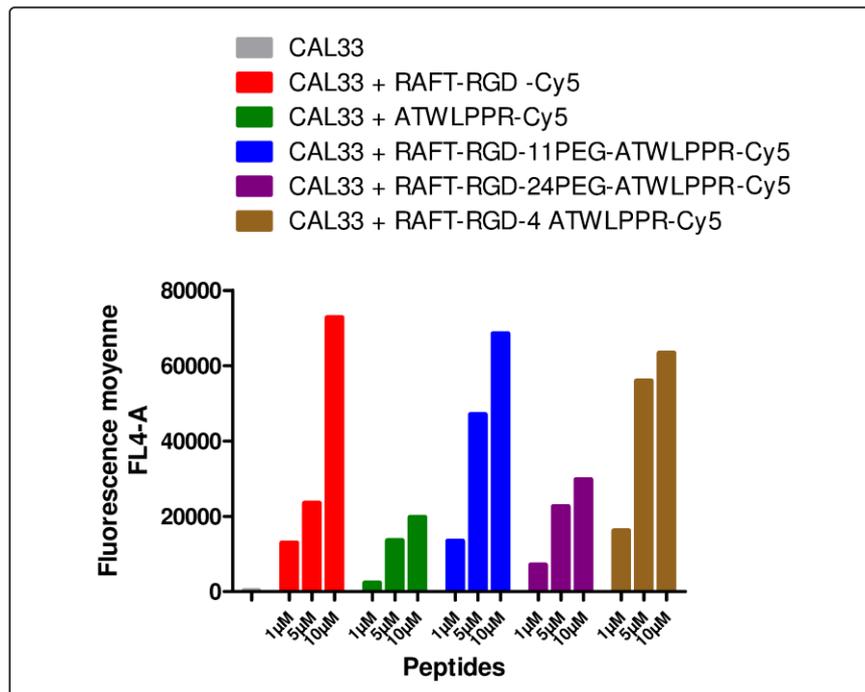


Figure 30 : Liaison de l'ATWLPPR couplé ou non au RAFT-c[RGD]₄ dans les cellules CAL33 évaluée par cytométrie en flux.

Ces résultats nécessitent d'être confirmés. En effet, le RAFT-c[RGD]₄-RAFT-[ATWLPPR]₄ pourrait être considéré comme un peptide d'intérêt qui servirait à vectoriser des molécules destinées à l'imagerie ou à la thérapie des cancers des VADS. Il reste à tester ce peptide sur d'autres lignées cellulaires. Il est également indispensable d'étudier l'effet de ce peptide sur les voies de signalisation de la NRP1 et du VEGF.

3.2.3.2. Nanoparticules

La liaison des nanoparticules sur lesquelles sont greffés l'ATWLPPR et la séquence RGD à différents ratios, aux cellules CAL33, est analysée par cytométrie en flux à la concentration de 1.76 nM après 30 min d'incubation à 37°C. Les résultats montrent une augmentation de la capacité de liaison aux cellules CAL33, proportionnelle à la quantité de la séquence RGD

greffée sur les nanoparticules (Figure 31). Il semble aussi que l'ATWLPPR greffés sur ces nanoparticules n'ait pas d'effet sur leur capacité d'adhésion aux cellules CAL33, mais ces résultats restent à confirmer.

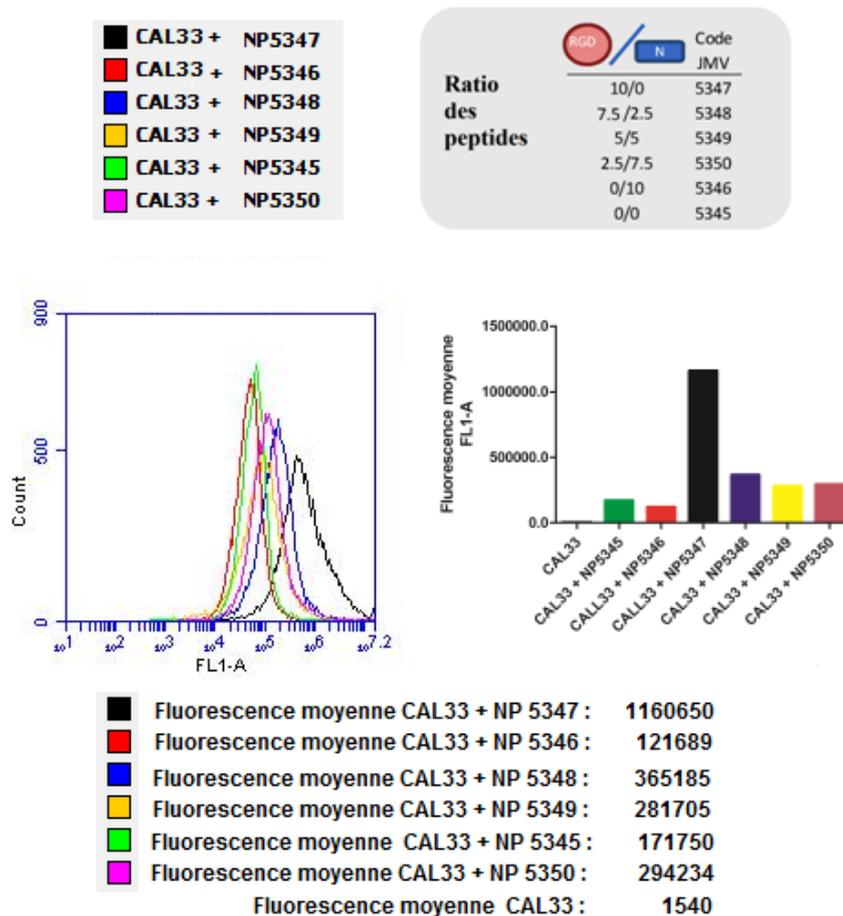


Figure 31 : Liaison des nanoparticules présentant différents ratios d'ATWLPPR et de séquence RGD dans les cellules CAL33 évaluée par cytométrie en flux.

3.3. Tumeurs CAL33 sous-cutanées et intramusculaires

Les cellules CAL33 expriment l'EGFR, l'IGF1R, la NRP1 et l'intégrine $\alpha\beta 3$. Ce profil d'expression des récepteurs est concordant avec celui reconnu des cancers des VADS (Alattar et al., 2014; Chen et al., 2000; Clauditz et al., 2013; Fabricius et al., 2011; Jedlinski et al.,

2013; Limesand et al., 2013; Smilek et al., 2006; Wang et al., 2012). Ces résultats nous permettent d'utiliser cette lignée cellulaire *in vivo*.

3.3.1. Croissance tumorale *in vivo* des cellules CAL33

La croissance de tumeurs développées à partir de la lignée cellulaire CAL33, est étudiée. L'implantation sous-cutanée des cellules CAL33 *in vivo* montre une croissance tumorale rapide avec un signal en bioluminescence qui se multiplie même avant que la tumeur soit détectable macroscopiquement vers J7-J10 post-implantation au niveau du flanc de la souris (n=4) (Figure 32).

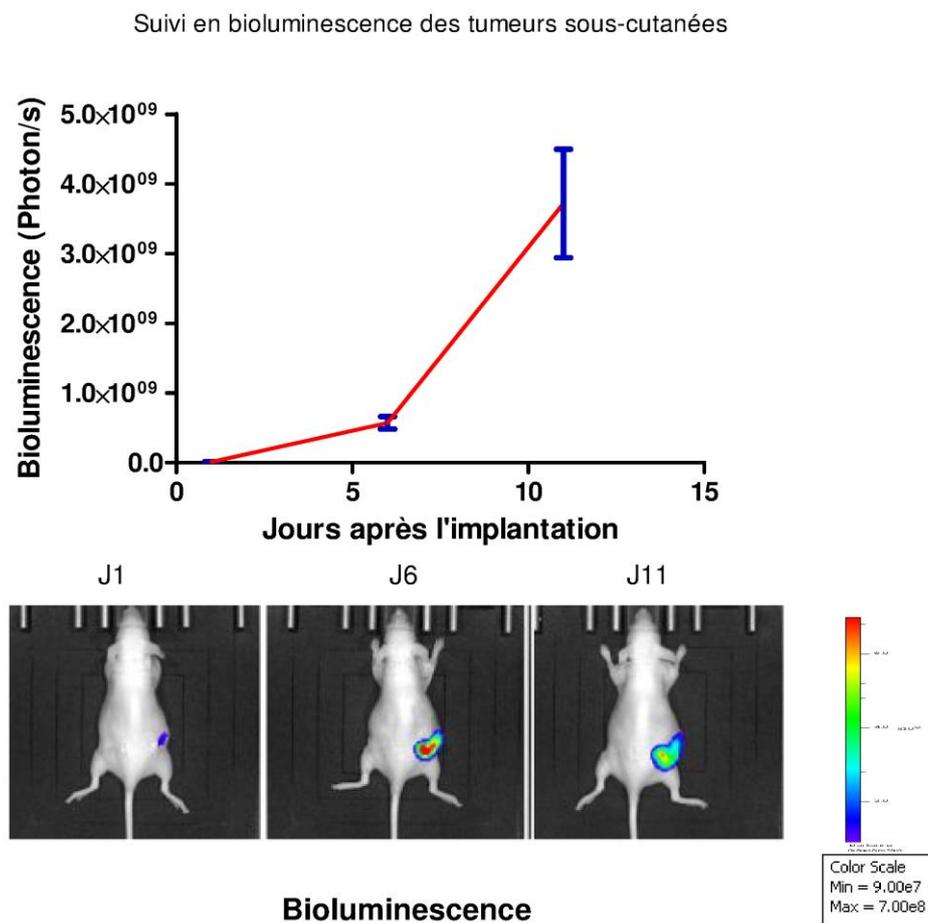


Figure 32 : Bioluminescence des tumeurs sous-cutanées. Signal de la bioluminescence en fonction du temps après implantation des cellules CAL33 au niveau du flanc de la souris

L'implantation de 10×10^6 cellules CAL33 développe de volumineuses tumeurs qui peuvent atteindre 1000 mm^3 à J15 post-implantation (Figure 33 A). Ce volume tumoral important, parfois associé à une ulcération cutanée, impose le sacrifice de la souris vers J15. Vu la

croissance tumorale rapide, le nombre de cellules implantées est réduit à 1×10^6 (n=4). Malgré cette réduction, la croissance tumorale passe par une phase de croissance lente suivie d'une phase de croissance rapide pour atteindre un volume de 1000 mm^3 , vers J15 (Figure 33 B), comme dans l'implantation de 10×10^6 cellules. Afin de freiner la croissance tumorale des cellules CAL33, des copeaux tumoraux de 0,5 à 1 mm obtenus à partir des tumeurs CAL33 sous-cutanées déjà développées chez la souris, sont implantés en intramusculaire (n=4). Les tumeurs développées à partir de ces copeaux présentent une croissance tumorale plus lente (Figure 33 C). Ceci pourrait être expliqué par le fait que dans cette méthode d'implantation, nous évitons la dissémination cellulaire qui résulte de la pression hydrostatique de la syringe pendant l'injection de cellules tumorales. En plus, l'implantation de copeaux tumoraux dans un espace confiné dans le muscle, contraint physiquement le développement tumoral en comparaison à l'espace sous-cutané qui ne présente pas de barrière anatomique à la progression tumorale. Les tumeurs intramusculaires deviennent macroscopiquement détectables à partir de J15 et atteignent une taille de 800 à 1000 mm^3 à J30. Grâce à cette méthode d'implantation, la durée de survie de la souris avec une tumeur *in situ* au niveau du flanc, est augmentée de 15 jours par rapport à la méthode d'injection cellulaire sous-cutanée.

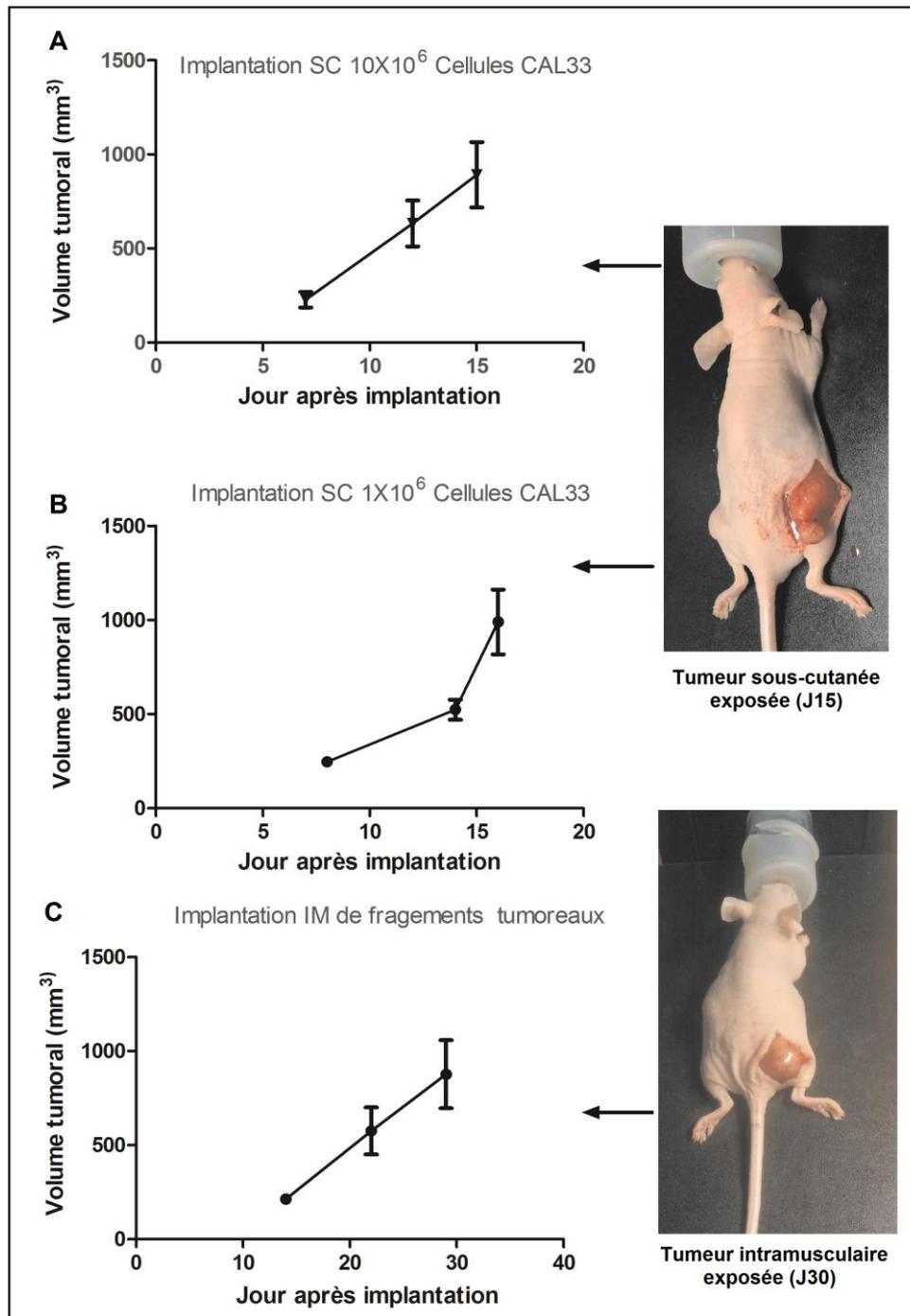


Figure 33 : Croissance tumorale sous-cutanée et intramusculaire. Comparaison entre la vitesse de croissance tumorale après l'implantation des cellules CAL33 10×10^6 et (A) et 1×10^6 (B) cellules en sous-cutané et après l'implantation des copeaux tumoraux en intramusculaire (C).

3.3.2. Ciblage de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ *in vivo*

Nous avons analysé le ciblage du RAFT-c[RGD]₄ *in vivo* sur les tumeurs développées à partir de la lignée cellulaire CAL33. En effet, en plus des résultats encourageants du ciblage *in vitro*

des cellules CAL33 par le RAFT-c[RGD]₄, notre laboratoire a l'expérience de l'utilisation de ce peptide *in vivo* avec des résultats prometteurs dans le ciblage et la résection tumorale chez les modèles animaux du cancer du sein, du cancer du poumon et du fibrosarcome (Dufort, 2010; Garanger, 2005; Keramidas et al., 2010; Sancey et al., 2007; Wenk et al., 2013).

Les résultats de la dynamique de captation du RAFT-c[RGD]₄ *in vivo* par les tumeurs développées à partir des cellules CAL33 montrent que le signal maximal au sein de la tumeur est obtenu 16 à 24 heures après l'injection intraveineuse du RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700 (Figure 34). L'identification de cette fenêtre temporelle pendant laquelle le signal fluorescent de la tumeur, est maximal sert à adapter le temps d'injection du traceur fluorescent afin d'optimiser le temps d'acquisition des images.

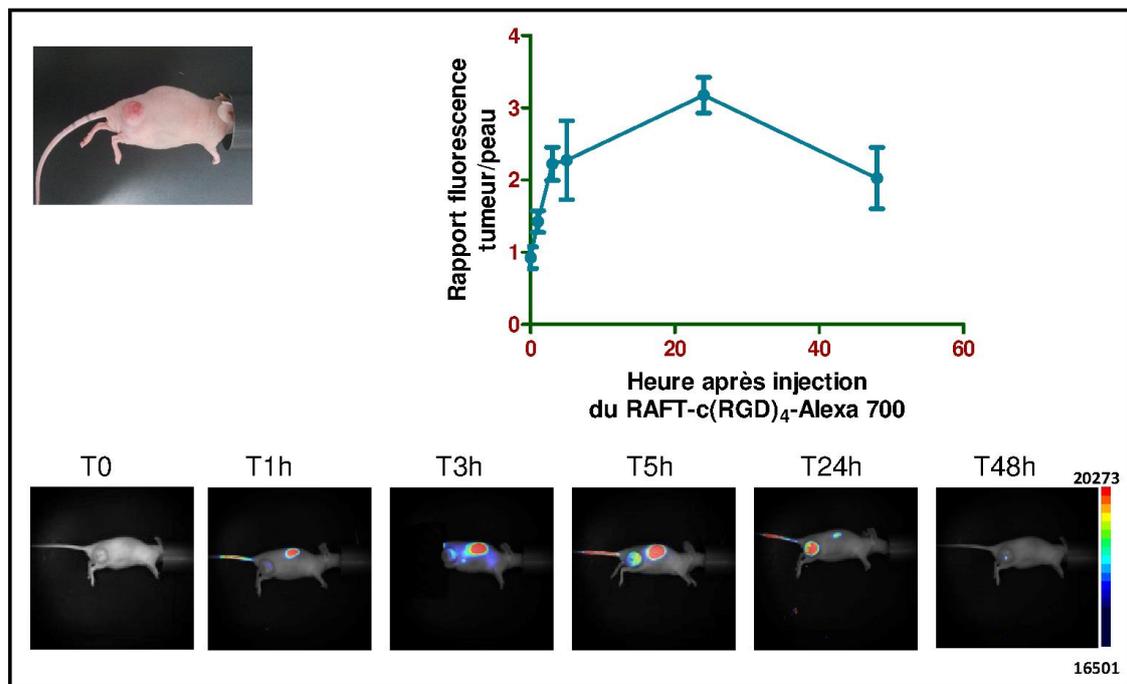


Figure 34 : Imagerie de fluorescence des tumeurs sous-cutanées. Captation en fonction du temps du RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700 par une tumeur sous-cutanée développée à partir de la lignée cellulaire CAL33.

Nos résultats *in vitro* et *in vivo* montrent que le RAFT-c[RGD]₄ cible spécifiquement notre lignée cellulaire des cancers des VADS.

3.4. Développement d'un nouveau modèle animal orthotopique des cancers des VADS

3.4.1. Développement tumoral intralingual

Dans un premier temps, nous voulons reproduire les modèles animaux orthotopiques de la littérature par injection de cellules tumorales au niveau lingual. Les résultats de l'injection des cellules CAL33 (0.5×10^6 cellules dans 25 et 50 μ l de PBS) au niveau de la langue de la souris (n=2), sont concordants avec la littérature (Bozec et al., 2007; Bozec et al., 2011; Bozec et al., 2008; Bozec et al., 2009). En effet, la progression tumorale rapide observée macroscopiquement et en bioluminescence (Figure 35) est responsable d'une perte de poids de 10 à 15 % parce que la souris présente de difficultés à manger et à boire ce qui impose son sacrifice vers J10-J12 post-implantation. Par ailleurs, il est important de signaler que dans ce modèle, les tumeurs CAL33 expriment aussi l'intégrine $\alpha\beta 3$ comme dans les tumeurs sous-cutanées (Figure 39). Ceci est confirmé par l'injection du RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700 qui est capté par la tumeur linguale (Figure 35).

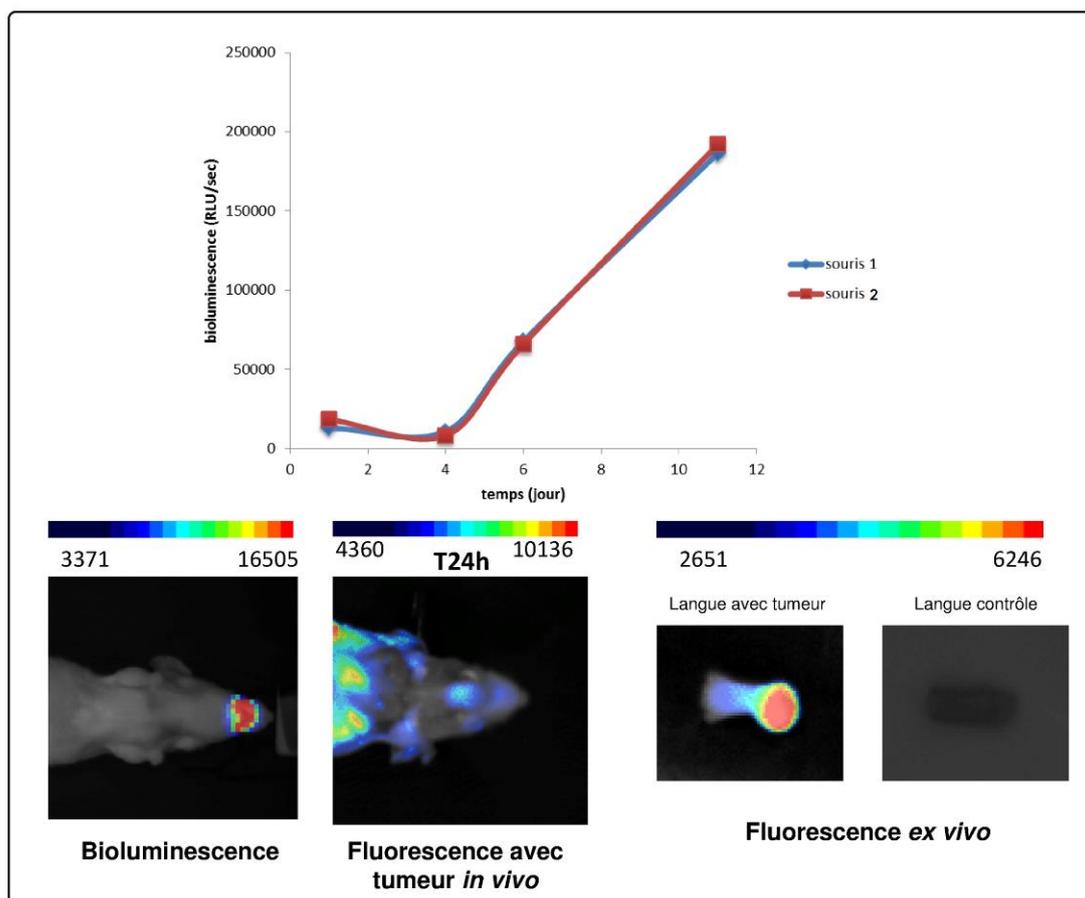


Figure 35 : Tumeurs intralinguales : bioluminescence et fluorescence après injection du RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700, dans des tumeurs développées par injection intra-linguale de cellules CAL33.

3.4.2. Développement tumoral intrajugal

En raison de la croissance tumorale rapide après injection cellulaire au niveau de la langue de la souris et au vu des résultats qui montrent un freinage de la croissance tumorale des cellules CAL33 après implantation intramusculaire au niveau du flanc de la souris, nous développons un nouveau modèle orthotopique, par implantation des fragments tumoraux au niveau de la face interne de la joue de la souris.

Les résultats de nos manipulations montrent l'absence de mortalité (n=28) parmi les souris qui sont implantées. La morbidité peropératoire et postopératoire est nulle. En postopératoire, nous notons l'apparition d'une légère tuméfaction au niveau de la face externe de la joue, qui régresse spontanément après 24 heures. Après l'implantation tumorale et au cours du développement de la tumeur, les souris ne présentent ni perte de poids, ni difficulté

alimentaire. La surveillance quotidienne des souris montre que les tumeurs deviennent détectables macroscopiquement à partir de J10-J12 (Figure 36). L'imagerie en bioluminescence confirme et suit la croissance tumorale (Figure 37). Toutes les souris implantées, développent de tumeurs orthotopiques. A partir de J30, les souris commencent à avoir de difficultés alimentaires avec perte de poids.

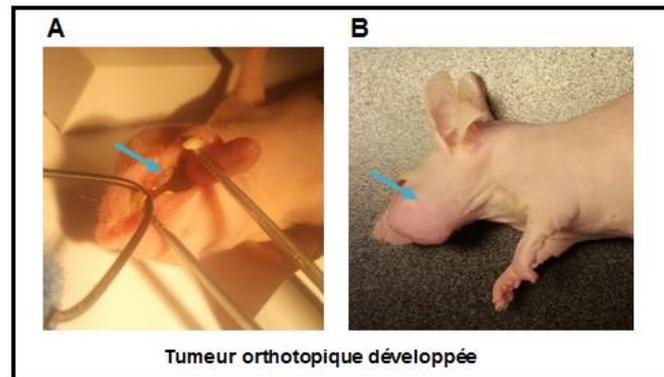


Figure 36 : Tumeur orthotopique développée. Aspect ulcéro-infiltrant au niveau de la face interne de la joue (A). Face jugale externe qui montre une tuméfaction témoignant d'une tumeur sous-jacente (B).

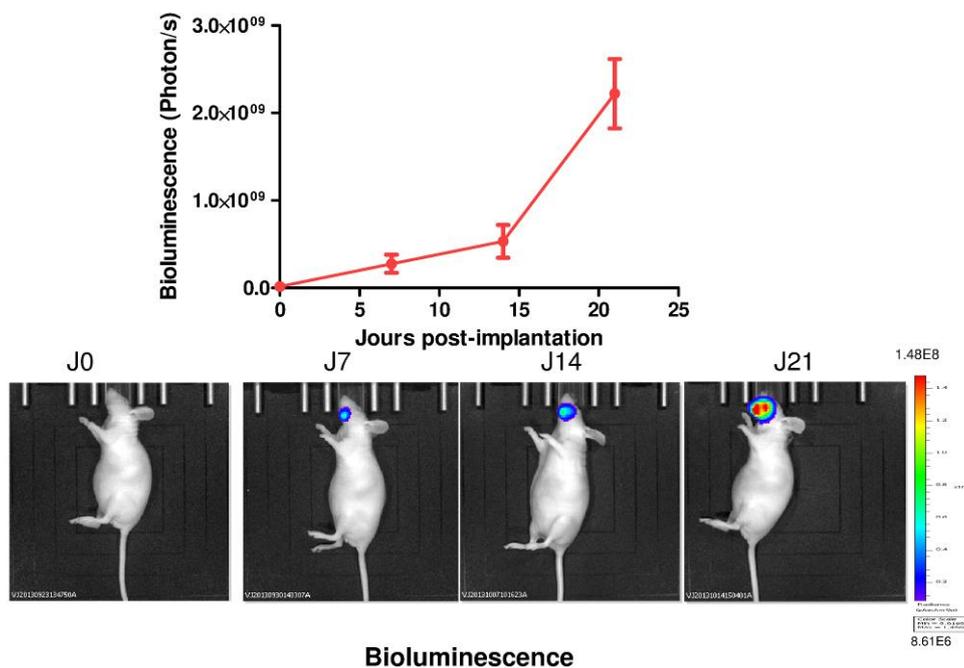


Figure 37 : Suivi en bioluminescence des tumeurs orthotopiques.

3.4.3. Caractérisation des tumeurs *in vivo*

L'analyse anatomopathologique des tumeurs orthotopiques (coupes histologiques avec coloration à l'H&E) montre des images de carcinome malpighien moyennement différencié, comparable aux tumeurs des VADS développées chez l'être humain (Figure 38).

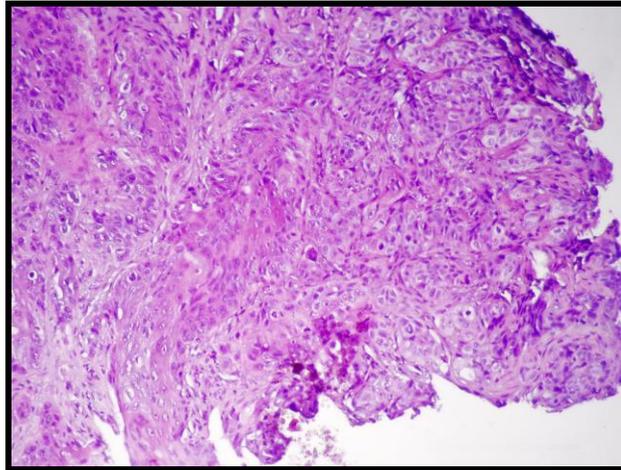


Figure 38 : Image histologique (H&E) d'une tumeur développée à partir des cellules CAL33 (grossissement 10X). La photo montre un carcinome malpighien moyennement différencié présentant une architecture désorganisée et des cellules avec des noyaux hyperchromatiques, un pléomorphisme marqué, une augmentation de l'activité mitotique et une augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique.

Nous avons voulu évaluer si les tumeurs issues des cellules CAL33 expriment *in vivo*, le même profil de récepteurs exprimés *in vitro*. La caractérisation des tumeurs CAL33 est réalisée en western blot pour l'expression de l'EGFR, l'IGF1R, la NRP1 et la NRP2. La recherche de l'expression de l'intégrine $\alpha\beta3$ est réalisée en immunohistochimie.

Nos résultats montrent que la lignée cellulaire CAL33 présente un profil d'expression de récepteurs *in vivo* qui est comparable à celui *in vitro*. Les tumeurs développées en sous-cutané, en intramusculaire et en orthotopique expriment l'EGFR, l'IGF1R et la NRP1 (Figure 39).

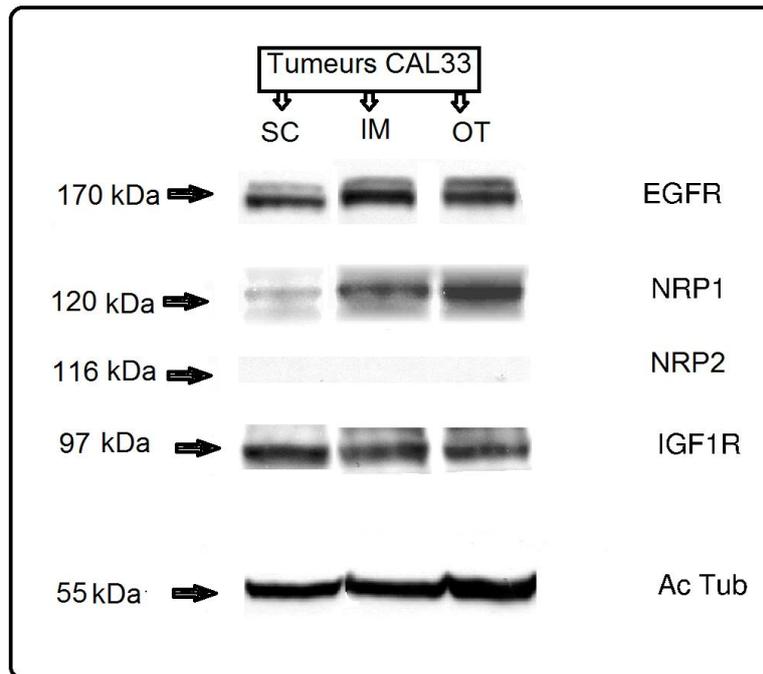


Figure 39 : Caractérisation *in vivo* de la lignée cellulaire CAL33. Des tumeurs sont développées à partir de l'implantation de ces cellules en sous-cutané (SC), en intramusculaire (IM) et en orthotopique (OT) au niveau de la cavité buccale.

Les tumeurs orthotopiques développées à partir de la lignée cellulaire CAL33, montrent un marquage positif pour l'intégrine $\alpha\beta_3$, par rapport au marquage négatif du tissu contrôle (Figure 40).

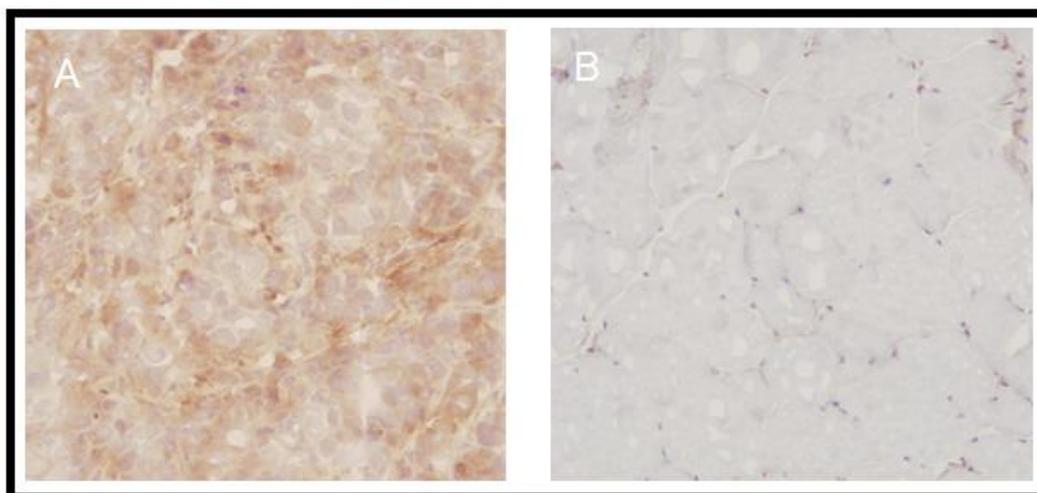


Figure 40 : Immunohistochimie des tumeurs orthotopiques. Marquage par l'anticorps anti-intégrine $\alpha\beta_3$ des tumeurs développées à partir des cellules CAL33 (A) et du tissu contrôle (B). La tumeur montre un marquage positif (couleur marron) par rapport au tissu contrôle (muscle strié) qui montre un marquage négatif (grossissement 20X).

La présence de l'intégrine $\alpha\beta_3$ est aussi confirmée par le signal fluorescent au sein de la tumeur orthotopique après l'injection du RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700 (Figure 41).

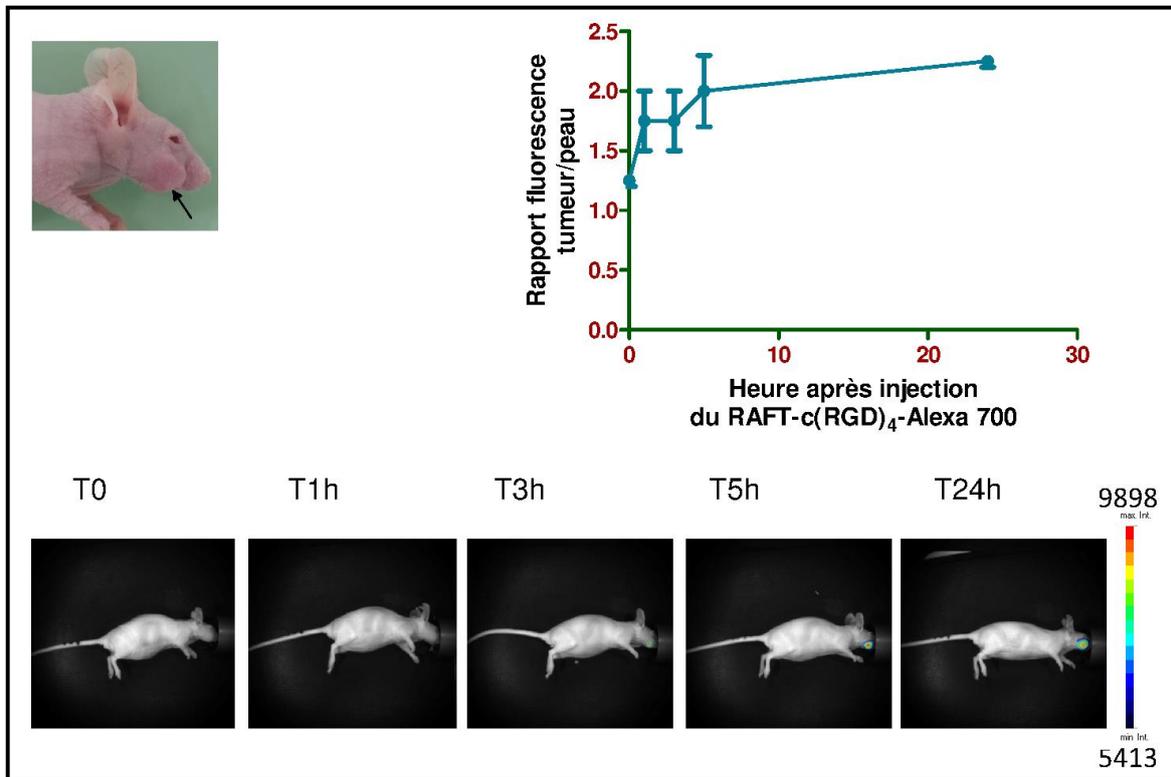


Figure 41 : Imagerie de fluorescence des tumeurs orthotopiques. Captation en fonction du temps du RAFT-c[RGD]₄-Alexa Fluor 700 par une tumeur orthotopique développée à partir de la lignée cellulaire CAL33

3.4.4. Développement de métastases ganglionnaires

Afin de vérifier la capacité de notre modèle à développer des métastases ganglionnaires, une expérience avec un suivi prolongé après la résection tumorale (cf. partie 3.5.2.), est réalisée. Des adénopathies métastatiques sont mises en évidence chez 40 % des souris survivantes entre le troisième et le cinquième mois post-implantation (entre le deuxième et quatrième mois post-explantation des tumeurs orthotopiques). Ces adénopathies sont détectées en bioluminescence (Figure 42). Quand ces adénopathies sont volumineuses, elles sont aussi détectées macroscopiquement et à la palpation. L'analyse histologique des ganglions suspects réséqués, montre des métastases de carcinome malpighien (Figure 43).

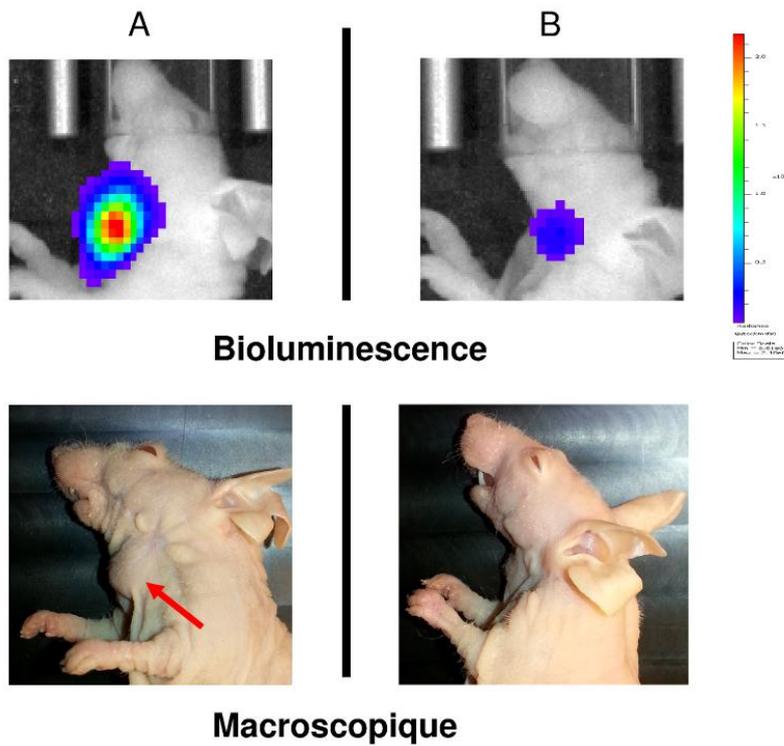


Figure 42 : Détection des adénopathies métastatiques. Les adénopathies métastatiques peuvent être détectées à la fois en bioluminescence et macroscopiquement (A). Dans d'autres cas, elles sont détectées uniquement en bioluminescence (B).

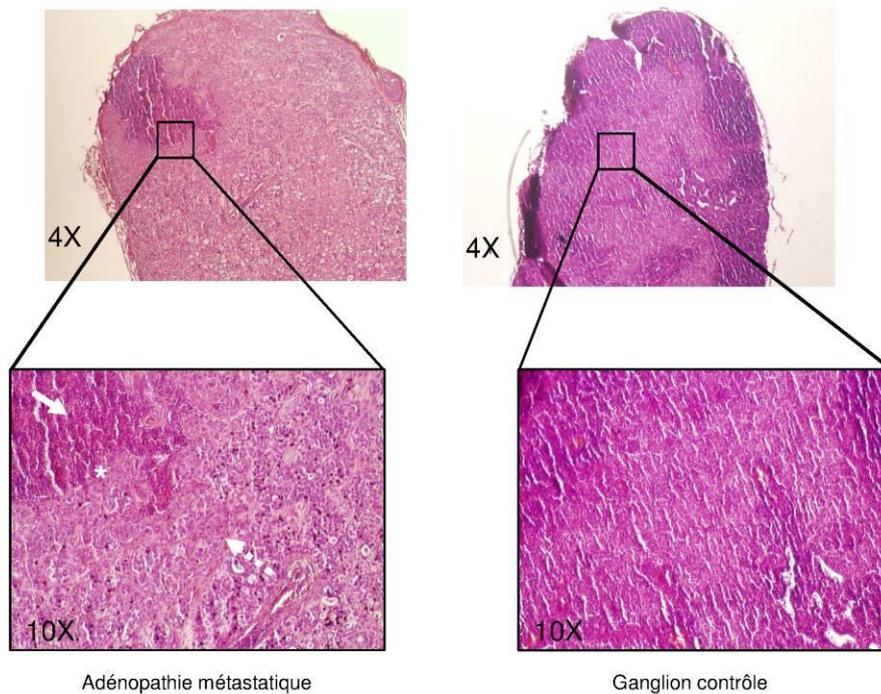


Figure 43 : Analyse histologique des ganglions (H&E). Dans l'adénopathie métastatique, le carcinome malpighien (flèche pointillée) infiltre presque la totalité du ganglion. Nous observons aussi l'interface (étoile) entre une population lymphocytaire résiduelle (flèche) et la métastase. Le ganglion contrôle montre une structure indemne de tout envahissement tumoral.

D'après les résultats de nos travaux, nous pouvons conclure que nous avons développé un nouveau modèle orthotopique représentatif des cancers des VADS humains. Ce modèle présente une survie prolongée par rapport aux modèles animaux déjà existants et permet le ciblage des tumeurs avec du RAFT-c[RGD]₄ couplé à un fluorophore. Comme décrit dans la dernière partie des résultats (partie 3.5.), ce ciblage tumoral *in vivo* sert à réaliser des résections tumorales guidées par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge sans sacrifier la souris ce qui permet un suivi postopératoire avec une survie post-résection. Ce modèle orthotopique pourra également servir aux tests *in vivo* d'autres molécules qui font preuve de ciblage tumoral efficace *in vitro*.

3.5. Apport de l'imagerie de fluorescence dans la chirurgie des cancers des VADS

Comme nous avons vu dans l'introduction, la chirurgie est le traitement de référence des cancers des VADS. Elle doit permettre l'exérèse complète de la tumeur avec des marges de sécurité suffisantes. Le bénéfice que peut apporter l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la résection tumorale des cancers des VADS et dans la détection ainsi que la résection des adénopathies métastatiques, est étudié dans notre modèle animal orthotopique. Nous déterminons aussi l'impact de la résection tumorale guidée par l'imagerie de fluorescence, sur la rechute tumorale.

3.5.1. Apport dans la résection tumorale

Dans le manuscrit suivant qui a été soumis à *Head & Neck*, nous présentons les résultats de l'apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans de la résection tumorale et ses conséquences sur la survie sans rechute dans notre nouvel modèle animal orthotopique des cancers des VADS.



Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves the recurrence-free survival rate in a novel orthotopic animal model of HNSCC

Journal:	Head & Neck
Manuscript ID:	HED-14-0198
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	22-Feb-2014
Complete List of Authors:	Atallah, Ihab; Grenoble University Hospital, ; INSERM U823, ; Joseph Fourier University, Milet, Clément; INSERM U823, ; Joseph Fourier University, Henry, Maxime; INSERM U823, ; Joseph Fourier University, Josserand, Véronique; INSERM U823, ; Joseph Fourier University, Rey, Emile; Grenoble University Hospital, ; Joseph Fourier University, Hurbin, Amandine; INSERM U823, ; Joseph Fourier University, Coll, Jean-Luc; INSERM U823, ; Joseph Fourier University, RIGHINI, Christian; Grenoble University Hospital, ; INSERM U823, ; Joseph Fourier University,
Key Words:	Head and neck squamous cell carcinoma, Orthotopic animal model, Near-infrared optical imaging-guided surgery, $\alpha\beta3$ integrin, Surgical margins

SCHOLARONE™
Manuscripts

John Wiley & Sons, Inc.

L'AngioStamp™ 800 qui cible l'intégrine $\alpha\beta3$ exprimée par les tumeurs développées à partir de la lignée cellulaire CAL33, est injecté en intraveineux à la dose de 10 nmol / injection chez une série de souris portant des tumeurs orthotopiques. Des résections tumorales sont réalisées en comparant l'exérèse macroscopique (2 groupes indépendants de souris avec n=6 dans chaque groupe) et l'exérèse guidée par l'imagerie de fluorescence (2 groupes indépendants de souris avec n=6 dans chaque groupe). Pendant deux mois après la résection, les souris sont suivies macroscopiquement. L'expression du gène de la luciférase par la lignée cellulaire CAL33, nous permet aussi d'utiliser l'imagerie optique *in vivo* en bioluminescence afin de détecter de façon précoce les rechutes tumorales même avant que celles-ci se manifestent cliniquement.

Des reliquats fluorescents détectés par l'imagerie optique de fluorescence proche infrarouge ont été identifiés chez les souris qui ont bénéficié d'une résection tumorale guidée par l'optique. L'analyse histologique de ces reliquats (n=37) a permis la mise en évidence de cellules tumorales dans 94,6 % des reliquats. La détection de ces foyers tumoraux résiduels avait un impact positif sur la survie sans rechute chez les souris qui ont bénéficié de l'exérèse tumorale guidée par l'imagerie optique de fluorescence par rapport à celles qui ont bénéficié

d'une exérèse macroscopique sans guidage optique. Le taux de survie sans rechute était de 75 % (± 5) à 2 mois post-résection tumorale, dans le premier groupe par rapport à 25 % (± 5) dans le deuxième groupe.

Nous pouvons conclure que l'imagerie optique de fluorescence offre un contraste en temps réel entre le tissu sain et le tissu tumoral en détectant des foyers tumoraux qui pourraient passer inaperçus si la résection avait été faite exclusivement d'une façon macroscopique. En conséquence, elle améliore la qualité d'exérèse tumorale des cancers des VADS avec une augmentation de 50 % de survie sans rechute dans notre modèle animal orthotopique.

Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves the recurrence-free survival rate in a novel orthotopic animal model of HNSCC

Ihab Atallah MD-Msc¹⁻³, Clément Milet^{1,2}, Maxime Henry^{1,2}, Véronique Josserand PhD^{1,2},
Emile Reyt MD^{2,3}, Jean-Luc Coll PhD^{1,2}, Amandine Hurbin PhD^{1,2} *,
Christian Adrien Righini MD-PhD¹⁻³ *

*These authors contributed equally to this work.

Affiliation of authors:

1. INSERM U823, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France
2. Joseph Fourier University, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France
3. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, BP 217, Grenoble University Hospital, France

Conflict of interest: none.

For correspondence and request for reprints:

Ihab Atallah

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery

BP 217

Grenoble University Hospital

France

Tel.: +33 (0) 6 13 74 30 13

Fax: +33 (0) 4 76 54 94 54

Mail: IAtallah@chu-grenoble.fr

Running title: HNSCC optical guided surgery in a novel orthotopic model

Keywords: Head and neck squamous cell carcinoma; orthotopic animal model, near-infrared optical imaging-guided surgery, $\alpha v\beta 3$ integrin; surgical margins

Abstract

Background

Appropriate animal models are required to test novel therapeutics for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) such as near-infrared (NIR) imaging-guided surgery.

Methods

We developed an optimized animal model of orthotopic HNSCC (in female athymic NMRI nude mice) with a prolonged survival time. Resection of the orthotopic tumors was performed 30 days after implantation with or without the aid of a miniaturized clinical grade NIR optical imaging device, after systemic administration of a fluorescent RGD-based probe that targets $\alpha_v\beta_3$ integrin.

Results

NIR optical imaging-guided surgery increased the recurrence-free survival rate by 50% through the detection of fluorescent cancer residues as small as 185 μm ; these fragments could remain unidentified if resection was performed exclusively under unaided visual guidance.

Conclusion

NIR optical imaging-guided surgery showed an improved HNSCC tumor resection quality in our optimized orthotopic animal model.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide, with 600 000 new cases diagnosed each year. Surgical resection is considered the cornerstone of HNSCC treatment and could be associated with radiochemotherapy in some cases. Although recent advances in the treatment of HNSCC have improved the survival rate, there is a considerable risk of mortality; with more than 300 000 deaths from this disease annually (1-3).

The complete excision of HNSCC during surgical resection with negative surgical margins improves prognosis and decreases the recurrence rate (4). Intraoperative margin assessment of HNSCC is performed by visual inspection and palpation, followed by the selective assessment of any suspicious areas using rapid histological evaluation, which can be time consuming and sometimes inaccurate. Frequent discrepancies between the selective intraoperative assessment and the more comprehensive postoperative pathology margin assessment are not unusual, necessitating additional surgeries to achieve negative margins or postoperative radiochemotherapy, which can have multiple side effects.

One novel tool to improve tumor resection quality is near-infrared (NIR) optical imaging-guided surgery, which creates a specific contrast between normal and cancer tissue, thus helping to achieve tumor free surgical margins. Multiple animal studies and clinical trials have been performed to determine the effectiveness of NIR optical guided surgery at optimizing the quality of brain, breast, skin and liver tumors resection, and these studies have reported many encouraging results (5-8). One of the most important targets of NIR optical imaging-guided surgery is $\alpha_v\beta_3$ integrin, which plays an important role in cancer-associated angiogenesis, cell proliferation, migration and metastasis. It is widely expressed on neo-endothelial cells and some cancer cells, such as HNSCC (9-13). RAFT-c(-RGDfK-)₄ (regioselectively addressable functionalized template-arginine-glycine-aspartic acid) is a peptide-like scaffold that contains four cyclo(-RGDfK-) (cRGD) motifs, and this molecule has been shown to target $\alpha_v\beta_3$ integrin *in vitro* and *in vivo*. This peptide is also particularly efficient at targeted delivery of drugs and imaging contrast agents.(14-17)

The development and evaluation of novel anticancer agents or new surgical techniques for HNSCC treatment require the use of an appropriate animal model that must be representative and reproducible and can accurately recapitulate the disease process.

Here, we developed an experimental xenograft orthotopic animal model of HNSCC that can be used to test novel molecular therapeutics or surgical tools. In this model, orthotopic tumor implantation and resection was performed in a novel way. The aim of the development of our model is to assess the role of NIR optical imaging-guided surgery in the surgical resection of HNSCC tumors, by using a miniaturized NIR optical device designed for oral oncologic procedures (18) and fluorescent RAFT-c(-RGDfK-)₄ injection. Our orthotopic model allowed us to test the benefits of NIR optical imaging-guided tumor resection compared to macroscopic tumor resection in the detection of cancer residues and its effect on the recurrence-free survival rate of mice.

Materials and methods

Cell line

This study was conducted using the human head and neck squamous cell carcinoma cell line CAL33, which was stably transfected with the pLenti-luciferase vector. This cell line was obtained from the Antoine-Lacassagne Center, Nice, France (19). The cell line was maintained as a monolayer culture in DMEM supplemented with 10% FBS (v/v) in a humidified incubator (Sanyo, Japan) at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. CAL33 cells were used *in vivo* for establishing subcutaneous tumors from which tumor fragments were obtained for orthotopic tumor implantation. In addition to luciferase expression by these cells which allows bioluminescence imaging, they represent an adequate cellular model for HNSCC as they show positive expression of EGFR, IGF1R and NRP1 like in some types of head and neck cancers (20-24).

Molecule

AngioStamp™ 800 (Fluoptics, Grenoble, France) was injected into the tail vein of the mice. This imaging agent is a tetravalent RGD-based peptide (RAFT-c(-RGDfK-)₄) that targets $\alpha_v\beta_3$ integrin. It is labeled with a NIR organic fluorophore with an absorbance and an emission

maxima of 781 nm and 794 nm respectively to allow *in vivo* NIR fluorescence imaging using the NIR fluorescence imaging system described below (15, 17, 25-27).

Flow cytometry

The expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin and the binding of RAFT-c(-RGDfK-)₄ to the CAL33 cell line were analyzed by flow cytometry. Briefly, CAL33 cells were harvested, washed with PBS containing 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂ (PBS Ca²⁺/Mg²⁺) and fixed in 2% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. Cell fixation was done exclusively for the assessment of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression. After washing twice with PBS Ca²⁺/Mg²⁺, the cells were incubated with an anti-human CD51/CD61 mouse phycoerythrin-conjugated antibody (clone 23C6, Pharmingen, BD Bioscience) or with the RAFT-c(-RGDfK-)₄ for 1 hour at 4 °C for the former and at 37 °C for the later, then washed again and resuspended in PBS Ca²⁺/Mg²⁺ at 4 °C. Analysis was performed using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, US) and the CFlow Plus software. The results are reported as the mean fluorescence intensity. The RGD-based peptide RAFT-c(-RGDfK-)₄ used in the flow cytometry analysis was labeled by Cy5 to make it compatible with the laser wavelength and filters of BD Accuri C6 flow cytometer. Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)₄ was synthesized according to previously reported procedures (28).

Animals

All animal experiments were performed in agreement with the EEC guidelines and the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication 14, nos. 86–23, revised 1985); the protocol was approved by the Animal Care and Use Committee (Comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble). Female athymic NMRI nude mice (Janvier, Le Genest-Isle, France) were maintained under specific pathogen-free conditions. The animals were housed and optical imaging was performed at the small animal optical imaging platform OPTIMAL of INSERM U823 Institute.

Subcutaneous tumor implantation and excision

Human CAL33 cells were harvested, and 10⁶ cells in PBS were injected subcutaneously into the flank of the mice for heterotropic establishment of tumors. Tumor growth was quantified by measuring the tumors in two dimensions with a Vernier calliper twice a week. The tumor volume was calculated using the following equation: $a \times b^2 \times 0.4$, where a and b are the largest and smallest diameters, respectively. When the tumor volumes reached 750 mm³, after

approximately 14 to 16 days, the tumors were excised by direct approach under general anesthesia with isoflurane/oxygen; 3.5% anesthesia was used for induction, and 1.5% was used for the maintenance of anesthesia. The mice were then euthanized by cervical dislocation. Fragments from these tumors were subsequently used for orthotopic tumor implantation as described below.

Orthotopic tumor implantation

Under general anesthesia, obtained by intraperitoneal injection of Domitor (Pfizer, Orsay, France) and Imalgene (Merial, Lyon, France), a small incision was performed on the inner aspect of the mouse's cheek. A tumor fragment with a diameter of 0.5 mm, obtained from the subcutaneous tumours, was implanted through the incision, and the incision was closed using PDS™ II (polydioxanone) 5-0 monofilament synthetic absorbable suture. The growth of the orthotopic tumors was examined each week using non-invasive bioluminescence imaging, and the tumors reached the maximal size compatible with the mouse's well-being 30 days after implantation.

Bioluminescence imaging

The mice received an intraperitoneal injection of luciferin (150 mg/kg) 5 min before the bioluminescence imaging, which was carried out using an IVIS Kinetic device (Caliper Life Sciences). This enabled the quantification and tracing of the bioluminescent signal during orthotopic tumor development and the early detection of recurrence after tumor resection. Semiquantitative data were obtained from the bioluminescence images within demarcated regions of interest in the area to be quantified. The results were expressed as the number of photons per second.

NIR fluorescence imaging

AngioStamp™ 800 was injected into the tail vein of the mice at a dose of 10 nmol per mouse 16 to 24 hours before fluorescence imaging to obtain the maximal fluorescence signal intensity at the tumor site. Moreover, the AngioStamp™ 800 biodistribution as well as the orthotopic tumors fluorescence kinetics was performed. NIR fluorescence imaging was performed using the FluoStick™ Clinical System (FluoOptics, Grenoble, France). This novel commercial fluorescence imaging system has been miniaturized and optimized for oral oncologic procedures in humans. It excites fluorescence at 750 nm and detects the emitted light at wavelengths greater than 800 nm.

Orthotopic tumor resection

Orthotopic tumor resection was performed under visual guidance or through the aid of NIR optical imaging. Under general anesthesia (intraperitoneal injection of Domitor and Imalgene), we performed a direct approach through an incision on the outer aspect of the cheek to obtain a large surgical field that permitted tumor dissection and resection. Initially, the tumor was exposed, and the fluorescence of the head and neck region was obtained. Intentionally, 90% of the tumor was removed under visual guidance, without NIR optical imaging, and a rim of tissue (10%) was left behind to simulate residual disease and to investigate the ability of the fluorescence imaging to detect smaller disease foci. The rim of the residual tumor tissue was then removed under visual guidance to achieve a complete macroscopic tumor resection. After excision, fluorescence imaging was repeated. In this step, any residual fluorescent tissue unintentionally left behind was removed with the help of the fluorescence imaging guidance system. Non-fluorescent control tissue fragments were also taken from the tumor bed. One dose of 0.1 mg/kg buprenorphine (RB Pharmaceuticals, France) was injected subcutaneously to reduce postoperative pain after orthotopic tumor resection. The fluorescence of the tumor, residual fluorescent tissue and control tissue were measured *ex vivo*.

Analysis of NIR fluorescence data

The fluorescent data collected using the FluoStick™ Clinical System were quantified with the WASABI Imaging software V.1.5.0.5 (Hamamatsu Photonics GmbH, Germany) and Microsoft Excel. The fluorescence intensity value of the different tissues was defined as the mean fluorescence intensity of the region of interest minus the mean fluorescence intensity of the background divided by the exposure time in milliseconds, resulting in the relative light unit per pixel per millisecond (RLU/pixel/ms).

Mouse follow-up after tumor resection

Four mice were used experimentally to develop the orthotopic model. The rest of mice (n=24) were examined and weighed regularly after orthotopic tumor excision to detect tumor recurrence through repeated clinical examination and bioluminescence imaging in order to compare the recurrence-free survival rate of the macroscopic tumor resection and the NIR fluorescence imaging-guided tumor resection. Any mouse that showed signs of tumor recurrence was euthanized by cervical dislocation. Mice without relapse were followed up for

two months after tumor excision and were then euthanized and dissected post-mortem to search for infra-clinical recurrence.

Histopathological and immunohistochemical analyses

Surgical specimens were separated into two samples for histopathological and immunohistological analyses of the $\alpha_v\beta_3$ integrin expression level. A portion of the samples was fixed in formaldehyde, embedded in paraffin and cut into 7 μm slices for hematoxylin and eosin (H.E.) staining of the orthotopic tumors, residual fluorescent tissues and non-fluorescent control tissues. Histological examination was performed under an Olympus BX41 Laboratory Microscope. Any tumor foci identified in the residual fluorescent tissues were measured using the Image J 1.46r software. Other samples were frozen in isopentane and underwent shock freezing in liquid nitrogen. These samples were cut into 8 μm slices (microcryotome) and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until fixation and staining. After the frozen slices were thawed at room temperature, they were fixed in acetone. Immunostaining with a mouse anti-human integrin $\alpha_v\beta_3$ monoclonal antibody (clone MAB1976, 1:500; Millipore) was performed on the acetone-fixed cryosections of the orthotopic tumours using the M.O.M. immunodetection (peroxidase) Kit (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA). Staining was performed using liquid DAB and a substrate chromogen system (Dako, North America, Inc., CA). The nuclei were counterstained with hematoxylin.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the coefficient of determination R^2 in the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc.). Statistical significance was assigned for values of $p < 0.05$.

Results

Development of an optimized head and neck cancer orthotopic animal model

Twenty eight mice were implanted with a tumor fragment obtained from subcutaneous CAL33 tumors (fig. 1a and 1b). All mice survived after the orthotopic tumor implantation, and there were no complications during the surgical procedure. Minimal cheek swelling and inflammation was observed after implantation, and this regressed spontaneously after one day. The mice did not exhibit weight loss, and there was no change in feeding during tumor development (fig. 1f). Orthotopic tumors could be observed macroscopically from day 10 to 12 following implantation (fig. 1c). The mice underwent orthotopic tumor resection on the day 30 day after implantation (fig. 1d). There were no complications during tumor excision except that special care had to be taken to ensure hemostasis, by applying pressure with a cotton swab to stop the bleeding and to prevent blood inhalation by the mice during surgery. One mouse developed a cheek hematoma that spontaneously resolved postoperatively. Minimal transient weight loss of about two grams was observed in some mice following tumor resection owing to difficulty in feeding due to the presence of cheek inflammation; this condition spontaneously resolved after 3 days (fig. 1f), and weight gain returned to its normal rate within 2 days of explantation. All mice survived after tumor resection, and complete wound healing was finished after 5-7 days (fig. 1e). Pathological analysis of resected orthotopic tumors showed the characteristics of moderately differentiated HNSCC (fig. 2a).

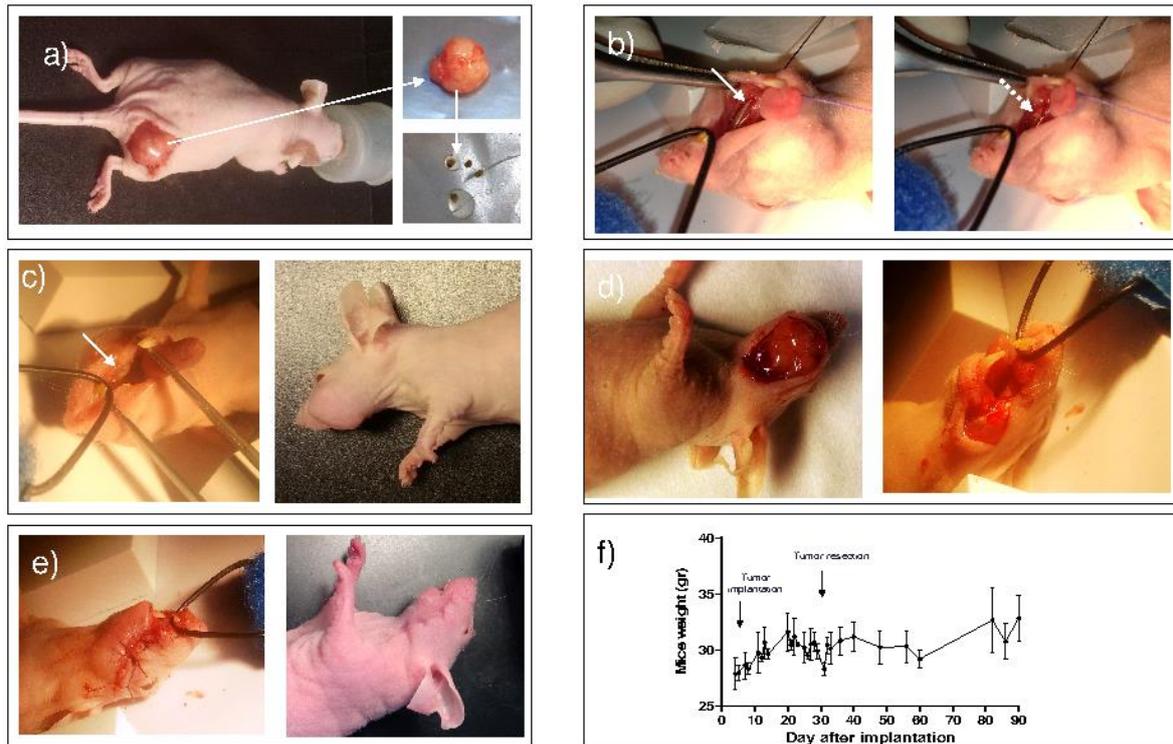


Figure 1: Orthotopic tumor implantation and resection. a) Small tumor fragments were obtained from subcutaneous tumors. b) A small incision was made on the inner aspect of the mouse cheek (arrow), and a tumour fragment was implanted (dashed arrow). c) Internal (arrow) and external aspect of a developed orthotopic tumor. d) Orthotopic tumor resection through an external incision on the cheek. e) Wound closure by absorbable sutures. Complete wound healing was observed after 5-7 days. f) Weight curve of the mice showed normal weight gain after orthotopic tumor implantation. Minimal transient weight loss was observed for approximately 2-3 days following tumor resection.

Expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin in the CAL33 cell line

Flow cytometry analysis showed a positive *in vitro* expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin by 98.5 % of the CAL33 cells (fig. 2b). RAFT-c(-RGDfK-)₄ showed a positive binding to 96.2 % of these cells (fig. 2c). *In vivo* expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin in the human CAL33 cell line was also confirmed by immunohistochemical labelling of the tumor sections; positive staining in tumor samples (fig. 2d) and negative staining in control tissue (fig. 2e).

These results were essential to target the orthotopic tumors developed from this cell line using the RGD-based probe AngioStamp™ 800 NIR Molecular Imaging Agent, which binds specifically to $\alpha_v\beta_3$ integrin.

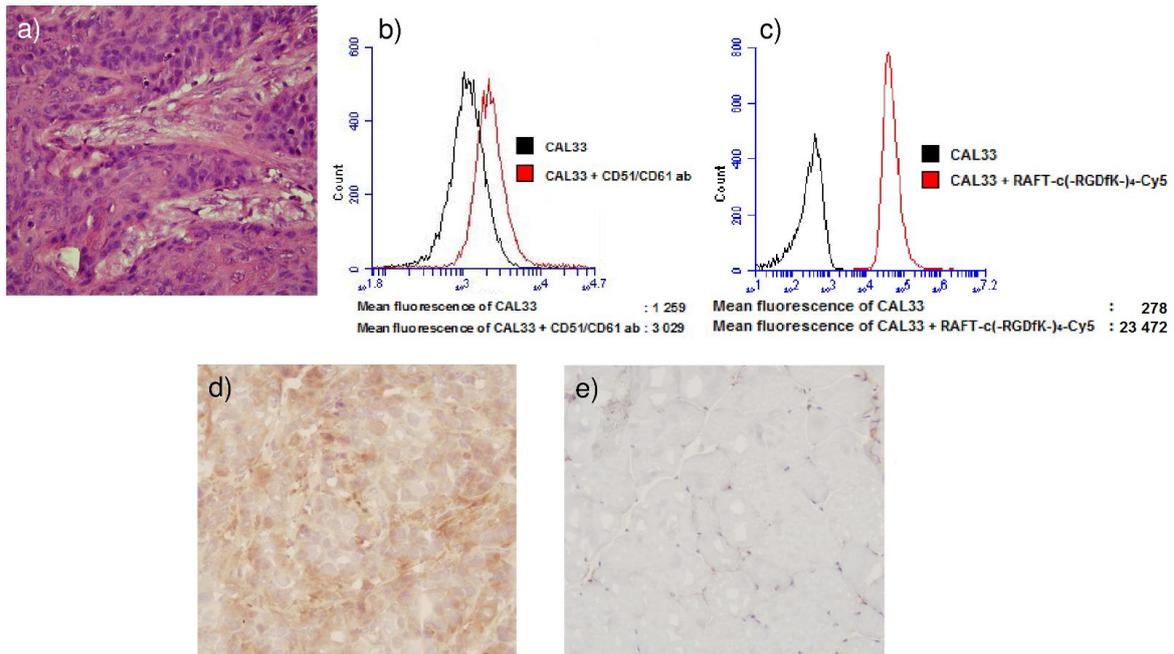


Figure 2: Microscopic analysis of an orthotopic tumor, *in vitro* and *in vivo* expression of $\alpha v\beta 3$ integrin, and *in vitro* binding of the probe that targets $\alpha v\beta 3$ integrin on CAL33 cell line. a) Hematoxylin-eosin (H.E.) staining of orthotopic tumors showed a moderately differentiated squamous cell carcinoma with disorganized architecture, hyperchromatic nuclei, pleomorphism, increased mitotic activity and a greatly altered nuclear-cytoplasmic ratio. Original magnification: 20x objective lenses. b) Flow cytometry analysis of $\alpha v\beta 3$ integrin expression was performed using the CD51/CD61 R-Phycoerythrin clone 23C6 mouse anti-human antibody (Pharmingen, BD Bioscience). The results showed that the CAL33 cell line shows positive *in vitro* expression of $\alpha v\beta 3$ integrin. d) Flow cytometry analysis of binding of the RGD-based peptide RAFT-c(-RGDfK-)-4 which targets $\alpha v\beta 3$ integrin. The results showed a positive binding of the RAFT-c(-RGDfK-)-4 to CAL33 cells. d) Immunohistochemical staining with an anti-human $\alpha v\beta 3$ integrin monoclonal antibody of orthotopic tumors developed from the CAL33 cell line. The tumor cells show positive *in vivo* expression of $\alpha v\beta 3$ integrin (brown/yellow coloration). Original magnification: 20x objective lenses. e) Immunohistochemical staining with an anti-human $\alpha v\beta 3$ integrin monoclonal antibody of the control tissue showed no expression of $\alpha v\beta 3$ integrin. Original magnification: 20x objective lenses.

Fluorescence imaging is a valuable tool for head and neck tumor resection

The biodistribution of AngioStamp™ 800 showed high concentration in the kidney and in the orthotopic tumor 24 hours after intravenous injection (fig 3a). Importantly, elevated tumor to background fluorescence ratios were obtained 16 to 24 hours after AngioStamp™ 800 injection (fig. 3b).

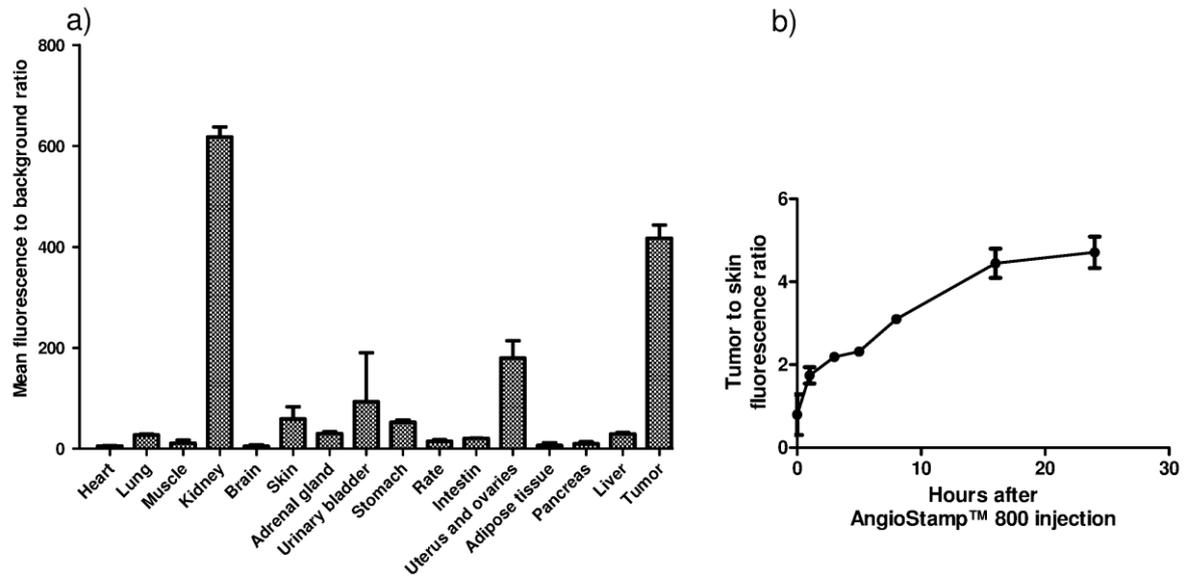


Figure 3: AngioStamp™ 800 biodistribution and tumor fluorescence kinetic. a) The highest fluorescence intensity is found in the kidney and in the tumor, 24 hours after the injection of AngioStamp™ 800. b) Tumor fluorescence intensity increases gradually to reach a high level between 16 and 24 hours after intravenous injection of AngioStamp™ 800.

Two independent group of mice (n=6 in each group) underwent tumor resection with the aid of fluorescence imaging as described in the materials and methods section. All orthotopic tumors were fluorescent (fig. 4a) with a very elevated contrast of 65 (\pm 22) due to the high fluorescence ratio of the tumor to the surrounding muscle. After macroscopic excision of 90% of the tumor, the FluoStick™ Clinical System device (fig. 4f) detected the residual 10% of the tumor (fig. 4b). This confirmed that fluorescence imaging could efficiently detect small disease foci. After removal of the 10% macroscopic tumor residue under visual guidance, residual fluorescent tissue 0.2-1.8 mm in diameter was unintentionally left behind in all of the mice (fig. 4c). These tissue foci (n=37) were removed under fluorescence imaging guidance. No fluorescent signal could be detected in the tumor bed after the residual fluorescent tissue excision (fig. 4d), except for the autofluorescence signal of the mandible and of the skin that was observed in a few mice. All resected tissue foci were significantly fluorescent *ex vivo* compared to the control tissue (fig. 4e).

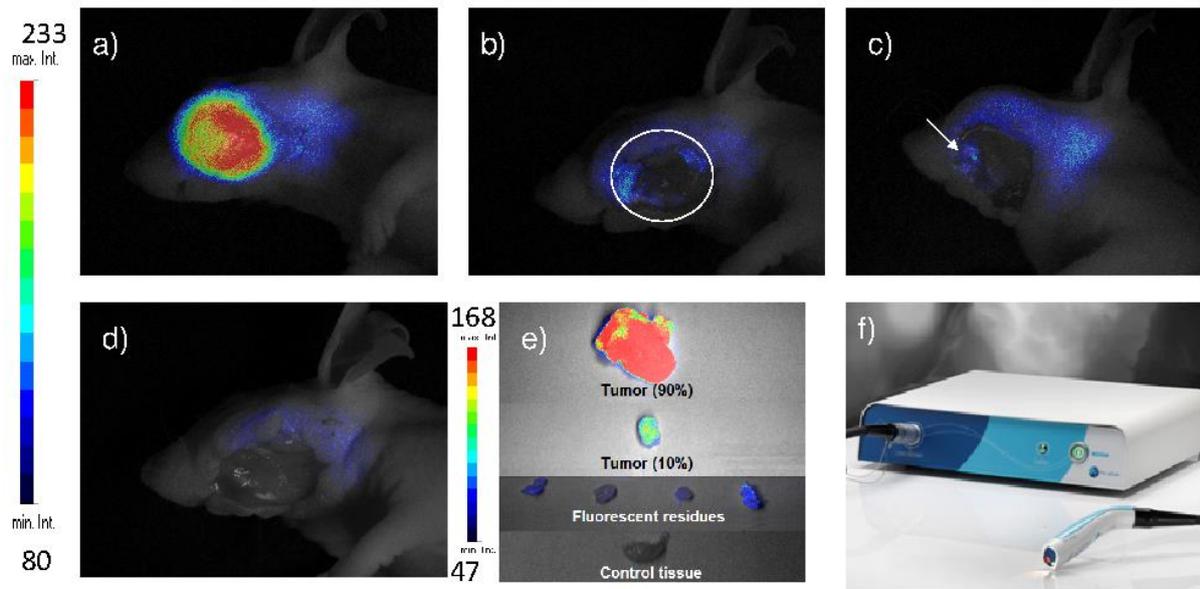


Figure 4: Orthotopic tumor resection with the aid of fluorescence imaging. a) Fluorescence of the main tumor. b) NIR optical imaging was able to detect the fluorescence of a cancer tissue rim (10%) left behind (circle) after the macroscopic removal of 90% of the tumor. c) Fluorescent residues (arrow) unintentionally left behind after total macroscopic resection of the tumor. d) No fluorescence was observed in the surgical bed after the excision of all fluorescent tissues. e) *Ex vivo* fluorescence of the tumor and the fluorescent residues compared to the control tissue. f) The FluoStick™ Clinical System device was used for NIR optical imaging.

Histopathological analysis (fig. 5) showed that tumor foci were present in 94.6 % of the residual fluorescent tissues. For each mouse, at least one fluorescent residue revealed a tumor focus. Histological examination showed that fluorescence imaging could detect tumor foci as small as 185 μm (fig. 5a). There was a positive correlation between the diameter of the tumor focus and the fluorescence intensity of the residual tissue containing the focus (fig. 5b). Moreover, the fluorescent probe provided good contrast between residual cancer tissue and normal tissue with a residual cancer tissue to background tissue fluorescence ratio of 10 (± 6).

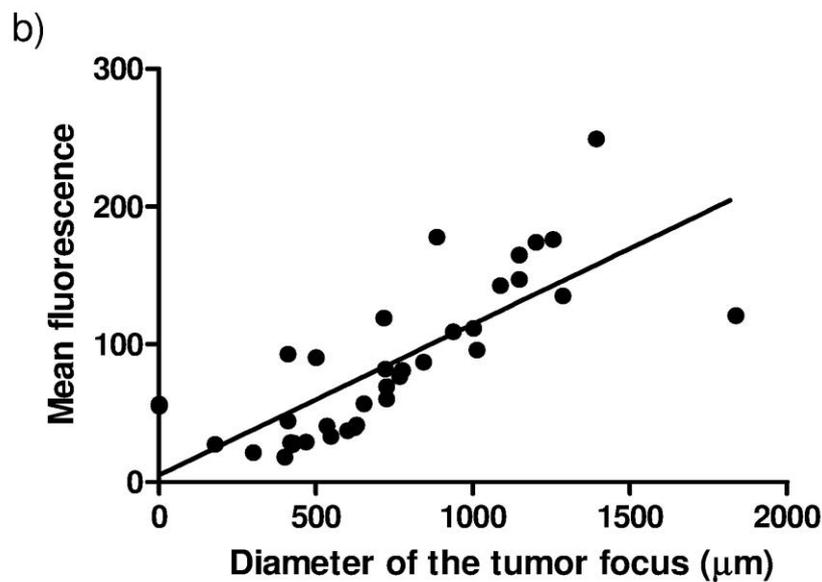
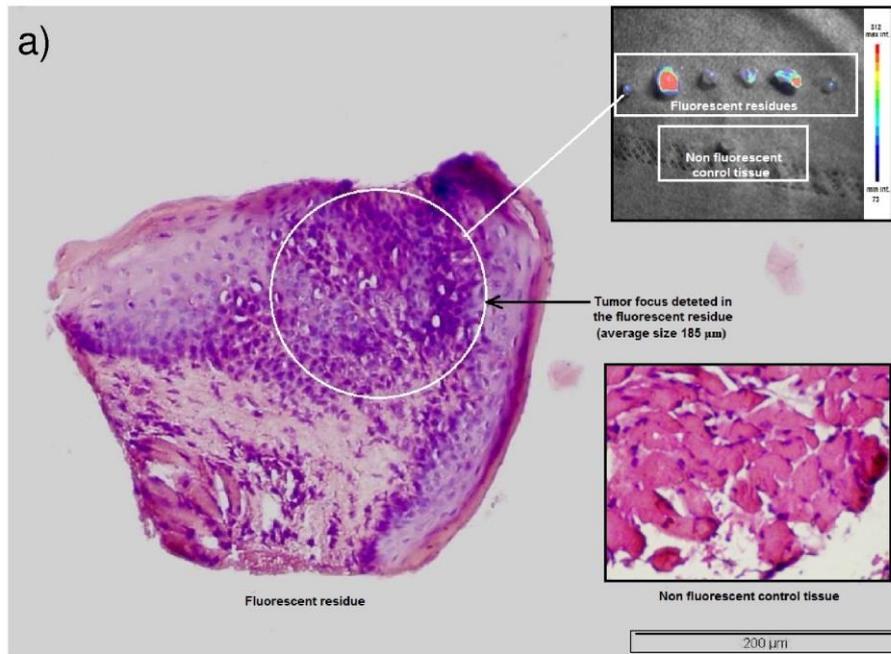


Figure 5: Microscopic analysis of fluorescent residues. a) Hematoxylin-eosin (H.E.) staining of a fluorescent residue revealed a focus of squamous cell carcinoma. The control tissue shows normal skeletal muscle. Original magnification: 10x objective lenses. b) Positive correlation between the size of the tumor foci detected microscopically in the fluorescent residues and the intensity of the fluorescent signal ($R^2 = 0.5956$ and P value < 0.0001).

Effect of NIR optical imaging-guided surgery on recurrence-free survival rate

The recurrence-free survival rate of mice after NIR optical imaging-guided surgery was compared to that after visually guided macroscopic tumor resection. Bioluminescence was performed regularly after tumor resection (fig. 6a). In two independent groups where the resection of orthotopic tumors was performed under visual guidance (n=6 in each group), the

macroscopic recurrence of the disease was mostly observed 3-4 weeks after tumor excision in 75 % (± 5) of the mice, in contrast to 25 % (± 5) in the two groups where NIR optical imaging was used during tumor resection (n=6 in each group) (fig. 6b-d). Relapse was confirmed by bioluminescence, which showed an early gradual increase of the bioluminescent signal. No tumor was found on the post-mortem dissection of mice that showed no signs of macroscopic recurrence. Therefore, we found that NIR optical imaging-guided surgery increased the recurrence-free survival rate by 50% two months after tumor resection (fig. 6e).

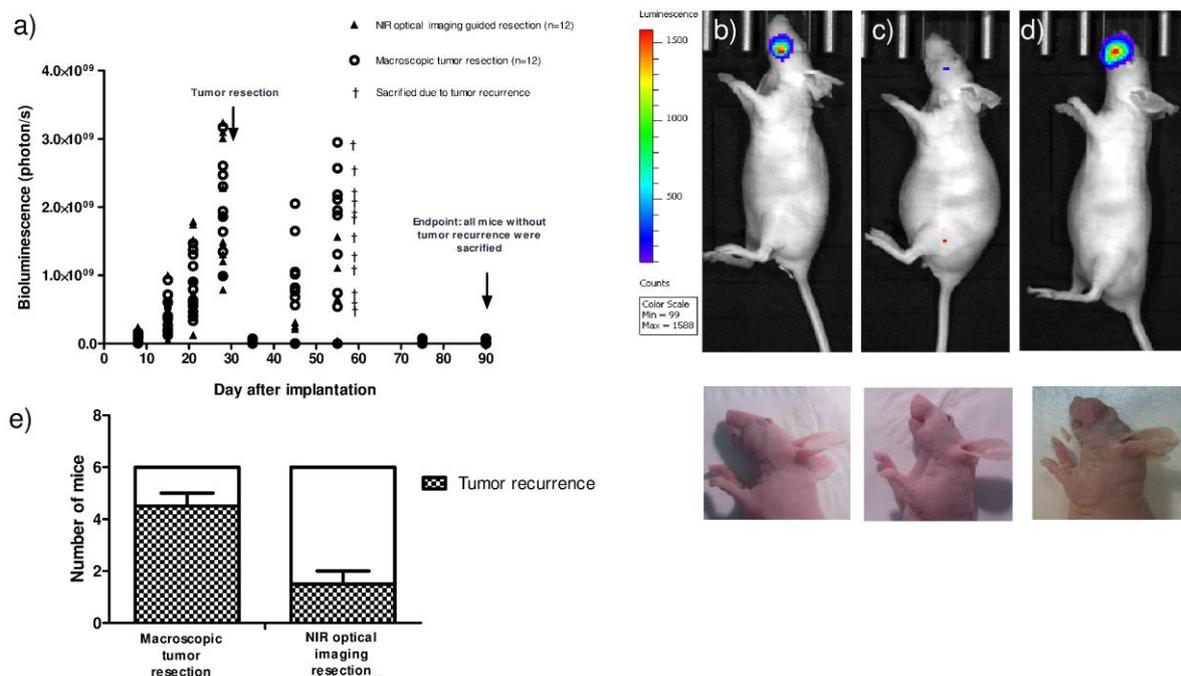


Figure 6: Bioluminescence follow-up of the orthotopic tumors. a) The graph shows that the bioluminescent signal increased gradually till tumor resection. A high rate of tumor recurrence was observed in the group of mice that underwent macroscopic resection compared to the NIR optical imaging-guided resection group. b) Bioluminescence imaging was performed one week after orthotopic tumor implantation, and 100% of the mice presented a unique local bioluminescent signal before the appearance of a macroscopic visible tumor. c) No bioluminescent signal recurrence was observed after complete excision of the orthotopic tumor. d) Macroscopic tumor recurrence confirmed by bioluminescence. e) The graph shows the high tumor recurrence rate in the macroscopic resection groups (two independent groups with 6 mice in each group) compared to the NIR optical imaging-guided surgery groups (two independent groups with 6 mice in each group).

Discussion

The advantage of orthotopic HNSCC animal models over subcutaneous models is that they provide specific interactions between the cancer cells and their native environment. These interactions can influence the molecular, pathological, and clinical features of the orthotopic tumors, rendering them representative of human HNSCC tumours (29-31).

Mice are one of the preferred animal species in biomedical research because they are small in size, easy to handle and relatively inexpensive. Several methods have been used to develop orthotopic HNSCC mouse models. One of these methods is based on the repetitive local application of carcinogenic agents, such as 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, benzo[a]pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and nitrosornicotine, in the oral cavity. The major disadvantage of this method is that it takes between 12 and 34 weeks to develop tumours with a poor penetrance. Additionally, these tumors do not mimic the invasive pathology of HNSCC in humans (29-32). In a transgenic mouse model of HNSCC, the keratin 5 (K5) or keratin 14 (K14) promoters are used to overexpress the oncogene *K-ras*^{G12D} in the oral epithelium to induce squamous cell carcinoma (33-34). Although these transgenic models appear to reproduce some clinical characteristics of HNSCC, one major point that should be taken into consideration is that no single gene is predominantly associated with the HNSCC carcinogenic process in humans. In addition, the frequency of *K-ras* mutations in HNSCC is relatively low (31). Finally, one of the most important methods of inducing head and neck tumors in animals is through the orthotopic xenograft of HNSCC by injecting the cancer cells into the tongue or mouth floor of the mouse. The major disadvantage of this model is that animals have to be euthanized on day 10 to 12 after tumor cell injection because of rapid tumor growth that prevents correct feeding by the animals, resulting in unethical suffering (21, 35-36). This short period with *in situ* tumors does not allow for the adequate long-term efficacy evaluation of new treatments. Additionally, due to the disruption of vital structures in the oral cavity during tumor resection, the mice have to be euthanized at the end of the surgery, which prevents the evaluation of the post-operative benefits and effects of novel surgical and therapeutic tools.

We developed a novel method of orthotopic HNSCC tumor implantation and resection in female athymic NMRI nude mice. Our model allowed us to obtain a period of 30 days with *in situ* tumors. Our method used tumor fragment implantation instead of direct cellular injection and was developed in other types of small animal xenograft tumor models for gastric, hepatic and oesophageal cancers (37-39). This method prevented the cancer cell dissemination created by the hydrostatic pressure of the syringe during injection, which results in the rapid development of large tumors that reduce mice survival to 10-12 days (29-31). All mice that underwent tumor fragment implantation developed an orthotopic tumor. A major advantage of our model is that orthotopic tumor resection can be performed 30 days after implantation.

Furthermore, the postoperative survival rate reached 100% because the site of orthotopic tumor development and our surgical resection technique preserved the vital structures of the mouse oral cavity. This allowed us to follow up with the mice when investigating novel surgical or medical treatments to establish efficacy, toxicity, and survival studies.

The prognosis of HNSCC depends on many factors, such as the TNM staging, the localization of the tumor, the level of differentiation and the quality of the surgical margins. In HNSCC, as in other solid tumors, complete tumor resection improves the patient's outcome. Positive surgical margins cannot be compensated by adjuvant radiotherapy/chemotherapy, and they increase the rate of tumor recurrence and reduce the overall survival rate (4). In real life surgical practice, to ensure tumor removal, the surgeon excises a safe margin of 0.5 to 1.0 cm around the tumor. This margin is difficult to determine macroscopically at the deepest part of the tumor, which is in contact with the surgical bed, because resection at this site depends mainly on palpation and not on visual guidance. The pathologist then uses frozen sections to confirm that the margins of resection do not contain cancerous tissue. Unfortunately, frozen sections removed at the level of the surgical bed lead to important sampling errors because of the increased difficulty in margin relocation. Consequently, small residual cancer foci can be left behind, resulting in an increased risk of tumor recurrence (40-41).

The introduction of real-time imaging technologies, such as NIR fluorescence, into the operating room has the potential of bridging the gap between radiology and surgery, resulting in intraoperative image-guided surgery that improves the quality of solid tumor resection. This type of imaging requires specific targeted contrast agents that bind to the cancer cells and generate a significant signal to noise ratio between the tumor and the surrounding normal tissue. Various cell surface molecules, including epidermal growth factor receptor, Her-2/Neu, $\alpha_v\beta_3$ integrin, urokinase plasminogen activator receptor, mucin 1, carcinoembryonic antigen, and the folate receptor, have been investigated for targeted imaging (8). Multiple studies have been performed in animals and humans to evaluate the role of NIR optical imaging-guided surgery in solid tumor resection. In preclinical animal models, NIR optical imaging-guided surgery was used to optimize the resection quality of breast, ovarian, brain and colon tumors or metastases. In these models, $\alpha_v\beta_3$ integrin, which is overexpressed in tumor cells and in neo-endothelial cells, was the most common receptor targeted in NIR optical imaging-guided surgery. AngioStamp™ 800, the commercial version of the RAFT-c(-RGDfK-)₄ peptide coupled with a fluorophore, was commonly used to target $\alpha_v\beta_3$ integrin.

NIR optical imaging-guided surgery in these models improved the tumor resection quality and the detection and excision of metastases (5, 42-44). Other studies have also been performed in humans to assess the benefit of NIR optical imaging-guided surgery in head and neck cancer resection. In most of these studies, ICG (indocynaine green) was used as a fluorescent tracer. Although ICG is considered a blood pool agent that is not inherently specific for any tumor, it is the only NIR fluorescent agent that has been used in clinical applications because it is EMA (European Medicines Agency) and FDA (US Food and Drug Administration) approved. Yoakoyama *et al.* used ICG to delineate head and neck tumors and lymph node metastases in humans 30 to 60 minutes after intravenous administration (45). All tumors and lymphatic metastases displayed bright fluorescence emissions that clearly contrasted with the normal structures. Fluorescence imaging was very useful to detect metastatic lymph nodes that were not palpable, and not visible macroscopically, in the retropharyngeal space. Despite of these encouraging results, precautions have to be taken in tumor margin demarcation using ICG because accumulation of ICG may not be limited to cancerous tissues. In fact, ICG would also be expected to accumulate in inflammatory tissues and areas of surgical trauma that could partly hamper specificity in the initial phase of enhanced permeability and retention effect. However, these effects occur at much lower levels and retention in tumors is greatly increased owing to defective architecture of lymphatic drainage (46-47). For these reasons, a targeted probe, like the one that we used in our study, would provide real-time, intra-operative distinction of the molecular edge between cancer and adjacent normal tissue. The benefit would be to potentially decreasing the incidence of a positive surgical tumor margin.

AngioStamp™ 800 that targets specifically $\alpha_v\beta_3$ integrin was used in our orthotopic model because $\alpha_v\beta_3$ integrin is expressed in HNSCC tumors (9-13), as well as in the CAL33 HNSCC cell line. We previously developed a miniaturized NIR optical imaging prototype adapted to the geometry of the oral cavity (18). In the present work, we used a commercial clinical grade device called FluoStick™, which was also developed for use in oral oncologic procedures in humans. After macroscopic removal of the orthotopic tumors, very small residual fluorescent tissues of 0.2-1.8 mm in diameter were unintentionally left behind, and these foci were detected in the tumor bed. These fluorescent residues were removed separately, and cancer foci as small as 185 μm were identified in these extracted samples; a positive correlation between the intensity of the fluorescence and the size of the cancer focus existed. Indeed, the amount of bound AngioStamp™ 800 increases as the number of malignant and neo-endothelial cells in the tumor foci increases. Additionally, we showed that NIR optical

imaging-guided surgery improved the recurrence-free survival rate by 50% two months after tumor resection. Because NIR optical imaging-guided surgery improved the quality of HNSCC resection and decreased the cancer recurrence rate in our orthotopic animal model, this valuable tool could be used in humans to optimize HNSCC resection, especially at the deepest part of the tumor, through the identification of small tumor foci, as shown in our model.

Conclusion

We developed a reproducible orthotopic mouse model of HNSCC with mice surviving up to 30 days with an *in situ* tumor, as well as after tumor resection. Our orthotopic model currently provides the most accurate reflection of the clinical situation and allows efficacy, toxicity, and survival studies of novel medical or surgical treatments for HNSCC. This model allowed us to demonstrate that NIR optical imaging-guided surgery improves the quality of HNSCC resection by detecting fluorescent cancer foci that could remain unidentified if resection was performed exclusively under visual guidance. This preclinical stage is the first step toward testing NIR optical imaging-guided surgery for HNSCC in humans.

Acknowledgments

This work was supported by the Fondation d'Entreprise Groupe Pasteur Mutualité, the Fondation Avenir and the Société Française d'ORL. We would also like to thank Dr. BOZEC (Antoine-Lacassagne Center, Nice, France) who provided the CAL33 cell line. We are very grateful to all of the team at the OPTIMAL-Grenoble small animal optical imaging platform of INSERM U823, particularly Dr. J Vollaire. Finally, we would like to thank Fluoptics for their technical assistance.

References

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;24(14):2137-50.
2. Hu D, Lau OD, Wang L, et al. A novel modular polymer platform for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in an animal model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;138(4):412-7.
3. Mehanna H, Paleri V, West CM, Nutting C. Head and neck cancer-part 1: epidemiology, presentation, and preservation. *Clin Otolaryngol* 2011;36(1):65-8.
4. Eldeeb H, Macmillan C, Elwell C, Hammod A. The effect of the surgical margins on the outcome of patients with head and neck squamous cell carcinoma: single institution experience. *Cancer Biol Med* 2012;9(1):29-33.
5. Themelis G, Harlaar NJ, Kelder W, et al. Enhancing surgical vision by using real-time imaging of alphavbeta3-integrin targeted near-infrared fluorescent agent. *Ann Surg Oncol* 2011;18(12):3506-13.
6. Sexton K, Tichauer K, Samkoe KS, Gunn J, Hoopes PJ, Pogue BW. Fluorescent affibody Peptide penetration in glioma margin is superior to full antibody. *PLoS One* 2013;8(4):e60390.
7. Liu Y, Akers WJ, Bauer AQ, et al. Intraoperative detection of liver tumors aided by a fluorescence goggle system and multimodal imaging. *Analyst* 2013;138(8):2254-7.
8. Hadjipanayis CG, Jiang H, Roberts DW, Yang L. Current and future clinical applications for optical imaging of cancer: from intraoperative surgical guidance to cancer screening. *Semin Oncol* 2011;38(1):109-18.
9. Lu JG, Sun YN, Wang C, Jin de J, Liu M. Role of the alpha v-integrin subunit in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas: a clinical and in vitro investigation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266(1):89-96.
10. Danhier F, Le Breton A, Preat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm* 2012;9(11):2961-73.
11. Keereweer S, Mol IM, Kerrebijn JD, et al. Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer. *J Surg Oncol* 2012;105(7):714-8.

12. Fabricius EM, Wildner GP, Kruse-Boitschenko U, Hoffmeister B, Goodman SL, Raguse JD. Immunohistochemical analysis of integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ and $\alpha 5\beta 1$, and their ligands, fibrinogen, fibronectin, osteopontin and vitronectin, in frozen sections of human oral head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Ther Med* 2011;2(1):9-19.
13. Takayama S, Hatori M, Kurihara Y, Kinugasa Y, Shirota T, Shintani S. Inhibition of TGF- $\beta 1$ suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases. *Oncol Rep* 2009;21(1):205-10.
14. Jin ZH, Josserand V, Razkin J, et al. Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)-4. *Mol Imaging* 2006;5(3):188-97.
15. Jin ZH, Josserand V, Foillard S, et al. In vivo optical imaging of integrin $\alpha V\text{-}\beta 3$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer* 2007;6:41.
16. Sancey L, Ardisson V, Riou LM, et al. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34(12):2037-47.
17. Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot MC, Coll JL. New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther* 2005;12(6):1168-75.
18. Gioux S, Coutard JG, Berger M, et al. FluoSTIC: miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt* 2012;17(10):106014.
19. Bozec A, Sudaka A, Etienne-Grimaldi MC, Brunstein MC, Fischel JL, Milano G. Antitumor activity of cetuximab associated with the taxotere-cisplatin-fluorouracil (TPF) combination on an orthotopic head and neck cancer model. *Oral Oncol* 2011;47(10):940-5.
20. Barnes CJ, Ohshiro K, Rayala SK, El-Naggar AK, Kumar R. Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(14):4291-9.
21. Bozec A, Formento P, Lassalle S, Lippens C, Hofman P, Milano G. Dual inhibition of EGFR and VEGFR pathways in combination with irradiation: antitumour supra-additive effects on human head and neck cancer xenografts. *Br J Cancer* 2007;97(1):65-72.
22. Alattar M, Omo A, Elsharawy M, Li J. Neuropilin-1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014;45(3):514-20.

23. Wang ZL, Tang ZC, Zhang Y, et al. Neuropilin-1 down-regulation impairs cell migration and induces the differentiation of human tongue squamous cell carcinoma cells. *Head Neck Oncol* 2012;4:54.
24. Liu X, Jiang L. [Present research on the status and the prospect of insulin-like growth factor-I in head and neck cancer]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2012;26(15):717-20.
25. Keramidas M, Josserand V, Feige JJ, Coll JL. Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol Imaging Biol* 2013;15(3):239-44.
26. Wenk CH, Ponce F, Guillermet S, et al. Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- α v β 3 integrin molecular probe. *Cancer Lett* 2013;334(2):188-95.
27. Boturyn D, Coll JL, Garanger E, Favrot MC, Dumy P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc* 2004;126(18):5730-9.
28. Sancey L, Garanger E, Foillard S, et al. Clustering and internalization of integrin α v β 3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther* 2009;17(5):837-43.
29. Cabanillas R, Secades P, Rodrigo JP, Astudillo A, Suarez C, Chiara MD. [Orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005;56(3):89-95.
30. Lu SL, Herrington H, Wang XJ. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006;28(10):945-54.
31. Kim S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2009;2(2):55-60.
32. Aubry K, Paraf F, Monteil J, Bessede JP, Rigaud M. Characterization of a new rat model of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 2008;22(4):403-8.
33. Caulin C, Nguyen T, Longley MA, Zhou Z, Wang XJ, Roop DR. Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res* 2004;64(15):5054-8.
34. Vitale-Cross L, Amornphimoltham P, Fisher G, Molinolo AA, Gutkind JS. Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64(24):8804-7.

35. Bozec A, Sudaka A, Toussan N, Fischel JL, Etienne-Grimaldi MC, Milano G. Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model. *Ann Oncol* 2009;20(10):1703-7.
36. Bozec A, Sudaka A, Fischel JL, Brunstein MC, Etienne-Grimaldi MC, Milano G. Combined effects of bevacizumab with erlotinib and irradiation: a preclinical study on a head and neck cancer orthotopic model. *Br J Cancer* 2008;99(1):93-9.
37. Li Y, Li B, Xiang CP, Zhang Y, Li YY, Wu XL. Characterization of gastric cancer models from different cell lines orthotopically constructed using improved implantation techniques. *World J Gastroenterol* 2012;18(2):136-43.
38. Huang J, Zhang Y, Zhong H, et al. Comparison of endoscopic submucosal implantation vs. surgical intramuscular implantation of VX2 fragments for establishing a rabbit esophageal tumor model for mimicking human esophageal squamous carcinoma. *PLoS One* 2014;9(1):e85326.
39. Chen JH, Lin YC, Huang YS, Chen TJ, Lin WY, Han KW. Induction of VX2 carcinoma in rabbit liver: comparison of two inoculation methods. *Lab Anim* 2004;38(1):79-84.
40. Meier JD, Oliver DA, Varvares MA. Surgical margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey. *Head Neck* 2005;27(11):952-8.
41. Ord RA, Aisner S. Accuracy of frozen sections in assessing margins in oral cancer resection. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(7):663-9; discussion 669-71.
42. Harlaar NJ, Kelder W, Sarantopoulos A, et al. Real-time near infrared fluorescence (NIRF) intra-operative imaging in ovarian cancer using an alpha(v)beta(3)-integrin targeted agent. *Gynecol Oncol* 2013;128(3):590-5.
43. Huang R, Vider J, Kovar JL, et al. Integrin alphavbeta3-targeted IRDye 800CW near-infrared imaging of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5731-40.
44. Keramidas M, Jossierand V, Righini CA, Wenk C, Faure C, Coll JL. Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* 2010;97(5):737-43.
45. Yokoyama J, Fujimaki M, Ohba S, et al. A feasibility study of NIR fluorescent image-guided surgery in head and neck cancer based on the assessment of optimum surgical time as revealed through dynamic imaging. *Onco Targets Ther* 2013;6:325-30.

46. Sandanaraj BS, Gremlich HU, Kneuer R, Dawson J, Wacha S. Fluorescent nanoprobe as a biomarker for increased vascular permeability: implications in diagnosis and treatment of cancer and inflammation. *Bioconjug Chem* 2010;21(1):93-101.
47. Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem* 2010;21(5):797-802.

3.5.2. Apport dans la chirurgie ganglionnaire

Dans les résultats précédents, nous avons démontré que l'imagerie de fluorescence proche infrarouge apporte un bénéfice dans la chirurgie des cancers des VADS en améliorant la qualité de l'exérèse tumorale. Nous avons aussi montré que notre modèle orthotopique développe des métastases ganglionnaires entre le deuxième et le quatrième mois post-explantation. Afin d'évaluer l'apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la détection et la résection des adénopathies métastatiques, une deuxième série (n=14) de souris sont suivies pendant 4 mois après la résection des tumeurs orthotopiques pour laisser le temps aux métastases ganglionnaires de se développer.

L'AngioStamp™ 800, qui cible l'intégrine $\alpha\beta3$, est injecté en intraveineux à la dose de 10 nmol / injection chez les souris survivantes après le deuxième mois post-résection tumorale. 16 heures après l'injection de l'AngioStamp™ 800, une acquisition en imagerie de fluorescence est réalisée avant et après une incision cervicale large exposant toutes les structures anatomiques du cou. Ensuite, les souris sont sacrifiées. Les adénopathies suspectes sont prélevées, ainsi que les adénopathies qui présentent un signal fluorescent, et analysées histologiquement. Des adénopathies contrôles, non suspectes et non fluorescentes, sont aussi prélevées et analysées.

Nos résultats préliminaires montrent que, dans le cas où la souris ne développe pas d'adénopathie métastatique, les imageries de bioluminescence et de fluorescence ne montrent pas de signal au niveau cervical (Figure 44 A). Inversement, quand l'examen macroscopique préopératoire montre une adénopathie macroscopiquement détectable et présentant un signal en bioluminescence, l'imagerie de fluorescence confirme cette constatation en peropératoire (Figure 44 B). De plus, l'imagerie de fluorescence sert à guider en peropératoire le prélèvement de l'adénopathie avec un signal bioluminescent préopératoire, quand celle-ci est indétectable en peropératoire du fait de l'absence de caractère morphologique de malignité (Figure 44 C).

Nous pouvons ainsi conclure que l'imagerie de fluorescence proche infrarouge représente une aide pour la détection des adénopathies métastatiques qui sont macroscopiquement non suspectes.

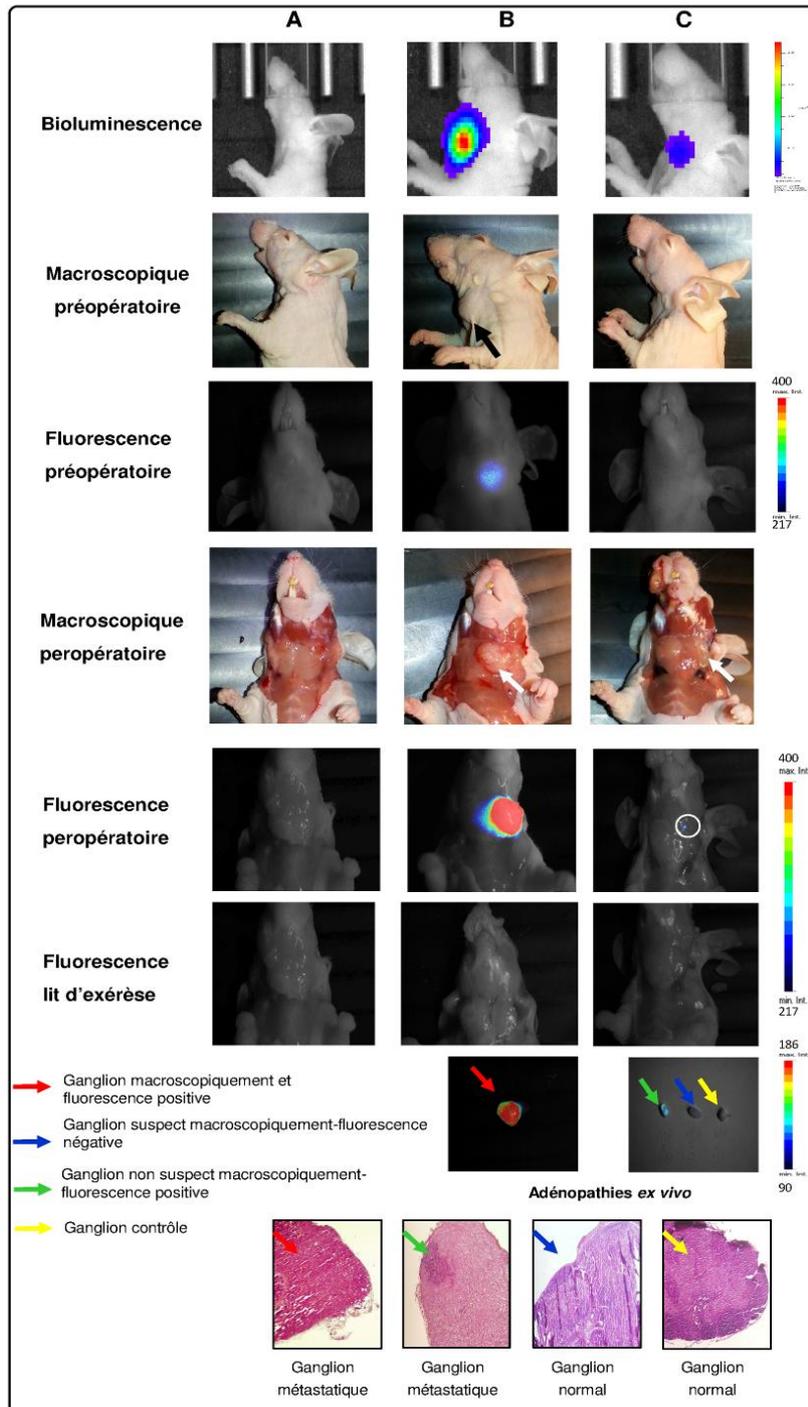


Figure 44 : Apport de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la chirurgie ganglionnaire des cancers des VADS. Chez la souris A, il n'existe pas d'adénopathie métastatique. Chez la souris B il existe une adénopathie métastatique macroscopiquement visible en préopératoire et peropératoire. Cette adénopathie est détectée en imagerie en bioluminescence et fluorescence. L'analyse anatomopathologique est concordante avec la nature métastatique de l'adénopathie. Chez la souris C, il existe un signal bioluminescent cervical. L'adénopathie n'est pas détectée cliniquement en préopératoire. En peropératoire, une adénopathie hypertrophique (flèche) est considérée comme l'adénopathie responsable du signal bioluminescent. Après une imagerie de fluorescence en peropératoire, cette adénopathie ne montre pas de signal fluorescent. Par contre, une autre adénopathie non suspecte montre un signal fluorescent. Ces deux adénopathies sont prélevées avec une troisième adénopathie contrôle et sont analysées histologiquement. L'adénopathie fluorescente montre une métastase de carcinome malpighien alors que l'adénopathie non fluorescente, mais suspecte macroscopiquement, ne montre pas d'anomalie à l'examen histologique aussi bien que l'adénopathie contrôle.

Chapitre 4 : Discussion

Ciblage des cancers des VADS

Les cancers des VADS se développent à travers un processus multi-étapes de changements génétiques, épigénétiques et métaboliques. Les altérations spécifiques des cellules cancéreuses constituent des cibles privilégiées pour des traitements innovants.

Parmi les cibles thérapeutiques privilégiées des cancers des VADS, l'EGFR est impliqué dans la régulation de plusieurs processus néoplasiques tels que l'activation du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse, la mobilité cellulaire et le pouvoir métastatique (Thiery-Vuillemin et al., 2005). La principale molécule développée qui vise cette cible est le cétuximab dont l'efficacité a été initialement démontrée dans les cancers colorectaux. Le cétuximab a eu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 2006 pour le traitement des cancers des VADS.

D'autres molécules que le cétuximab, destinées à la thérapie ciblée des cancers des VADS et des autres cancers sont en cours de développement (Dreyer et al., 2009; Loriot, 2010; Thiery-Vuillemin et al., 2005). Le développement de ces molécules est confronté à un problème d'efficacité thérapeutique. En effet, ces traitements ne sont efficaces que chez les patients dont la tumeur est porteuse d'anomalies précises, alors que les cancers des VADS présentent un profil hétérogène d'expression génétique et moléculaire. L'association de plusieurs molécules de thérapie ciblée ou la polythérapie pourrait donc augmenter l'efficacité des traitements, mais malheureusement, la spécificité serait perdue. En effet, en plus de cibler les cellules tumorales, ces molécules ciblent dans une moindre mesure, les tissus sains. En conséquence, en multipliant les molécules utilisées afin de traiter un patient atteint d'un cancer des VADS, les effets secondaires seraient également multipliés (Dancey et Chen, 2006; Gisselbrecht et Kahn, 2007). Une solution à ce problème, serait de coupler deux ou plusieurs molécules de thérapie ciblée afin de créer des composés polyspécifiques. L'idée est que la plus grande spécificité soit atteinte à travers une combinatoire plus subtile entre des molécules qui ciblent des facteurs multiples. En conséquence, la puissance, l'efficacité et la spécificité seront obtenues dans un seul composé.

Dans cette optique, nous avons testé plusieurs peptides qui ciblent différents récepteurs exprimés par les cancers des VADS ou les néovaisseaux associés. Ces molécules ont été synthétisées en forme simple ou en forme combinée afin de les rendre bispécifiques. Le RAFT-c[RGD]₄ est un peptide qui cible spécifiquement l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et présente la possibilité d'être couplé avec d'autres peptides ou des composés destinés à la thérapie ou à l'imagerie (Boturyn et al., 2004; Bozon, 2013; Danhier et al., 2012; Garanger et al., 2005; Jin et al., 2007; Jin et al., 2006). Il a montré une capacité de liaison importante *in vivo* et *in vitro*, aux cellules des cancers des VADS CAL33, ainsi qu'aux tumeurs développées à partir de cette lignée.

La liaison du RAFT-c[RGD]₄ aux cellules tumorales a été augmentée en le couplant à d'autres peptides qui ciblent d'autres récepteurs exprimés, notamment l'ATWLPPR qui cible la NRP1 et le GE11 qui cible l'EGFR (Li et al., 2005; Starzec et al., 2007; Starzec et al., 2006; Thomas et al., 2008).

Nos résultats ont montré que le RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 qui est un ligand bispécifique de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et de l'EGFR, présente une liaison accrue aux cellules tumorales par rapport au RAFT-c[RGD]₄ ou au GE11 seuls. Par ailleurs, nous avons montré que le RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 semblait augmenter l'activité de l'EGFR. Ceci s'est manifesté par une augmentation du taux de l'EGFR phosphorylé. De notre point de vue, ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que ce nouveau peptide bispécifique peut empêcher l'internalisation de l'EGFR. En conséquence, les récepteurs EGFR restent exposés à la surface cellulaire, à l'EGF qui induit leur autophosphorylation. Une fois que ces récepteurs sont phosphorylés et dimérisés, ils sont bloqués à la surface cellulaire par le RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11 qui est lié d'une part à l'EGFR et d'autre part à l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. En conséquence, en l'absence d'internalisation, la phosphorylation des récepteurs EGFR, persiste ce qui explique l'augmentation du taux de l'EGFR phosphorylé. En effet, l'internalisation est indispensable afin de mettre fin à la phosphorylation de l'EGFR (Adelstein et al., 2011; Baselga, 2003; Bianconi et al., 2012; Hofman et al., 2010). Notre hypothèse devrait être confirmée par des études microscopiques en fluorescence afin d'étudier l'internalisation du RAFT-c[RGD]₄-(PEG)(11)-GE11.

Au vu de nos résultats préliminaires, l'activation de l'EGFR par ce peptide ou la sensibilisation de l'EGFR à l'EGF en présence de ce peptide risquerait d'augmenter la prolifération cellulaire tumorale ce qui pourrait empêcher son utilisation *in vivo* même s'il présente une liaison accrue *in vitro* aux cellules cancéreuses. Il est à noter que des modifications dans la longueur de l'espaceur qui lie le GE11 au RAFT-c[RGD]₄, sont en train d'être réalisées par les chimistes. Ces modifications pourraient avoir des effets sur la phosphorylation de l'EGFR et sur la capacité du nouveau peptide à se lier aux cellules tumorales et à s'internaliser.

Le deuxième peptide qui a été couplé au RAFT-c[RGD]₄ est l'ATWLPPR. Ce peptide qui est une séquence d'acides aminés très sélective vis-à-vis de la NRP1, inhibe la reconnaissance du VEGF165 (Starzec et al., 2007). Des études *in vitro* montrent qu'il est internalisé dans les cellules surexprimant la NRP1 (Starzec et al., 2007; Thomas et al., 2008; Tirand et al., 2006). Des études *in vivo* sur le cancer du sein, ont montré aussi que ce peptide entraîne une diminution notable de l'angiogénèse et de la croissance cellulaire (Starzec et al., 2006). Au vu de ces résultats, l'ATWLPPR pourrait être un bon candidat pour le ciblage et la vectorisation des molécules thérapeutiques ou des molécules spécifiques à l'imagerie des cancers des VADS. Dans nos travaux l'ATWLPPR a été couplé au RAFT-c[RGD]₄ dans le but d'obtenir un composé qui cible à la fois l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et NRP1. Ce couplage a été réalisé par l'intermédiaire d'espacesurs de différentes longueurs à base de PEG. La longueur de ces espacesurs a des effets sur l'affinité des peptides synthétisés à leurs récepteurs. En effet, la reconnaissance du ligand par son récepteur peut dépendre de plusieurs facteurs. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer la taille du ligand et la chimie de couplage entre les différents peptides comme la longueur de la chaîne PEG à l'extrémité de laquelle le ligand est greffé et la nature de l'espaceur ou du groupement fonctionnel par lequel le ligand est couplé (Dubernet, 2011; Peer et al., 2007). Nous avons aussi montré qu'en augmentant le nombre d'ATWLPPR couplé au RAFT-c[RGD]₄, la liaison aux cellules tumorales pourrait être augmenté. Cependant, cette constatation était uniquement réservée à certaines concentrations auxquelles le peptide a été incubé avec les cellules. Ces résultats nécessitent d'être confirmés. Il est aussi indispensable de tester ces peptides sur d'autres lignées cellulaires et d'étudier leurs effets sur les voies de signalisation de la NRP1 et du VEGF.

Les grandes possibilités de modélisation des nanoparticules organiques et inorganiques, leur donnent une polyvalence qui peut servir à les utiliser comme des vecteurs de médicaments (thérapeutique) ou de sondes d'imagerie (diagnostique), voire les deux à la fois (théranostique) (Chuto et Chaumet-Riffaud, 2010). Concernant la thérapeutique, des molécules destinées au traitement, peuvent être internalisées au sein des nanoparticules afin de favoriser leur adressage vers les cellules cibles. Les concentrations actives de ces molécules pourraient ainsi être augmentées au niveau des nanoparticules tout en réduisant leur toxicité liée à leur dispersion au sein de l'organisme. L'internalisation permet aussi de protéger la substance de phénomènes d'inactivation. Le ciblage des cellules cancéreuses par les nanoparticules peut être actif ou passif. Dans le ciblage actif, la surface des nanoparticules est fonctionnalisée par des ligands spécifiques aux récepteurs exprimés par les cellules tumorales. Quant au ciblage passif, il a lieu par l'effet EPR (enhanced permeability and retention). Dans ce phénomène, le diamètre important des pores de l'endothélium, les modifications des paramètres hémodynamiques au sein des néo-vaisseaux ainsi que le faible drainage lymphatique des tumeurs entraînent une accumulation de particules de petite taille dans le tissu tumoral (Wang et al., 2008). Dans nos travaux, nous avons testé des nanoparticules sur lesquelles ont été greffés à différents ratios, l'ATWLPPR et la séquence RGD. Cette dernière cible l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Nos résultats montrent une augmentation de la capacité de liaison aux cellules tumorales, qui est proportionnelle à la quantité de la séquence RGD greffée sur les nanoparticules et indépendante de la concentration de l'ATWLPPR. Ces résultats doivent être confirmés avant de juger s'il est indispensable d'échanger l'ATWLPPR greffé sur ces nanoparticules, par un autre peptide. Il est aussi nécessaire d'étudier l'internalisation de ces nanoparticules afin de déterminer si elles sont capables de véhiculer une molécule thérapeutique à l'intérieur de la cellule tumorale.

Enfin, en plus de la mise au point de nouvelles thérapies ciblées, nous pensons qu'il est indispensable de disposer d'outils et de tests diagnostics permettant une caractérisation de chaque tumeur chez les patients atteints des cancers des VADS. En conséquence, le cancer sera ciblé d'une façon plus spécifique parce que le traitement sera personnalisé et adapté à chaque patient.

Développement d'un modèle animal orthotopique représentatif des cancers des VADS humains

Le développement et l'évaluation de nouveaux outils thérapeutiques ou diagnostiques des cancers des VADS, nécessitent leur essai préalable chez un modèle animal approprié qui doit être reproductible et représentatif des cancers des VADS. Nous avons développé un modèle animal orthotopique des cancers des VADS qui présente une période de survie de 30 jours avec une tumeur *in situ*. Dans notre modèle nous avons opté pour l'implantation des fragments tumoraux au niveau de la cavité buccale au lieu d'injecter les cellules tumorales. En effet, dans les autres modèles orthotopiques, l'injection cellulaire pourrait être responsable de la dissémination des cellules cancéreuses par la pression hydrostatique de la seringue pendant l'injection. Cette dissémination cellulaire se traduit par le développement rapide de volumineuses tumeurs qui imposent le sacrifice de la souris à J10-J12 post-implantation (Bozec et al., 2009; Gleysteen et al., 2008; Keereweer et al., 2012). Nous avons prouvé que notre modèle orthotopique est reproductible puisque toutes les souris ont développé des tumeurs. Nous avons aussi montré que notre modèle permet la résection tumorale qui est réalisée 30 jours après l'implantation avec une survie postopératoire qui atteint presque 100 %. En effet, le site du développement de la tumeur orthotopique (face interne de la joue) et notre technique chirurgicale de résection, permettent de conserver les structures anatomiques de la cavité buccale de la souris. En plus du développement de tumeurs orthotopiques, notre modèle développe aussi, dans 40 % des souris survivantes, des métastases ganglionnaires entre le deuxième et quatrième mois post-explantation tumorale. En conséquence, notre modèle semble refléter toutes les caractéristiques des cancers des VADS. Il permet donc d'évaluer de nouvelles thérapeutiques chirurgicales ou médicales et d'établir des études d'efficacité, de toxicité et de survie.

L'imagerie de fluorescence proche infrarouge pour l'aide à la chirurgie des cancers des VADS

Le pronostic des cancers des VADS dépend de plusieurs facteurs, tels que la classification TNM de la tumeur, sa localisation, le degré de différenciation et la qualité des marges d'exérèse. Comme dans tout cancer solide, la résection tumorale complète des cancers des VADS améliore la survie du patient. La radio-chimiothérapie n'est pas une alternative et ne

peut pas compenser des marges d'exérèse non saines. Celles-ci augmentent le taux de récurrence et diminuent la survie globale des patients (Eldeeb et al., 2012). Dans la pratique chirurgicale, les marges d'exérèse sont définies macroscopiquement et avec l'aide de l'examen anatomopathologique extemporané. Au niveau de la partie profonde de la tumeur, les marges d'exérèse sont surtout définies à la palpation, avec des difficultés à réaliser des prélèvements qui représentent la totalité du lit tumoral, pour être envoyés en analyse anatomopathologique extemporané (Meier et al., 2005; Ord et Aisner, 1997).

Pour pallier ce problème, l'imagerie de fluorescence proche infrarouge pourrait apporter une aide incontournable en temps réel au chirurgien afin de le guider pendant la résection tumorale. Ce type d'imagerie nécessite des sondes fluorescentes spécifiques qui ciblent des récepteurs spécifiques aux cellules cancéreuses, générant ainsi un contraste entre le tissu cancéreux et le tissu sain. Différents récepteurs de la surface cellulaire ont été ciblés par des sondes fluorescentes, comme l'EGFR, l'intégrine $\alpha v\beta 3$, le récepteur de l'urokinase plasminogène activateur, la mucine 1, l'antigène carcino-embryonnaire, et le récepteur à folate (Hadjipanayis et al., 2011). De multiples études ont été réalisées chez des modèles animaux et chez l'homme pour évaluer le rôle de la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge dans la résection tumorale. Dans les modèles animaux, ce type de chirurgie a été utilisé afin d'optimiser la qualité de résection des tumeurs du sein, des ovaires, du cerveau et du colon ainsi que pour détecter et réséquer les métastases (Garanger et al., 2005; Gebhart et al., 2007; Harlaar et al., 2013; Huang et al., 2012; Jin et al., 2006; Sexton et al., 2013). Dans ces modèles, l'intégrine $\alpha v\beta 3$, qui est surexprimée par les cellules tumorales et les néovaisseaux, est le récepteur le plus ciblé. La molécule qui a été le plus employée dans le ciblage de l'intégrine $\alpha v\beta 3$, est le RAFT-c[RGD]₄ couplé à un fluorophore. Dans ces études précliniques, la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge a fait preuve d'efficacité dans la résection des tumeurs ainsi que dans la détection et l'exérèse des métastases (Harlaar et al., 2013; Huang et al., 2012; Keramidas et al., 2010; Themelis et al., 2011).

Dans notre modèle animal orthotopique des cancers des VADS, nous avons prouvé que les tumeurs développées dans ce modèle expriment l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Nous avons aussi montré que la lignée cellulaire utilisée dans le développement de ce modèle, exprime *in vitro* le même type d'intégrine avec des résultats en cytométrie en flux qui confirment la liaison positive du

RAFT-c[RGD]₄ à ces cellules. En conséquence, nous avons testé, dans notre modèle orthotopique, l'imagerie de fluorescence proche infrarouge après injection intraveineuse du RAFT-c[RGD]₄ fluorescent, afin de définir le rôle de ce type d'imagerie dans la résection tumorale des cancers des VADS et dans la détection des métastases ganglionnaires. Dans nos manipulations, nous avons aussi testé des caméras d'imagerie de fluorescence proche infrarouge, miniaturisées et adaptées spécifiquement aux applications futures dans la chirurgie des cancers des VADS. Cette étape est indispensable pour la translation de ces systèmes d'imagerie en clinique. Nous avons démontré que l'imagerie de fluorescence proche infrarouge améliore la qualité d'exérèse tumorale à travers la détection des reliquats fluorescents de 0,2 à 1,8 mm au niveau du lit chirurgical. L'analyse histologique a montré la présence de foyers de carcinome malpighien aussi petit que 185 µm au sein de ces reliquats. Il existe aussi une corrélation positive entre l'intensité de fluorescence des reliquats et la taille du foyer tumoral résiduel. Nous pouvons expliquer cette constatation par le fait que la quantité du RAFT-c[RGD]₄ capté au sein de ces reliquats, augmente proportionnellement avec le nombre de cellules malignes et de néovaisseaux. La détection de ces résidus tumoraux a amélioré le taux de survie sans rechute de 50 % dans notre modèle orthotopique.

Finalement, nous avons démontré que l'imagerie de fluorescence proche infrarouge détecte les adénopathies métastatiques. Chez les souris qui présentent un examen clinique en faveur d'adénopathies cervicales et/ou qui présentent un signal cervical bioluminescent, l'imagerie de fluorescence proche infrarouge vient pour confirmer la nature métastatique de l'adénopathie. Par ailleurs, elle peut guider en temps réel, le chirurgien à prélever l'adénopathie métastatique visée si elle n'est pas détectable cliniquement en préopératoire et en peropératoire. En effet, la bioluminescence seule, ne peut pas guider le chirurgien à prélever le ganglion ciblé parce que ce type d'imagerie a une mauvaise localisation spatiale. En plus, la bioluminescence est considérée comme une imagerie expérimentale qui ne peut pas être utilisée en temps réel.

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

Nous avons testé des molécules bispécifiques qui ciblent les cancers des VADS. Certaines molécules montrent des résultats prometteurs, mais qui nécessitent d'être confirmés afin d'apporter certaines modifications à ces molécules dans le but d'améliorer leur ciblage tumoral. Parallèlement, nous avons développé un modèle animal orthotopique optimisé des cancers des VADS avec une reproductibilité proche de 100 %. Notre modèle montre une survie à 30 jours avec une tumeur *in situ* et permet aussi la résection tumorale sans sacrifier la souris, ce qui donne la possibilité de réaliser des études de survie. En plus du développement tumoral orthotopique, notre modèle animal développe aussi de métastases ganglionnaires. A notre connaissance, notre modèle est actuellement celui qui se rapproche le plus de la pratique clinique. Il nous a permis aussi de démontrer que la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence proche infrarouge améliore la qualité de l'exérèse tumorale et peut guider le chirurgien à prélever les adénopathies métastatiques même si elles ne sont pas identifiables cliniquement. Cette étape préclinique est indispensable avant de tester cette technique chez l'être humain.

Bibliographie

Adelstein B. A., Dobbins T. A., Harris C. A., *et al.* A systematic review and meta-analysis of KRAS status as the determinant of response to anti-EGFR antibodies and the impact of partner chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2011, 47, 9, pp. 1343-1354.

Alattar M., Omo A., Elsharawy M., *et al.* Neuropilin-1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 45, 3, pp. 514-520.

Argiris A., Karamouzis M. V., Raben D., *et al.* Head and neck cancer. *Lancet*, 2008, 371, 9625, pp. 1695-1709.

Askari J. A., Buckley P. A., Mould A. P., *et al.* Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci*, 2009, 122, Pt 2, pp. 165-170.

Aubry K., Paraf F., Monteil J., *et al.* Characterization of a new rat model of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo*, 2008, 22, 4, pp. 403-408.

Bagri A. D., Liang W.-C., Watts R. J., *et al.* (2007). Inhibition of tumor metastasis by anti neuropilin 2 antibodies.

Baselga J. A review of EGFR targeted therapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2003, 1, 4, pp. 218-219.

Bensadoun R.-J., Pinel B. (2012). Radiothérapie des cancers oto-rhino-laryngologiques. In EMC - Oto-rhino-laryngologie, Vol. 8(1), Article 20-902-A-10, pp. 1-13. Elsevier Masson, Paris.

Bianconi F., Baldelli E., Ludovini V., *et al.* Computational model of EGFR and IGF1R pathways in lung cancer: a Systems Biology approach for Translational Oncology. *Biotechnol Adv*, 2012, 30, 1, pp. 142-153.

Billemont B., Méric J.-B., Izzedine H., *et al.* Angiogenèse et cancer du rein. *Bulletin du Cancer*, 2007, 94, 5, pp. 232-240.

Boing A. F., Antunes J. L. [Socioeconomic conditions and head and neck cancer: a systematic literature review]. *Cien Saude Colet*, 2011, 16, 2, pp. 615-622.

Boturyn D., Coll J. L., Garanger E., *et al.* Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J Am Chem Soc*, 2004, 126, 18, pp. 5730-5739.

Bozec A., Formento P., Lassalle S., *et al.* Dual inhibition of EGFR and VEGFR pathways in combination with irradiation: antitumour supra-additive effects on human head and neck cancer xenografts. *Br J Cancer*, 2007, 97, 1, pp. 65-72.

Bozec A., Sudaka A., Etienne-Grimaldi M. C., *et al.* Antitumor activity of cetuximab associated with the taxotere-cisplatin-fluorouracil (TPF) combination on an orthotopic head and neck cancer model. *Oral Oncol*, 2011, 47, 10, pp. 940-945.

Bozec A., Sudaka A., Fischel J. L., *et al.* Combined effects of bevacizumab with erlotinib and irradiation: a preclinical study on a head and neck cancer orthotopic model. *Br J Cancer*, 2008, 99, 1, pp. 93-99.

Bozec A., Sudaka A., Toussan N., *et al.* Combination of sunitinib, cetuximab and irradiation in an orthotopic head and neck cancer model. *Ann Oncol*, 2009, 20, 10, pp. 1703-1707.

Bozon A. *Le RAFT-RGD radiomarqué avec un émetteur bêta⁻ comme nouvel agent de radiothérapie interne vectorisée*, 2013,

Busser B., Sancey L., Josserand V., *et al.* Amphiregulin promotes BAX inhibition and resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancers. *Mol Ther*, 2010, 18, 3, pp. 528-535.

Cabanillas R., Secades P., Rodrigo J. P., *et al.* [Orthotopic murine model of head and neck squamous cell carcinoma]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2005, 56, 3, pp. 89-95.

Caswell P., Norman J. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends Cell Biol*, 2008, 18, 6, pp. 257-263.

Caswell P. T., Vadrevu S., Norman J. C. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10, 12, pp. 843-853.

Caulin C., Nguyen T., Longley M. A., *et al.* Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity. *Cancer Res*, 2004, 64, 15, pp. 5054-5058.

Chen Z., Ke L. D., Yuan X. H., *et al.* Correlation of cisplatin sensitivity with differential alteration of EGFR expression in head and neck cancer cells. *Anticancer Res*, 2000, 20, 2A, pp. 899-902.

Chuto G., Chaumet-Riffaud P. Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire*, 2010, 34, 6, pp. 370-376.

Ciardiello F., Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358, 11, pp. 1160-1174.

Claron M. *Synthèse de vecteurs peptidiques non-viraux : vectorisation et ciblage tumoral*, Joseph Fourier, Grenoble, 2013,

Clauditz T. S., Wang C. J., Gontarewicz A., *et al.* Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, 2013, 42, 2, pp. 125-132.

Cojocariu O., Huguet F., Lefevre M., *et al.* Facteurs pronostiques et prédictifs des cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bulletin du Cancer*, 2009, 96, 4, pp. 369-378.

Dancey J. E., Chen H. X. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5, 8, pp. 649-659.

Danhier F., Le Breton A., Preat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm*, 2012, 9, 11, pp. 2961-2973.

Delbaldo C., Faivre S., Raymond E. Les inhibiteurs des récepteurs de l'Epidermal Growth Factor (EGF). *La Revue de médecine interne*, 2003, 24, 6, pp. 372-383.

Dreyer C., Raymond E., Faivre S. Les thérapies ciblées et leurs indications dans les tumeurs solides. *La Revue de médecine interne*, 2009, 30, 5, pp. 416-424.

Dubernet C. Vectorisation à visée thérapeutique ou diagnostique: une synthèse de l'état de l'art dans le domaine du cancer. *Bulletin du Cancer*, 2011, 98, 11, pp. 1363-1371.

Dufort S. *Vectorisation de biomolécules pour l'imagerie et la thérapie des cancers*, 2010, 1 vol. (339 p.).

Eldeeb H., Macmillan C., Elwell C., *et al.* The effect of the surgical margins on the outcome of patients with head and neck squamous cell carcinoma: single institution experience. *Cancer Biol Med*, 2012, 9, 1, pp. 29-33.

Ellis L. M. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5, 5, pp. 1099-1107.

Espitalier F., Ferron C., Sachot-Lebouvier S., *et al.* (2012). Chimiothérapie et thérapeutiques ciblées dans le traitement des cancers des voies aérodigestives supérieures (lymphome malin exclu). In *EMC Oto-rhino-laryngologie*, Vol. 20-901-F-10, pp. 1-16. Elsevier Masson, Paris.

Fabricius E. M., Wildner G. P., Kruse-Boitschenko U., *et al.* Immunohistochemical analysis of integrins $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ and $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, and their ligands, fibrinogen, fibronectin, osteopontin and vitronectin, in frozen sections of human oral head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Ther Med*, 2011, 2, 1, pp. 9-19.

Faraji A. H., Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17, 8, pp. 2950-2962.

Garanger E. *Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie*, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2005,

Garanger E., Boturyn D., Jin Z., *et al.* New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther*, 2005, 12, 6, pp. 1168-1175.

Garrel R., Dromard M., Costes V., *et al.* The diagnostic accuracy of reverse transcription-PCR quantification of cytokeratin mRNA in the detection of sentinel lymph node invasion in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a comparison with immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 8, pp. 2498-2505.

Gebhart S. C., Thompson R. C., Mahadevan-Jansen A. Liquid-crystal tunable filter spectral imaging for brain tumor demarcation. *Appl Opt*, 2007, 46, 10, pp. 1896-1910.

Gestwicki J. E., Cairo C. W., Strong L. E., *et al.* Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J Am Chem Soc*, 2002, 124, 50, pp. 14922-14933.

Gioanni J., Fischel J. L., Lambert J. C., *et al.* Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1988, 24, 9, pp. 1445-1455.

Gioux S., Choi H. S., Frangioni J. V. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging*, 2010, 9, 5, pp. 237-255.

Gioux S., Coutard J. G., Berger M., *et al.* FluoSTIC: miniaturized fluorescence image-guided surgery system. *J Biomed Opt*, 2012, 17, 10, pp. 106014.

Gisselbrecht S., Kahn A. *Histoire de la thérapie ciblée en cancérologie.* John Libbey Eurotext, 2007.

Gleysteen J. P., Newman J. R., Chhieng D., *et al.* Fluorescent labeled anti-EGFR antibody for identification of regional and distant metastasis in a preclinical xenograft model. *Head Neck*, 2008, 30, 6, pp. 782-789.

Hadjipanayis C. G., Jiang H., Roberts D. W., *et al.* Current and future clinical applications for optical imaging of cancer: from intraoperative surgical guidance to cancer screening. *Semin Oncol*, 2011, 38, 1, pp. 109-118.

Hamakawa H., Fukuzumi M., Bao Y., *et al.* Keratin mRNA for detecting micrometastasis in cervical lymph nodes of oral cancer. *Cancer Lett*, 2000, 160, 1, pp. 115-123.

Hans S., Brasnu D. (2010). *Cancers ORL : conduite à tenir et traitement.* In EMC, *Traité de Médecine Akos*, Vol. 6-0470. Elsevier Masson, Paris.

Harlaar N. J., Kelder W., Sarantopoulos A., *et al.* Real-time near infrared fluorescence (NIRF) intra-operative imaging in ovarian cancer using an alpha(v)beta(3)-integrin targeted agent. *Gynecol Oncol*, 2013, 128, 3, pp. 590-595.

Hicklin D. J., Ellis L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 2005, 23, 5, pp. 1011-1027.

Hodivala-Dilke K. M., Reynolds A. R., Reynolds L. E. Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res*, 2003, 314, 1, pp. 131-144.

Hofman E. G., Bader A. N., Voortman J., *et al.* Ligand-induced EGF receptor oligomerization is kinase-dependent and enhances internalization. *J Biol Chem*, 2010, 285, 50, pp. 39481-39489.

Hood J. D., Chesh D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, 2, pp. 91-100.

Huang R., Vider J., Kovar J. L., *et al.* Integrin α v β 3-targeted IRDye 800CW near-infrared imaging of glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2012, 18, 20, pp. 5731-5740.

James M. L., Gambhir S. S. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*, 2012, 92, 2, pp. 897-965.

Jedlinski A., Ansell A., Johansson A. C., *et al.* EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med*, 2013, 42, 1, pp. 26-36.

Jia H., Cheng L., Tickner M., *et al.* Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity. *Br J Cancer*, 2010, 102, 3, pp. 541-552.

Jin Z. H., Josserand V., Foillard S., *et al.* In vivo optical imaging of integrin α V- β 3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer*, 2007, 6, pp. 41.

Jin Z. H., Josserand V., Razkin J., *et al.* Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)₄. *Mol Imaging*, 2006, 5, 3, pp. 188-197.

Keereweer S., Mol I. M., Kerrebijn J. D., *et al.* Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer. *J Surg Oncol*, 2012, 105, 7, pp. 714-718.

Keramidas M., Josserand V., Righini C. A., *et al.* Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg*, 2010, 97, 5, pp. 737-743.

Kim S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2009, 2, 2, pp. 55-60.

Kramer N. M., Horwitz E. M., Cheng J., *et al.* Toxicity and outcome analysis of patients with recurrent head and neck cancer treated with hyperfractionated split-course reirradiation and concurrent cisplatin and paclitaxel chemotherapy from two prospective phase I and II studies. *Head Neck*, 2005, 27, 5, pp. 406-414.

Le Duc G., Miladi I., Alric C., *et al.* Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano*, 2011, 5, 12, pp. 9566-9574.

Le Masne de Chermont Q. *Nanoparticules à luminescence persistante pour l'imagerie optique in vivo*, 2007, 1 vol. ([VI]- 209 p.)

Le Tourneau C., Jung G. M., Borel C., *et al.* Prognostic factors of survival in head and neck cancer patients treated with surgery and postoperative radiation therapy. *Acta Otolaryngol*, 2008, 128, 6, pp. 706-712.

Leblond P., Meignan S., Le Tinier F., *et al.* L'inhibiteur d'intégrines Cilengitide: un nouveau principe actif en neuro-oncologie. *Bulletin du Cancer*, 2011, 98, 9, pp. 1083-1090.

Lefebvre J.-L. Tumeurs «ORL». *Oncologie*, 2012, pp. 1-4.

Leon X., Lopez-Pousa A., de Vega M., *et al.* Results of an organ preservation protocol with induction chemotherapy and radiotherapy in patients with locally advanced laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2005, 262, 2, pp. 93-98.

Li Z., Zhao R., Wu X., *et al.* Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB J*, 2005, 19, 14, pp. 1978-1985.

Limesand K. H., Chibly A. M., Fribley A. Impact of targeting insulin-like growth factor signaling in head and neck cancers. *Growth Horm IGF Res*, 2013, 23, 5, pp. 135-140.

Lingwood D., Kaiser H. J., Levental I., *et al.* Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37, Pt 5, pp. 955-960.

Loriot Y. Les thérapies ciblées et nouvelles molécules. *Oncologie*, 2010, 12, 8, pp. 467-470.

Lu J. G., Sun Y. N., Wang C., *et al.* Role of the alpha v-integrin subunit in cell proliferation, apoptosis and tumor metastasis of laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas: a clinical and in vitro investigation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009, 266, 1, pp. 89-96.

Lu S. L., Herrington H., Wang X. J. Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, 2006, 28, 10, pp. 945-954.

Luo B. H., Springer T. A. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18, 5, pp. 579-586.

Magné N., Bay J.-O., Blay J.-Y., *et al.* Les données incontournables de l'American Society of Clinical Oncology (Asco) 2012: le point de vue du comité de rédaction du Bulletin du Cancer. *Bulletin du Cancer*, 2012, 99, 12, pp. 1209-1217.

Mehanna H., Paleri V., West C. M., *et al.* Head and neck cancer-part 1: epidemiology, presentation, and preservation. *Clin Otolaryngol*, 2011, 36, 1, pp. 65-68.

Meier J. D., Oliver D. A., Varvares M. A. Surgical margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey. *Head Neck*, 2005, 27, 11, pp. 952-958.

Morgillo F., Woo J. K., Kim E. S., *et al.* Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res*, 2006, 66, 20, pp. 10100-10111.

Mousavie Anijdan S. H., Mahdavi S. R., Shirazi A., *et al.* Megavoltage X-ray Dose Enhancement with Gold Nanoparticles in Tumor Bearing Mice. *Int J Mol Cell Med*, 2013, 2, 3, pp. 118-123.

NeufCoeur P. E., Arafa M., Delvenne P., *et al.* Implication des papillomavirus humains dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bulletin du Cancer*, 2009, 96, 10, pp. 941-950.

Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8, pp. 1-33.

Ord R. A., Aisner S. Accuracy of frozen sections in assessing margins in oral cancer resection. *J Oral Maxillofac Surg*, 1997, 55, 7, pp. 663-669; discussion 669-671.

Peer D., Karp J. M., Hong S., *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2, 12, pp. 751-760.

Pignon J. P., Baujat B., Bourhis J. Apport des méta-analyses sur données individuelles au traitement des cancers ORL. *Cancer/Radiothérapie*, 2005, 9, 1, pp. 31-36.

Poissonnet G., Benezery K., Peyrade F., *et al.* Cancers ORL: les grands principes thérapeutiques. *La Presse Médicale*, 2007, 36, 11, pp. 1634-1642.

Prud'homme G. J., Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget*, 2012, 3, 9, pp. 921-939.

Saint-Guily J. L., Périé S. Actualités dans les cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bulletin du Cancer*, 2006, 93, 1, pp. 51-59.

Sancey L., Ardisson V., Riou L. M., *et al.* In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the alpha(v)beta (3) integrin-targeted tracer ^{99m}Tc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34, 12, pp. 2037-2047.

Sancey L., Garanger E., Foillard S., *et al.* Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther*, 2009, 17, 5, pp. 837-843.

Sexton K., Tichauer K., Samkoe K. S., *et al.* Fluorescent affibody Peptide penetration in glioma margin is superior to full antibody. *PLoS One*, 2013, 8, 4, pp. e60390.

Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 1997, 387, 6633, pp. 569-572.

Smilek P., Dusek L., Vesely K., *et al.* Correlation of expression of Ki-67, EGFR, c-erbB-2, MMP-9, p53, bcl-2, CD34 and cell cycle analysis with survival in head and neck squamous cell cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006, 25, 4, pp. 549-555.

Starzec A., Ladam P., Vassy R., *et al.* Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides*, 2007, 28, 12, pp. 2397-2402.

Starzec A., Vassy R., Martin A., *et al.* Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci*, 2006, 79, 25, pp. 2370-2381.

Takayama S., Hatori M., Kurihara Y., *et al.* Inhibition of TGF-beta1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases. *Oncol Rep*, 2009, 21, 1, pp. 205-210.

Thariat J., Jegoux F., Pointreau Y., *et al.* Évolution des concepts dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, sous l'égide de l'Intergroupe ORL (GORTEC, GETTEC, GERCOR). *Bulletin du Cancer*, 2013, 100, 10, pp. 983-997.

Themelis G., Harlaar N. J., Kelder W., *et al.* Enhancing surgical vision by using real-time imaging of alphavbeta3-integrin targeted near-infrared fluorescent agent. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18, 12, pp. 3506-3513.

Thiery-Vuillemin A., Nguyen T., Chaigneau L., *et al.* Les thérapies ciblées des cancers des VADS. *Oncologie*, 2005, 7, 4, pp. 290-295.

Thomas N., Tirand L., Chatelut E., *et al.* Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem Photobiol Sci*, 2008, 7, 4, pp. 433-441.

Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., *et al.* A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release*, 2006, 111, 1-2, pp. 153-164.

Tohnai I., Kawabe Y., Nakashima T., *et al.* [Clinical effects and toxicity of chemotherapy with cisplatin for head and neck cancer--the multi-institutional joint research in Tokai district]. *Nihon Gan Chiryo Gakkai Shi*, 1990, 25, 10, pp. 2567-2578.

Vincent N., Dassonville O., Chamorey E., *et al.* Facteurs pronostiques cliniques et histologiques des cancers localement avancés de la cavité buccale traités par chirurgie première. *Annales françaises d'Oto-rhino-laryngologie et de Pathologie Cervico-faciale*, 2012, 129, 6, pp. 339-344.

Vitale-Cross L., Amornphimoltham P., Fisher G., *et al.* Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis. *Cancer Res*, 2004, 64, 24, pp. 8804-8807.

Wang X., Yang L., Chen Z. G., *et al.* Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58, 2, pp. 97-110.

Wang Z. L., Tang Z. C., Zhang Y., *et al.* Neuropilin-1 down-regulation impairs cell migration and induces the differentiation of human tongue squamous cell carcinoma cells. *Head Neck Oncol*, 2012, 4, pp. 54.

Weekes C., LoRusso P., Ramakrishnan V., *et al.* A Phase 1b study for MNRP1685A (anti-NRP1) administered intravenously with bevacizumab with or without paclitaxel to patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Abstr*, 2011, 29, pp. 3050.

Wenk C. H., Ponce F., Guillermet S., *et al.* Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- α v β 3 integrin molecular probe. *Cancer Lett*, 2013, 334, 2, pp. 188-195.

Xin Y., Li J., Wu J., *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of circulating biomarkers of anti-NRP1, a novel antiangiogenesis agent, in two phase I trials in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2012, 18, 21, pp. 6040-6048.

Zalcman G. [EGFR pathway and mechanism of action of tyrosine kinase inhibitors]. *Rev Pneumol Clin*, 2007, 63, 1 Pt 2, pp. 2S5-6.