



HAL
open science

Biomarqueurs du microenvironnement tumoral pour la stratification thérapeutique des cancers tête et cou

Claire Lailler

► **To cite this version:**

Claire Lailler. Biomarqueurs du microenvironnement tumoral pour la stratification thérapeutique des cancers tête et cou. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. NNT : 2021AMIE0065 . tel-03881131

HAL Id: tel-03881131

<https://theses.hal.science/tel-03881131>

Submitted on 1 Dec 2022

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 de Doctorat

*Mention Biologie-Santé
Spécialité Physiopathologie Humaine, Approches pharmacologiques des
cancers*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Claire LAILLER

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Biomarqueurs du Microenvironnement tumoral pour la
stratification thérapeutique des cancers de la tête et du cou***

Soutenue le 21 octobre 2021 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

**M. Laurent POULAIN, DR, UNICAEN
M^{me} Sandrine FAIVRE, PU-PH, Univ. de Paris
M^{me} Sylvie TESTELIN, PU-PH, UPJV
M. Florian CLATOT, PU-PH, Univ. De Rouen Normandie
M. Antoine GALMICHE, PU-PH, UPJV
M^{me} Zuzana SAIDAK, Enseignant, UPJV**

**Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur**

Remerciements

Aux membres du jury

Monsieur le Professeur Antoine GALMICHE

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre équipe de recherche. Ce fut un honneur de bénéficier de vos connaissances, de votre pédagogie et de votre disponibilité durant ces quatre années de Master 2 et de Doctorat.

Madame le Docteur Zuzana SAIDAK

Je te remercie sincèrement pour ton encadrement, ta disponibilité et les connaissances dont tu m'as fait bénéficier durant ces quatre années de Master 2 et de Doctorat.

Madame le Professeur Sylvie TESTELIN

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir au sein de votre équipe de recherche CHIMERE, ainsi que d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse de Sciences.

Monsieur le Docteur Laurent POULAIN

Je vous remercie de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse de Sciences en qualité de rapporteur de cette thèse. Votre expertise dans le domaine des cancers et votre avis seront très enrichissants pour nous.

Madame le Professeur Sandrine FAIVRE

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse de Sciences en tant que rapporteur. Bénéficier de votre expertise et de vos connaissances est un honneur.

Monsieur le Docteur Florian CLATOT

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse de Sciences en qualité d'examineur. Je suis sensible à l'intérêt que vous porterez à ce travail et je vous en remercie.

Aux membres de l'équipe de Recherche de Biochimie

A Corinne et Christophe

La gentillesse, la bonne humeur, ainsi que la patience et la pédagogie dont vous faites preuve au quotidien pour transmettre vos précieuses connaissances aux étudiants m'ont beaucoup aidée lors de ces quatre années. Vous êtes une équipe de choc et travailler avec vous est un réel plaisir.

A Chloé

Je te remercie pour tes précieux conseils et ta gentillesse, je te souhaite toute la réussite professionnelle et personnelle que tu mérites.

A Anaïs, Marine et Floriane

Anaïs, merci pour ta sympathie et ton humour. Je te souhaite une bonne continuation.

Merci les Marflo pour votre bonne humeur, et Marine pour ton aide précieuse ! Je vous souhaite une bonne continuation (je n'ai pas de doutes à ce propos), vous allez me manquer.

Aux membres de l'équipe de Recherche de Virologie

A Madame le Docteur Catherine François, Véronique Descamps, Virginie Morel

Je vous remercie pour votre accueil, votre disponibilité, vos conseils ainsi que la confiance que vous m'avez accordée lors de mon apprentissage des PCR. Travailler avec vous fut un plaisir.

A Vincent, à ma famille, à mes amis

Merci pour tout, vous êtes un soutien indéfectible. Vous avoir à mes côtés est un grand bonheur qui, je l'espère, est partagé.

Résumé

Les Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou (CETC) représentent les septièmes tumeurs les plus fréquentes au niveau mondial en 2020. Si les perspectives thérapeutiques ont évolué favorablement ces dix dernières années, la recherche de biomarqueurs utiles pour la stratification thérapeutique reste un enjeu de taille pour ces tumeurs. En outre, l'induction d'une immunité adaptative antitumorale apparaît comme un mécanisme de plus en plus important pour l'efficacité des thérapeutiques approuvées dans les CETC. Dans cette perspective, l'étude des interactions entre cellules tumorales et cellules immunitaires du microenvironnement tumoral (MT) est incontournable. Plusieurs thérapies anticancéreuses ont été rapportées pour induire la mort des cellules tumorales par ferroptose, une nécrose régulée dépendante du fer survenant lors d'un stress oxydant non résolu par la cellule. Nous nous sommes intéressés dans la première partie de nos travaux à la possibilité d'exploiter la ferroptose dans les CETC positifs au Papillomavirus Humain (CETC HPV+ve), les CETC HPV+ve montrant habituellement un état de stress oxydant supérieur aux CETC négatifs pour l'HPV (CETC HPV-ve). Nous avons mis en évidence une expression faible de SLC7A11, transporteur essentiel de la cellule pour la synthèse du glutathion inhibiteur du stress oxydant, dans les CETC HPV+ve par rapport aux CETC HPV-ve *in silico*. *In vitro*, nous avons mis en évidence une vulnérabilité supérieure à la ferroptose induite par l'érastine dans les lignées de CETC exprimant les protéines transformantes E6/E7 de l'HPV par rapport à leurs lignées parentales. Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons étudié la régulation de l'expression du ligand PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) par différentes thérapies approuvées dans les CETC. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et inflammatoires du MT est en effet responsable en partie de l'inactivation fréquente des cellules T cytotoxiques du MT, et représente donc un obstacle pour l'induction de l'immunité adaptative antitumorale. Nous avons mis en évidence une régulation spécifique de PD-L1 par le 5-fluorouracile (5-FU) dépendante de la réponse aux dommages de l'ADN ainsi que de la voie JAK / STAT.

Mots-clefs : Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou, Microenvironnement Tumoral, Ferroptose, Papillomavirus Humain, SLC7A11, 5-fluorouracile, PD-L1.

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	15
I. Les Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou (CETC)	16
I.1. Définition et épidémiologie des CETC	16
I.2. Facteurs carcinogènes des CETC	17
I.2.1.....	17
I.2.1. Le rôle de l'alcool et du tabac dans les CETC	17
I.2.2. Le papillomavirus humain dans les CETC oropharyngés	18
I.3. Prise en charge thérapeutique des CETC	22
I.3.1. Diagnostic des CETC	22
I.3.2. Stratification des CETC	22
I.3.3. Traitements des CETC	25
I.4. Altérations génomiques fréquentes et retentissement sur les voies de signalisation dans les CETC.....	28
I.4.1. Modifications structurelles du génome.....	28
Gènes fréquemment invalidés dans les CETC.....	30
Gènes fréquemment activés dans les CETC	31
I.4.2. Modifications épigénétiques dans les CETC	32
I.5. La Réponse aux dommages de l'ADN.....	34
I.5.1. Définition et grandes voies de la réponse aux dommages de l'ADN .	34
I.5.2. Les voies ATM / Chk2 et ATR / Chk1	35
I.5.3. Les voies ATM/ATR dans les CETC.....	38
I.5.4. Rationnel pour le ciblage de la DDR dans les tumeurs	39
I.5.5. Ciblage de la DDR dans les CETC	40
II. La ferroptose.....	42
II.1. Définition.....	42
II.2. Acteurs principaux du programme ferroptotique	44

II.2.1.	Le fer	45
II.2.2.	La formation des ROS	45
II.2.3.	GPx4 et le Glutathion	47
II.2.4.	Le système antiport Xc-.....	48
II.3.	La ferroptose en thérapeutique dans les cancers	49
II.3.1.	Thérapies antitumorales et ferroptose.....	49
II.3.2.	Biomarqueurs de la ferroptose dans les cancers	50
II.3.3.	Ferroptose et nécro-inflammation.....	51
III.	Microenvironnement Tumoral des CETC.....	55
III.1.	Définition et composition du MT.....	55
III.1.1.	La MEC	56
III.1.2.	Les CAF	57
III.1.3.	Vascularisation dans le MT	57
III.1.4.	Coagulation dans le MT.....	58
III.1.5.	Les plaquettes dans le MT	58
III.1.6.	Fibres nerveuses et MT.....	58
III.2.	MT immunitaire et inflammatoire des tumeurs.....	60
III.3.	Les caractéristiques du MT immunitaire des CETC.....	66
III.4.	Le Ciblage de PD-L1 dans les CETC	69
III.4.1.	Définition des points de contrôle immunitaires et phénomène d'épuisement des LT.....	69
III.4.2.	Les ICB dans les CETC.....	70
III.4.3.	Régulation de l'expression de PD-L1 dans les CETC	72
IV.	Hypothèses de travail et objectifs	76
Chapitre 2 :	Travaux	77
I.	SLC7A11, biomarqueur et cible thérapeutique dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou positifs à HPV.....	78

II. Régulation spécifique de l'expression de la molécule checkpoint PD-L1, dépendante de la signalisation JAK/STAT et de la DDR dans les cellules de CETC exposées au 5-FU.....	98
Chapitre 3 : Discussion générale et conclusions	107
I. SLC7A11 comme biomarqueur dans les CETC HPV+ve	108
II. Régulation spécifique de l'expression de la molécule checkpoint PD-L1 par la signalisation JAK/STAT et la DDR dans les cellules de CETC exposées au 5-FU. 111	
III. Perspectives pour l'étude translationnelle du MT des CETC.....	115
Chapitre 4 : Références bibliographiques.....	119
Annexes.....	140
Annexe 1 : L'invasion périneurale dans les CETC : contexte, mécanismes et implications pronostiques.....	141
Annexe 2 : La signalisation ERK1/2 régule le microenvironnement tumoral et le recrutement des macrophages dans les glioblastomes.	159
Annexe 3 : L'apport de la génomique dans la prise en charge chirurgicale et dans l'étude des tumeurs orales.....	172

Table des illustrations

<i>Figure 1: Localisations primaires des CETC (d'après Sabatini and Chiocca, 2020).</i>	16
<i>Figure 2 : Infection de l'épithélium du col de l'utérus par l'HPV, différenciation des kératinocytes et expression des protéines virales (Graham, 2017)</i>	20
<i>Figure 3: Mode d'action des protéines transformantes E6 et E7 des HPV à haut risque</i>	21
<i>Figure 4 : Représentation schématique de la stratification des CETC selon la présentation de la tumeur (exemple des CETC de la cavité orale).....</i>	23
<i>Figure 5 : Oncoprint présentant les mutations les plus fréquentes dans les CETC, selon leur statut HPV et leur localisation</i>	29
<i>Figure 6: Profil génomique des CETC (Beck and Golemis, 2016).....</i>	32
<i>Figure 7 : ATM et ATR bloquent le cycle cellulaire après un DSB ou l'accumulation de ssDNA</i>	37
<i>Figure 8 : Exemple de létalité synthétique dans les tumeurs BRCA1/2 mutées avec l'utilisation des inhibiteurs de PARP</i>	40
<i>Figure 9 : Morphologie d'une cellule ferroptotique comparée à celle d'une cellule apoptotique (d'après Lachaier et al., 2014a).</i>	43
<i>Figure 10 : Vue d'ensemble des principaux acteurs du programme ferroptotique....</i>	44
<i>Figure 11 : Représentation simplifiée de la peroxydation lipidique des AGPI.....</i>	46
<i>Figure 12 : Les DAMP / alarmines et médiateurs lipidiques libérés par les cellules ferroptotiques et leurs PRR / récepteurs</i>	52
<i>Figure 13 : Les médiateurs de l'inflammation dans la ferroptose.....</i>	53
<i>Figure 14 Composition du Microenvironnement Tumoral</i>	56
<i>Figure 15 : Représentation des cellules pouvant composer l'infiltrat immunitaire....</i>	60
<i>Figure 16 : Catégories de tumeurs classées selon l'infiltrat immunitaire et l'inflammation du MT</i>	62
<i>Figure 17 : Eléments du MT pouvant déclencher une inflammation</i>	63
<i>Figure 18 : Comparaison de la densité de l'infiltrat tumoral immunitaire dans les 16 types de tumeurs les plus communs</i>	66
<i>Figure 19 : Représentation schématique du fonctionnement des ICB visant la voie PD-1 / PD-L1</i>	70

Figure 20 : Régulation transcriptomique de l'expression de PD-L1 dans les carcinomes épidermoïdes..... 74

Figure 21: L'expression de SLC7A11 dans les CETC présente une hétérogénéité inter et intra-tumorale. 116

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Présentation des principaux mécanismes de réparation et senseurs de la DDR (D'après (Giglia-Mari et al., 2011; Lord and Ashworth, 2012)).....</i>	<i>35</i>
<i>Tableau 2 : Liste de biomarqueurs candidats dans les CETC prédictifs de l'efficacité des ICB.....</i>	<i>72</i>
<i>Tableau 3: Vulnérabilité des cellules immunitaires aux inducteurs de la ferroptose (d'après Xu et al., 2021)</i>	<i>117</i>

Liste des principales abréviations

5-FU :	5-fluorouracile
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AGPI :	Acides Gras Polyinsaturés
ARN:	Acide Ribonucléique
ATM:	Ataxia Telangectasia Mutated
ATR:	Ataxia Telangectasia and Rad3 related
CAF:	Cancer-Associated Fibroblasts
CDKN2A:	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CETC :	Cancer épidermoïde de la tête et du cou
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DDR:	DNA Damage Response
DNA-PK:	DNA-dependent Protein Kinase
DOI:	Depth of Invasion
DSB:	Double Strand Break
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
FDA:	Food and Drug Administration
Fe:	Fer
GPx4:	Glutathione Peroxidase 4
GSH:	Glutathion (forme réduite)
GSSG:	Glutathion (forme oxydée)
HPV:	Human Papillomavirus
ICB:	Immune Checkpoint Blockade
IFN- γ :	Interferon gamma
IL :	Interleukine
IPN :	Invasion Périneurale
MDSC :	Myeloid-Derived Suppressor Cell
MEC :	Matrice Extracellulaire
MMP :	Matrix Metalloproteinase
MT :	Microenvironnement Tumoral
NHEJ:	Non-Homologous End-Joining
OP:	Oropharyngé
OS:	Overall Survival
PD-1:	Programmed Cell Death-1

PD-L1:	Programmed Death-Ligand 1
PFS:	Progression-Free Survival
PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA :	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate kinase (sous-unité catalytique alpha)
pRb :	Protéine du Rétinoblastome
ROS:	Reactive Oxygen Species
RSL3:	Ras Selective Lethal 3
RTK:	Récepteur Tyrosine Kinase
SLC7A11:	Solute Carrier Family 7 Member 11
SSB:	Single-Strand Break
ssDNA:	Single-stranded DNA
TAM:	Tumor-Associated Macrophage
TCGA:	The Cancer Genome Atlas
TGF- β :	Tumor Growth Factor beta
TNM:	Tumor Node Metastasis
TP53:	Tumor Protein 53

Chapitre 1 : Introduction

I. Les Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou (CETC)

I.1. Définition et épidémiologie des CETC

Les cancers de la tête et du cou représentent la septième cause de cancers dans le monde en 2020 en termes d'incidence (environ 772 000 nouveaux cas), soit 4% des nouveaux cas de cancers (Sung et al., 2021). Ils ont entraîné environ 467 000 décès la même année et se situaient au septième rang de mortalité par cancers (Sung et al., 2021). Les Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou (CETC) dérivent des epithelia stratifiés des voies aérodigestives supérieures, et constituent la majorité des tumeurs de la tête et du cou (Cohen et al., 2018). On les distingue selon leur localisation anatomique. Les localisations principales habituellement décrites dans la littérature sont la cavité orale, l'oropharynx, l'hypopharynx et le larynx (cf. *Figure 1*) (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Chow, 2020).

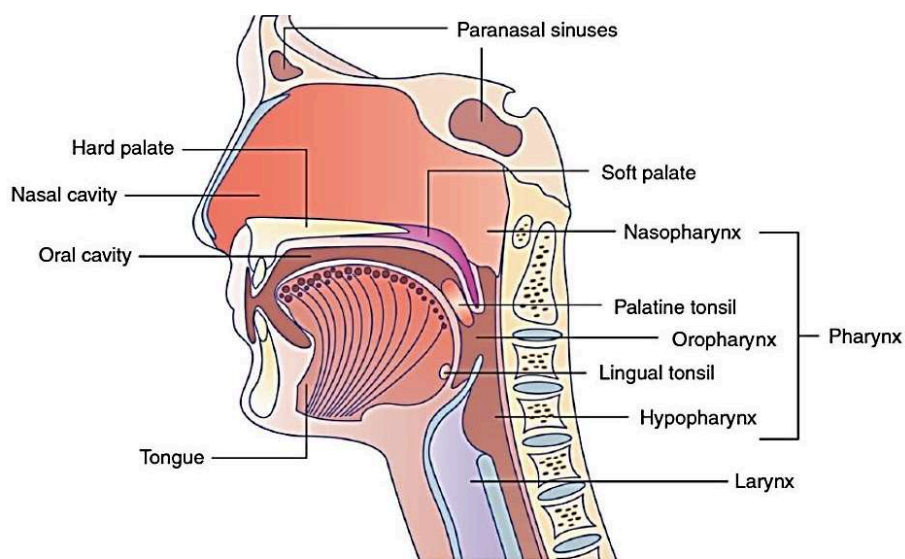


Figure 1: Localisations primaires des CETC (d'après Sabatini and Chiocca, 2020)

Schéma répertoriant les principales localisations des CETC, publié par Sabatini and Chiocca (2020) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.fr>). La cavité orale regroupe les lèvres, la muqueuse orale, la crête alvéolaire, la partie antérieure de la langue, le palais, les gencives (supérieures et inférieures) et le trigone rétro-molaire. Les CETC du nasopharynx, de l'oropharynx et de l'hypopharynx constituent les CETC pharyngés (Sabatini and Chiocca, 2020).

Nous ne traiterons pas dans ce manuscrit des carcinomes nasopharyngés puisqu'ils constituent une catégorie à part entière de cancers tête et cou sur le plan épidémiologique, histologique et thérapeutique (Chow, 2020). La survie globale à 5 ans des patients atteints de CETC est estimée aux alentours de 60% (Johnson et al., 2020). La survie globale s'est améliorée ces dernières années, notamment du fait de l'émergence de nouvelles thérapeutiques approuvées dans les CETC récidivants / métastatiques telles que l'immunothérapie (Burtness et al., 2019), ainsi que l'augmentation de la proportion de CETC positifs au papillomavirus humain (HPV) (CETC HPV+ve), qui répondent globalement mieux aux traitements et montrent une meilleure survie globale que les CETC négatifs à HPV (CETC HPV-ve) (Chow, 2020).

I.2. Facteurs carcinogènes des CETC

Le principal facteur de risque des CETC est une intoxication tabagique et / ou alcoolique chronique (Cohen et al., 2018). Néanmoins, une cause émergente de CETC oropharyngés est l'infection par certaines souches d'HPV (Cohen et al., 2018; Tumban, 2019). Les CETC oropharyngés HPV positifs (CETC OP HPV+ve) présentent des particularités puisqu'ils touchent généralement des sujets plus jeunes, possèdent une biologie différente et sont de meilleur pronostic que les CETC HPV-ve (Chow, 2020). D'autres facteurs de risques moins fréquents ont été rapportés, comme une exposition aux polluants atmosphériques ou aux radiations, une mauvaise hygiène bucco-dentaire ou encore la mastication de noix de Betel (Cohen et al., 2018).

I.2.1. Le rôle de l'alcool et du tabac dans les CETC

Les facteurs de risque principaux des CETC HPV-ve sont donc la consommation d'alcool et/ou de tabac. Ces deux substances sont connues comme étant des carcinogènes avérés (Jethwa and Khariwala, 2017; Mizumoto et al., 2017). Elles contiennent toutes deux des composés génotoxiques susceptibles d'entraîner des lésions de l'ADN lors de leur consommation (Jethwa and Khariwala, 2017; Ma et al., 2019; Mizumoto et al., 2017).

Le tabac contient plusieurs milliers de molécules cancérigènes, dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et nitrosamines, connus pour être

mutagènes (Jethwa and Khariwala, 2017; Ma et al., 2019). Ces molécules peuvent être éliminées après leur inhalation ou ingestion, après avoir été métabolisées sous une forme détoxifiée (Jethwa and Khariwala, 2017). Si leur excrétion échoue, elles persistent dans l'organisme et peuvent se fixer à l'ADN (Acide Désoxyribonucléique), créant ainsi des structures appelées adduits à l'ADN (Ma et al., 2019). Certaines voies du métabolisme de ces composés peuvent également aboutir à la formation d'adduits (Ma et al., 2019). Ces adduits constituent de graves dommages à l'ADN (Jethwa and Khariwala, 2017). S'ils ne sont pas pris en charge par les mécanismes cellulaires de réparation, des mutations peuvent survenir au niveau des séquences de gènes suppresseurs de tumeurs ou au contraire de proto-oncogènes (Jethwa and Khariwala, 2017). L'expression normale de ces gènes est indispensable au maintien de la stabilité du génome, et leur dérégulation favorise l'initiation de la cancérogenèse (Jethwa and Khariwala, 2017). D'autres mécanismes impliquant les composés de la fumée de cigarette dans l'initiation de la cancérogenèse existent. Parmi ceux-ci figure la méthylation inactivant potentiellement l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Jethwa and Khariwala, 2017).

La consommation d'alcool est elle aussi impliquée dans la cancérogenèse des CETC. En effet, le métabolisme de l'éthanol en acétaldéhyde peut être à l'origine de la formation d'adduits à l'ADN (Mizumoto et al., 2017). Par ailleurs, l'éthanol joue un rôle de solvant, potentialisant l'absorption des molécules cancérigènes du tabac dans les VADS (Johnson et al., 2020). La consommation concomitante d'alcool et de tabac aboutit donc à une multiplication des risques de cancers dans ces localisations anatomiques.

1.2.2. Le papillomavirus humain dans les CETC oropharyngés

Les CETC OP HPV+ve constituent un sous-ensemble à part de CETC. Ils montrent généralement une biologie particulière et un meilleur pronostic (Ang et al., 2010; Chow, 2020). L'HPV est un virus non enveloppé et encapsidé à ADN double brin circulaire appartenant à la famille des Papillomaviridae (Harden and Munger, 2017). Il s'agit d'un virus strictement humain se transmettant par voie sexuelle ou cutanée, infectant les cellules des epithelia malpighiens.

Il existe de nombreux génotypes d'HPV, classés en plusieurs genres selon leur tropisme et les pathologies qu'ils engendrent (Doorbar et al., 2012). Nous nous

intéresserons ici uniquement au genre alpha, incluant les HPV de tropisme muqueux. Parmi ces HPV alpha, il existe des souches d'HPV non carcinogènes, à bas risque carcinogène et à haut risque carcinogène. Les HPV 16 et 18 sont reconnus par l'Organisation Mondiale de la Santé comme les deux souches principales d'HPV à haut risque carcinogène (Bouvard et al., 2009). Ils sont responsables de la majorité des cancers du col de l'utérus (de Martel et al., 2017) et sont présents dans environ 85% des CETC HPV+ve (de Martel et al., 2017, Tumban, 2019). L'HPV 16 est la souche la plus représentée au sein des CETC HPV+ve (environ 70% des HPV retrouvés dans les CETC HPV+ve) (de Martel et al., 2017, Tumban, 2019).

Le génome de l'HPV contient 8 gènes divisés en deux catégories selon le stade du cycle viral auquel ils s'expriment: les gènes précoces (*E* pour Early : *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7*) et les gènes tardifs (*L* pour Late : *L1* et *L2*) (Harden and Munger, 2017). Chaque gène code pour une protéine qui porte le même nom que son gène. Les gènes *E* contrôlent la réplication virale, les gènes *L* codent pour les protéines de la capside (Harden and Munger, 2017).

Chaque HPV présentant des spécificités dans son cycle de réplication virale, nous aborderons ici les aspects du cycle des HPV 16 et 18 (Graham, 2017). Les étapes de ce cycle et l'expression des protéines virales suivent la différenciation de l'épithélium infecté (cf. *Figure 2*). La particularité du cycle des HPV à haut risque réside dans l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte (Graham, 2017). Ils exploitent ainsi la machinerie cellulaire pour se répliquer et transcrire leur matériel génétique (Graham, 2017). Lorsque les cellules infectées ne sont pas éliminées par le système immunitaire de l'hôte, l'infection par HPV devient persistante et favorise la formation de la tumeur (Graham, 2017).

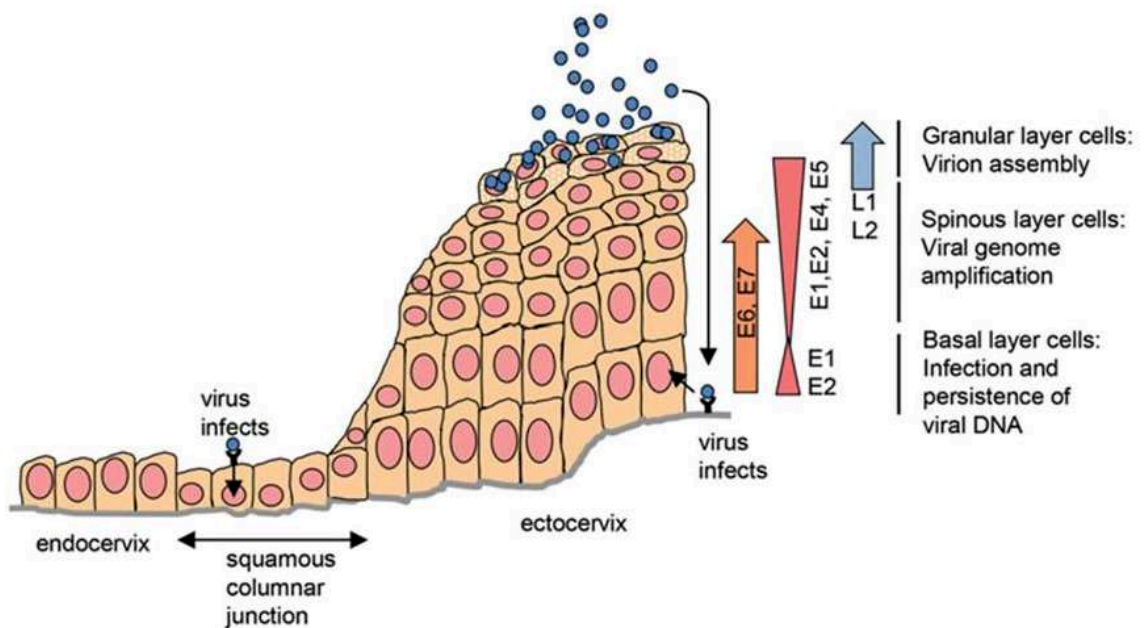


Figure 2 : Infection de l'épithélium du col de l'utérus par l'HPV, différenciation des kératinocytes et expression des protéines virales (Graham, 2017)

Schéma publié par Graham (2017) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Le virus pénètre tout d'abord les kératinocytes de l'épithélium basal. Il entame ensuite la phase non productive de son cycle de réplication ; les gènes *E* sont exprimés dans les cellules basales, les gènes *L* ne sont pas encore exprimés. A mesure que les kératinocytes se différencient, les gènes *L* sont exprimés, de nouveaux virions sont libérés par la cellule infectée et peuvent infecter de nouvelles cellules. Cette étape du cycle de réplication viral est appelée phase productive. Une étape spécifique des HPV à haut risque consiste en l'intégration du génome de l'HPV à celui de la cellule hôte, et à l'expression des protéines transformantes *E6* et *E7* codées par les gènes viraux précoces *E6* et *E7*. L'expression de ces protéines conduit la cellule à acquérir des propriétés de cellules tumorales.

Pour les HPV à haut risque carcinogène, les gènes *E* contrôlent l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte. Les gènes *E5*, *E6* et *E7* sont également des oncogènes dont l'expression persistante est cruciale pour que la cellule infectée devienne tumorale (Hoppe-Seyler et al., 2018). Ils codent pour les protéines transformantes *E5*, *E6* et *E7* responsables de la carcinogénèse des cellules infectées par HPV (Hoppe-Seyler et al., 2018). Les protéines *E6* et *E7* sont respectivement responsables de l'inactivation de p53 et de la séquestration de la protéine du rétinoblastome (pRB) (Halbert et al., 1991; Scheffner et al., 1990) (cf. Figure 3).

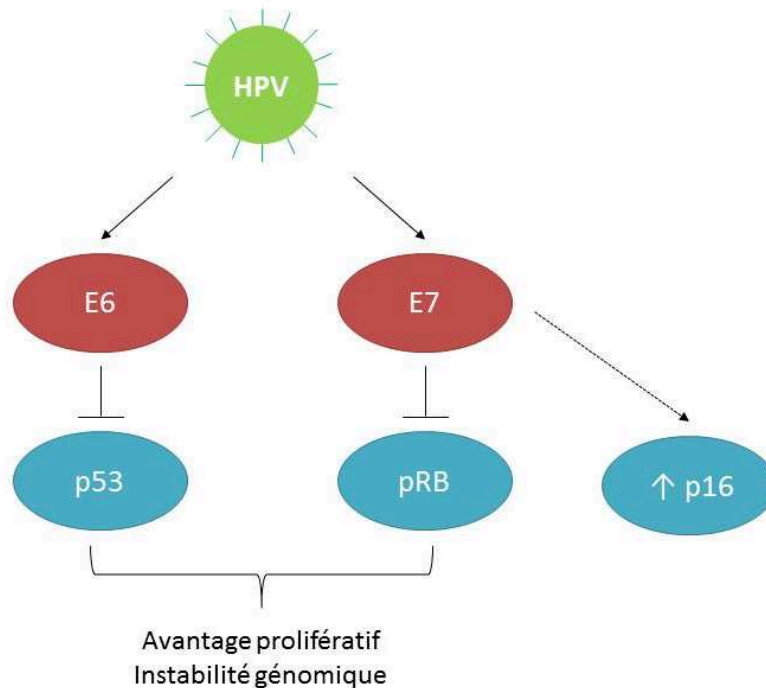


Figure 3: Mode d'action des protéines transformantes E6 et E7 des HPV à haut risque

Les protéines transformantes E6 et E7 de l'HPV inhibent respectivement les protéines p53 et pRB. Ces protéines contrôlent physiologiquement le cycle cellulaire et garantissent l'intégrité du génome. La protéine E6 inhibe l'acétylation activatrice de p53 et se lie à p53 et E6AP (ubiquitine ligase), entraînant l'ubiquitinylation de p53 et sa dégradation par le protéasome (Hoppe-Seyler et al., 2018). La protéine E7 quant à elle se fixe sur pRB, empêchant la formation du complexe pRB avec le facteur de transcription E2F. E2F peut alors autoriser la progression du cycle cellulaire grâce à la transcription de la cycline A (Hoppe-Seyler et al., 2018). La protéine p16 inhibe habituellement la libération de pRb du complexe pRb-E2F. Lorsque la formation du complexe pRb – E2F est bloquée par E7 et que le cycle progresse de façon anarchique, la protéine p16 est surexprimée par une boucle de rétrocontrôle. Le blocage de p53 et pRb permet aux cellules touchées d'acquies plusieurs caractéristiques tumorales (Halbert et al., 1991; Scheffner et al., 1990).

La protéine p53 remplit de nombreux rôles dans la cellule. Elle assure la sauvegarde de l'intégrité du génome et est ainsi appelée communément gardien du génome (Boutelle and Attardi, 2021; Kastenhuber and Lowe, 2017). En tant que facteur de transcription, elle favorise l'expression de gènes impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires incluant la réparation de l'ADN en réponse à un stress cellulaire (Kastenhuber and Lowe, 2017). P53 peut également favoriser la mort cellulaire par apoptose en cas de dommages trop importants de l'ADN (Boutelle and Attardi, 2021; Kastenhuber and Lowe, 2017). Les mécanismes précis d'engagement

préférentiel induit par p53 dans la voie de réparation de l'ADN ou de l'apoptose restent mal connus (Boutelle and Attardi, 2021; Kasthuber and Lowe, 2017).

Les cellules transformées par E6 et E7 deviennent insensibles aux signaux de mort cellulaire par apoptose activant p53 et prolifèrent de façon incontrôlée. La dérégulation du cycle cellulaire par l'inhibition de p53 et le blocage de pRb favorise également la survenue d'erreurs dans le génome qui ne sont plus corrigées (Zhao et al., 2016). Ces modifications dans la biologie des cellules infectées correspondent à l'acquisition de propriétés tumorales et favorisent la transformation des cellules infectées en cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

I.3. Prise en charge thérapeutique des CETC

I.3.1. Diagnostic des CETC

Le diagnostic des CETC repose principalement sur l'examen clinique du patient, l'imagerie médicale (tomodensitométrie et/ou Imagerie par Résonance Magnétique) et est confirmé par l'examen anatomopathologique de prélèvement de biopsies. Les signes d'appels des CETC peuvent être déclarés par le patient (glossopathie, odynophagie ou dysphonie par exemple), reposer sur la constatation d'une masse anormale dans la sphère ORL (Machiels et al., 2020) ou encore de lésions orales potentiellement malignes (OPMD pour Oral Potentially Malignant Disease) (Warnakulasuriya, 2020). Les OPMD correspondent à des états ou des lésions observés dans la cavité orale qui ont un potentiel de transformation maligne (Warnakulasuriya et al., 2007). On peut citer par exemple les leuco / érythroplasies (plaques orales blanches et / ou rouges), les fibroses sous-muqueuses ou encore les lichens plans (Warnakulasuriya et al., 2007). Le risque de transformation maligne des OPMD est estimé entre 2 et 5% de la durée de vie des patients (Saidak et al., 2021a).

I.3.2. Stratification des CETC

Les CETC sont stratifiés selon la huitième version de la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) (Chow, 2020; Huang and O'Sullivan, 2017). Dans cette classification, la taille de la tumeur, la présence de métastases ainsi que plusieurs facteurs de récives sont pris en compte : l'invasion des ganglions lymphatiques, la profondeur d'invasion ou DOI (Depth of Invasion), l'envahissement des marges

chirurgicales après résection, la rupture extracapsulaire et l'invasion périneurale (IPN) (Machiels et al., 2020) (cf. *Figure 4*). L'imagerie médicale (tomodensitométrie et/ou Imagerie par Résonance Magnétique mais aussi Tomographie par Emission de Positons avec le 18-fluorodeoxyglucose) et un examen clinique des voies aérodigestives supérieures sont utilisés pour déterminer le statut TNM clinique de la tumeur (Machiels et al., 2020).

Les tumeurs de grade I et II sont des tumeurs de petite taille, sans ou avec une atteinte ganglionnaire mineure (Chow, 2020). Les tumeurs de grade III et IV sont des tumeurs localement avancées, avec l'invasion d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques et la présence éventuelle de métastases (Chow, 2020).

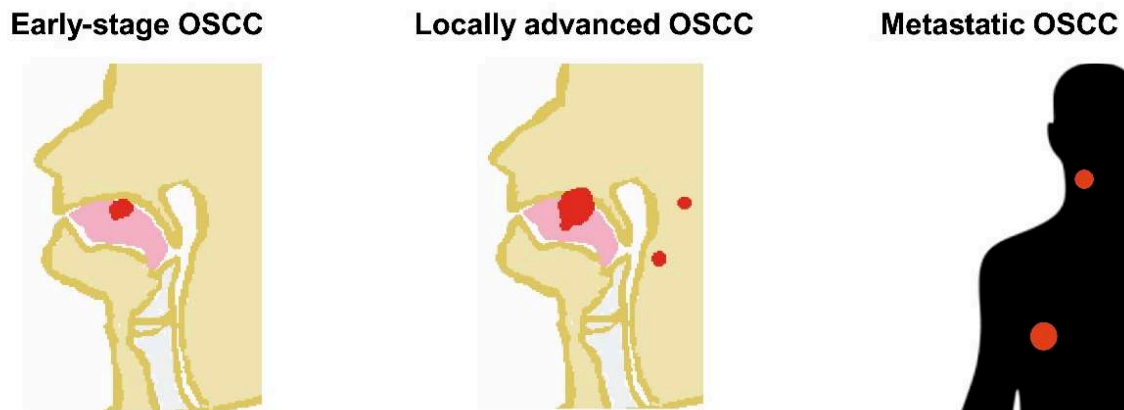


Figure 4 : Représentation schématique de la stratification des CETC selon la présentation de la tumeur (exemple des CETC de la cavité orale)

La recherche des critères de gravité des CETC selon la présentation de la tumeur au diagnostic peut schématiquement se résumer selon trois cas de figures. Ici, on prend l'exemple des CETC de la cavité orale (OSCC pour Oral cavity Squamous Cell Carcinoma). Concernant les CETC de bas grade (« Early-stage OSCC »), la recherche de ganglions lymphatiques envahis ou de métastases constitue la préoccupation majeure du clinicien après la détermination du grade de la tumeur. Pour les tumeurs de présentation localement avancée (Locally Advanced OSCC), la question de la résécabilité chirurgicale se pose, ainsi que celle de l'envahissement des marges chirurgicales par les cellules tumorales le cas échéant. Aussi, le risque de récurrence doit être évalué selon les critères de la classification TNM. Enfin, si la présence de métastases est avérée, une des priorités est de rechercher des mutations pouvant être ciblées en thérapeutique et de personnaliser la prise en charge du patient.

Une des nouveautés majeures dans la huitième classification TNM concernant les CETC est la prise en compte de la biologie tumorale (Huang and O'Sullivan, 2017). En effet, la détermination du statut HPV du patient atteint de CETC OP est désormais nécessaire (Chow, 2020; Huang and O'Sullivan, 2017; Machiels et al., 2020). Celui-ci est déterminé grâce à la recherche de la protéine p16, positive voire surexprimée dans la majorité des CETC HPV+ve, au contraire des CETC HPV-ve. La distinction entre HPV-ve et HPV+ve pour les patients atteints de CETC OP est importante car les CETC OP HPV+ve bénéficient d'un classement distinct dans la classification TNM (Chow, 2020).

L'examen de plusieurs des critères de classification TNM, repose sur l'anatomopathologie : l'invasion angiolymphatique (ALI), l'invasion des marges chirurgicales, ou encore l'IPN, c'est-à-dire classiquement la présence de cellules tumorales sur plus de 33% de la circonférence des fibres nerveuses d'un diamètre supérieur à 1 mm (Saidak et al., 2020). Une difficulté de taille pour l'étude et la détection de l'IPN est le manque de standardisation dans son diagnostic anatomopathologique. Par exemple, toutes les études ne considèrent pas les nerfs à partir du même diamètre, faisant varier le pourcentage d'observation d'IPN dans les CETC entre 14 et 63% (Roh et al., 2015). La recherche de biomarqueurs validés et standardisés associés à ces critères diagnostics et pronostiques serait donc d'une aide précieuse pour les cliniciens, appuyant les observations des anatomopathologistes.

Plusieurs possibilités sont envisageables afin de trouver ces biomarqueurs, et un domaine exploité dans cette problématique est l'étude de la transcriptomique (qui correspond à l'étude de l'ensemble des ARN messagers reflétant l'expression des gènes) (Saidak et al., 2020). L'étude de l'expression des gènes est un outil précieux en biologie. Elle permet d'établir des signatures de gènes associées à l'observation d'un évènement biologique, comme l'ALI ou l'IPN (Goesswein et al., 2018; Hu et al., 2020; O'Donnell et al., 2005). De cette façon, des travaux ont récemment identifié une signature de gènes associée à l'IPN comme prédictive d'un risque de récurrence dans un groupe de patients à priori à faible risque de récidiver (c'est-à-dire ne présentant pas d'ALI ou de rupture extracapsulaire) (Saidak et al., 2018).

1.3.3. Traitements des CETC

Le traitement des CETC dépend de la localisation de la tumeur, des critères évoqués dans la partie précédente ainsi que de l'état général du patient. Classiquement, ce traitement comporte trois modalités principales ; la chirurgie (résection de la tumeur), la radiothérapie et les traitements systémiques (chimiothérapie, thérapie ciblée et immunothérapie) (Chow, 2020). Concernant les tumeurs localisées, la chirurgie et la radiothérapie sont généralement utilisées en monothérapie, et sont choisies notamment en fonction du caractère opérable du patient et de la résécabilité de la tumeur (Chow, 2020; Pfister et al., 2020). L'objectif de la chirurgie est de réséquer totalement la tumeur au niveau macroscopique et microscopique, tout en conservant au maximum les fonctions du patient (nutrition, phonation) (Cramer et al., 2019a). La présence de facteurs de risques de récurrence, par exemple si l'on constate après résection tumorale que les marges chirurgicales sont envahies (R post-opératoire > 0), est une indication à l'instauration d'une radio/chimiothérapie concomitante adjuvante par la suite (Chow, 2020). Dans le cas de tumeurs localement avancées inopérables (présentant par exemple une invasion locale marquée, l'invasion de ganglions lymphatiques), le traitement choisi est la radio/chimiothérapie concomitante exclusive (Chow, 2020).

Les molécules de chimiothérapie conventionnelle utilisées le plus fréquemment dans les CETC sont les sels de platine (agents alkylants de l'ADN), les taxanes (poison du fuseau mitotique) et le 5-fluorouracile (5-FU) (Pfister et al., 2020). Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au 5-FU. Le 5-FU est un antinéoplasique cytostatique : il bloque la prolifération des cellules tumorales. Il appartient à la classe thérapeutique des antimétabolites ; il modifie le métabolisme physiologique des cellules en inhibant la synthèse des bases pyrimidiques de l'ADN : la cytosine et la thymine. Le 5-FU est métabolisé en 5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate (FdUMP), qui va se fixer à l'enzyme responsable de la synthèse de ces bases, la thymidilate synthétase. Le 5-FU inhibe ainsi la synthèse de la thymine. Du fait de sa structure d'analogue pyrimidique, il est aussi incorporé dans l'ADN et l'ARN, causant des dommages à ces structures (Vodenkova et al., 2020).

La prise en charge thérapeutique des CETC a connu ces dernières années une évolution continue, notamment grâce à l'émergence des thérapies ciblées dans un

premier temps, puis de l'immunothérapie (Cramer et al., 2019a). En effet, ces nouvelles stratégies thérapeutiques associant plusieurs modalités sont maintenant utilisées dans les CETC récidivants / métastatiques, en association avec la chimiothérapie (Chow, 2020). C'est dans ce cadre que le cetuximab, un anticorps dirigé contre l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) et obtenu en France une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement des CETC récidivants / métastatiques. Le rationnel en faveur de l'utilisation de cet anticorps réside dans l'activation fréquente de l'EGFR dans les CETC, par mutation / amplification d'EGFR mais également surexpression fréquente de ses ligands (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Huang et al., 2021). Le cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé spécifiquement contre le domaine de liaison de l'EGFR, avec une forte affinité. Le cetuximab couplé à la chimiothérapie a montré des bénéfices en terme de survie globale (OS pour Overall Survival) et de survie sans progression (PFS pour Progression Free Survival) dans les CETC récidivants / métastatiques par rapport à la chimiothérapie seule (Vermorken et al., 2008). Cet anticorps associé à la radiothérapie a montré des bénéfices en termes de PFS / OS inférieurs en comparaison de la radio-chimiothérapie concomitante à base de cisplatine dans le traitement des CETC localement avancés (Ley et al., 2013; Walsh et al., 2011). Ainsi, la radio-chimiothérapie reste le traitement standard dans les CETC localement avancés, mais le cetuximab peut être utilisé en cas de contre-indication à la chimiothérapie.

L'immunothérapie tient une place croissante dans la prise en charge des CETC (Chow, 2020; Pfister et al., 2020). En effet, son utilisation en association avec la chimiothérapie ou seule a montré des bénéfices en termes de survie globale et de tolérance par rapport aux traitements standards dans les CETC récidivants / métastatiques (Burtness et al., 2019; Cohen et al., 2019a; Ferris et al., 2016). Dans ce cadre, deux inhibiteurs de points de contrôle (ICB pour Immune Checkpoint Blockade) sont approuvés par la FDA depuis 2016 et ont reçu également une AMM dans les CETC récidivants ou métastatiques : le pembrolizumab (Burtness et al., 2019; Cohen et al., 2019a) et le nivolumab (Ferris et al., 2016). Ces anticorps monoclonaux ciblent tous deux le récepteur PD-1 (Programmed cell Death 1), exprimé notamment par les lymphocytes T (LT). Ils bloquent la liaison de ces récepteurs avec leurs ligands, empêchent l'inactivation des cellules immunitaires et restaurent la réponse immunitaire

vis-à-vis des cellules cancéreuses (Blank et al., 2019) (cf. partie III.4). Des résultats précliniques encourageants concernant l'utilisation de la radiothérapie couplée à l'immunothérapie (Newton et al., 2019; Oweida et al., 2017) ont favorisé la mise en place d'essais cliniques dans les CETC localement avancés et récurrents / métastatiques afin d'évaluer le bénéfice de cette association (Qian and Schoenfeld, 2021).

Enfin, de nombreux essais thérapeutiques sont en cours pour la prise en charge spécifique des CETC OP HPV+ve (Chow, 2020). Des essais de désintensification des traitements pour ces tumeurs ont été mis en place, du fait de leur statut global de meilleur répondeur aux thérapeutiques (Ang et al., 2010; Chow, 2020; Cramer et al., 2019a).

L'utilisation croissante de ces traitements personnalisés s'inscrit dans le cadre plus large de la médecine personnalisée, c'est-à-dire basée sur des biomarqueurs des tumeurs traitées. La biologie, grâce à la définition de biomarqueurs standardisés prédictifs de la réponse au traitement, offre donc des perspectives intéressantes dans la prise en charge des CETC.

I.4. Altérations génomiques fréquentes et retentissement sur les voies de signalisation dans les CETC

Le génome des cellules de CETC subit des altérations, survenant à la suite de l'intervention de plusieurs mécanismes comme des mutations mais aussi une instabilité génomique (Leemans et al., 2018). Comme c'est globalement le cas pour les carcinomes à cellules squameuses, les CETC peuvent également présenter une dérégulation de la machinerie épigénétique (Campbell et al., 2018). Ces événements structuraux et épigénétiques mènent à l'invalidation des gènes ayant une fonction suppressive de tumeurs, et à une activation des proto-oncogènes (Campbell et al., 2018 ; Demokan and Dalay, 2011). Nous présenterons dans cette partie les principales modifications génomiques rencontrées dans les cellules de CETC, ainsi que leurs conséquences sur les voies de signalisation cellulaire et leurs implications quant à la multiplication et la survie des cellules cancéreuses.

I.4.1. Modifications structurelles du génome

Bien que les CETC HPV-ve soient des tumeurs hétérogènes, ils sont caractérisés par la mutation fréquente de gènes clefs. La quantité et le profil des gènes mutés varient entre les CETC HPV-ve et les CETC HPV+ve (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018). En effet, les CETC HPV-ve ont une charge mutationnelle nettement supérieure à celle des CETC HPV+ve (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018). Ceci s'explique notamment par le fait que les CETC HPV-ve soient en grande partie causés par la consommation tabagique, à l'origine de nombreuses mutations (Jethwa and Khariwala, 2017; Ma et al., 2019). Les gènes les plus fréquemment mutés dans les CETC sont présentés par l'étude du TCGA (The Cancer Genome Atlas) en *Figure 5*. A ces mutations s'ajoutent les modifications entraînées par l'instabilité génomique régnant dans les CETC. On observe en effet pour plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs ou proto-oncogènes des altérations du nombre de copies (amplifications ou délétions) (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018).

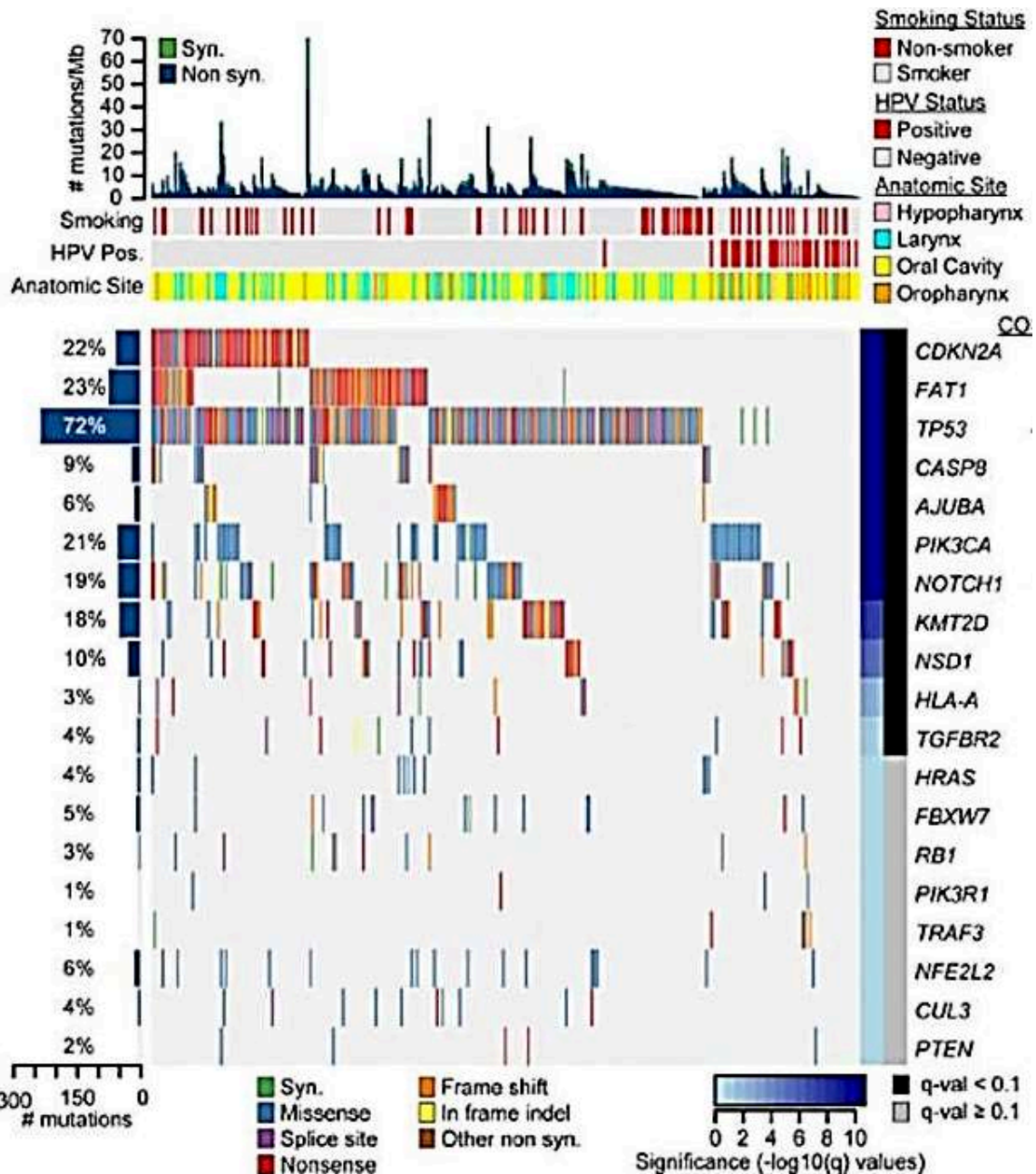


Figure 5 : Oncoprint présentant les mutations les plus fréquentes dans les CETC, selon leur statut HPV et leur localisation

Cet oncoprint est tiré d'une étude menée en 2015 dans la cohorte du TCGA (The Cancer Genome Atlas) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>) (Cancer Genome Atlas Network, 2015). En haut de la figure (dans le premier graphique) sont indiqués les données sur le statut tabagique des patients, le statut HPV et la localisation tumorale des tumeurs analysées. Les CETC HPV-ve sont situés sur la partie gauche de l'oncoprint, les CETC HPV+ve sur la partie droite. En dessous sont indiqués les types de mutations des gènes et leur significativité, représentée par l'échelle de couleur bleue (plus celle-ci est intense et plus la mutation a été souvent observée). On observe une charge mutationnelle plus élevée dans les CETC HPV-ve, en particulier concernant le gène TP53. Le seul gène dont les auteurs ont observé la mutation fréquente dans les CETC HPV+ve est le gène PIK3CA.

Gènes fréquemment invalidés dans les CETC

Les mutations ou délétions les plus fréquemment observées dans les CETC HPV-ve sont celles du gène suppresseur de tumeur *TP53* (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018). Le gène *CDKN2A* est lui aussi fréquemment muté dans les CETC HPV-ve (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Zhao et al., 2016). Ces deux gènes codent respectivement pour les protéines p53 et p16^{INK4A}, aussi appelée CDKN2A (inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A). La protéine p53 contrôle normalement l'activation des checkpoints du cycle cellulaire en activant la transcription de la protéine p21. P21 bloque la formation des complexes cyclines – CDK, permettant le passage du cycle à l'étape suivante (Abbas and Dutta, 2009). La protéine p16^{INK4A} exerce quant à elle, dans les conditions normales, un rôle d'induction des points de contrôle du cycle cellulaire en empêchant la formation du complexe cycline D- CDK 4/6, qui autorise la progression du cycle cellulaire (Zhao et al., 2016). Le gène *TP53* n'est pas ou très peu muté dans les CETC HPV+ve (Cancer Genome Atlas Network, 2015). En revanche, la protéine p53 est inactivée par l'action de la protéine transformante E6, comme vu dans la partie I.2.2 (Hoppe-Seyler et al., 2018).

On observe également la mutation / délétion fréquente de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire : *FAT1* et *AJUBA* pour les CETC HPV-ve, et *NOTCH1* pour tous les CETC (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015). Si les gènes *FAT1* (FAT Atypical Cadherin 1) et *AJUBA* (Ajuba LIM Protein) ont un rôle de suppresseur de tumeur bien établi dans les CETC (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018; Lin et al., 2018), le statut de *NOTCH1* est plus controversé (Fukusumi and Califano, 2018). En effet, une suractivation de la voie NOTCH1 corrèle avec des facteurs de mauvais pronostic tels que l'invasion métastatique (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Fukusumi and Califano, 2018).

Les gènes *KMT2D* (lysine methyltransferase 2D) et *NSD1* (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1) sont fréquemment invalidés dans tous les CETC (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Ces gènes codent pour des méthyltransférases, des enzymes régulant négativement l'expression des gènes en transférant un groupement méthyle sur leur ADN. Ils jouent également un rôle de suppresseur de tumeur (Leemans et al., 2018).

Gènes fréquemment activés dans les CETC

Le gène *PIK3CA*, codant pour la sous-unité catalytique de la phosphatidylinositol-3,4- biphosphate kinase, est fréquemment activé dans les CETC (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Cette kinase est notamment impliquée dans la voie de signalisation oncogénique Akt. L'activation de la kinase Akt favorise l'inflammation, l'angiogenèse, la migration, la progression dans le cycle cellulaire et la survie cellulaire (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015). *PIK3CA* est la mutation / amplification la plus fréquemment retrouvée dans les CETC HPV+ve, c'est-à-dire dans environ 50% des CETC HPV+ve (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Plusieurs gènes codant pour des récepteurs de tyrosine kinases (RTK) sont également mutés / amplifiés dans les CETC. C'est le cas de l'*EGFR* dans tous les CETC (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Le gène *FGFR1* (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) est fréquemment amplifié dans les CETC HPV-ve, alors que *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3) est fréquemment muté ou fusionné avec le gène *TACC* (*Transforming Acidic Coiled-coil*) dans les CETC HPV+ve (Cancer Genome Atlas Network, 2015). L'activation de ces RTK mène notamment à l'activation constitutive de leur voies de signalisation en aval incluant la voie PI3K/Akt (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015). Par ailleurs, la surexpression des ligands de l'*EGFR* a été rapportée dans certains CETC (Huang et al., 2021). La surexpression de ces ligands définit en outre un sous-type de CETC et est associée à une meilleure réponse au ciblage de l'*EGFR* en termes de PFS (Huang et al., 2021).

De même, le gène *CCND1* (Cyclin D1) codant pour la cycline D1 est fréquemment amplifié dans les CETC HPV-ve, favorisant la progression du cycle cellulaire (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015).

Ces modifications génomiques dans les CETC ont un impact sur plusieurs voies de signalisation cellulaires impliquées principalement dans la régulation du cycle cellulaire, la signalisation RTK / RAS / PI(3)K et la différenciation cellulaire (cf. *Figure 6*).

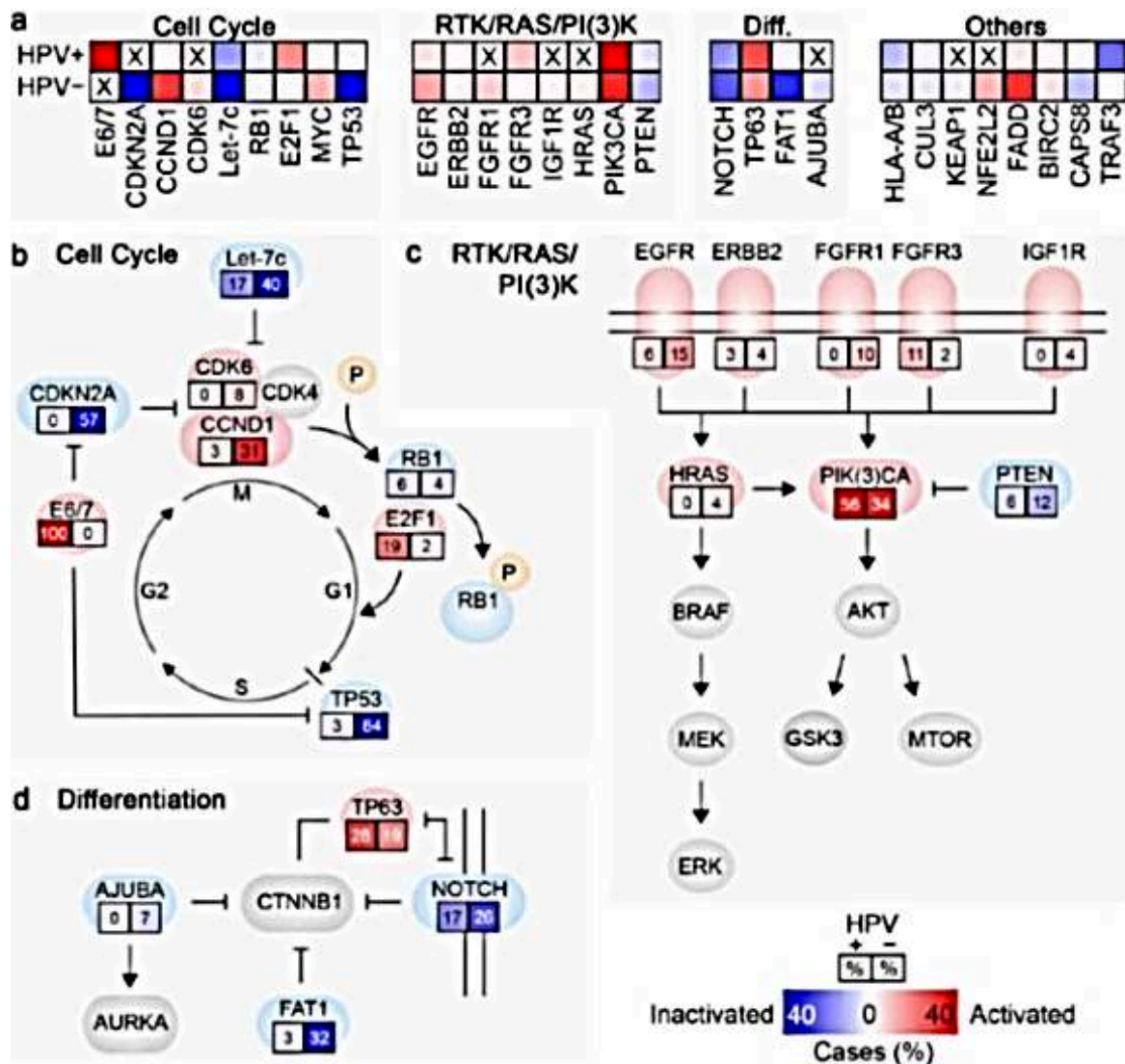


Figure 6: Profil génomique des CETC (Beck and Golemis, 2016)

Figure tirée d'une étude menée sur la cohorte du TCGA (Beck and Golemis, 2016) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Les altérations les plus fréquentes sont présentées dans la figure 5 a, selon le statut HPV des CETC et sont expliquées dans les figures 5 b, c et d selon leur fonction. Globalement, les modifications génomiques dans les CETC entraînent une dérégulation du cycle cellulaire, une diminution de la différenciation cellulaire, ainsi qu'une suractivation des voies de signalisation oncogéniques RTK / RAS / PI(3)K.

1.4.2. Modifications épigénétiques dans les CETC

Les modifications épigénétiques jouent également un rôle important dans la biologie des CETC (Beck and Golemis, 2016). En effet, les CETC appartiennent à la catégorie des carcinomes à cellules squameuses, présentant fréquemment une hypométhylation globale de l'ADN (Demokan and Dalay, 2011). Celle-ci dé-réprime l'expression de proto-oncogènes, ce qui peut avoir comme conséquence l'activation

constitutive de voies de signalisation favorisant la croissance tumorale (Campbell et al., 2018 ; Richards et al., 2009). Dans les tumeurs à cellules squameuses, certaines régions clés de l'ADN peuvent au contraire être hyperméthylées, réprimant notamment l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (Campbell et al., 2018 ; Johnson et al., 2020). Dans les CETC, c'est le cas par exemple pour les régions comportant les séquences des gènes *CDKN2A* et *MGMT*, ce dernier codant pour une méthyltransférase impliquée dans la réparation des gènes (Viswanathan et al., 2003; Zhao et al., 2016).

I.5. La Réponse aux dommages de l'ADN

I.5.1. Définition et grandes voies de la réponse aux dommages de l'ADN

La Réponse aux dommages de l'ADN ou DDR (pour DNA Damage Response) correspond aux mécanismes cellulaires mis en œuvre pour détecter, réparer les dommages subis par l'ADN ou induire la mort cellulaire en cas de dommages irréparables (Giglia-Mari et al., 2011). Ces mécanismes sont cruciaux pour maintenir la stabilité du génome puisque l'ADN subit chaque jour plusieurs milliers de lésions (Giglia-Mari et al., 2011). Différents facteurs peuvent entraîner ces lésions de l'ADN. Ils peuvent être d'origine endogène (avec l'émission d'espèces réactives de l'oxygène [ROS pour Reactive Oxygen Species] lors d'un stress cellulaire oxydant, l'hydrolyse spontanée des nucléotides), ou exogènes (comme les rayons ultraviolets, certaines infections virales, certaines chimiothérapies, les radiations ionisantes) (Giglia-Mari et al., 2011; Ryan et al., 2016). Les lésions induites sont de natures très variées (cf. Tableau 1) : certaines substances chimiques comme les nitrosamines du tabac créent des adduits sur l'ADN (Blackford and Jackson, 2017; Jethwa and Khariwala, 2017) alors que les ROS peuvent par exemple provoquer des cassures simple brin (Giglia-Mari et al., 2011). La diversité de ces altérations fait que la DDR implique diverses voies de signalisation cellulaires, détectant et réparant les erreurs génomiques (Giglia-Mari et al., 2011). On distingue ainsi schématiquement six mécanismes majeurs de réparation selon la lésion de l'ADN, présentés dans le Tableau 1.

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés aux kinases ATM et ATR, activées en réponse à la détection de cassures doubles brins (DSB pour Double Strand Break) ou à l'accumulation d'ADN simple brin (ssDNA pour Single-Stranded DNA) (Blackford and Jackson, 2017).

Tableau 1 : Présentation des principaux mécanismes de réparation et senseurs de la DDR (D'après Giglia-Mari et al., 2011; Lord and Ashworth, 2012)).

	Lésions ADN Facteurs	Exemples de Senseurs
NER	Dimères de pyrimidine <i>UV</i> Adduits ADN <i>Xénobiotiques, polluants, nourriture</i> Pontage intra-brin <i>cisplatine</i>	ERCC1
BER	Oxydations des bases <i>ROS</i> Alkylation des bases <i>Nourriture, polluants</i> SSB <i>ROS, radiations ionisantes</i>	PARP1
HR	DSB <i>Radiations ionisantes, ROS</i> Pontage inter-brin	ATM / ATR BRCA1/2
NHEJ	DSB <i>Radiations ionisantes, ROS</i>	DNA-PK
DR	Alkylation ADN <i>Chimiothérapie, nourriture, Produits du métabolisme oxydatif</i>	MGMT
MMR	Insertions / Délétions Mésappariements <i>Erreurs de réplication</i>	MLH1

Les principales catégories de réparation sont présentées sur la gauche du tableau : réparation par excision de nucléotides (NER pour Nucleotide Excision Repair), réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair), recombinaison homologue (HR pour Homologous Recombination), jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour Non Homologous End Joining), reversion directe (DR pour Direct Reversal) et réparation de mésappariement (MMR mismatch repair). Des exemples des lésions de l'ADN ainsi que les facteurs à l'origine de ces lésions sont présentés ainsi que les acteurs de ces réponses. Les pontages correspondent à la formation de liaison covalente entre différentes bases de l'ADN, appartenant au même brin (pontage intra-brin) ou à deux brins différents (pontage inter-brin). ERCC1 (Excision Repair cross-Complementation group1), PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1), ATM (Ataxia Telangectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangectasia and Rad 3-related), DNA-PK (DNA-Protein Kinase dependent), MGMT (O6-methylguanine-DNA méthyltransférase), MLH1 (MutL Homolog 1).

1.5.2. Les voies ATM / Chk2 et ATR / Chk1

Les kinases ATM et ATR sont des kinases ubiquitaires, qui ont un rôle de senseur de la DDR en cas de DSB ou de blocage de la fourche de réplication

conduisant à l'accumulation de ssDNA (Blackford and Jackson, 2017). Elles comportent toutes deux un domaine kinase semblable à celui de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) et appartiennent ainsi à la catégorie des PI3K-like kinases (Blackford and Jackson, 2017; Kantidze et al., 2018).

ATM et ATR sont activées très rapidement après la détection des DSB et de l'accumulation de ssDNA (Blackford and Jackson, 2017). Elles activent les points de contrôle du cycle cellulaire, afin d'arrêter celui-ci et de permettre la réparation (cf. *Figure 6*) (Blackford and Jackson, 2017).

ATM activée par phosphorylation sur la sérine S1981 agit notamment grâce à la phosphorylation de la sérine – thréonine kinase Chk2 (Checkpoint Kinase 2) (Blackford and Jackson, 2017). Chk2 phosphorylée sur la tyrosine T68 stabilise ensuite p53 en la phosphorylant et provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S ou G2/M (Kantidze et al., 2018; Weber and Ryan, 2015). La kinase ATM active la signalisation cellulaire responsable de l'induction de la recombinaison homologue (Blackford and Jackson, 2017; Kantidze et al., 2018). Si les dommages subis par l'ADN sont difficiles à réparer, ATM peut induire la sénescence (Malaquin et al., 2015).

La kinase ATR est typiquement recrutée lors de l'accumulation de ssDNA, lors de lésions de l'ADN dans les fourches de réplication et après la résection des brins sur le site du DSB (Kantidze et al., 2018). Cette kinase est essentielle pour la survie des cellules des mammifères (Blackford and Jackson, 2017). Quand ATR est activée par phosphorylation sur la Thréonine T1989 à la suite de la détection de ssDNA, elle phosphoryle Chk1 (Checkpoint Kinase1), inhibant la poursuite du cycle cellulaire avant et pendant son passage en phase S, et avant son passage en phase M (cf. *Figure 6*) (Blackford and Jackson, 2017). Chk1 est phosphorylée sur plusieurs sérines de sa partie C-terminale, la seule phosphorylation indispensable à son activation est celle de la sérine S345 (Walker et al., 2009).

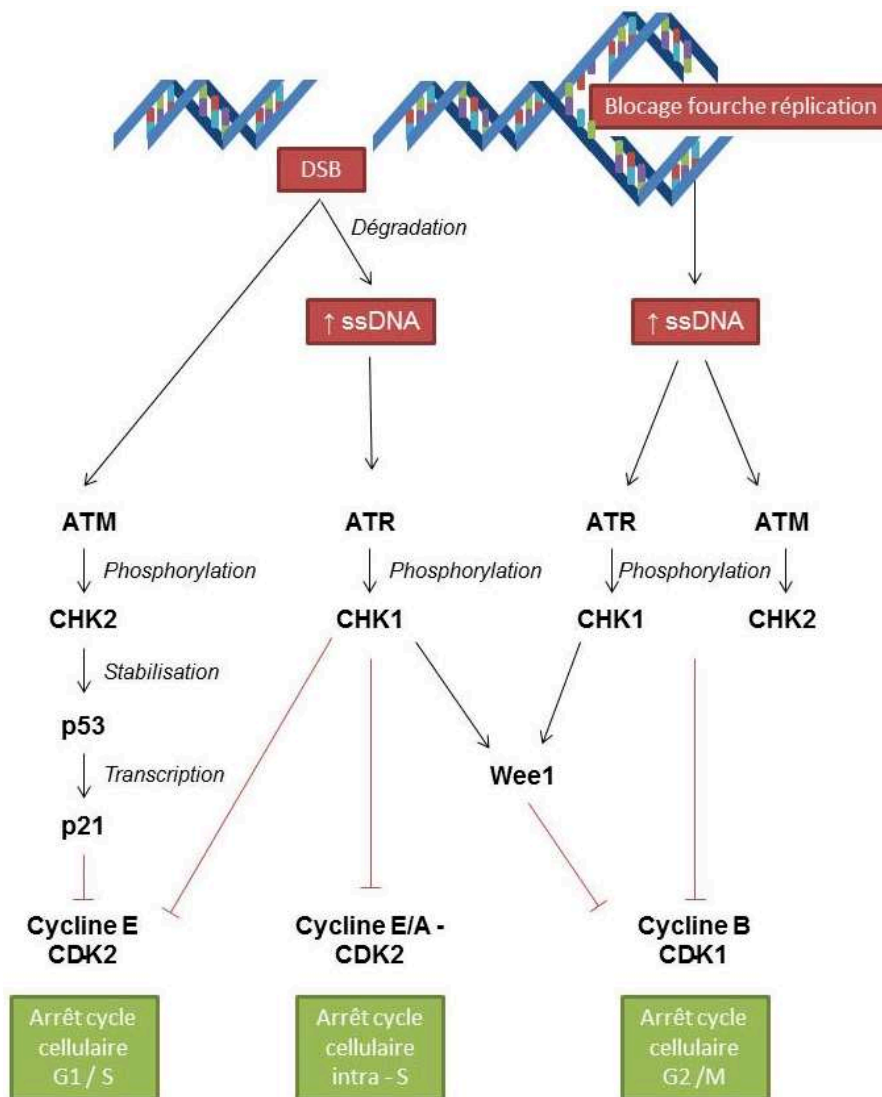


Figure 7 : ATM et ATR bloquent le cycle cellulaire après un DSB ou l'accumulation de ssDNA

ATM est activée quand des DSB surviennent, ainsi que lors du blocage de la fourche de réplication. Son activation entraîne la phosphorylation de Chk2, qui phosphoryle la protéine p53. P53 active l'expression de p21 qui inhibe la formation du complexe cycline E-CDK2 afin d'arrêter le cycle cellulaire en G1/S. ATM inhibe également la formation du complexe cycline B-CDK1, et bloque ainsi le cycle cellulaire en G2/M. ATR, quant à elle, est activée en présence d'une accumulation de ssDNA. Quand cette accumulation survient à la suite d'un DSB, ATR phosphoryle Chk1, qui inhibe alors la formation des complexes Cycline E-CDK2 et Cycline E/A – CDK2, bloquant le cycle en G1/S et en S. Lorsque l'accumulation de ssDNA a lieu dans la fourche de réplication, ATR phosphoryle Chk1 qui bloque la formation du complexe Cycline B – CDK1. Le cycle cellulaire s'arrête en G2/M. Chk1 active également la tyrosine kinase Wee1, qui inhibe la formation du complexe Cycline B- CDK1 (Blackford and Jackson, 2017; Kantidze et al., 2018; Weber and Ryan, 2015).

1.5.3. Les voies ATM/ATR dans les CETC

Il existe un rapport complexe entre la DDR et les tumeurs. En effet, les erreurs de réplication favorisent les altérations du génome qui sont des étapes de la carcinogenèse (Luo et al., 2009). Une DDR opérationnelle possède un effet antitumoral grâce à la réparation de ces dommages à l'ADN (Weber and Ryan, 2015). En outre, des déficiences de la DDR, par exemple les altérations génétiques d'ATM, sont connues pour favoriser l'émergence de tumeurs (Blackford and Jackson, 2017). Paradoxalement, la DDR peut également jouer un rôle pro-tumoral. Les cellules tumorales sont caractérisées par un stress réplcatif intense (Bowry et al., 2021), rendant la DDR indispensable pour leur survie. Enfin, la DDR joue également un rôle important dans le cadre de la sensibilité aux traitements anti-tumoraux génotoxiques. En effet, celle-ci peut entraîner une réparation des dommages causés par les traitements anticancéreux aux cellules tumorales (Weber and Ryan, 2015).

Plusieurs auteurs mettent en évidence l'invalidation fréquente d'au moins un acteur de la DDR dans les tumeurs. Il n'existe pas de biomarqueur validé concernant la recherche des déficiences de la DDR dans les CETC. Dans ces tumeurs, la plupart des études envisageant la dérégulation de la DDR sont centrées sur p53, qui est très fréquemment mutée dans les CETC (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Néanmoins, quelques auteurs ont montré une invalidation fréquente d'ATM dans les CETC, par méthylation de son promoteur ou variation du nombre de copies du gène (Ai et al., 2004; Lee et al., 2011; Lim et al., 2012). Au contraire, certaines voies de la DDR peuvent être suractivées dans des tumeurs. C'est par exemple le cas d'ATR, qui est amplifié dans 10% des CETC (données du TCGA).

Les liens entre DDR et microenvironnement tumoral (MT), c'est-à-dire les éléments tumoraux autres que les cellules cancéreuses, sont également intéressants. En effet, en cas de dommages de l'ADN trop importants pour être réparés rapidement, la persistance de la DDR active la voie NF-KB et entraîne la sénescence de la cellule touchée (Kumari and Jat, 2021). Cette cellule va alors acquérir un phénotype appelé SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype), impliqué dans la modulation du microenvironnement tumoral, notamment par la sécrétion de cytokines inflammatoires et chimioattractantes de cellules inflammatoires (Kumari and Jat, 2021; Malaquin et al., 2015). La DDR peut également avoir un impact direct sur l'immunité

antitumorale (Lama-Sherpa and Shevde, 2020). En effet, certains facteurs endommageant l'ADN entraînent l'émission de micronoyaux dans le cytoplasme, qui activent la transcription d'interférons (IFN) de type I tels que l'IFN- β (Lama-Sherpa and Shevde, 2020). Ces IFN favorisent l'activation des cellules T du MT (Lama-Sherpa and Shevde, 2020). La kinase ATM peut également entraîner la surexpression de PD-L1 de façon dépendante de la voie JAK/STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription), ce que nous détaillerons dans la partie III.4.3 (Sato et al., 2019).

1.5.4. Rationnel pour le ciblage de la DDR dans les tumeurs

Les thérapies génotoxiques, comme la radiothérapie ou les chimiothérapies alkylantes et intercalantes, sont fréquemment utilisées dans les traitements des cancers (Kantidze et al., 2018). La DDR est activée en réponse aux dommages que ces thérapies infligent à l'ADN des cellules traitées, et peut ainsi assurer la survie de ces cellules et favoriser la résistance à ces traitements (Kantidze et al., 2018). Plusieurs études suggèrent que l'inhibition d'effecteurs de la DDR renforce l'efficacité de ces thérapies génotoxiques, comme c'est le cas pour la combinaison d'inhibiteurs d'ATM avec des inhibiteurs de topoisomérases (Kantidze et al., 2018; Weber and Ryan, 2015). Il existe par ailleurs plusieurs inhibiteurs d'ATM et d'ATR testés en essais cliniques en association avec ces thérapies (Kantidze et al., 2018). Le défi majeur de ces combinaisons est le ciblage préférentiel des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, afin d'en limiter la toxicité (Kantidze et al., 2018; Weber and Ryan, 2015).

Un autre argument pour le ciblage de la DDR est le succès rencontré dans les tumeurs ovariennes ou mammaires *BRCA1/2* (*Breast Cancer 1/2*) mutées, avec l'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme PARP (poly(ADP-ribose)polymérase) (O'Connor, 2015) (Cf. *Figure 8*). Cette enzyme joue un rôle très important dans la réparation des lésions simples brins de l'ADN (O'Connor, 2015). Cette stratégie exploite le phénomène de létalité synthétique, à savoir le ciblage d'une des voies de la DDR alors que les cellules possèdent déjà une altération sur une autre voie de la DDR (Kantidze et al., 2018; O'Connor, 2015).

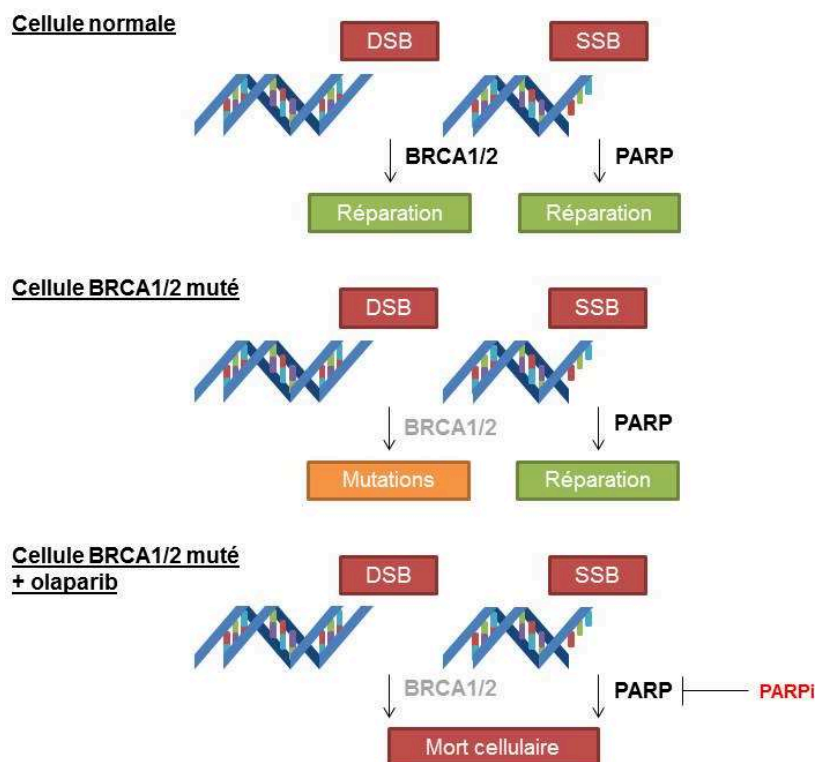


Figure 8 : Exemple de létalité synthétique dans les tumeurs BRCA1/2 mutées avec l'utilisation des inhibiteurs de PARP

Les DSB et SSB sont respectivement réparés par BRCA1/2 et PARP1 dans les cellules normales. Dans les tumeurs BRCA1/2 mutées, la réparation des DSB est altérée et favorise la survenue de mutations, mais n'engendre pas suffisamment de dommages de l'ADN pour que la cellule meure. Si l'on bloque PARP avec les inhibiteurs de PARP (PARPi, comme l'olaparib), la réparation des SSB est également altérée ; la quantité de dommages de l'ADN est telle que la cellule meure (O'Connor, 2015).

1.5.5. Ciblage de la DDR dans les CETC

Peu d'études concernant le ciblage de la DDR dans les CETC sont disponibles dans la littérature. Un essai clinique de phase I est actuellement en cours de recrutement dans les CETC pour évaluer l'impact clinique du ciblage d'ATR en combinaison avec une thérapie génotoxique (National Cancer Institute (NCI), 2021). Cet essai (NCT02567422) évalue l'efficacité de l'inhibiteur d'ATR VX-970, aussi appelé berzosertib, en association avec la radiothérapie et le cisplatine dans les CETC non opérables (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02567422>).

La possibilité d'exploiter la létalité synthétique dans les thérapeutiques anticancéreuses est également étudiée grâce à l'analyse des données de

transcriptomiques (Nijman, 2011). En effet, l'identification de voies de la DDR déficientes dans les tumeurs permet de mettre en évidence des partenaires de létalité, c'est-à-dire un autre acteur de la DDR dont l'inhibition entraîne la mort des cellules cancéreuses (Zhang et al., 2021).

En 2020, Deneka et al. (2020) ont étudié des lignées cellulaires de CETC HPV-ve mutées pour les gènes *p53* et *CDKN2A*, donc déficientes au niveau du point de contrôle du cycle cellulaire en G1/S (Deneka et al., 2020). Les auteurs ont utilisé deux molécules ciblant la DDR : le prexasertinib et l'adavosertib. Le prexasertinib inhibe la tyrosine kinase Wee1 (cf. *Figure 7*) et abolit le point de contrôle du cycle cellulaire en G2/M (Deneka et al., 2020), alors que l'adavosertib inhibe Chk1, abolissant les points de contrôle dans la phase S et au point G2/M (Deneka et al., 2020). L'exposition des cellules à cette combinaison ralentissait la division cellulaire et favorisait la survenue d'erreurs mitotiques aboutissant à l'apoptose des cellules testées (Deneka et al., 2020). D'autres travaux réalisés ont été réalisés *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de CETC sur des lignées cellulaires de CETC HPV-ve présentant une mutation de *TP53* ou n'exprimant pas la protéine p16 (Lee et al., 2019). Les auteurs ont mis en évidence l'intérêt de la co-inhibition de Wee1 et de la kinase Aurora A (AURKA pour Aurora A Kinase), ayant des rôles pléiotropiques dans le maintien du cycle cellulaire, dont la régulation du cycle cellulaire (Lee et al., 2019). En effet, cette combinaison inhibait la croissance tumorale et améliorait la survie globale des modèles murins (Lee et al., 2019).

II. La ferroptose

II.1. Définition

La ferroptose est une mort cellulaire appartenant à la catégorie des nécroses régulées (Berghe et al., 2014; Dixon et al., 2012). Une mort cellulaire régulée est, selon la définition de Galluzzi et al., (2018), contrôlée par une ou plusieurs voies de transduction cellulaire du signal, et peut donc être manipulée au niveau pharmacologique et génétique (Galluzzi et al., 2018). La ferroptose est provoquée par un déséquilibre oxydoréducteur intracellulaire, dans lequel le fer intracellulaire joue un rôle central (Dixon et al., 2012; Stockwell et al., 2017). Ce stress oxydant entraîne la production excessive de ROS qui à leur tour réagissent avec les Acides Gras Polyinsaturés (AGPI) de la membrane plasmique en les peroxydant (Stockwell et al., 2017). Cette peroxydation massive des lipides membranaires constitue l'élément spécifique de la ferroptose (Stockwell et al., 2017).

La ferroptose fut mise en évidence grâce à l'activité d'un composé chimique, l'érastine (Eradicator of Ras and ST-expressing cell) sur des cellules tumorales exprimant *RAS* muté (Dolma et al., 2003). Le rôle crucial du fer dans la survenue de la ferroptose fut par la suite mis en évidence (Yagoda et al., 2007; Yang and Stockwell, 2008), et Dixon et al. (2012) proposèrent en 2012 de la nommer « ferroptose » (Dixon et al., 2012).

Comme toute cellule nécrotique, les cellules ferroptotiques présentent une perte d'intégrité de la membrane plasmique, aboutissant à la fuite d'éléments intracellulaires vers le milieu extracellulaire et à un gonflement cellulaire appelé « oncosé » (Kim et al., 2019). Les cellules ferroptotiques présentent également des mitochondries de taille réduite et dont la membrane est plus dense que la normale (cf. *Figure 9*) (Dixon et al., 2012; Yagoda et al., 2007).



Figure 9 : Morphologie d'une cellule ferroptotique comparée à celle d'une cellule apoptotique (d'après Lachaier et al., 2014a).

Les nécroses se différencient de l'apoptose notamment par la morphologie des cellules qu'elles touchent. Ici, les cellules ferroptotiques (exposées à l'érastine) montrent une oncose et un changement dans la morphologie mitochondriale. Les cellules exposées à la doxorubicine, inducteur connu de l'apoptose, subissent une déformation de leur membrane plasmatique appelée blebbing avant la formation des corps apoptotiques (d'après Lachaier et al., 2014a). Les corps apoptotiques sont ensuite éliminés par phagocytose (Kim et al., 2019). Au contraire des nécroses, le contenu intracellulaire des cellules apoptotiques n'est pas en contact avec le milieu extracellulaire (Kim et al., 2019). L'apoptose se différencie également des nécroses par les voies de signalisation qu'elle implique (Kim et al., 2019).

II.2. Acteurs principaux du programme ferroptotique

Dans les cellules exposées à l'érastine, un dépassement des capacités de détoxification cellulaire par le glutathion provoque l'accumulation de ROS à l'origine de la peroxydation des AGPI membranaires (cf. *Figure 10*) (Stockwell et al., 2017). La survenue de la ferroptose dépend de plusieurs facteurs : du fer intracellulaire, de la formation des ROS, de la présence de l'enzyme GPx4, du glutathion (GSH) et de l'antiport Xc⁻.

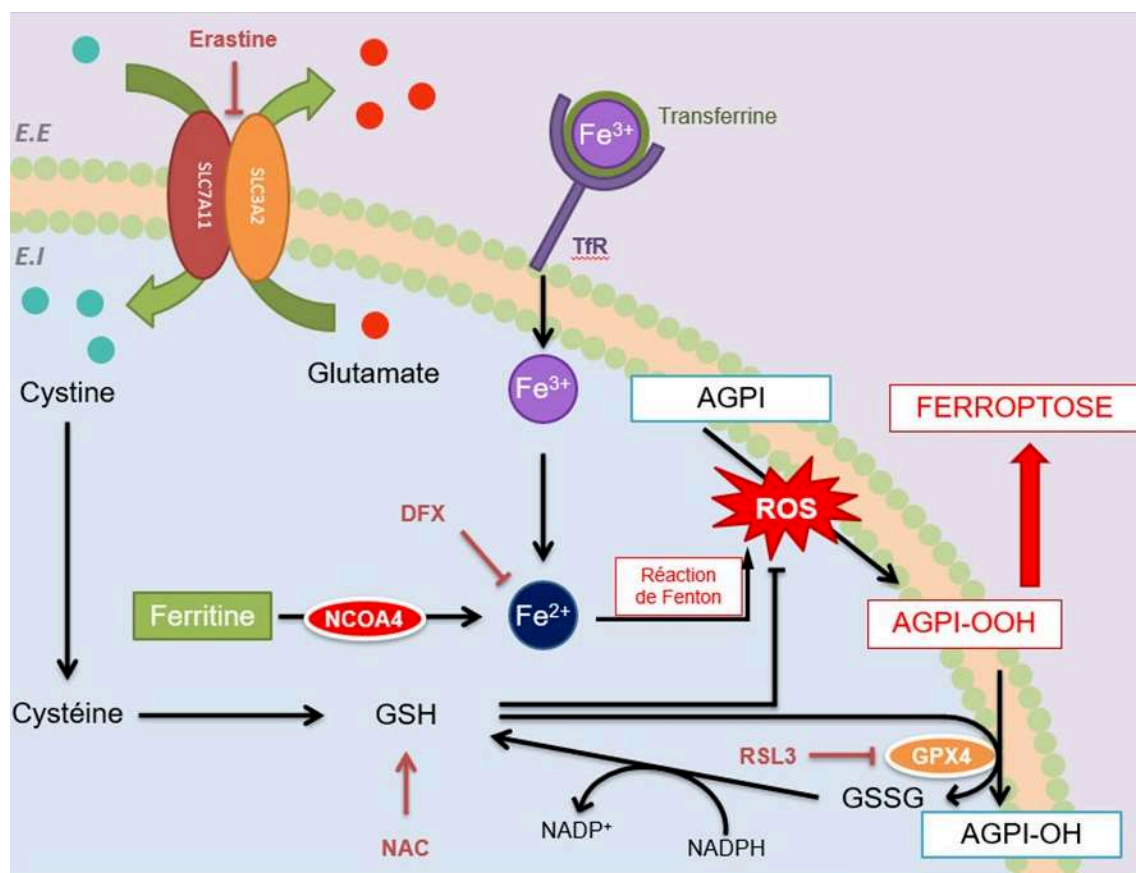


Figure 10 : Vue d'ensemble des principaux acteurs du programme ferroptotique

Le fer joue un rôle crucial dans le processus ferroptotique puisqu'il entre dans la réaction de Fenton aboutissant à la production des ROS. Il peut entrer dans la cellule sous forme de fer ferrique (Fe (III) ou Fe³⁺) lié à la Transferrine, via le récepteur de la Transferrine (TfR), ou être libéré de sa protéine cytoplasmique de stockage, la Ferritine, par NCOA4 (Nuclear receptor coactivator 4). La peroxydation des AGPI (AGPI-OOH) membranaires est limitée par l'enzyme GPx4, qui va réduire ces AGPI-OOH en AGPI-OH grâce au GSH. Ce GSH est produit en amont à partir de la Cystéine importée dans la cellule par l'antiport Xc⁻, en échange d'un glutamate. Xc⁻ est constitué de deux sous-unités (SLC7A11 et SLC3A2). Le GSH participe également à la

détoxification des ROS, passant alors sous forme oxydée (GSSG). Le GSSG est ensuite réduit en GSH grâce au NADPH intracellulaire, afin d'être réutilisé. RSL3 (*Ras-Selective Lethality protein 3*) et l'Erastine sont deux composés chimiques induisant la ferroptose. RSL3 inhibe l'enzyme GPx4, et favorise donc la ferroptose en empêchant la réduction des AGPI-OOH. L'Erastine, quant à elle, inhibe l'antiport Xc⁻, bloquant l'entrée de Cystine dans la cellule et donc la synthèse de GSH. Il existe deux principes actifs limitant la survenue de la ferroptose. Premièrement, la N-acétylcystéine (NAC), précurseur de la cystéine, favorisant la synthèse de GSH et deuxièmement, la déferoxamine (DFX), un chélateur du fer, empêchant la réaction de Fenton et donc la production de ROS. (E.E : espace extracellulaire, E.I : Espace intracellulaire).

II.2.1. Le fer

Le fer joue un rôle central dans la ferroptose (Dixon et al., 2012; Stockwell et al., 2017). Il entre dans la cellule sous forme ferrique (Fe(III) ou Fe³⁺) lié à la Transferrine, via le récepteur de la Transferrine (TfR). Il est ensuite internalisé dans les endosomes intracellulaires où il est réduit en fer ferreux (Fe(II) ou Fe²⁺) (Bogdan et al., 2016). Le Fe(II) est ensuite importé dans le cytoplasme où il peut être stocké par la ferritine (Bogdan et al., 2016). Ce rôle central du fer a été observé suite à l'inhibition de la ferroptose lors de la chélation du fer libre intracellulaire par la déferoxamine (DFX) (Dixon et al., 2012; Stockwell et al., 2017). A contrario, l'augmentation de la quantité de fer libre intracellulaire favorisait la survenue de cette nécrose régulée (Stockwell et al., 2017). Ainsi, les mécanismes favorisant la ferroptose peuvent être liés à une augmentation de l'entrée de fer dans la cellule, ou à la libération accrue au niveau intracellulaire de fer par la ferritine (cf. *Figure 10*) (Bogdan et al., 2016).

II.2.2. La formation des ROS

Dans le cytoplasme, le Fe(II) entre dans la réaction de Fenton et d'Haber Weiss afin de former des ROS. Au cours de ces deux réactions d'oxydo-réduction, le Fe(II) est oxydé par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Cette oxydation aboutit à la formation de Fe(III), un ion hydroxyde OH⁻ et un radical hydroxyle HO[•] : $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet}$ (Kajarabille and Latunde-Dada, 2019). Ce radical hydroxyle appartient à la catégorie des ROS. Ces ROS sont des espèces très réactives, puisqu'elles comportent un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs orbitales externes. Ils réagissent ainsi très facilement avec les AGPI de la membrane plasmique et les

transforment en AGPI-OOH (cf. *Figure 11*) (Kajarabille and Latunde-Dada, 2019). Le métabolisme du glucose et la glutaminolyse (voie transformant la glutamine en acétoglutarate) sont deux voies métaboliques cruciales dans la ferroptose puisqu'elles aboutissent à la formation des lipides ciblés par les radicaux hydroxyles (Xie et al., 2016).

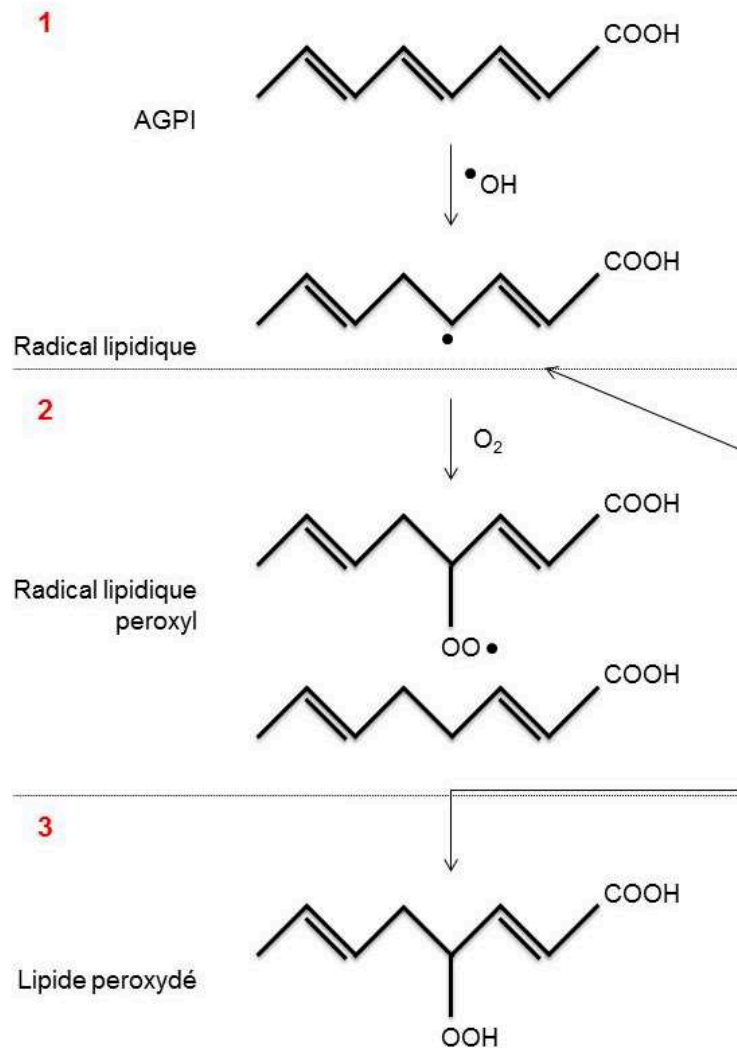


Figure 11 : Représentation simplifiée de la peroxydation lipidique des AGPI

La peroxydation des AGPI est le résultat de l'action d'un radical, comme le radical hydroxyle $\text{HO}\bullet$ sur ces AGPI. Cette réaction comporte trois phases, illustrées par les trois numéros rouges sur le schéma. Durant la première phase, appelée phase d'initiation, le radical réagit avec l'AGPI pour former un radical lipidique. Durant la deuxième phase, nommée phase de propagation, ce radical lipidique réagit avec l' O_2 afin de former un radical lipidique peroxydé. Durant la troisième phase, appelée phase de résolution, le radical est hydroxylé.

La peroxydation modifie la structure des AGPI membranaires, compromettant l'intégrité de la membrane plasmique et entraînant la mort cellulaire par ferroptose (Dixon et al., 2012; Yang and Stockwell, 2008). Les effets des ROS peuvent être limités par les antioxydants, qui réagissent avec les radicaux libres afin de les neutraliser (Kajarabille and Latunde-Dada, 2019). La vitamine E fait partie de ces composés antioxydants et libère un hydrogène qui se fixe sur les radicaux libres des ROS (Brigelius-Flohé and Traber, 1999), les empêchant de peroxyder les AGPI membranaires.

II.2.3. GPx4 et le Glutathion

Le glutathion ou γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine sous sa forme réduite (GSH) est un acteur majeur de l'équilibre oxydoréducteur de la cellule (Dixon et al., 2012). Le glutathion est un tripeptide qui est produit de façon abondante dans toutes les cellules eucaryotes, à partir de trois acides aminés : l'acide glutamique, la glycine et la cystéine. La cystéine est obtenue après la réduction de la cystine intracellulaire (Seibt et al., 2019; Yang et al., 2014b) (cf. *Figure 10*). La cystéine est un réactif limitant dans la synthèse du glutathion, une quantité suffisante de cystine intracellulaire est donc primordiale pour maintenir un stock de GSH suffisant (Dixon et al., 2012). Par ailleurs, il est possible d'inhiber la ferroptose en apportant aux cellules un précurseur de la cystéine, la N-acétylcystéine (NAC) (Atkuri et al., 2007).

Le GSH est utilisé par l'enzyme GPx4 (Glutathion Peroxydase 4) comme cofacteur indispensable pour catalyser la réaction de réduction des lipides peroxydés (AGPI-OOH) en lipides hydroxylés (AGPI-OH) et détoxifie ainsi les ROS (Conrad and Friedmann Angeli, 2015; Seibt et al., 2019) (cf. *Figure 10*). GPx4 appartient à la famille des Glutathion peroxydases (Conrad and Friedmann Angeli, 2015). Elle est la seule isoforme de cette famille qui agisse sur les lipides peroxydés, et est donc cruciale pour limiter la survenue de la ferroptose (Yang et al., 2014b). Le composé RSL3 est capable d'induire la ferroptose en se fixant sur GPx4 et en inhibant ainsi son activité enzymatique (Dixon et al., 2012; Yang and Stockwell, 2008).

II.2.4. Le système antiport Xc-

Xc⁻ est un canal antiport cystine-glutamate indépendant du sodium. Il est composé de deux sous-unités (Sato et al., 1999). La première sous-unité de cet antiport est xCT (aussi appelé SLC7A11 pour Solute Carrier family 7 member 11), qui est la sous-unité catalytique de Xc⁻ (Sato et al., 1999). La deuxième sous unité est nommée 4F2 ou SLC3A2 (Solute Carrier family 3 member 2). Ce système antiport échange une cystine extracellulaire contre un glutamate intracellulaire, selon un ratio 1 : 1 (Bannai, 1986; Koppula et al., 2018). Le fonctionnement de Xc⁻ conditionne la quantité de cystine intracellulaire et donc la quantité de cystéine et la synthèse de glutathion.

L'érastine bloque ce transporteur de façon sélective et irréversible, empêchant ainsi l'entrée de cystine dans la cellule et limitant la synthèse de glutathion (Sato et al., 2018). La détoxification des ROS ne peut donc plus avoir lieu et la ferroptose survient (Sato et al., 2018). L'érastine induit la ferroptose par d'autres mécanismes que le blocage du système Xc⁻ (Yagoda et al., 2007). Elle se fixe également sur la tubuline et bloque ainsi en position ouverte les canaux calciques VDAC2 et 3 (Voltage Dependent Anion Channels 2 / 3) mitochondriaux (Yagoda et al., 2007). Ce blocage entraîne un déséquilibre oxydoréducteur supplémentaire dans la cellule et aboutit donc à la ferroptose (Dixon et al., 2012).

II.3. La ferroptose en thérapeutique dans les cancers

II.3.1. Thérapies antitumorales et ferroptose

De nombreux travaux ont mis en évidence la survenue de la ferroptose à la suite de l'administration de certaines thérapies antitumorales actuellement recommandées dans la prise en charge de patients atteints de cancers. C'est le cas du sorafénib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant RAF et VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), indiqué notamment dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires (Dixon et al., 2014; Lachaier et al., 2014b). Le sorafénib inhibe le système Xc- et favorise donc la survenue de la ferroptose (Dixon et al., 2014). Plus récemment, l'activité pro-ferroptotique du cisplatine par l'inhibition de GPx4 a été mise en évidence (Guo et al., 2018; Zhang et al., 2020b). Ye et al. (2019) ont quant à eux mis en évidence *in vitro* une synergie entre le paclitaxel et RSL3 dans l'induction de la ferroptose de cellules de CETC hypopharyngés p53 mutés, grâce à une diminution de la glutaminolyse (Ye et al., 2019). Enfin, la radiothérapie possède également des propriétés pro-ferroptotiques (Lang et al., 2019; Lei et al., 2020; Ye et al., 2020). Le ciblage d'inducteurs connus de la ferroptose en renfort de certaines chimiothérapies présente également un intérêt afin de potentialiser l'efficacité de ces dernières. Roh et al. (2016) ont par exemple mis en évidence *in vitro* et dans des modèles murins de CETC une restauration de la sensibilité au cisplatine et même une potentialisation des effets cytotoxiques de cette chimiothérapie (Roh et al., 2016).

Les effets pro-ferroptotiques des thérapies antitumorales peuvent également toucher les cellules immunitaires infiltrées dans le MT et ainsi influencer l'immunité antitumorale (Xu et al., 2021). En effet, les cellules immunitaires du MT ne présentent pas toutes la même susceptibilité vis-à-vis des inducteurs de la ferroptose (cf. Discussion, partie III). Les cellules T cytotoxiques, présentent généralement un fort taux de lipides peroxydés, sont par exemple très susceptibles au blocage de GPx4 (Xu et al., 2021). Au contraire, les macrophages associés à la tumeur (TAM) pro-inflammatoires résistent généralement à la ferroptose (Xu et al., 2021).

La découverte des mécanismes pro-ferroptotiques de ces molécules et des procédures thérapeutiques déjà approuvées en oncologie médicale ouvre la perspective d'envisager un « Drug repurposing », c'est-à-dire le positionnement thérapeutique nouveau (ici l'induction de la ferroptose) d'une thérapie existante. Ce

repositionnement présente l'avantage de faciliter la réalisation des essais cliniques chez l'Homme, à condition que des biomarqueurs soient validés pour prédire la sensibilité à la ferroptose des tumeurs traitées.

II.3.2. Biomarqueurs de la ferroptose dans les cancers

L'utilisation de thérapies anticancéreuses provoquant la ferroptose des cellules tumorales représente une opportunité dans la prise en charge thérapeutique des patients. Plusieurs travaux se sont intéressés à la recherche de biomarqueurs de la ferroptose dans ce contexte.

Plusieurs auteurs ont recherché des signatures de gènes prédictives de la sensibilité des cellules étudiées à la ferroptose dans différents types tumoraux (Chen et al., 2021; Nie et al., 2021). En parallèle de la recherche de ces signatures de gènes, d'autres biomarqueurs tissulaires incluant plusieurs acteurs connus du métabolisme lipidique, du métabolisme oxydoréducteur, du métabolisme du fer ont été étudiés. Ainsi, l'enzyme ACSL4 (acyl-coA synthetase long chain family member 4), membre de la famille des ligases intervenant dans la chaîne de synthèse des phospholipides, semble avoir un potentiel de biomarqueur en thérapeutique. En effet, l'expression d'ACSL4 favorise spécifiquement la survenue de la ferroptose (Doll et al., 2017; Yuan et al., 2016). Le facteur de transcription Nrf2, activant l'expression de gènes des défenses antioxydantes cellulaires, a également été étudié comme biomarqueur potentiel. Son activation mène à la surexpression de plusieurs gènes codant pour des acteurs limitant la ferroptose comme SLC7A11 (Chen et al., 2017) et la chaîne lourde de la ferritine (Sun et al., 2016a). L'activation excessive des gènes cibles de Nrf2 favorise ainsi probablement la résistance des cellules à la ferroptose (Sun et al., 2016b).

Certains acteurs du métabolisme du fer, souvent altéré dans les tumeurs, ont été étudiés comme éventuels biomarqueurs (Feng et al., 2020; Lelièvre et al., 2020; Zhang et al., 2020a). Ainsi, Feng et al. (2020) ont montré qu'il était possible de cibler spécifiquement les cellules ferroptotiques grâce à des anticorps dirigés contre le récepteur de la transferrine (TRF1) (Feng et al., 2020).

Certains acteurs du métabolisme cellulaire semblent également présenter un intérêt comme biomarqueurs de la sensibilité à la ferroptose. En effet, une régulation

métabolique de cette mort cellulaire via réponse au stress énergétique a été mise en évidence (Lee et al., 2020). Lee et al. (2020) ont en effet montré que le fait de soumettre des cellules à un stress énergétique atténuait voire inhibait la ferroptose induite par l'érastine, la cystine starvation ou RSL3 (Lee et al., 2020). Cette inhibition de la ferroptose était par ailleurs dépendante de l'enzyme AMPK (AMP-activation Protein Kinase), contrôlant le métabolisme de l'ATP en réponse au stress énergétique (Lee et al., 2020).

En l'absence de marqueurs entièrement spécifiques de cette mort cellulaire, une stratégie intéressante pour évaluer la survenue de la ferroptose serait de rechercher des combinaisons de plusieurs marqueurs s'y rapportant. La mort par ferroptose entraîne en effet la libération de marqueurs nécrotiques et inflammatoires tels que les cytokératines 18 ou leurs fragments et HMGB1 (High Mobility Group Box 1) (Wen et al., 2019; Yang et al., 2014a). Ces marqueurs ont l'avantage de pouvoir être dosés dans des prélèvements sanguins.(Yang et al., 2014a). En outre, le dosage des peroxydes lipidiques permettrait de préciser le type de nécrose observé, puisque les cellules ferroptotiques libèrent des isoprostanoïdes et la prostaglandine E2 (Ingold et al., 2018; Kagan et al., 2017; Yang et al., 2014b).

II.3.3. Ferroptose et nécro-inflammation

La ferroptose appartient à la catégorie des nécroses, sa survenue implique donc la fuite d'éléments du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire (Kim et al., 2019). Certains de ces éléments déclenchent une inflammation (appelée nécro-inflammation) ainsi que l'activation de certains effecteurs de la réponse immunitaire innée tels que les macrophages (Kim et al., 2019).

Les cellules ferroptotiques libèrent des éléments intracellulaires immunogènes appelés DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns, par analogie avec les PAMP des agents pathogènes ; Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Fucikova et al., 2020; Galluzzi et al., 2017). Ces DAMP sont classiquement divisés en deux catégories : les signaux « find-me », qui attirent les premières cellules de l'immunité innée sur le site de la nécrose, et les signaux « eat-me » qui favorisent l'élimination des cellules nécrotiques par les cellules immunitaires recrutées (Fucikova et al., 2020). Ces signaux se lient sur les récepteurs des cellules de l'immunité innée, les PRR (Pattern recognition receptors) (Galluzzi et al., 2017).

Une alarmine a été particulièrement étudiée dans le contexte ferroptotique : HMGB1 (High Mobility Group box 1) (Stockwell et al., 2017; Wen et al., 2019) (cf. *Figure 12*). Dans le milieu extracellulaire, les alarmines se lient à leurs PRR. La reconnaissance de l'alarmine par le PRR permet d'activer la cellule immunitaire et de déclencher l'inflammation et la phagocytose. HMGB1 se lie notamment à l'AGER (Advanced-glycosylation end-product specific Receptor) situé sur les macrophages (Wen et al., 2019). Ces macrophages sécrètent en réponse du TNF (Tumor Necrosis Factor), qui est une cytokine pro-inflammatoire (Wen et al., 2019). HMGB1 se lie également au TLR4 (Toll-Like Receptor 4), qui déclenche classiquement la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise l'activation des cellules présentatrices d'antigène. Néanmoins, dans un contexte ferroptotique, il n'est pas apparu que la liaison HMGB1-TLR4 soit un médiateur de la réponse inflammatoire (Wen et al., 2019).

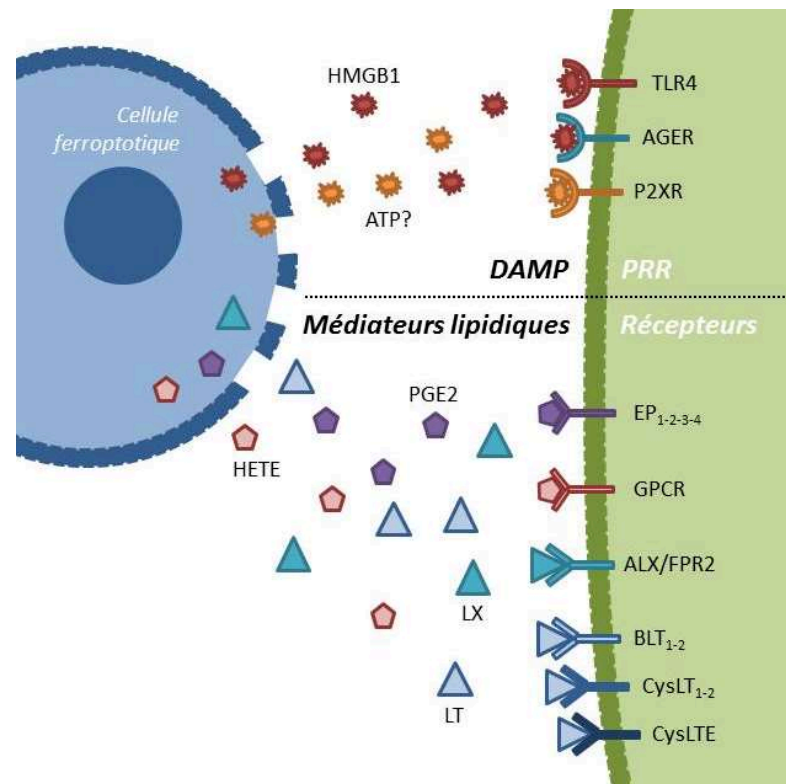


Figure 12 : Les DAMP / alarmines et médiateurs lipidiques libérés par les cellules ferroptotiques et leurs PRR / récepteurs

Les cellules ferroptotiques émettent l'alarmine HMGB1, qui se fixe classiquement sur ses récepteurs AGER et TLR4 (Wen et al., 2019). L'ATP est classiquement relâché précocement lors des nécroses cellulaires (Galluzzi et al., 2017), et se fixe sur son récepteur P2XR. Cependant, le relargage d'ATP intracellulaire n'a, à notre connaissance, jamais été mis formellement en évidence dans un contexte ferroptotique. Les cellules ferroptotiques libèrent également des lipides, dont la PGE2

(Prostaglandine E2) et des HETE (hydroxyeicosatetraenoic acids) (Yang et al., 2014b). Ces lipides se fixent classiquement sur EP1/2/3/4 (Prostaglandine receptors E 1/2/3/4) et un RCPG (ou GPCR pour G protein-coupled receptor), respectivement. Enfin, elles libèrent également des LT (leucotriènes) et des LX (lipoxines) (Kagan et al., 2017), qui se fixent respectivement sur BLT1/2 (Leukotrien B4 Receptor 1/2), CysLT1/2 (Cysteinyl Leukotrien receptor 1/2), CysLTE (Cysteinyl Leukotrien receptor E) et ALX/FPR2 (Lipoxin A4 / Formyl Peptide Receptor 2).

A côté de HMGB1, les cellules ferroptotiques libèrent également des lipides peroxydés (cf. Figure 12) tels que les prostaglandines (PG), les leucotriènes (LT) et les lipoxines (LX), qui sont des médiateurs de l'inflammation (cf. Figure 13) (Ingold et al., 2018; Kagan et al., 2017; Yang et al., 2014a).

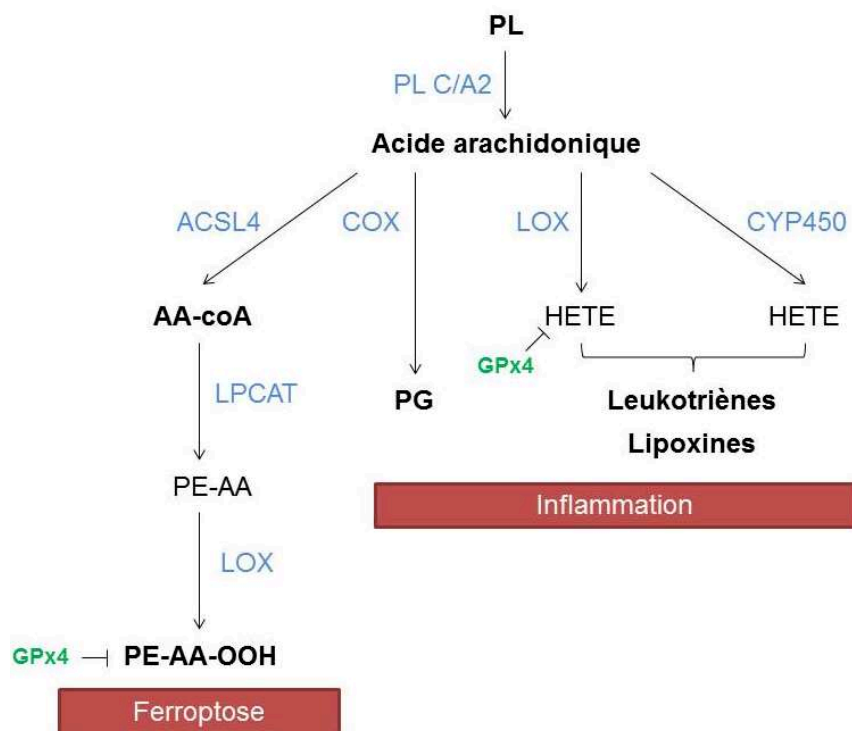


Figure 13 : Les médiateurs de l'inflammation dans la ferroptose

La ferroptose exerce également un effet pro-inflammatoire (Friedmann Angeli et al., 2019; Sun et al., 2020). En effet, l'acide arachidonique libéré des phospholipides par les phospholipases C et A2 (PLC/A2) est métabolisé par les cyclooxygénases (COX) en PGE2 (Sun et al., 2020). Il est également transformé en HETE (Hydroxyeicosatetraenoic acid) par les lipoxigénases et le CYP450, avant d'être transformé en lipoxines et en leucotriènes (Sun et al., 2020). Ces trois groupes de lipides sont pro-inflammatoires. L'acide arachidonique est également acétylé et inséré dans les phospholipides dans les membranes par l'ACSL4 et LPCAT (lysophosphatidylcholine transferase 3). Ce sont ces dernières qui sont ensuite

peroxydées et provoquent la ferroptose. Lors de la ferroptose, le glutathion est consommé, ce qui compromet la capacité de l'enzyme GPx4 à catalyser normalement la réduction des lipides peroxydés.

Plusieurs études réalisées sur des modèles animaux de pathologies neurodégénératives ou d'insuffisance rénale aigue ont mis en évidence une inflammation associée à la ferroptose (Chen et al., 2015; Friedmann Angeli et al., 2014; Hambright et al., 2017; Linkermann et al., 2014; Martin-Sanchez et al., 2017; Zilka et al., 2017). Dans ces systèmes, les inhibiteurs de ferroptose préviennent le relargage de multiples cytokines à l'échelle du tissu : l'interleukine 33 (membre de la famille de l'IL-1 inflammatoire), CXCL2 (C-X-C motif Chemokine Ligand 2), l'IL-6, le TNF et MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (Linkermann et al., 2014; Martin-Sanchez et al., 2017). Ces modèles ont ainsi permis d'établir le rôle pro-inflammatoire de la ferroptose. Les nécroses comme la ferroptose sont ainsi quelques fois appelées « morts cellulaires immunogènes » (ICD pour Immunogenic Cell Death) (Galluzzi et al., 2017; Green et al., 2009).

III. Microenvironnement Tumoral des CETC

III.1. Définition et composition du MT

Le MT correspond à l'ensemble des composants cellulaires et non cellulaires dans une tumeur qui ne sont pas des cellules cancéreuses. Ainsi, la tumeur est une structure incluant les cellules cancéreuses et les éléments de leur microenvironnement qui coopèrent pour favoriser la survie, la croissance et l'invasion des cellules cancéreuses (Bhat et al., 2021). L'ensemble des éléments du MT sont présentés dans la *Figure 14*. Les cellules composant le MT sont les cellules de l'infiltrat immunitaire et les cellules stromales telles que les fibroblastes associés à la tumeur (CAF) et les cellules endothéliales. Les composants non cellulaires du MT incluent des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sécrétés par les cellules du MT et les cellules cancéreuses (Wu and Dai, 2017). On compte également une matrice extracellulaire (MEC), qui correspond à un réseau de soutien dans les tissus solides, composée de protéines (dont le collagène), de protéoglycanes et de facteurs solubles incluant des enzymes, des facteurs de croissance et des cytokines (Filipe et al., 2018). L'existence de nombreuses boucles de régulation rend l'étude du MT complexe.

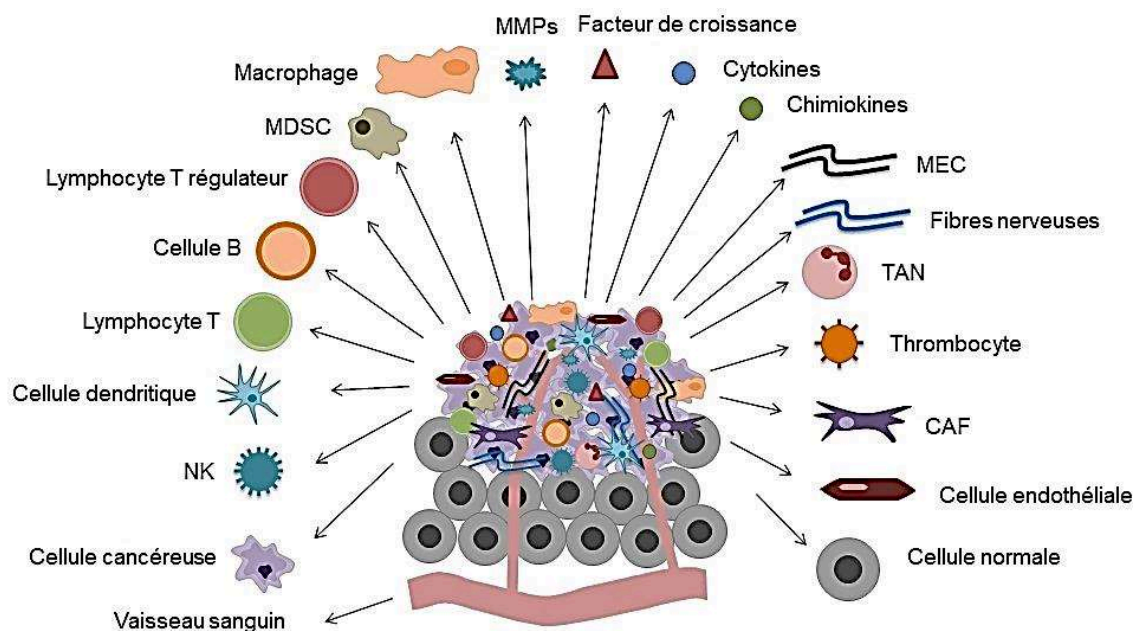


Figure 14 Composition du Microenvironnement Tumoral

Les cellules cancéreuses et leur MT font de la tumeur une entité fonctionnelle. Les composants du MT sont dispersés dans la tumeur. Le MT comprend des éléments acellulaires comme des MMP (Matrix Metalloprotéinases), des cytokines, des chimiokines ainsi que des facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses et stromales. Les cellules composant l'infiltrat immunitaire sont réparties dans la tumeur, tout comme les CAF et les cellules endothéliales. Les fibres de la MEC assurent un soutien physique à la tumeur et sont remodelées lors de la progression tumorale. Les vaisseaux tumoraux assurent les apports nutritifs à la tumeur, mais représentent également une voie de passage des cellules recrutées par la tumeur (cellules immunitaires, thrombocytes) ainsi qu'une voie de dissémination lors de la cascade métastatique. Enfin, des fibres nerveuses composent aussi le MT, rendant possible l'invasion des nerfs par les cellules tumorales. NK: Natural Killer, MDSC: Myeloid-Derived Suppressor Cell, TAN: Tumeur-Associated Neutrophils.

III.1.1. La MEC

Jusqu'à peu, on attribuait à la MEC un simple rôle de soutien physique pour le tissu, mais l'on sait maintenant qu'elle possède des fonctions différentes selon sa localisation et composition (Filipe et al., 2018). Les tumeurs solides présentent un stroma dont la structure évoque celle d'un tissu cicatriciel (Dvorak, 2019). On observe effet une MEC desmoplastique dans les tumeurs solides, c'est-à-dire de structure réorganisée et plus rigide que la MEC normale, présentant une quantité plus importante de collagène (Filipe et al., 2018). Ce remodelage de la MEC dans les tumeurs solides s'explique par plusieurs évènements incluant la modification du turn-over synthèse-dégradation de ses composants ainsi que des proportions respectives de molécules la composant (Filipe et al., 2018). Des modifications génomiques semblent également expliquer le remaniement de la MEC dans les tumeurs solides. En effet, une analyse récente des données du TCGA a permis de mettre en évidence une dérégulation globale du matrisome, terme désignant le profil d'expression des gènes impliqués dans sa composition et son fonctionnement, au sein des tumeurs solides (Lim et al., 2019). Enfin, des modifications post-traductionnelles du matrisome contribuent également à la desmoplasie, en particulier au niveau des fibrilles de collagène (Filipe et al., 2018; Sahai et al., 2020).

III.1.2. Les CAF

Une population cellulaire du MT jouant un rôle important dans la desmoplasie de la MEC est constituée par les CAF, grâce à leur sécrétion de collagène (Sahai et al., 2020). Les CAF sont activés par la cellule cancéreuse via la sécrétion de TGF- β et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et l'IL-6 (Erez et al., 2010; Karakasheva et al., 2018; Wever et al., 2004). Ils constituent une population très hétérogène de cellules car ils dérivent de populations cellulaires différentes comme les macrophages résidents, les cellules souches mésenchymateuses ou encore les adipocytes (Sahai et al., 2020). Ils interagissent avec les cellules cancéreuses de plusieurs façons et possèdent des propriétés diverses, parfois exprimées simultanément : pro-inflammatoires, contractiles, métaboliques et immunomodulatrices (Karakasheva et al., 2018; Monteran and Erez, 2019; Sahai et al., 2020). L'acquisition de certaines de ces propriétés est conditionnée par le niveau d'expression de certains marqueurs appelés marqueurs de « CAF activé », dont les plus connus sont l' α -SMA (α smooth muscle actin), et FAP (Fibroblast Activation Protein α) (Nurmik et al., 2020). De plus, les signaux d'autres composants du MT peuvent moduler ces phénotypes de façon réversible, amenant à la notion que le phénotype des CAF est plastique (Sahai et al., 2020).

III.1.3. Vascularisation dans le MT

La vascularisation des tumeurs est anarchique. En effet, les vaisseaux du MT présentent classiquement une forte perméabilité, une forte dilatation ainsi qu'une ramification anarchique (Lugano et al., 2020). Un des principaux mécanismes de formation des vaisseaux intratumoraux est l'angiogenèse par bourgeonnement. L'angiogenèse tumorale implique l'activation de cellules endothéliales quiescentes qui migrent selon un gradient chimiotactique de VEGF pour former de nouveaux vaisseaux (Gerhardt et al., 2003; Jakobsson et al., 2010). Outre le fait d'être des composants structuraux des vaisseaux, ces cellules endothéliales favorisent également la survie des cellules tumorales et leur migration (Neiva et al., 2009). Elles produisent activement des cytokines et facteurs de croissances qui définissent une véritable niche péri-vasculaire. En effet, Zhang et al. (2014) ont montré *in vitro* que les cellules endothéliales sécrètent de l'EGF, conférant aux cellules cancéreuses environnantes des propriétés de cellules souches dans les CETC (Zhang et al., 2014).

III.1.4. Coagulation dans le MT

En lien avec les altérations vasculaires, et notamment l'état d'hyperperméabilité vasculaire intratumorale, la cascade de la coagulation est souvent activée dans le MT. Cette activation est liée à une expression élevée du TF (Tissue Factor) par les cellules tumorales, dans les CETC notamment (Saidak et al., 2021b). Le TF est une glycoprotéine transmembranaire pro-coagulante. La diffusion dans la circulation sanguine de TF sous forme de microparticules peut favoriser la survenue de thromboses veineuses chez les patients atteints de tumeurs (Falanga et al., 2017). L'étude de système des cancers souligne les liens entre coagulation et MT, et illustre également la particularité des CETC, où les acteurs de la coagulation et fibrinolyse sont exprimés à très haut niveau (Saidak et al., 2021b).

III.1.5. Les plaquettes dans le MT

Également en lien avec les altérations vasculaires, on observe fréquemment le recrutement et l'activation de plaquettes dans le MT. Elles constituent de riches sources de médiateurs, dont certains comme le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) agissent pour recruter une grande variété de cellules stromales (Watts et al., 2016). Les plaquettes sont connues pour être des acteurs précoces de l'inflammation, et contribuent également aux étapes tardives de la progression tumorale (Kopp et al., 2009 ; Placke et al., 2012 ; Yu et al., 2014). Cependant, le rôle des plaquettes dans la phase précoce de progression est plus débattu (Michael et al., 2017). Ainsi, l'étude des altérations vasculaires, de la coagulation et du recrutement plaquettaire illustre la complexité et la redondance des mécanismes biochimiques qui conduisent au remodelage du MT.

III.1.6. Fibres nerveuses et MT

La présence de fibres nerveuses périphériques dans le MT est connue depuis longtemps. En revanche, on sait depuis peu que ces fibres nerveuses sont importantes notamment dans le cadre des tumeurs du pancréas, mammaires et de la prostate (Ayala et al., 2008; Magnon et al., 2013; Pundavela et al., 2015; Roger et al., 2019; Tan et al., 2021). Sasahira et al. (2013) ont en effet montré que les récepteurs des neurotrophines Trk (tropomyosin receptor kinases) jouent un rôle dans la progression tumorale des CETC de la cavité orale (Sasahira et al., 2013).

Ces interactions peuvent se manifester en histologie par l'IPN (Saidak et al., 2020). La présence d'invasion périneurale est notée dans 14 – 63% des CETC, ce pourcentage variant en raison du manque de standardisation de son diagnostic (Saidak et al., 2020). Ces liens peuvent également se manifester par la croissance de prolongements nerveux qui innervent les tumeurs, phénomène que l'on appelle neuritogenèse (Scanlon et al., 2015). Certains travaux ont également mis en évidence une neurogenèse, c'est-à-dire le recrutement de cellules progénitrices nerveuses par la tumeur pour former des neurones dans le MT de tumeurs digestives (Cervantes-Villagrana et al., 2020). Il est difficile d'établir des comparatifs entre les différents cancers concernant l'IPN du fait de la particularité de l'innervation cervico-faciale. Dans les CETC, l'IPN pourrait constituer un élément d'agressivité dans le groupe des patients présentant un risque modéré de récidives post chirurgicales, c'est-à-dire ne présentant pas de rupture extracapsulaire, de marges chirurgicales envahies (Saidak et al., 2018).

III.2. MT immunitaire et inflammatoire des tumeurs

Un constituant majeur du MT est l'infiltrat immunitaire. Il inclut des cellules de l'immunité innée et adaptative : des polynucléaires neutrophiles (PNN) ou TAN , des TAM, des NK, des cellules dendritiques (CD), des LT et des lymphocytes B (LB) (cf. *Figure 15*) (Hegde and Chen, 2020). Ces cellules peuvent être recrutées par les chimiokines et cytokines émises par les cellules tumorales ainsi que par certaines cellules stromales telles que les CAF (Monteran and Erez, 2019).

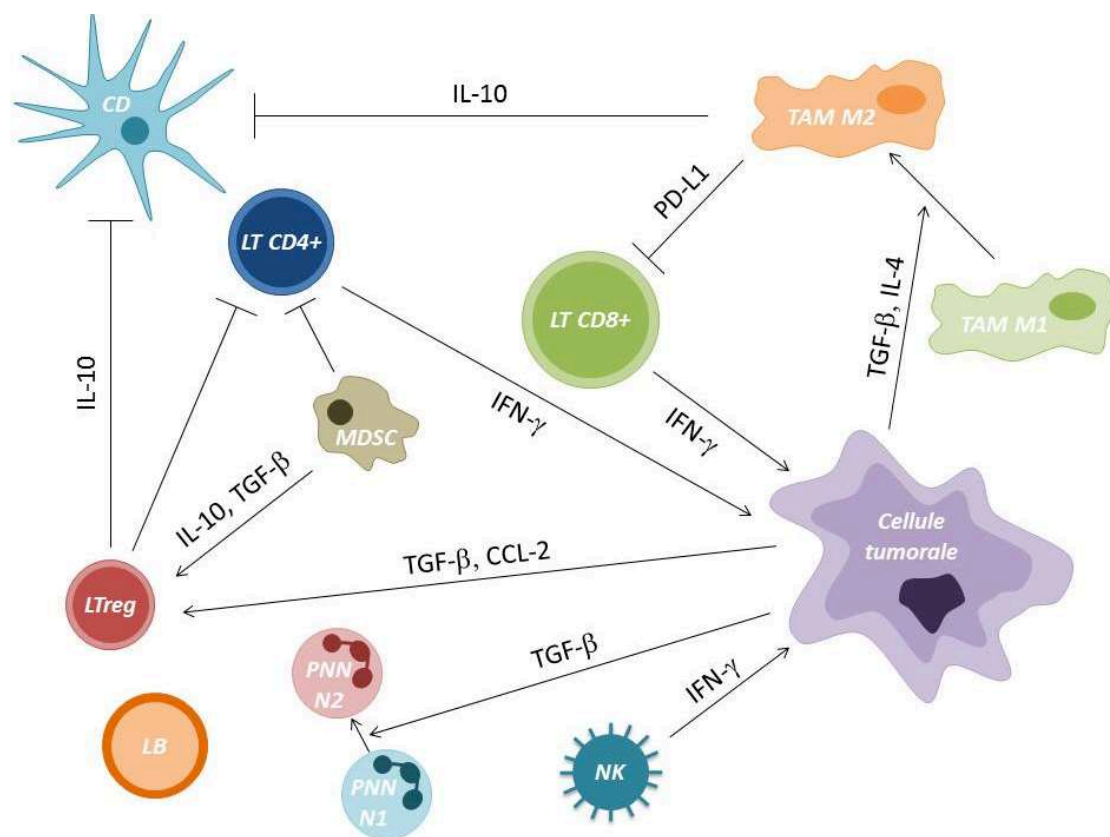


Figure 15 : Représentation des cellules pouvant composer l'infiltrat immunitaire

L'infiltrat immunitaire est composé de cellules immunitaires qui sont recrutées sur le site de la tumeur. Les cellules de l'immunité innée sont recrutées par les molécules émises par les cellules tumorales mais aussi par les CAF. Le phénotype des cellules immunitaires recrutées peut être influencé par les sécrétions des autres cellules du MT. C'est par exemple le cas pour les PNN et les TAM, dont le phénotype est modulé par le $TGF-\beta$ sécrété par les cellules cancéreuses et les CAF (non montré). Les TAM ont une présentation hétérogène dans le MT, et peuvent présenter une multitude de phénotypes, dont les deux extrêmes sont les phénotypes M1 et M2 (Peltanova et al., 2019). Le phénotype M1 est dit « pro-inflammatoire » et favorise la réponse immunitaire anti-tumorale, le phénotype M2 est quant à lui « anti-inflammatoire » et a

un rôle pro-tumoral (Peltanova et al., 2019; Wang et al., 2019b). Les TAM M2 inhibent notamment les cellules présentatrices d'antigènes grâce à la sécrétion d'IL-10, ainsi que l'activation des lymphocytes T CD8+ par l'expression de PD-L1. Les PNN peuvent eux aussi être polarisés et adopter un phénotype protumoral N2. Ces variations de phénotypes pour les TAM et PNN sont dynamiques dans le temps et réversibles. Les MDSCs correspondent à une population hétérogène de cellules myéloïdes de différenciation incomplète. Du fait de l'état d'inflammation chronique généralement présent dans le MT, les signaux d'activation de ces cellules ne sont pas sécrétés de façon physiologique mais à un faible niveau continu. Les MDSCs ne parviennent donc pas à se différencier totalement et acquièrent un phénotype, immature ainsi que des propriétés immunosuppressives. La présence de ces cellules favorise le recrutement de lymphocytes T régulateurs (LT reg) (par la sécrétion de TGF- β et d'interleukine 10) et inhibe l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Veglia et al., 2018). L'infiltrat immunitaire tumoral consiste aussi en des lymphocytes (TIL pour Tumor-Infiltrating Lymphocytes) : des LT reg, des LT CD8+ (lymphocytes T CD8+ cytotoxiques) et des LT CD4+ (Lymphocytes T CD4+ auxiliaires). Physiologiquement, les lymphocytes T sont des cellules de l'immunité adaptative, qui médient l'immunité cellulaire. Les lymphocytes B (LB) participent à l'immunité humorale, grâce à leur production d'immunoglobulines (Balkwill et al., 2012 ; Peltanova et al., 2019).

La composition de l'infiltrat immunitaire conditionne la réponse immunitaire antitumorale. Elle varie selon le type de tumeur, et peut également varier localement / dans le temps au sein d'une même tumeur (cf. *Figure 16*). Il a été proposé de distinguer trois catégories de MT selon la composition en cellules immunitaires (Hegde and Chen, 2020). Les MT appelés « déserts immunitaires » ne comportent pas de lymphocytes infiltrés ni de mécanisme de présentation d'antigènes (Hegde and Chen, 2020). Les MT « immuns exclus » présentent des LT CD8+ localisés en marge de la tumeur, bloqués par une forte infiltration de cellules immunosuppressives telles que les LT reg, les MDSC et les TAM M2 (Hegde and Chen, 2020). Enfin, les MT « enflammés-infiltrés » présentent une forte infiltration de lymphocytes cytotoxiques, des mécanismes de présentation d'antigènes compétent et une forte expression de PD-L1 par les cellules inflammatoires et cancéreuses (Hegde and Chen, 2020).

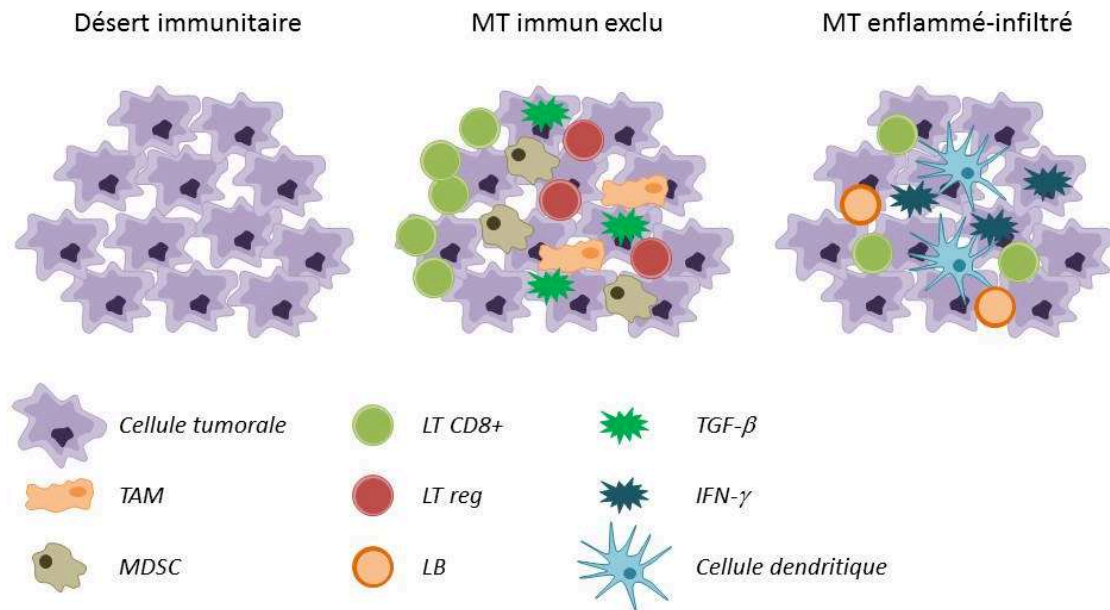


Figure 16 : Catégories de tumeurs classées selon l'infiltrat immunitaire et l'inflammation du MT

On distingue classiquement trois catégories de MT selon la composition de leur infiltrat immunitaire (Hegde and Chen, 2020). Les MT qualifiés de déserts immunitaires ne comportent pas ou très peu de cellules immunitaires. Les MT immuns exclus présentent des lymphocytes T cytotoxiques, qui sont bloqués en périphérie de la tumeur par les cellules immunosuppressives du MT (MDSC et TAM). On observe une importante activation de la signalisation $TGF-\beta$ dans ces MT, sécrété notamment par les TAM. Les MT enflammés-infiltrés comportent quant à eux des lymphocytes T cytotoxiques infiltrés dans la tumeur, ainsi que des cellules dendritiques et des lymphocytes B. La signalisation $IFN-\gamma$ est active dans cette catégorie de MT du fait de la présence de lymphocytes

Plusieurs mécanismes sont à l'origine d'inflammation dans la tumeur et à son entretien au sein du MT (cf. Figure 17) (Shalapour and Karin, 2019). Le MT enflammé est semblable à un tissu en cicatrisation puisqu'on observe dans ces deux situations l'activation et l'agrégation plaquettaire, l'activation de la cascade de la coagulation ainsi que le recrutement des PNN (Dvorak, 2019). La tumeur sécrète des cytokines et chimiokines telles que l'IL-1, l'IL-6, le M-CSF (Macrophage colony-stimulating Factor) qui recrutent et activent les cellules inflammatoires lors de la phase d'initiation de l'inflammation, comme les MDSC, les monocytes, les macrophages, les PNN, les cellules dendritiques et les NK sur le site tumoral (Groth et al., 2019; Shalapour and Karin, 2019). Le recrutement et l'activation de ces premiers effecteurs permet ensuite

le recrutement des effecteurs de l'immunité innée incluant les LT et LB (Shalapour and Karin, 2019).

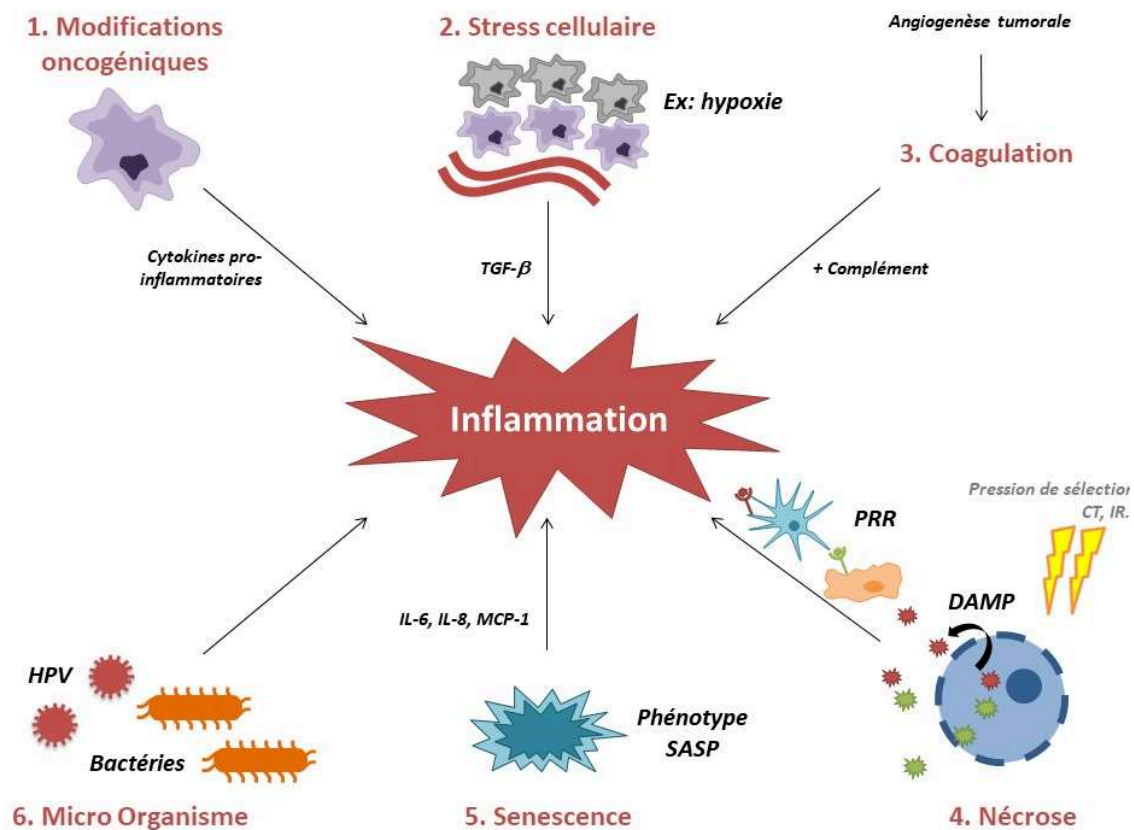


Figure 17 : Eléments du MT pouvant déclencher une inflammation

Différents éléments du MT peuvent déclencher l'activation d'une inflammation. Les modifications oncogéniques des cellules cancéreuses, et en particulier l'activation d'oncogènes, peuvent contribuer à la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules cancéreuses (Kortlever et al., 2017). L'hypoxie favorise l'expression de TGF- β par les cellules cancéreuses. La perméabilité vasculaire ainsi que la synthèse de cytokines par les cellules cancéreuses peuvent aboutir à l'inflammation via l'activation de la coagulation et du complément (Oikonomopoulou et al., 2012). Les cellules cancéreuses ne résistant pas à la sélection exercée par les conditions imposées par la croissance tumorale / certaines thérapies antitumorales nécrosent (Fucikova et al., 2020; Greten and Grivennikov, 2019; Shalapour and Karin, 2019). En mourant, ces cellules émettent des DAMP, qui activent l'inflammation (Shalapour and Karin, 2019). La perte de fonction de certains gènes suppresseurs de tumeurs (comme ATM et TP53), mène à l'induction de voies inflammatoires en réponse aux dommages de l'ADN (Greten and Grivennikov, 2019). La persistance de la DDR entraîne la sénescence de la cellule touchée et l'acquisition du phénotype SASP, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, l'IL-8 et MCP-1) (Malaquin et al., 2015). Les tumeurs induites par les micro-organismes (MO) tels que l'HPV induisent également une inflammation (Greten and Grivennikov, 2019).

Les cellules cancéreuses et stromales entretiennent une inflammation déclenchée par la tumeur au profit de cette dernière, ce phénomène est appelé « Tumor-elicited inflammation » dans la littérature (Greten and Grivennikov, 2019; Mantovani et al., 2019; Shalapour and Karin, 2019). Ainsi, le recrutement et l'activation des effecteurs de l'inflammation n'élimine pas la tumeur mais favorise la survie voire la progression tumorale ainsi que la formation de métastases (Greten and Grivennikov, 2019; Mantovani et al., 2019; Shalapour and Karin, 2019). Les cellules cancéreuses ont également la capacité de reprogrammer les cellules de l'immunité recrutées et convertissent alors le processus inflammatoire en phénomène immunosuppresseur (Greten and Grivennikov, 2019; Shalapour and Karin, 2019). La sécrétion de TGF- β par les cellules cancéreuses et par les CAF constitue un bon exemple. En effet, le TGF- β contribue à polariser les macrophages et PNN recrutés en TAM M2 protumoraux et en PNN N2 protumoraux, respectivement (Masucci et al., 2019; Sahai et al., 2020). Les MDSC recrutés par la tumeur illustrent également la conversion de l'inflammation en procédé immunosuppresseur. En effet, les MDSC possèdent de plus des propriétés immunosuppressives et se différencient en TAM ou en cellules dendritiques immatures sous l'effet de l'inflammation tumorale (Veglia et al., 2018).

En retour, l'inflammation détermine des caractéristiques physiques essentielles de la tumeur. Les CAF recrutés participent au remaniement inflammatoire de la MEC et à l'acquisition de ses caractéristiques desmoplastiques (Sahai et al., 2020). L'activation de la voie NF- κ B et de la signalisation inflammatoire favorisent l'angiogenèse tumorale (Noort et al., 2014). L'inflammation joue également un rôle dans la transition épithéliale mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses. La TEM correspond à la perte de caractéristiques épithéliales, comme les jonctions adhérentes, pour l'acquisition de propriétés mésenchymateuses (Ricciardi et al., 2015). Ce nouveau phénotype permet aux cellules d'acquies des propriétés de mobilité mais également d'être moins immunogènes que lorsqu'elles présentent un phénotype épithélial (Ricciardi et al., 2015). Enfin, les LT du MT sécrètent de l'IFN- γ , favorisant l'expression de PD-L1 par les cellules cancéreuses et inflammatoires, inactivant les fonctions des LT cytotoxiques comme nous le verrons dans la partie III.4.3 (Cha et al., 2019).

L'inflammation exerce un rôle complexe dans la progression de la tumeur et sa réponse à certaines thérapeutiques anticancéreuses, comme l'immunothérapie (Hegde and Chen, 2020). Certains marqueurs de l'inflammation pourraient avoir une valeur prédictive dans la prise en charge des tumeurs. Le rapport préopératoire protéine C réactive (CRP) / lymphocytes élevé, reflétant un fort niveau d'inflammation systémique, était associé à des tumeurs plus agressives et une diminution de la survie globale chez les patients atteints de CETC oraux (Ko et al., 2021). L'inhibition de l'inflammation grâce aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme stratégie thérapeutique antitumorale, préventive ou curative, a également été étudiée (Bunt et al., 2007; Harris, 2009; Na et al., 2013). L'intérêt de l'utilisation des AINS dans les thérapies antitumorales semble limité à certains profils d'expression des tumeurs. En effet, une analyse rétrospective de la cohorte de Pittsburg suggère que le bénéfice des AINS dans les CETC est restreint à la sous-population de patients présentant une mutation ou une amplification de la voie PIK3CA (Hedberg et al., 2019). Le mécanisme de cette sensibilité semble lié à la sécrétion basale supérieure de PGE2 par les cellules cancéreuses, médiée par la sur-activation de la voie PIK3CA et inhibée par les AINS (Hedberg et al., 2019).

III.3. Les caractéristiques du MT immunitaire des CETC

Le MT des CETC est globalement riche en cellules inflammatoires et immunitaires (Mandal et al., 2016). Dans notre analyse comparative des 16 types tumoraux les plus fréquents, menée grâce aux données du TCGA, nous avons montré que les CETC présentaient un fort taux de LT, de PNN et de NK infiltrés (cf. *Figure 18*) (Lailler et al., 2019).

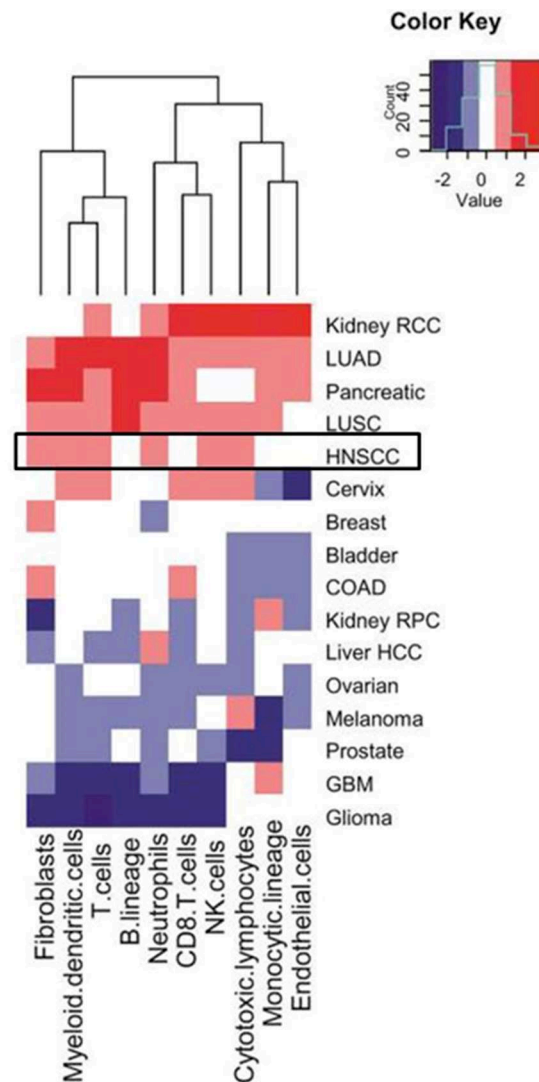


Figure 18 : Comparaison de la densité de l'infiltrat tumoral immunitaire dans les 16 types de tumeurs les plus communs

La représentation en « Heatmap » a été réalisée à partir des données de séquençage des ARN du TCGA (Lailler et al., 2019). La couleur rouge correspond à une forte infiltration de cellules immunitaires et le bleu à une faible infiltration de cellules immunitaires. Les CETC (HNSCC encadrés en noir). Les CETC sont parmi les tumeurs avec le plus fort infiltrat immunitaire.

Néanmoins, les CETC sont des tumeurs hétérogènes et leur MT l'est également (Wondergem et al., 2020).

Les premiers travaux réalisés en immunohistochimie (IHC) ont étudié la valeur pronostique de la composition du MT des CETC. Ainsi, Nguyen et al. (2016) ont mis en évidence une corrélation positive entre le niveau d'infiltration en lymphocytes T et la survie globale dans les CETC traités par radio-chimiothérapie (Nguyen et al., 2016). De façon étonnante, l'infiltration forte en LT reg a également été mise en évidence comme un facteur de bon pronostic dans les CETC (Badoual et al., 2006; Seminerio et al., 2019), probablement en lien avec leur effet anti inflammatoire. Une corrélation positive entre infiltration en TAM et marqueurs cliniques défavorables a également été mise en évidence dans les CETC (Kumar et al., 2019). Ces travaux présentent néanmoins la limite d'avoir été réalisés sur des effectifs limités, de façon semi-quantitative et sur un nombre limité de composants du MT (Badoual et al., 2006; Seminerio et al., 2019). Au vu de la complexité de la composition des infiltrats, ces études ne permettent pas de mettre en évidence précisément les rôles pathologiques de chaque type cellulaire.

Plus récemment, l'émergence des approches basées sur la génomique fonctionnelle, a permis d'aborder de façon plus standardisée, sur des effectifs plus importants, l'état fonctionnel et le rôle des différents acteurs du MT immunitaire. Ces études ont notamment mis en évidence le lien entre la composition du MT et le grade de la tumeur, le statut HPV ainsi que la localisation tumorale primaire (Chen et al., 2019; Liu et al., 2021; Mandal et al., 2016). En effet, ces travaux ont mis en évidence le fait que les CETC HPV+ve présentent généralement un infiltrat immunitaire incluant une forte infiltration en LT et une signalisation IFN- γ inflammatoire active (Chen et al., 2019; Mandal et al., 2016). Les travaux de Mandal et al. (2016) montrent ainsi dans une étude pan-cancers que les CETC possèdent une médiane haute du ratio LT reg / LT cytotoxiques (Mandal et al., 2016). Chen et al. (2019) ont quant à eux mis en évidence la possibilité de stratifier les CETC selon la composition de leur MT immunitaire grâce à l'analyse des données transcriptomiques de ces tumeurs (Chen et al., 2019). Les auteurs ont ainsi mis en évidence trois catégories de MT dans les CETC selon l'expression de signatures associées à la signalisation inflammatoire et à l'infiltration de cellules immunitaires. La première sous-catégorie, appelée « immunitaire épuisée » par les auteurs, présentait une signature enrichie en TAM M2

et en signalisation Wnt-TGF- β , alors que la deuxième sous-catégorie nommée « immune activée », montrait une signature enrichie en TAM M1, en activité cytotoxique et en signalisation IFN- γ . La troisième catégorie de CETC n'exprimait pas ou très peu ces signatures et a été nommée par les auteurs MT « non immunitaire » (Chen et al., 2019). Enfin, les travaux de Liu et al. (2021) ont mis en évidence une association entre composition du MT immunitaire et grade de la tumeur, ainsi qu'une corrélation entre la survie globale et l'infiltration de certaines cellules immunitaires (Liu et al., 2021).

Plusieurs mécanismes peuvent aboutir à une diminution de l'immunité antitumorale dans les CETC. Tout d'abord, la présentation de l'antigène aux cellules immunitaires est souvent altérée dans ces tumeurs (Ferris et al., 2005). Des pertes d'hétérozygotie sur le locus 6p21 (portant le Complexe majeurs d'histocompatibilité [CMH]) entraînent une baisse d'expression des CMH de classe I, et donc la reconnaissance des antigènes par le système immunitaire (Ferris et al., 2005). L'infiltration de cellules immunosuppressives telles que les LT reg et les TAM M2 est également fréquente dans les CETC (Chen et al., 2019; Mandal et al., 2016). L'expression par les cellules cancéreuses et inflammatoires de ligands appartenant aux points de contrôle immunitaire, tels que PD-L1 joue également un rôle important dans l'échappement immunitaire des CETC (cf. partie III.4.1).

III.4. Le Ciblage de PD-L1 dans les CETC

III.4.1. Définition des points de contrôle immunitaires et phénomène d'épuisement des LT

Les points de contrôle immunitaires sont des régulateurs physiologiques de l'immunité; ils ont pour but d'éviter l'activation excessive ou inappropriée des LT, et de marquer la fin de la réponse immunitaire (Boussiotis, 2016). Ces points de contrôle immunitaires sont des voies de signalisation activées par l'interaction entre les récepteurs membranaires exprimés par les LT et leurs ligands spécifiques (Boussiotis, 2016).

Parmi ces récepteurs, deux sont fréquemment exprimés dans les CETC : les récepteurs CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) et PD-1 (Boussiotis, 2016; Mandal et al., 2016). Leurs ligands sont respectivement CD80/CD86 et PD-L1/PD-L2 (Programmed Death Ligand 1 / 2). Ces ligands sont exprimés de façon constitutive par certaines cellules humaines telles que les cellules placentaires afin de leur éviter d'être éliminées (Boussiotis, 2016). Leur expression peut également être induite, comme c'est le cas dans certaines cellules cancéreuses et inflammatoires (Boussiotis, 2016).

L'activation chronique de ces voies de signalisation par l'interaction répétée des récepteurs avec leurs ligands inhibe la fonction des LT ou favorise leur apoptose (Blank et al., 2019). L'inhibition aboutit à l'anergie des LT : ces derniers perdent leur capacité de réponse à la présentation d'antigènes, de sécrétion de cytokines inflammatoires et de prolifération (Blank et al., 2019). Ce phénomène est appelé épuisement des lymphocytes (Blank et al., 2019). Le mécanisme précis et les voies de signalisation impliqués sont encore mal élucidés (Blank et al., 2019).

Cet épuisement des lymphocytes dans le MT compromet donc la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses, qui sont protégées de la surveillance immunitaire (Pardoll, 2012). L'inflammation chronique joue un rôle important dans ce phénomène, puisque l'IFN- γ sécrété par les cellules inflammatoires recrutées dans le MT est un inducteur canonique de l'expression du ligand PD-L1 dans les cellules cancéreuses (Garcia-Diaz et al., 2017). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans notre étude au ligand PD-L1, dont le récepteur PD-1

est le seul pour lequel deux ICB sont approuvés en thérapeutique dans les CETC à ce jour (Pfister et al., 2020).

III.4.2. Les ICB dans les CETC

Une stratégie thérapeutique utilisée dans les CETC repose sur l'inhibition de la liaison entre ces points de contrôle et leurs ligands, afin de restaurer l'activation des lymphocytes T et restaurer l'immunité adaptative antitumorale (Cramer et al., 2019b). Les molécules utilisées en thérapeutique sont des immunoglobulines humanisées (Cramer et al., 2019b). Quand ces anticorps interagissent avec leur cible, la liaison récepteur-ligand devient impossible, inhibant l'épuisement des LT (cf. *Figure 19*). Deux anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1 sont approuvés par la FDA dans les CETC récidivants / métastatiques: le nivolumab et le pembrolizumab (Cohen et al., 2019a; Cramer et al., 2019b; Ferris et al., 2018a; Pfister et al., 2020). Ces deux ICB sont actuellement indiqués dans le cadre du traitement des patients présentant un CETC récidivant / métastatique avec un score CPS supérieur ou égal à 1 (Pfister et al., 2020). Le score CPS correspond à la comptabilisation de l'ensemble des cellules exprimant le ligand PD-L1 en IHC (tumoraux et immunitaires) rapportée au nombre total de cellules (Cohen et al., 2019b). D'autres anticorps ciblant le ligand PD-L1 sont en cours d'étude dans le traitement des CETC : le durvalumab et l'atezolizumab (Cramer et al., 2019b).

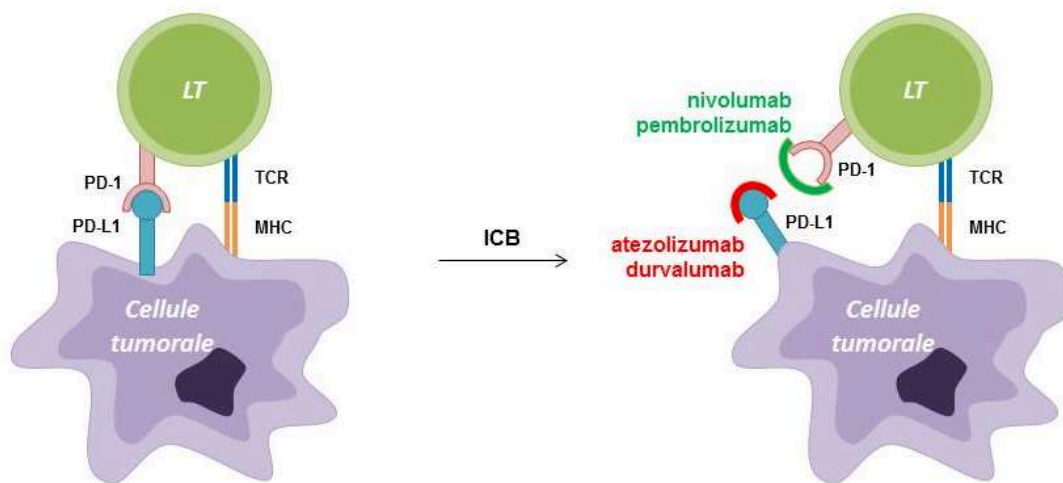


Figure 19 : Représentation schématique du fonctionnement des ICB visant la voie PD-1 / PD-L1

Le récepteur PD-1 peut être ciblé dans les CETC par le nivolumab et le pembrolizumab, deux anticorps déjà approuvés dans ces tumeurs. Deux autres sont actuellement en développement dans les CETC, inhibant PD-L1 : l'atezolizumab et le durvalumab. Quand ces anticorps interagissent avec leur cible, la liaison de PD-1 à son ligand n'est plus possible. Ceci empêche le phénomène d'épuisement des lymphocytes et a pour but de restaurer l'immunité adaptative engendrée par la reconnaissance du MHC par le TCR.

Dans les CETC, une surexpression de PD-L1 est rapportée dans plusieurs études analysant des tissus tumoraux (Chow, 2020; Mehra et al., 2018; Seiwert et al., 2016; Straub et al., 2016). Plusieurs essais ont montré une corrélation positive entre le score CPS et la réponse aux ICB bloquant PD-1, mettant en avant le potentiel de biomarqueur de ce score (Chow et al., 2016; Mehra et al., 2018; Seiwert et al., 2016). Néanmoins, sa valeur clinique reste faible puisque son analyse en IHC est difficile (aucune valeur seuil de positivité officielle n'est définie) et encore peu standardisée. Certains patients présentant un fort score CPS ne répondent pas au traitement et d'autres patients avec un faible score CPS répondent néanmoins aux ICB (Rasmussen et al., 2019). L'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression de PD-L1 est une autre limite pour l'interprétation de ce biomarqueur (Rasmussen et al., 2019).

La définition de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux ICB est donc nécessaire afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients. Cette recherche inclut l'étude de nouveaux biomarqueurs du MT, comme ceux présentés dans la table 2 (cf. *Tableau 2*) tels que le contexte cytokinique ou la charge mutationnelle, mais aussi l'expression des points de contrôle immunitaires.

Tableau 2: Liste de biomarqueurs candidats dans les CETC prédictifs de l'efficacité des ICB

Types de biomarqueurs	Biomarqueurs	Références
Protéine	PD-L1 exosomaux Inactivent les cellules T CD8+ cytotoxiques	(Theodoraki et al., 2018)
	DNA	
	Amplification génomique de PD-L1	(Straub et al., 2016)
	Charge mutationnelle Associée à l'efficacité des ICB	(Samstein et al., 2019)
	Déficiences MMR / Instabilité microsatellites Associée à une infiltration immunitaire augmentée et une activité cytolytique supérieure	(Zhao et al., 2019)
	Charge de néoantigènes Mutations ciblées par les cellules T Associée à l'efficacité des ICB	(McGranahan et al., 2016)
RNA	Profil d'expression des gènes de cellules T et de l'inflammation Une signature de 18 gènes en lien avec la signalisation IFN- γ et les fonctions immunitaires associée à l'efficacité des ICB	(Ayers et al., 2017)
	Analyse de l'expression des checkpoints immunitaires Co expression fréquente de PD-L1/ PD-1 et d'OX40/OX40L, TIGIT, CTLA4 dans les CETC	(Lecerf et al., 2019)

La charge mutationnelle correspond ici à la somme des mutations par mégabase dans tout le génome.

III.4.3. Régulation de l'expression de PD-L1 dans les CETC

L'expression de PD-L1 est soumise à des modalités complexes de régulation dans les CETC. Le gène *CD274* codant pour PD-L1, situé sur le chromosome 9, est amplifié à haut niveau (un ratio PDL1/ctrl>4, 4 correspondant à la situation normale en FISH) dans 15% des CETC (Straub et al., 2016).

Par ailleurs, l'expression de PD-L1 fait l'objet d'une régulation transcriptionnelle (cf. *Figure 20*). La transcription de PD-L1 dans les cellules tumorales épithéliales est stimulée par l'inflammation, en particulier par l'IFN- γ sécrété par les cellules inflammatoires du MT (cf. *Figure 20*) (Cha et al., 2019). L'IFN- γ se fixe sur son récepteur IFN γ de la cellule tumorale, activant la voie JAK / STAT (Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription) (Cha et al., 2019). STAT est libérée, transloque dans le noyau et se fixe sur le facteur de transcription IRF-1 (Interferon Regulatory Factor 1) (Cha et al., 2019). Le complexe STAT / IRF-1 se fixe alors sur la séquence promotrice de PD-L1 et permet sa transcription (Ritprajak and Azuma, 2015). Par ailleurs, la voie ATM/Chk2 de la DDR active également la voie NF- κ B, ainsi que la voie JAK / STAT (Cha et al., 2019; Sato et al., 2019). Un autre phénomène menant à l'augmentation de l'expression de PD-L1 est l'activation des récepteurs TLR (pour Toll-like Receptors) par les DAMP qui peuvent être émis par les cellules tumorales nécrosées (Ritprajak and Azuma, 2015). L'activation des récepteurs TLR mène, via l'activation du facteur 6 associé aux récepteurs de TNF (TRAF6 pour TNF Receptor-Associated Factor 6), à la fixation des facteurs de transcription NF- κ B et NFAT sur le promoteur de PD-L1. L'expression de PD-L1 est également favorisée par l'EGFR et ses voies de signalisation sous-jacentes (voie des MAPK et PI3KCA) dans les tumeurs (Cha et al., 2019). Enfin, l'hypoxie favorise l'activation des facteurs induits par l'hypoxie (HIF pour Hypoxia Inducible Factors), qui se fixent également sur le promoteur de PD-L1 et favorisent sa transcription (Cha et al., 2019; Zahnreich et al., 2021).

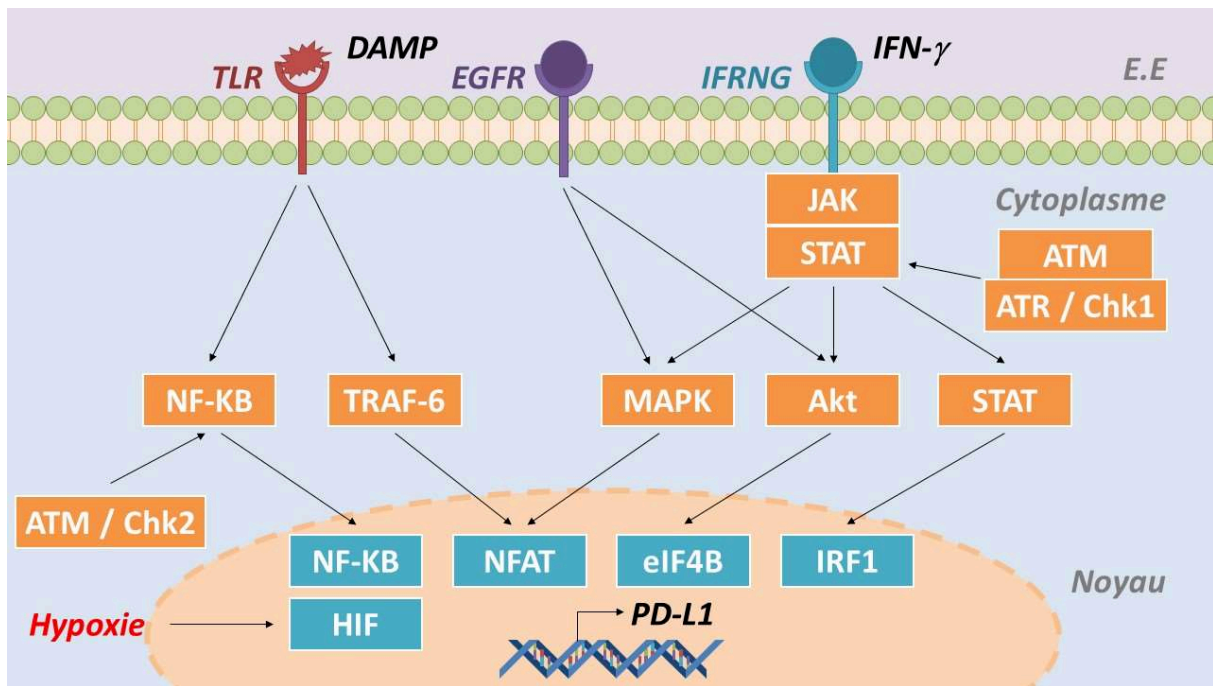


Figure 20 : Régulation transcriptomique de l'expression de PD-L1 dans les carcinomes épidermoïdes

La fixation des DAMP émis dans la tumeur au récepteur TLR et de l'IFN- γ sur son récepteur (IFRNG) entraîne l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire permettant la fixation de différents facteurs de transcription (NF-KB, NFAT, eIF4B et STAT-IRF1) sur la séquence promotrice de PD-L1. L'activation de l'EGFR régule également l'expression de PD-L1 (Concha-Benavente et al., 2016; Ritprajak and Azuma, 2015). L'hypoxie module la régulation transcriptionnelle de PD-L1 via le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Cha et al., 2019). Enfin, la DDR a également été rapportée comme modulateur de l'expression de PD-L1, par le biais notamment des voies NF-KB et JAK-STAT (E.E : Espace Extracellulaire).

L'expression de la protéine PD-L1 fait également l'objet d'une régulation post-transcriptionnelle. Ainsi, la glycosylation de PD-L1 a déjà été mise en évidence, stabilisant son expression (Li et al., 2016). PD-L1 peut également être ubiquitinée et ainsi dégradée. Dans un contexte inflammatoire, le TNF- α peut stabiliser PD-L1 en déubiquitinant PD-L1 (Lim et al., 2016). Enfin, PD-L1 peut être dégradée par les lysosomes (Wang et al., 2019a).

Dans le contexte thérapeutique, PD-L1 a pu être rapportée pour être induite par les chimiothérapies telles que le cisplatine (Ock et al., 2017). Leduc et al. (2018) ont par également mis en évidence la régulation de PD-L1 dans des tumeurs traitées par

chimiothérapie d'induction TPF (taxane, platine, 5-FU), sans mettre en évidence le rôle particulier de chacune ou le mécanisme de cette régulation (Leduc et al., 2018).

IV. Hypothèses de travail et objectifs

Le MT est un déterminant important de la réponse au traitement dans les CETC. La ferroptose, en tant que nécrose, constitue une source potentiellement importante d'alarmines modulant potentiellement le MT.

Dans la première partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la possibilité de l'existence de différences de sensibilité à la ferroptose dans les CETC selon leur statut HPV. Nous avons étudié l'expression de plusieurs acteurs clefs de la ferroptose et abordé la sensibilité des cellules de CETC à la ferroptose.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la régulation de différents acteurs des points de contrôle immunitaires par les chimiothérapies approuvées dans les CETC et la régulation de l'expression de ce ligand.

Chapitre 2 : Travaux

I. SLC7A11, biomarqueur et cible thérapeutique dans les cancers épidermoïdes de la tête et du cou positifs à HPV

Anaïs Hémon¹, Christophe Louandre¹, **Claire Lailier**¹, Corinne Godin, Maxime Bottelin, Virginie Morel, Catherine François, Antoine Galmiche, Zuzana Saidak (2020). SLC7A11 as a biomarker and therapeutic target in HPV-positive head and neck Squamous Cell Carcinoma. BBRC. 533 : 1083-1087.

¹ : co-premier auteur

Contexte :

Les CETC HPV+ve ont une biologie distincte des CETC HPV-ve (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018) et répondent souvent mieux à la radio(chimio)thérapie (Ang et al., 2010; Chow, 2020). Les protéines transformantes E6 et E7 des HPV à haut risque, inhibent respectivement p53 et pRb (Hoppe-Seyler et al., 2018). Le mode d'action de ces protéines pourrait également impliquer la survenue d'un stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre intracellulaire entre molécules oxydées et réduites (Cruz-Gregorio et al., 2018). En effet, Marullo et *al.* ont rapporté en 2015 la survenue d'un stress oxydant dans des cellules de CETC HPV+ve, du fait de la formation de ROS induite par E6 et E7 (Marullo et al., 2015).

Nous avons émis l'hypothèse que ce déséquilibre oxydoréducteur pouvait entraîner une sensibilité accrue à la ferroptose des CETC HPV+ve. En effet, cette mort cellulaire implique un stress oxydatif entraînant la formation de ROS pour aboutir à la peroxydation des AGPI membranaires (Li et al., 2020). Une différence de sensibilité à la ferroptose des tumeurs HPV+ve pourrait être utilisée en thérapeutique pour cibler spécifiquement ces tumeurs. Notre objectif a donc été d'étudier la ferroptose en lien avec le statut HPV dans les CETC.

Résultats :

Nous avons défini l'expression de 20 gènes impliqués dans la ferroptose. Nous avons comparé leur expression entre CETC HPV-ve et HPV+ve, dans deux cohortes différentes avec des données RNA-seq : le TCGA (The Cancer Genome Atlas) et les données de l'étude menée par Fleming et al., disponibles dans Gene Expression Omnibus sous le numéro GSE72536 (Fleming et al., 2019). Nous avons observé que les CETC HPV+ve expriment de plus bas niveaux d'ARN messager *SLC7A11* et *SLC3A2*, codant pour les deux sous-unités de XC^- , que les CETC HPV-ve. L'expression de *SLC7A11* était fortement corrélée à celle des enzymes oxydoréductrices (enzyme malique et enzymes de la voie des pentoses-phosphates), reliant l'expression de *SLC7A11* à l'équilibre oxydoréducteur cellulaire. Nous avons utilisé une troisième cohorte de données de séquençage de cellules uniques (Puram et al., 2017), pour montrer que *SLC7A11* est exprimée exclusivement par les cellules tumorales, et non par les cellules du MT.

Nous avons transposé ces résultats *in vitro*, en travaillant sur deux lignées (PE/CA-PJ41 [issues de CETC de la cavité orale] et BICR6 [issues de CETC de l'hypopharynx]) dans lesquelles nous avons introduit un plasmide pour exprimer de façon stable les protéines transformantes E6 et E7 d'HPV 16. Ces deux lignées E6/E7 étaient plus sensibles à l'érastine, l'inducteur de référence de la ferroptose, que leurs lignées parentales. Cette mortalité supérieure est abolie par la déferoxamine, confirmant que la mort cellulaire observée dans ce contexte était bien la ferroptose. Néanmoins, nous n'avons pas mis en évidence de différence d'expression de *SLC7A11* entre les lignées E6/E7 et leurs lignées parentales. L'exposition à l'érastine entraînait une baisse plus marquée de la concentration en GSH total dans les cellules exprimant E6/E7. La préexposition à la NAC (N-acétylcystéine, précurseur chimique de la cystéine) abolissait la différence de sensibilité à la ferroptose entre PE/CA-PJ41 E6/E7 et parentales.

SLC7A11 as a biomarker and therapeutic target in HPV-positive

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Anais Hémon ^{1,2,4}, Christophe Louandre ^{1,2,4}, Claire Lailier ^{1,2,4}, Corinne Godin ^{1,2},

Maxime Bottelin ², Virginie Morel ³, Catherine François ³, Antoine Galmiche ^{1,2,5}, Zuzana Saidak ^{1,2,4}

1: Equipe CHIMERE, EA7516, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

2: Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, France

3: Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, France

4: Contributed equally to this report

5: Corresponding author: Antoine Galmiche, MD-PhD, Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens Cedex, France. Tel: 033-(0)322087017; Fax: 033-(0)322087026; E-mail: Galmiche.Antoine@chu-amiens.fr

Running Title: SLC7A11 in HNSCC

Funding: Work in our laboratory is supported by the CHU Amiens Picardie and Ligue contre le Cancer, Comité de la Somme. The funders took no part in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest: none

Abstract

Ferroptosis, a regulated form of cell necrosis was previously reported to be induced upon pharmacological targeting of the cystine transporter SLC7A11 in Head and neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). Whether tumors arising in a context of chronic infection with Human Papillomavirus (HPV) are sensitive to ferroptosis is unknown. Using RNAseq data (both whole-tumor and single-cell sequencing) we report that HPV positive (HPV⁺) tumors have lower expression levels of SLC7A11 compared to HPV negative (HPV⁻) HNSCC. We examined *in vitro* the effect of erastin, a specific blocker of SLC7A11, applied on two HNSCC cell lines with stable expression of HPV16 E6 and E7 oncoproteins. We report a decrease in total GSH levels and an increased sensitivity to erastin-induced ferroptosis in E6-E7 cells. Cell sensitivity to ferroptosis was specifically related to a defect in cystine transport since we found no difference in ferroptosis induced by the direct inhibition of GPX4, and N-Acetyl Cysteine abolished the difference between WT and E6-E7-expressing cells. Our findings point to SLC7A11 as an HPV-related biomarker of potential therapeutic relevance in HNSCC. Targeting cystine import to promote ferroptosis might be a promising strategy against HPV⁺ HNSCC. (188 words)

Key words: HNSCC; ferroptosis; Human papillomavirus 16; SLC7A11; erastin

Abbreviations: HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; GPX4: Glutathione Peroxidase 4; HPV: Human papillomavirus; LDH: Lactate Dehydrogenase; NAC: N-Acetyl-Cysteine; SLC7A11: solute carrier family 7 member 11; SLC3A2: solute carrier family 3 member 2; TCGA: The Cancer Genome Atlas

1. Introduction

Head and neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) constitute a heterogeneous group of tumors that arise from the malignant transformation of the epithelial cells of the upper aerodigestive tract. HNSCC often appear in a context of chronic exposure to tobacco and alcohol, but the infection with Human Papillomavirus (HPV) is an emerging causative agent for tumors of the oropharynx [1]. Importantly, HPV is not only recognized as an important etiological actor of oral carcinogenesis, but it is also a major element of tumor prognosis as it is known that HPV^{+ve} HNSCC usually respond better to radio(chemo)therapy [1,2]. Although HPV^{+ve} tumors are recognized as tumors with specific biological alterations [3], to date no therapeutic approaches exist to rationally target HPV^{+ve} HNSCC. HPV16 is the most common type of HPV involved in HNSCC. Its capacity to transform oral epithelial cells into malignant cells has been extensively linked to the expression of the viral oncoproteins E6 and E7, classically reported to inactivate pRb and p53, respectively [4,5]. Cellular metabolic reprogramming is an essential hallmark of malignant transformation [6,7]. Recent studies identified alterations in glycolysis and mitochondrial respiration that are related to the HPV status in HNSCC [8-10]. Oxidative stress, *i.e.* an imbalance between the production of oxidant species derived from oxygen, and antioxidant defenses has been reported in HPV^{+ve} HNSCC cells and proposed to be linked to intrinsic characteristics of these tumors, such as genomic instability [11-12].

Ferroptosis, recently described as a distinct form of regulated cell death, has gained importance as an alternative to apoptosis for the elimination of cancer cells and the regression of solid tumors [13-15]. Compared to other forms of regulated necrosis, ferroptosis is characterized by the occurrence of intense membrane lipid peroxidation [16]. Ferroptosis is typically induced experimentally by the chemical compound erastin, a blocker of the transport of cystine across the plasma membrane of eukaryotic cells via the cystine/glutamate transporter system Xc⁻ [16,17]. The Xc⁻ transporter consists of a light-chain subunit xCT (*SLC7A11*) and a heavy-chain subunit CD98 (*SLC3A2*) [16]. Ferroptosis can also be experimentally induced by the chemical RSL3 that inhibits the enzyme

glutathione peroxidase 4 (GPX4), a cellular peroxidase that uses reduced glutathione (GSH) to reverse lipid peroxidation [18]. The possibility that ferroptosis might be induced in HNSCC was recently reported [19,20], and it was also suggested that this strategy may constitute an appealing possibility to control tumor resistance to common chemotherapeutic agents [13-15]. Despite the reports that HPV^{+ve} HNSCC cells undergo oxidative stress [12], no study to date has addressed the possibility of inducing ferroptosis in the HPV^{+ve} context. In the present study, we aimed to examine this possibility by combining gene expression analyses of HNSCC tumors with *in vitro* studies using HNSCC cells expressing HPV16 E6-E7 viral oncoproteins.

2. Materials and Methods

RNA expression analysis. Data for HNSCC tumors were retrieved from TCGA using Cbioportal: <http://cbioportal.org> [3,21]. 121 tumors had data on both the HPV status (based on p16 staining or in situ hybridization) and RNAseq data (normalised using RNA-Seq by Expectation Maximization: RSEM). Basic clinical and pathological data are summarized in Suppl. Table 1. Data from the Gene expression omnibus dataset GSE72536 (whole tumor RNAseq for 23 HNSCC tumors, Illumina HiSeq 2000) [9] and dataset GSE103322 (single cell gene expression analysis for 5902 cells available from 18 tumors) [22] were also used.

Cell culture and establishment of E6-E7-expressing subclones. The cell lines BICR6 and PECA/PJ41 were purchased from ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures). Stable subclones expressing HPV16 E6-E7 were established from each cell line using the plasmid pLXSN16 E6-E7 (Dr D. Galloway, Addgene #52394) [23] and maintained in culture with puromycin (1µg/mL). Additional information regarding cell lines and subclones is available in the Suppl. Materials & Methods section.

Ferroptosis assay. Lactate Dehydrogenase (LDH) released in the culture medium was measured with the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega) as reported previously [24,25]. The results are expressed as % of total LDH, taking complete cell extracts (1% Triton X100) as 100%. The protocol for the measurement of total cellular GSH (tGSH) content is described in Suppl. Materials & Methods.

Statistical analyses. The unpaired Wilcoxon-Mann-Whitney test and Student's t test were used as indicated. False-discovery rate (FDR) correction was applied as indicated. All analyses were done with R version 3.4.2 (<https://www.r-project.org>).

3. Results

3.1. HPV⁺ HNSCC tumors have lower expression levels of *SLC7A11* and *SLC3A2*.

We examined the expression levels of 20 key genes previously reported to regulate ferroptosis in HPV^{-ve} vs HPV⁺ HNSCC samples from TCGA (Table 1). 121 patients with a documented HPV status and RNA seq data (n=80 HPV^{-ve} and n=41 HPV⁺) were analyzed. The patient characteristics (sex, age, primary tumor size and location, angiolymphatic extension, extracapsular spread, perineural invasion) are summarised in Suppl. Table 1. The 20 ferroptosis genes were organised according to their main role: i) transporters of the amino-acid cystine ; ii) antioxidant defenses / lipid metabolism ; iii) iron metabolism and autophagy (Table 1). The essential finding obtained with this analysis, as shown in Fig. 1A, was that the levels of *SLC7A11* and *SLC3A2* mRNA, encoding the cystine/glutamate transporter system X_C(-) are strikingly lower in HPV⁺ compared to HPV^{-ve} HNSCC (Table 1, Fig. 1A). Based on RSEM, the median expression of *SLC7A11* was 4.1-fold times lower in HPV⁺ tumors compared to HPV^{-ve} tumors, and 2.4-fold times lower for *SLC3A2*. The expression levels of *SLC7A11* and *SLC3A2* were significantly correlated (Spearman r=0.49). This lower expression of *SLC7A11* and *SLC3A2* in HPV⁺ tumors compared to HPV^{-ve} tumors was verified in an independent HNSCC cohort (Fig 1B) [9]. Again using RNAseq data from TCGA, we aimed to relate the expression of *SLC7A11* to

the expression of gene markers of hypoxia, other cell surface transporters (glucose, glutamine and lactate), enzymes of glycolysis, and two enzymatic pathways that play a key role in redox metabolism, *i.e.* malic enzyme and the Pentose phosphate pathway (Fig. 1C). A strong correlation between the expression of *SLC7A11* and the redox enzymes (malic enzyme and the Pentose phosphate pathway) was apparent (Spearman $r=0.65$ with *ME1* and $r=0.52$ with *G6PD*). There was no significant correlation between the expression of *SLC7A11* and the other nutrient transporters analyzed (Fig. 1C), highlighting the specific regulation of *SLC7A11*. Importantly, the expression of *SLC7A11* mRNA was strictly restricted to the tumor cells themselves, as was determined using single cell-RNAseq data retrieved from the study by Puram et al. [22] (Fig 1D). We concluded that *SLC7A11* mRNA levels differ markedly between cancer cells in HPV^{+ve} tumors and HPV^{-ve} tumors.

3.2. HPV16 E6-E7 increase the sensitivity of HNSCC cells to erastin-induced ferroptosis.

In order to examine the impact of HPV on the sensitivity of HNSCC to ferroptosis, we established two cell lines stably expressing the HPV 16 oncoproteins E6-E7. The two cell lines differed in their growth response to E6-E7: the growth of PECA/PJ41 cells was stimulated by E6-E7 expression, while the growth of BICR6 cells was reduced by E6-E7 expression (Suppl. Fig. 1). The corresponding cell lines were exposed to erastin and compared to their parental cell lines (Fig. 2A). Erastin induced a 2-fold increase in cytotoxicity in PECA/PJ41 cells expressing E6-E7 compared to parental cells. Importantly, this increased cytotoxicity was prevented by iron chelation (deferrioxamine), demonstrating its ferroptotic nature (Fig. 2A). A comparable induction of ferroptosis was observed with the cell line BICR6 expressing E6-E7 (Fig. 2A). The sensitization of these cells to erastin through the expression of E6-E7 was therefore not restricted to a unique genotypic background of HNSCC. We next tested the chemical inducer RSL3, that is directly active against GPX4 [18] (Fig. 2B). Immunoblotting of the parental cell line compared to E6-E7 cells revealed stable levels of expression of *SLC7A11* and markers of oxidative stress (Heme Oxygenase, HO1) or iron stores (Transferrin receptor, TFR and Ferritin Heavy chain, FTH) (Fig. 2B).

We examined the specificity of our findings by applying increasing concentrations of RSL3, an inducer of ferroptosis acting through a different mechanism from erastin, *i.e.* by directly blocking GPX4. RSL3 (0-5 μ M) was applied to WT PECA/PJ41 cells and their E6-E7 counterparts (Fig. 3A). In contrast to what had been observed with erastin, we found no significant difference in ferroptosis induction by RSL3 between WT and E6-E7 cells (Fig. 3A). We next measured total GSH (tGSH) levels in PECA/PJ41 and BICR6 cells expressing E6-E7 (Fig. 3B). In both genomic backgrounds, we found an almost 50% reduction in the basal tGSH content in E6-E7 expressing cells (Fig. 3B, suppl. Fig. 2). Finally, we aimed to establish the role of cysteine supply in the effects of E6-E7 expression with N-Acetyl-Cysteine (NAC), a chemical precursor of cysteine (Fig. 3C). We noticed that NAC, applied 1h before erastin, potently protected PECA/PJ41WT and E6-E7-expressing cells. Moreover, NAC abolished any difference in ferroptosis induction between WT and E6-E7 cells, pointing to cysteine and tGSH metabolism as being altered in E6-E7 expressing cells (Fig. 3C).

4. Discussion

Previous studies have examined the induction of ferroptosis in HNSCC, but no studies to date have addressed this topic in HPV^{+ve} HNSCC [19,20]. The present study aimed to address the characteristics of these tumors. We found that HPV^{+ve} HNSCC have lower expression levels of *SLC7A11* compared to HPV^{-ve} tumors. A strong correlation was found between *SLC7A11* and the expression levels of the Malic Enzyme (*ME1*) and the Pentose phosphate pathway (*G6PD*), indicating a link with the NADPH metabolism and the overall specificity of the observations. The expression of *SLC7A11* was found to be restricted to tumor cells within these tumors, and we therefore examined the functional implications of targeting *SLC7A11* in HNSCC cells *in vitro*. Importantly, the expression of E6-E7 increased the extent of ferroptosis induced by *SLC7A11* targeting achieved with erastin by reducing tGSH levels without altering the expression levels of *SLC7A11*. These findings extend previous studies that have reported the occurrence of oxidative stress in HPV^{+ve} HNSCC cells [11,12]. We conclude that low expression of the Cystine transporter *SLC7A11* and the reduced levels of tGSH

constitute two separate biological characteristics of HPV^{+ve} HNSCC. At this stage, we are not able to explain how the E6-E7 oncoproteins contribute to the cell-intrinsic redox modulation. It is also unclear whether the reduction of tGSH levels and oxidative stress induced by E6-E7 are important for viral pathogenesis and cancer progression. It might indeed participate in the viral strategy for integrating the proviral genome by promoting DNA double strand breaks and potentially promoting genomic instability in HPV^{+ve} tumors [12]. Further exploration of cystine metabolism in the frame of a natural HPV infection is warranted. Besides the role of oxidative stress in viral pathogenesis, targeting of the cystine metabolism is increasingly studied as a viable strategy against solid tumors [27,28]. Our observations suggest that the transport of cystine across the plasma membrane is a potential vulnerability of HPV^{+ve} HNSCC. Finally, our study opens a number of interesting perspectives in terms of biomarker identification for therapeutic targeting in HPV^{+ve} HNSCC. Ferroptosis of cancer cells can readily be induced by a variety of medical treatments [26]. For example, radiotherapy might at least partially be efficacious against solid tumors by inducing cancer cell ferroptosis [29,30]. Our study opens up the interesting possibility that a greater sensitivity to ferroptosis might explain the better response of HPV^{+ve} HNSCC tumors to radio(chemo)therapy compared to HPV^{-ve} HNSCC [1,2]. Testing a variety of biomarkers of ferroptosis will permit to directly address this hypothesis [30,31].

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the contribution of the patients and researchers involved in TCGA. We thank the Amiens University Hospital and la Ligue contre le Cancer, comité de la Somme, for financial support.

5. References

- [1] J.D. Cramer, B. Burtness, Q.T. Le, R.L. Ferris, The changing therapeutic landscape of head and neck cancer, *Nat Rev Clin Oncol.* 16 (2019) 669-683. doi: 10.1038/s41571-019-0227-z.
- [2] K.K. Ang, J. Harris, R. Wheeler et al., Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer, *N Engl J Med.* 363 (2010) 24-35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217.
- [3] The Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517 (2015) 576-582. doi: 10.1038/nature14129.
- [4] C.R. Leemans, P.J.F. Snijders, R.H. Brakenhoff, The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 18 (2018) 269-282. doi: 10.1038/nrc.2018.11.
- [5] K. Hoppe-Seyler, F. Bossler, J.A. Braun et al., The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. *Trends Microbiol* 26 (2018) 158-168. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.007.
- [6] M. Vučetić, Y. Cormerais, S.K. Parks, J. Pouysségur, The central role of amino acids in cancer redox homeostasis: vulnerability points of the cancer redox code. *Front Oncol.* 7 (2017) 319. doi: 10.3389/fonc.2017.00319.
- [7] B. Faubert, A. Solmonson, R.J. DeBerardinis, Metabolic reprogramming and cancer progression, *Science* 368 (2020) pii:eaaw5473. doi: 10.1126/science.aaw5473.
- [8] Y.S. Jung, A.J. Najy, W. Huang et al., HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer, *Oncotarget* 8 (2017) 51530-51541. doi: 10.18632/oncotarget.17887.
- [9] J.C. Fleming, J. Woo, K. Moutasim, et al. HPV, tumour metabolism and novel target identification in head and neck squamous cell carcinoma, *Br J Cancer* 120 (2019) 356-367. doi: 10.1038/s41416-018-0364-7.

- [10] S. Chaudhary, K. Ganguly, S. Muniyan, et al., Immunometabolic alterations by HPV infection: New dimensions to Head and Neck Cancer disparity, *J Natl Cancer Inst.* 111 (2019) 233-244. doi: 10.1093/jnci/djy207.
- [11] R. Marullo, E. Werner, H. Zhang et al., HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells, *Carcinogenesis* 36 (2015) 1397-1406. doi: 10.1093/carcin/bgv126.
- [12] A. Cruz-Gregorio, J. Manzo-Merino, M. Lizano, Cellular redox, cancer and human papillomavirus. *Virus Res.* 246 (2018) 35-45. doi: 10.1016/j.virusres.2018.01.003.
- [13] B.R. Stockwell, J.P. Friedmann Angeli, H. Bayir H et al., Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease, *Cell* 171 (2017) 273-285. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
- [14] T. Hirschhorn, B.R. Stockwell, The development of the concept of ferroptosis, *Free Radic Biol Med.* 133 (2019) 130-143. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.043.
- [15] J.P. Friedmann Angeli, D.V. Krysko, M. Conrad, Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion, *Nat Rev Cancer* 19 (2019) 405-414. doi: 10.1038/s41568-019-0149-1.
- [16] S.J. Dixon, K.M. Lemberg, M.R. Lamprecht, et al., Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149 (2012) 1060-1072. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [17] M. Sato, R. Kusumi, S. Hamashima et al., The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc- and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells. *Sci Rep.* 8 (2018) 968. doi: 10.1038/s41598-018-19213-4.
- [18] W.S. Yang, R. SriRamaratnam, M.E. Welsch et al., Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4, *Cell.* 156 (2014) 317-331. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
- [19] J.L. Roh, E.H. Kim, H.J. Jang et al., Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett.* 381 (2016) 96-103. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.035.

- [20] D. Shin, E.H. Kim, J. Lee, J.L. Roh, Nrf2 inhibition reverses resistance to GPX4 inhibitor-induced ferroptosis in head and neck cancer, *Free Radic Biol Med.* 129 (2018) 454-462. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.426.
- [21] J. Gao, B.A. Aksoy, U. Dogrusoz et al., Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6 (2013) pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
- [22] S.V. Puram, I. Tirosh, A.S. Parikh, A.P. Patel et al., Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* 171 (2017) 1611-1624.
- [23] C.L. Halbert, G.W. Demers, D.A. Galloway, The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells, *J Virol.* 65 (1991) 473-478.
- [24] C. Louandre, Z. Ezzoukhry, C. Godin et al., Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib, *Int J Cancer.* 133 (2013) 1732-1742. doi: 10.1002/ijc.28159.
- [25] E. Lachaier, C. Louandre, C. Godin et al., Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res.* 34 (2014) 6417-6422.
- [26] B. Hassannia, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, Targeting ferroptosis to iron out cancer, *Cancer Cell.* 35 (2019) 830-849. doi: 10.1016/j.ccell.2019.04.002.
- [27] M.A. Badgley, D.M. Kremer, H.C. Maurer et al., Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice, *Science* 368 (2020) 85-89. doi: 10.1126/science.aaw9872.
- [28] X. Liu, K. Olszewski, Y. Zhang et al., Cystine transporter regulation of pentose phosphate pathway dependency and disulfide stress exposes a targetable metabolic vulnerability in cancer, *Nat Cell Biol.* 22 (2020) 476-486. doi: 10.1038/s41556-020-0496-x.
- [29] G. Lei, Y. Zhang, P. Koppula et al., The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. *Cell Res.* 30 (2020) 146-162. doi: 10.1038/s41422-019-0263-3.
- [30] L.F. Ye, K.R. Chaudhary, F. Zandkarimi et al., Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes with Ferroptosis Inducers. *ACS Chem Biol.* 15 (2020) 469-484. doi: 10.1021/acscchembio.9b00939.

[31] Q. Wen, J. Liu, R. Kang et al., The release and activity of HMGB1 in ferroptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 510 (2019) 278-283. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.090.

Figure Legends

Fig. 1: HPV⁺ve HNSCC express lower levels of *SLC7A11* and *SLC3A2* mRNA than HPV⁻ve tumors.

A. Box plots showing the expression levels of *SLC7A11* and *SLC3A2* in HNSCC tumors from TCGA stratified according to their HPV status. RNA expression is given in RSEM : RNA-Seq by Expectation Maximization; B. Box plots showing the expression levels of *SLC7A11* and *SLC3A2* in HNSCC tumors from the GSE72536 dataset stratified according to their HPV status. C. A heatmap showing the gene expression of ferroptosis genes in HNSCC tumors ranked according to their increasing mRNA expression of *SLC7A11*. The gene expression was normalized (z score) for each gene, red=higher than average expression, blue=lower than average expression. D. Box plots showing the expression levels of *SLC7A11* in different cell types within HNSCC tumors using the GSE103322 dataset.

Fig. 2: HPV16 E6-E7 expression sensitizes HNSCC cells to ferroptosis.

A. A graph showing the % of LDH released in the cell culture medium after exposure of cells to erastin (E, applied at 10 μ M for 18h) and DFX (100 μ M, 1 hr preincubation). The results are from a single experiment performed in triplicate and representative of 3. * indicates $p < 0.05$ compared to control without erastin ; # indicates $p < 0.05$ compared to WT cells in the same experimental conditions. B. Immunoblot analysis of complete cellular extracts prepared from PECA/PJ41 and BICR6 cells, WT vs E6-E7⁺ve.

Fig. 3: HPV16 E6-E7 expression sensitizes HNSCC cells to ferroptosis by altering cystine and GSH metabolism.

A. % of LDH release after exposure of PECA/PJ41 cells (WT vs E6-E7) to RSL3 (18h application, 1-5 μ M). B. total GSH (tGSH) content in PECA/PJ41 cells (WT vs E6-E7) exposed to erastin (10 μ M). * indicates $p < 0.05$ compared to WT cells in the same experimental conditions. C. NAC (1 mM) was applied to WT PECA/PJ41 cells and E6 E7-expressing cells 1h before erastin (10 μ M). A subsequent LDH release assay was performed. * indicates $p < 0.05$ compared to control without erastin ; # indicates $p < 0.05$ compared to WT cells.

Table 1. Ferroptosis gene expression in HNSCC from TCGA, stratified according to their HPV status

	HPV^{-ve} (n=80)	HPV^{+ve} (n=41)	fold HPV^{-ve/+ve}	p value (FDR)
Aminoacid transporters				
SLC7A11	623.61	150.44	4.14	2.424e-06
SLC3A2	8714.2	3692.24	2.36	1.412e-08
Antioxidant defenses / Lipid metabolism				
GPX4	1866.62	3184.7	0.59	0.0269
AIFM2	327.99	370.0	0.89	1
ACSL4	1528.13	973.96	1.56	1.052e-03
ALOX5	206.75	284.03	0.73	1
ALOX12	95.91	91.28	1.05	1
ALOX15	6.3377	6.77	0.94	1
ALOX15B	167.487	113.17	1.47	1
NFE2L2	4960.47	5893.68	0.84	1
HMOX1	1005.43	747.04	1.34	1
NFS1	544.11	504.02	1.08	1
GSS	1572.99	1757.58	0.89	1
GSR	787.84	1093.36	0.72	1
GCLM	545.42	602.85	0.90	1
GCLC	1287.44	1257.2	1.02	1
Iron/ autophagy				
TFRC	4157.34	5913.05	0.70	0.6580
FTH1	19956	16608	1.2	1
NCOA4	5084.75	4534.18	1.12	1
SQSTM1	7481.34	9145.81	0.82	1

RNA expression is given as median RSEM. *p* values obtained with Wilcoxon-Mann-Whitney test after FDR correction. Note that the genes with significantly different expression levels are in bold.

Fig. 1

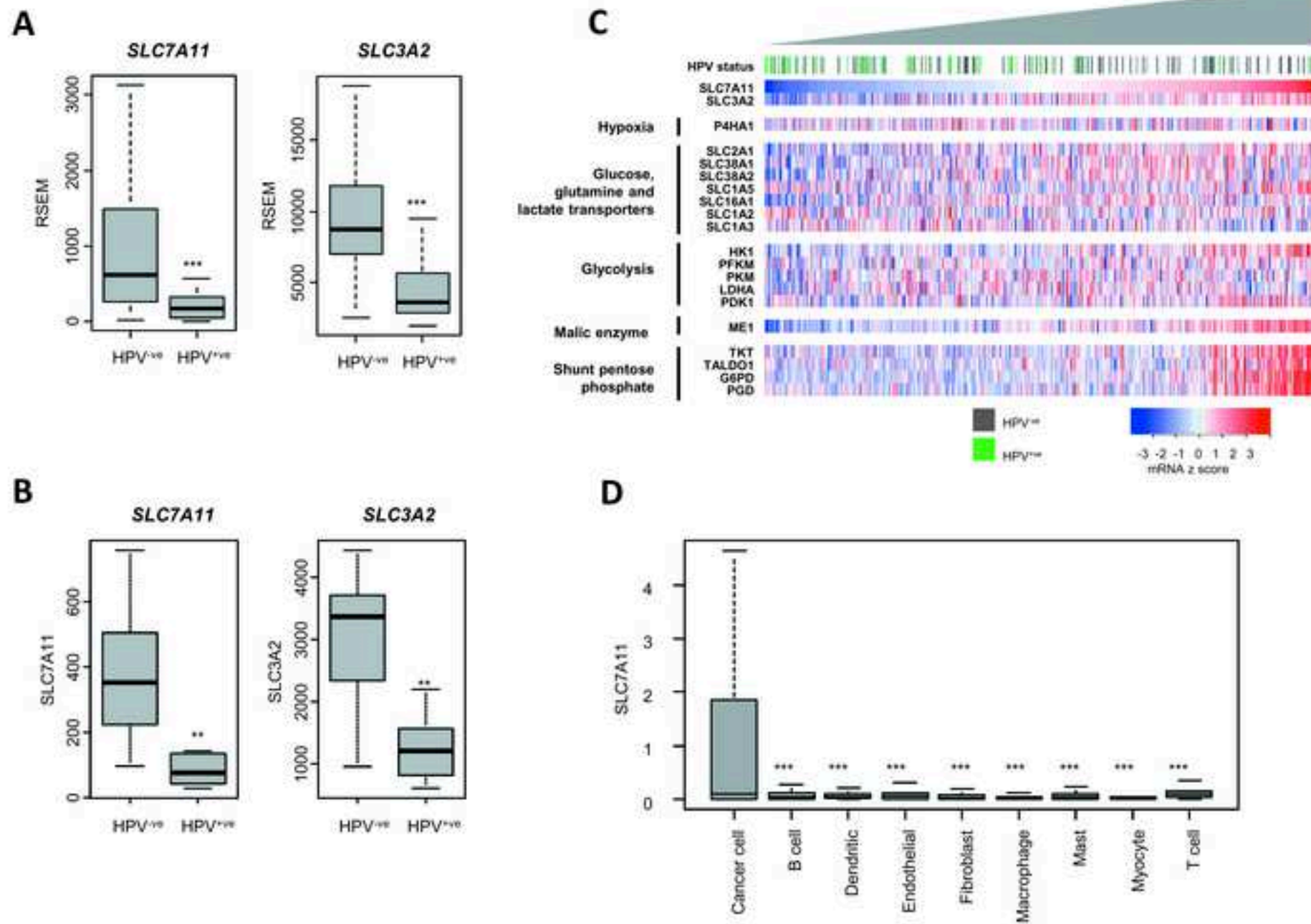


Fig. 2

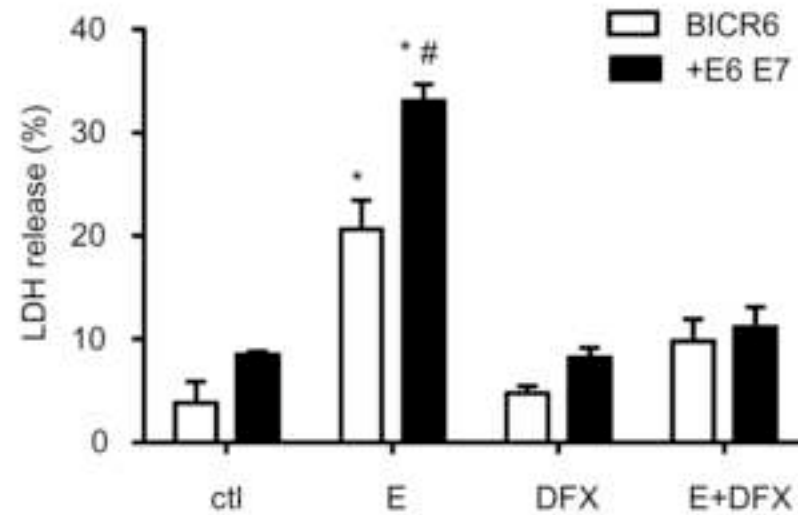
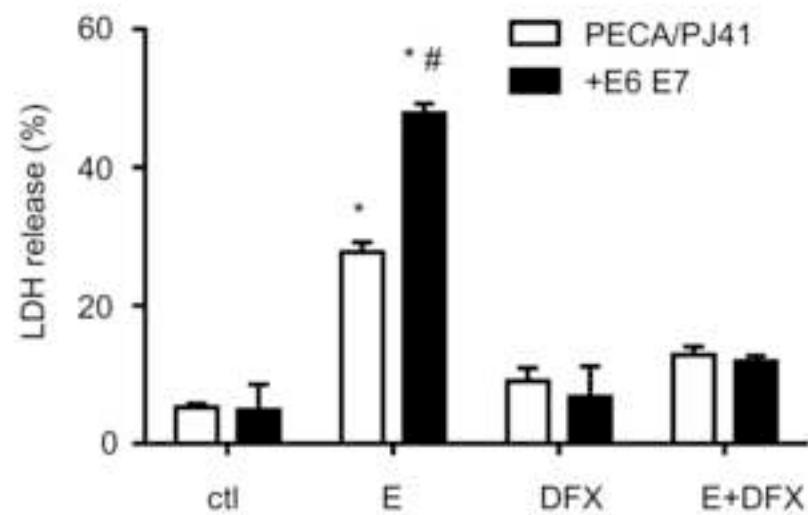
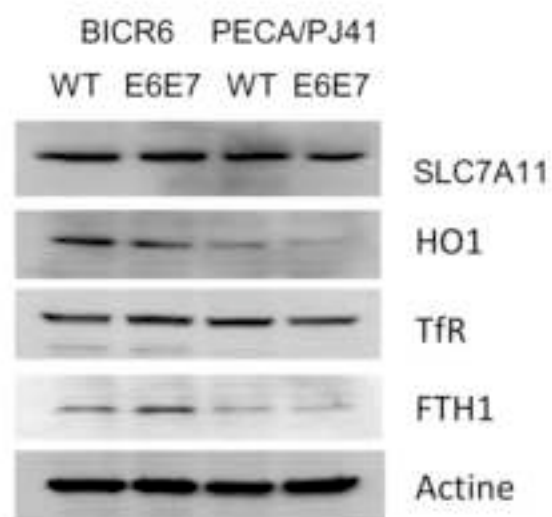
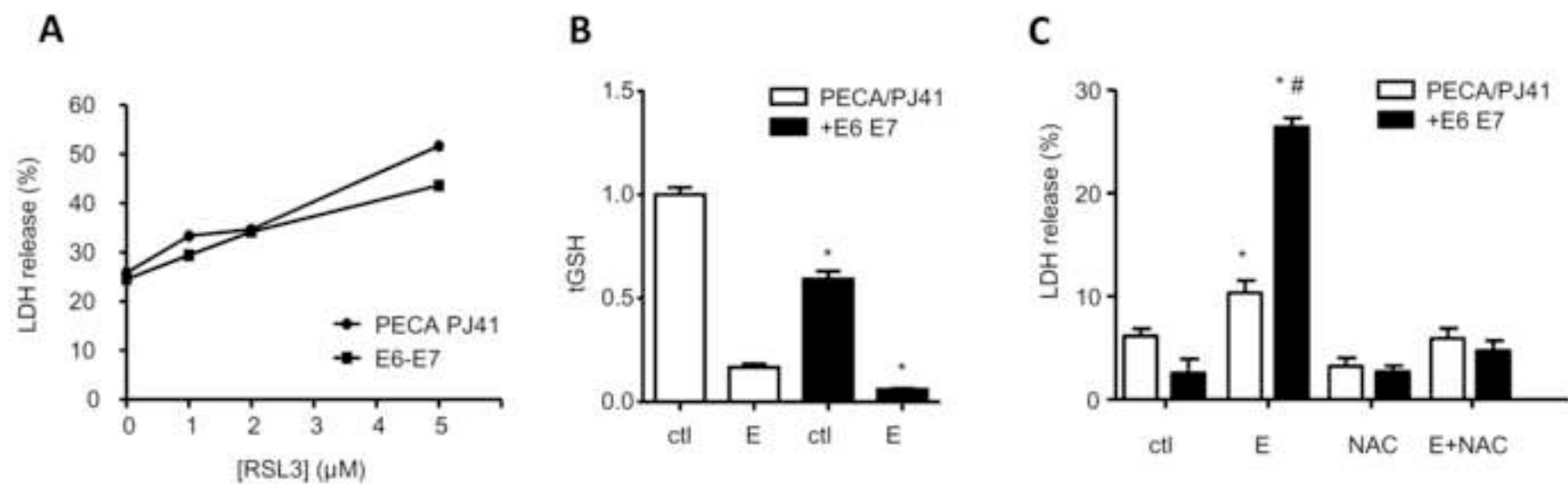
A**B**

Fig. 3



II. Régulation spécifique de l'expression de la molécule checkpoint PD-L1, dépendante de la signalisation JAK/STAT et de la DDR dans les cellules de CETC exposées au 5-FU.

Claire Lailier, Michele Lamuraglia, Floriane Racine, Christophe Louandre, Corinne Godin, Bruno Chauffert, Antoine Galmiche, Zuzana Saidak (2021). DNA damage response- and JAK-dependent regulation of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells exposed to 5-fluorouracil (5-FU). *Translational Oncology*. 14(8) : 101110.

Contexte :

Le 5-FU est utilisé dans les CETC métastatiques ou récidivants, seul ou en association avec les taxanes ou les sels de platine (Pfister et al., 2020). Cette chimiothérapie agit principalement en inhibant la thymidilate synthase, et bloque ainsi la synthèse des bases pyrimidiques et donc de l'ADN. Les CETC métastatiques ou récidivants constituent également une indication pour l'immunothérapie (Pfister et al., 2020). Deux molécules inhibant PD-1 disposent effectivement d'une AMM dans ce contexte : le nivolumab et le pembrolizumab. L'induction d'une réponse immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales est considérée comme un point important dans l'efficacité des thérapies antitumorales (Galluzzi et al., 2020). En effet, ces dernières peuvent stimuler l'immunité antitumorale, grâce à la libération de molécules immunostimulantes par les cellules tumorales mourantes ou encore en agissant sur les cellules tumorales (Galluzzi et al., 2020). Dans ce cadre, une stratégie thérapeutique prometteuse consiste en l'utilisation de combinaisons d'agents de chimiothérapie (activant par exemple le mécanisme de mort cellulaire immunogène) avec les ICB (Pfirschke et al., 2016).

L'intérêt de la combinaison chimiothérapies-ICB est suggéré par une étude récente rapportant une surexpression de PD-L1 dans les pièces d'exérèse de CETC après traitement par chimiothérapie néoadjuvante (protocole TPF : docetaxel, cisplatine, 5-FU) (Leduc et al., 2018). En effet, l'induction de PD-L1 par les chimiothérapies contribue certainement à limiter l'immunogénicité induite par ces dernières. La chimiothérapie et le mécanisme responsables de cette augmentation de

l'expression de PD-L1 n'ont pas été identifiés dans cette étude (Leduc et al., 2018). L'objectif de notre étude était donc d'apporter une connaissance mécanistique sur l'induction de PD-L1 par les molécules de thérapies anticancéreuses approuvées dans les CETC.

Résultats :

Dans trois lignées cellulaires de CETC (BICR-6 [issues de CETC de l'hypopharynx], PE/CA-PJ34 [issues de CETC de la cavité orale] et PE/CA-PJ41 [issues de CETC de la cavité orale]), nous avons mis en évidence que le 5-FU augmentait spécifiquement l'expression de PD-L1, sans augmenter celle de PD-L2, CD-80 ou CD-86. Nous avons mis en évidence *in silico* une régulation spécifique de *PD-L1*, distincte de celle de *PD-L2*, grâce aux données de transcriptomique de CETC issues de la cohorte de séquençage sur cellules uniques de Puram et al. (2017). Nous n'avons pas observé de corrélation entre les niveaux d'ARN messagers de *PD-L1* et *PD-L2* et les gènes dont l'expression corrélaient avec celle de *PD-L1* n'étaient pas les mêmes que ceux dont l'expression corrélait avec celle de *PD-L2*.

La génotoxicité du 5-FU jouait un rôle dans la surexpression de PD-L1 dans nos lignées. En effet, l'utilisation concomitante de VE-821, un inhibiteur de la DDR, inhibait la surexpression de PD-L1 par le 5-FU. Cette surexpression de PD-L1 par le 5-FU était également inhibée par la thymidine. L'utilisation d'un inhibiteur de JAK empêchait par ailleurs la surexpression de PD-L1, mettant en évidence le rôle de la voie JAK/STAT dans la régulation de l'expression de PD-L1 par le 5-FU.

Les effets du 5-FU étaient par ailleurs additifs ou synergiques avec ceux de l'IFN- γ , qui est l'inducteur canonique de l'expression, de PD-L1, et ceci au niveau transcriptionnel. Pour finir, nous avons mis en évidence l'importance de l'EGFR activé dans la régulation de l'expression de PD-L1 par le 5-FU. En effet, le traitement par le 5-FU augmentait l'activation d'EGFR par nos cellules. Par ailleurs, la combinaison entre le 5-FU et le cetuximab, inhibiteur spécifique de l'EGFR, utilisée sur nos lignées cellulaires limitait fortement la surexpression de PD-L1 induite par le 5-FU.



DNA damage response- and JAK-dependent regulation of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells exposed to 5-fluorouracil (5-FU)

Claire Lailier^{a,b}, Michele Lamuraglia^c, Floriane Racine^{a,b}, Christophe Louandre^{a,b}, Corinne Godin^{a,b}, Bruno Chauffert^{b,c}, Antoine Galmiche^{a,b}, Zuzana Saidak^{a,b,*}

^aLaboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Sud, Amiens, France

^bUR7516 "CHIMERE", Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

^cLaboratoire d'Imagerie Biomédicale (LIB), Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Oncologie Médicale, CHU Sud, Amiens, France

A B S T R A C T

Objectives: The immune checkpoint molecule PD-L1 (CD274) is a crucial regulator of the tumor immune response. Its expression has been reported in the therapeutic context in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC), but it remains unclear how therapeutically approved molecules regulate PD-L1 expression in HNSCC cells.

Materials and methods: Three HNSCC cell lines (BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41) were used to analyze PD-L1 expression by immunoblotting, immunofluorescence and QPCR. Freely-available single cell RNAseq data from HNSCC were also used.

Results: 5-Fluorouracil (5-FU) increased the expression of PD-L1 with high efficacy in HNSCC cells. Single cell RNAseq data suggested the specificity of the regulation of PD-L1 in this context. The effect of 5-FU on PD-L1 expression was related to its genotoxic effect and was prevented by extracellular application of thymidine or using a chemical inhibitor of the DNA damage Response kinases ATM/ATR. We found that the effect of 5-FU was additive or synergistic with IFN- γ , the canonical inducer of PD-L1 in epithelial cells. QPCR analysis confirmed this finding and identified JAK-dependent transcriptional activation of PD-L1/CD274 as the underlying mechanism. The induction of PD-L1 by 5-FU was partially prevented by Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) inhibition with cetuximab.

Conclusion: Our study highlights the specific DNA Damage Response- and JAK- dependent induction of PD-L1 by 5-FU in HNSCC cells. This induction is regulated by the cytokine context and is potentially therapeutically actionable.

Introduction

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) are a heterogeneous group of tumors that require multimodal treatment with surgery and adjuvant radio(chemo)therapy [1,2]. Despite adapted initial treatments, local recurrence and metastasis remain frequent and constitute an indication for chemotherapy and immunotherapy [1,2]. The recent introduction of immune checkpoint blockers (ICB) has challenged the medical practice for advanced stages of HNSCC. Nivolumab and pembrolizumab, two monoclonal antibodies targeting the interaction between the molecule PD-L1 (Programmed cell Death 1-Ligand 1, encoded by the gene *CD274*) and its receptor PD1, are approved for the treatment of recurrent/metastatic (R/M) HNSCC [3,4]. PD1 targeting used alone is considered effective in almost 20% of R/M HNSCC patients [3,4]. PD-

L1 expression is usually analyzed by immunohistochemistry and scored using the CPS (Combined Positive Score), defined as the sum of PD-L1-positive cancer cells and monocytes/lymphocytes divided by the total number of tumor cells x 100 [5]. The use of CPS reflects the dual expression of PD-L1 in cancer and tumor-infiltrating immune cells. In addition to the interest of CPS in predicting the benefit of ICB, PD-L1 can be a biomarker of negative or positive prognostic value, depending on its expression on epithelial or immune cells, respectively [6,7].

Chemotherapy is currently indicated for patients with advanced HNSCC, *i.e.* those directly presenting with R/M HNSCC or those with high risk tumors (nodal extracapsular spread or invaded surgical margins). Platinum salts (cisplatin or carboplatin), taxanes (docetaxel or paclitaxel), and 5-fluorouracil (5-FU) are used in this setting [8]. After transformation into FdUMP, 5-FU mainly interferes with nucleic acid

List of abbreviations: DEG, differentially expressed genes; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; FDR, false discovery rate; GO, Gene Ontology; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; ICB, immune checkpoint blockers; IFN- γ , Interferon- γ ; NGF, Nerve Growth Factor; PD-L1, Programmed cell Death 1-Ligand 1; R/M, Recurrent/Metastatic; TS, Thymidylate synthase.

* Corresponding author at: Laboratoire de Biochimie, centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens Cedex, France.

E-mail address: Saidak.Zuzana@chu-amiens.fr (Z. Saidak).

<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101110>

Received 22 January 2021; Received in revised form 14 April 2021; Accepted 20 April 2021

1936-5233/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

metabolism by blocking the enzyme thymidylate synthase (TS) and inhibiting *de novo* pyrimidine synthesis. This effect of 5-FU results in an inhibition of DNA synthesis and a block in cell cycle progression [9]. A homeostatic reaction called the DNA Damage Response (DDR) is induced in this context and constitutes a determinant of HNSCC sensitivity to 5-FU [9]. Cetuximab, a targeted therapy directed against the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) counteracts oncogenic signaling downstream of EGFR in HNSCC cells [2].

An immune response directed against cancer cells is emerging as a mechanism that contributes to the efficacy of therapeutic protocols used against solid tumors [10,11]. Interestingly, a recent study examining HNSCC resected after neoadjuvant chemotherapy reported increased PD-L1 expression in cancer cells in this context [12]. In 71% of tumor samples from patients that received induction chemotherapy with TPF (docetaxel + platinum + 5-FU), increased levels of PD-L1 and a significant increase in the density of CD8+ T cell infiltrate were detected [12]. Previous *in vitro* studies found that cisplatin induced PD-L1 expression in HNSCC cells [13,14]. It is unclear which chemotherapeutic drug is the most effective at increasing PD-L1 expression in HNSCC cells and how PD-L1 expression is regulated in this context.

Materials and methods

Cell culture. The cell lines BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA/PJ-41 are described in detail in the supplementary Materials and Methods section. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, and penicillin / streptomycin.

Reagents and chemicals. All chemical reagents were purchased from Sigma, unless stated otherwise. Afatinib and VE821 were purchased from Selleckchem. The JAK inhibitor1 (JAKi) was purchased from Calbiochem (420,099). The Human Phospho-RTK Array Kit was purchased from R&D Systems (Proteome Profiler Array, ARY00B). The antibodies used in this study are listed in the Suppl. Materials and Methods.

Single cell gene expression analysis. Single cell RNAseq data (5902 cells sequenced from 18 HPV-negative HNSCC) were retrieved from Puram et al. (2017) [15] (dataset GSE103322).

Gene ontology (GO) analysis. We used the PANTHER classification system (<http://pantherdb.org/>) to perform a statistical overrepresentation test. The enrichment of Gene Ontology (GO) terms in our gene set was compared to the whole *Homo Sapiens* genome (GO biological process complete), with a False Discovery Rate (FDR) correction [16].

QPCR. Total RNA was extracted and reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit and random hexamers (Applied Biosystems). Amplification was performed with the TaqMan Universal PCR master Mix on an ABI 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers and probe sets for PD-L1 and Glyceraldehyde-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) are described in the Suppl. Material and Methods.

Immunoblotting. Complete cell extracts were transferred to nitrocellulose membranes using standard procedures as previously described [17]. The ECL reaction was used to reveal protein. Signal quantifications were performed using ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Immunofluorescence. Immunofluorescence labeling of PD-L1 was performed on paraformaldehyde-fixed cells, according to standard procedures [17]. A detailed protocol is given in Suppl. Materials & Methods.

Statistical analyses. Analyses were done with R version 4.0.3 (<https://www.r-project.org>) using packages "Hmisc" and "venneuler". Student's t-test and ANOVA were used as indicated (GraphPad Prism). The Spearman test was used for gene correlation analyses. $p < 0.05$ was used as the threshold of significance. False discovery rate (FDR) correction was applied as indicated using the Bonferroni method.

Results

5-FU upregulates PD-L1 expression in HNSCC cells

In order to examine the effect of chemotherapeutic agents on HNSCC cells, we used a panel of three HNSCC cell lines (BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41) that were exposed to $n = 8$ chemotherapeutic agents (Fig. 1). All chemotherapeutic agents were applied at concentrations corresponding to their IC_{50} , *i.e.* in conditions of comparable efficacy, for 48 h (Suppl. Table 1). Cetuximab was applied at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and was found to block EGFR phosphorylation without significant inhibitory effect on the growth of HNSCC cells *in vitro* (data not shown). We then analyzed the protein expression of PD-L1 as well as PD-L2, CD80, CD86, and MHC class I molecules by immunoblotting (Fig. 1). We observed that 5-FU increased PD-L1 expression in all HNSCC cell lines (fold induction of 14.4, 3.1 and 1.7 compared to control for BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41, respectively) (Suppl. Fig. 1). No effect of 5-FU was detected on the expression of PD-L2, CD80, CD86 and the MHC class I molecules (Fig. 1). In two out of three cell lines, 5-FU seemed to be the chemotherapeutic agent that upregulated PD-L1 expression the most.

PD-L1 mRNA regulation in single cells from HPV-negative HNSCC tumors

Single cell RNAseq data from Puram et al. [15] were retrieved in order to examine PD-L1 / PD-L2 mRNA regulation in HNSCC. High levels of PD-L1 mRNA were detected in dendritic cells, mast cells and to a lower extent in HNSCC cells (Fig. 2A). Indeed, 16.4% of tumor cells expressed PD-L1 mRNA (Fig. 2B). PD-L2 was found to be expressed in a smaller fraction of the cancer cells (6.4%) that only minimally overlapped with the population of PD-L1 expressing cells (2.1%) (Fig. 2B). There was no correlation between PD-L1 and PD-L2 mRNA levels in cancer cells (Pearson $r = 0.05$). We identified the genes whose expression was significantly correlated with PD-L1 or PD-L2 mRNA in cancer cells from single cell RNAseq data (Suppl. Table 2 and 3, respectively), and compared them with the genes that correlated with PD-L1 mRNA in tumor infiltrating immune cells (Suppl. Table 4). A number of genes were significantly co-expressed with PD-L1, but not with PD-L2 in HNSCC cells (Suppl. Table 2 and 3). These non-overlapping gene contexts suggest the existence of specific regulation of PD-L1 mRNA in HNSCC cells. A statistical overrepresentation test of Gene Ontology terms was performed on the panel of genes found to be correlated with PD-L1 in HNSCC cells, and suggested a link between PD-L1 expression and xenobiotic/chemotherapeutic metabolism (Fig. 1C).

PD-L1 overexpression induced by 5-FU is related to its genotoxic effect in HNSCC cells

5-FU can incorporate into RNA or block TS and prevent the synthesis of thymidine. We examined the role played by these two mechanisms by analyzing PD-L1 expression in cells cultivated with extracellularly supplied uridine or thymidine (both at a concentration of 20 μM) (Fig. 3A). We found that extracellular thymidine, but not uridine, was able to revert PD-L1 induction by 5-FU (Fig. 3A, Suppl. Fig. 2A). We next envisioned the possibility that DNA damage response might play a role in PD-L1 induction (Fig. 3B). We used the chemical inhibitor VE-821, directed against the key kinases of the DNA Damage Response ATM/ATR, as previously reported by Ito et al. [9]. We verified that VE-821 prevented Chk1 phosphorylation on Ser345 (a site targeted by activated ATM/ATR) at a concentration of 10 μM (Fig. 3B). Importantly, DNA Damage Response inhibition with VE-821 partially prevented the induction of PD-L1 by 5-FU in the three HNSCC cell lines examined in this study (Fig. 3B, Suppl. Fig. 2B). We concluded that PD-L1 induction by 5-FU was related to its genotoxic effect in HNSCC cells.

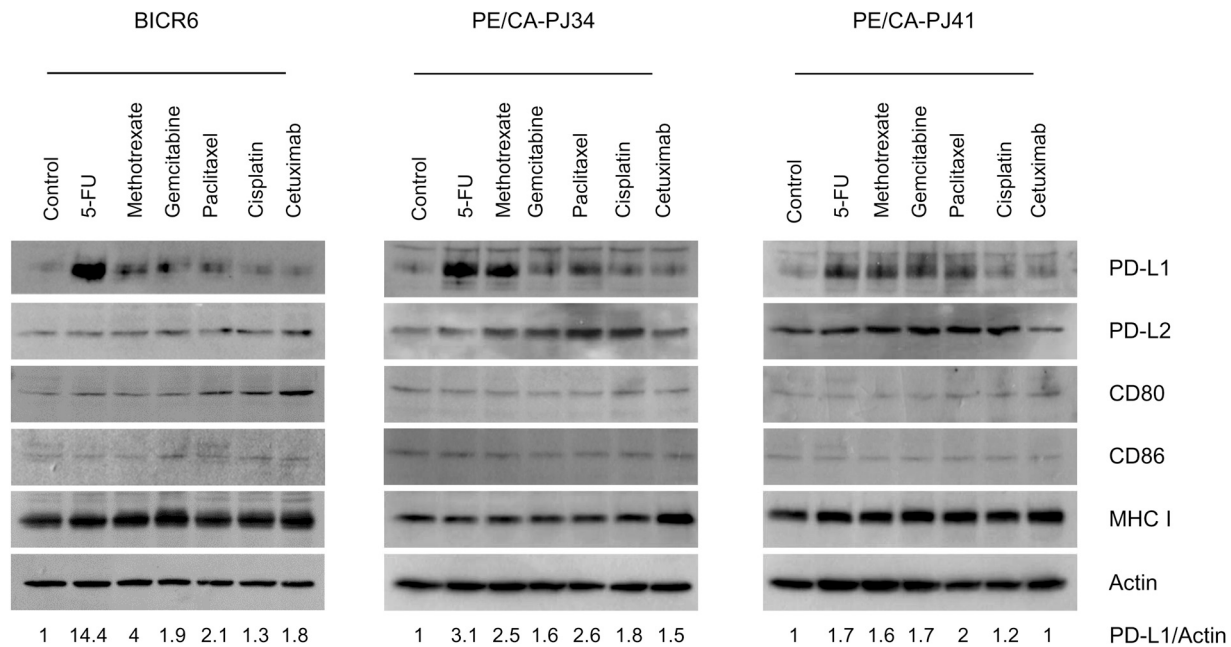


Fig. 1. Immunoblot analysis of the expression of the main immune checkpoint molecules in HNSCC cells exposed to chemotherapeutic agents. The cell lines BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41 were exposed to 5-FU, methotrexate, gemcitabine, paclitaxel, cisplatin at IC50 concentrations for 48 h. Cetuximab was applied at a concentration of 50 µg/mL. Expression analysis of the indicated molecules was performed by immunoblotting as indicated. Actin immunolabelling is given as loading control. The indicated values are normalized densitometric analyses of the PD-L1/Actin ratio, taking control condition as 1.

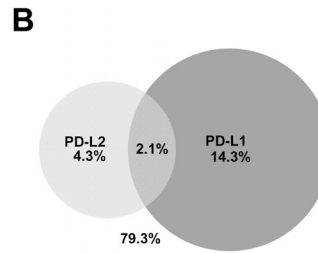
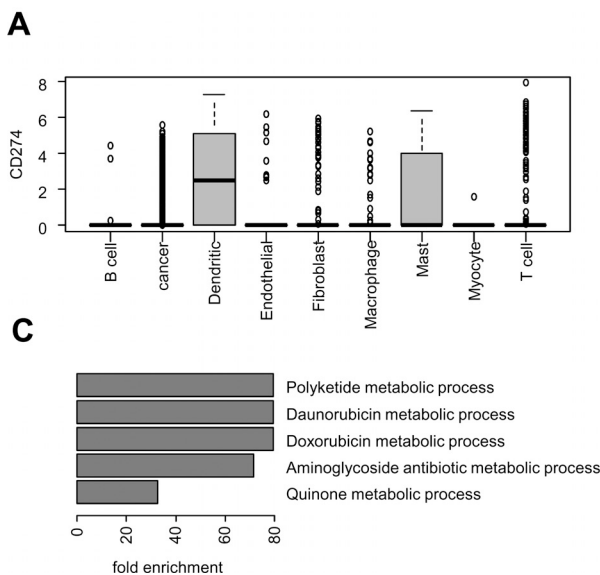


Fig. 2. CD274/PD-L1 expression in single cell RNA-seq data retrieved from HPV-negative HNSCC.

A. Analysis of CD274/PD-L1 mRNA levels in single cell RNA-seq data by Puram et al. [15]. n = 2215 cancer cells from 18 tumors. **B.** A Venn diagram of the percentage of HNSCC cells expressing PD-L1 and PD-L2 mRNA, and the overlap. **C.** A bar graph showing the Gene Ontology (GO) terms that were statistically over-represented in the top 150 genes that are significantly correlated with CD274/PD-L1 mRNA in cancer cells, using PANTHER GO overrepresentation test. The figure shows the fold enrichment of each GO term compared to what would be statistically expected.

5-FU and IFN-γ interact to regulate PD-L1 mRNA levels in HNSCC cells

Interferon γ (IFN- γ) is the canonical inducer of PD-L1 in cancer cells [17]. Compared to various other cytokines or growth factors (IL-6: 10 ng/ml, IL-1 β : 1 ng/ml, TNF- α : 25 ng/ml, TGF- β : 5 ng/ml and Nerve Growth Factor, NGF: 40 ng/ml), only IFN- γ (10 ng/ml) robustly induced PD-L1 expression in our experimental conditions (Suppl. Fig. 3). We examined the interaction between 5-FU and IFN- γ in the regulation of PD-L1 (Fig. 4). The co-application of 5-FU with IFN- γ led to an additive induction of PD-L1 in BICR6 and PE/CA-PJ41 cells, and a possible synergy was observed in PE/CA-PJ34 cells (Fig. 4A). A densitometric analysis of the PD-L1/Actin ratio indicated that 5-FU alone induced PD-L1 protein expression (fold induction of 2.1, 1.5 and 2.0 for BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41, respectively), but this induc-

tion was greater when the cells were simultaneously exposed to 5-FU and IFN- γ (Fold induction=3.3, 7.5 and 4.8 for BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41, respectively) (Suppl. Fig. 4). Immunofluorescent microscopy detected a clear and homogeneous PD-L1 signal on the surface of cultured BICR6 cells, confirming and extending our observations made by immunoblotting, suggesting that PD-L1 is functional in HNSCC cells exposed to 5-FU + IFN- γ (Fig. 4B).

We further examined the regulation of PD-L1/CD274 in BICR6 and PE/CA-PJ41 cells, by performing immunoblot and QPCR analysis (Fig. 5A,B). In order to examine the interaction observed between 5-FU and IFN- γ , we used a broad-spectrum chemical inhibitor of JAK signaling, JAK inhibitor-1 (JAKi) that prevents STAT1 phosphorylation on tyrosine 701 (Fig. 5A). At this concentration, JAKi reduced the clonogenic growth of BICR6 and PE/CA-PJ41 cells, even though its effect

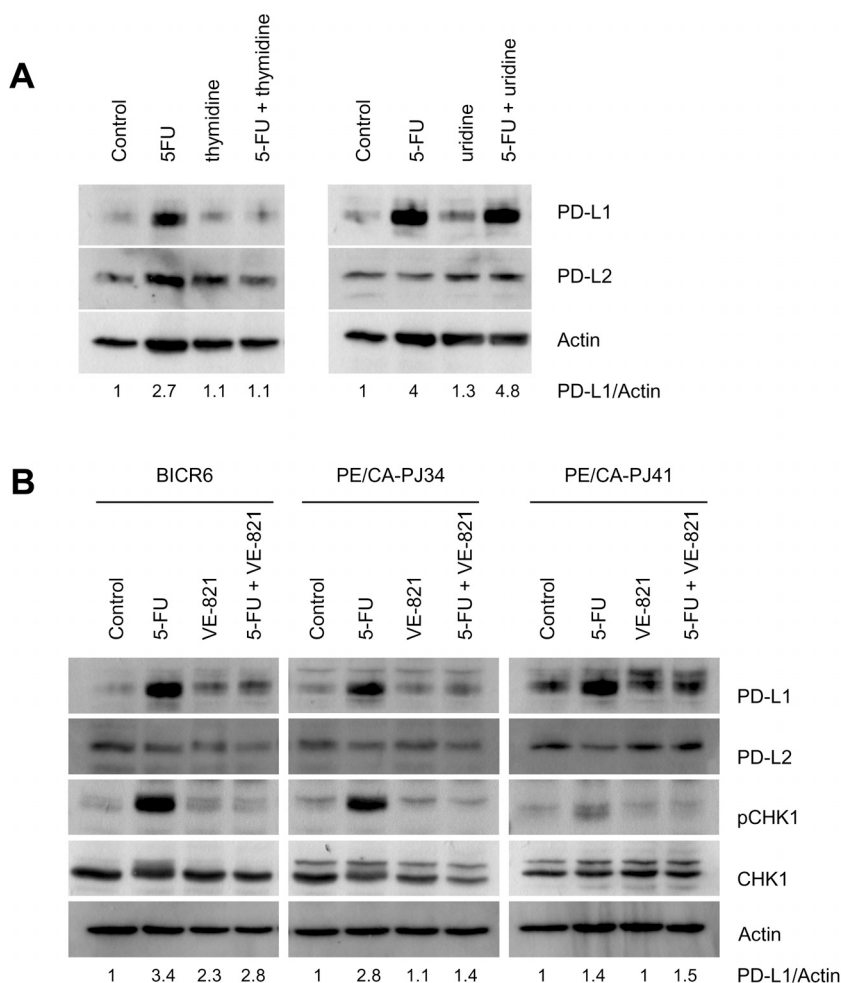


Fig. 3. PD-L1 induction in HNSCC cells is related to the genotoxic effect of 5-FU.

A. Thymidine (20 μ M) and uridine (20 μ M) were applied extracellularly on BICR6 cells \pm 5-FU (IC50) for 48 h. **B.** The chemical inhibitor VE-821 was applied at a final concentration of 10 μ M and the cellular extracts were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

was not additive with that of 5-FU (Suppl. Fig. 5). Importantly, JAKi abrogated PD-L1 protein expression in HNSCC cells (Fig. 5A, Suppl. Fig. 6). Meanwhile, we found no effect of trametinib, applied in conditions that radically prevented MEK1/2 phosphorylation (data not shown). The chemical blocker of caspases zVAD-fmk, applied at a concentration of 50 μ M blocking apoptosis [19], also had no effect on PD-L1 induction by 5-FU + IFN- γ (Fig. 5A). Similar results were obtained by QPCR (Fig. 5B). While 5-FU and IFN- γ applied as single agents only modestly increased *CD274* mRNA levels, an additive effect was observed upon the co-administration of the two molecules (Fig. 5B). The JAKi abrogated the increased levels of *CD274* mRNA induced by 5-FU + IFN- γ (Fig. 5B). We concluded that 5-FU and IFN- γ converge on JAK signaling to regulate *CD274*/PD-L1 expression at the transcriptional level.

EGFR as an actionable target to prevent PD-L1 induction by 5-FU in HNSCC cells

A previous study reported the existence of PD-L1 regulation downstream of the Receptor Tyrosine Kinase (RTK) EGFR [20]. We therefore explored the phosphorylation status of 49 RTK in HNSCC cells. A phospho-RTK array indicated that BICR6 and PE/CA-PJ41 mainly expressed phosphorylated forms of EGFR and HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor), while the other RTK were detectable at considerably lower levels (Fig. 6A). Importantly, HNSCC cells exposed to 5-FU at IC50 concentration for 48 h had increased phosphorylation levels of EGFR, with simultaneously reduced HGFR phosphorylation levels (Fig. 6A,B). The increase in EGFR phosphorylation was quantified to be 5-fold in BICR6 and 2.5-fold in PE/CA-PJ41 exposed to 5-FU for 48 h (Fig. 6B,

Suppl. Fig. 7). We used two different approaches that inhibit EGFR kinase activity to examine the role of EGFR in this setting: the application of cetuximab (50 μ g/ml) or the chemical inhibitor afatinib (5 μ M). While a slight upregulation of PD-L1 was induced by afatinib as single agent in basal conditions, both cetuximab and afatinib inhibited PD-L1 overexpression induced by 5-FU to an extent of around 50% in BICR6 and PE/CA-PJ41 (Fig. 6C). We concluded that EGFR targeting partially prevents PD-L1 expression in HNSCC cells exposed to 5-FU.

Discussion

In the present study, we examined the effects of various chemotherapeutic agents on HNSCC cells and observed that 5-FU robustly increased PD-L1 expression. This induction was observed in three independent genomic contexts, suggesting its potential broad relevance. A clear interaction (either additive or synergistic, depending on the cellular context) was observed between 5-FU and IFN- γ . PD-L1 was homogeneously distributed on the surface of the whole population of HNSCC cells, suggesting that it was not accounted for by a minor subpopulation of cancer cells and that PD-L1 is functional in this context. The effect of 5-FU on PD-L1 expression appeared to be related to its genotoxic effect and was prevented by the extracellular application of thymidine or by the DNA damage Response inhibitor VE-821, directed against the kinases ATM/ATR. Finally, we found that EGFR inhibition partially prevented PD-L1 induction by 5-FU.

Recent studies point to the regulation of PD-L1 by oncogenic, inflammatory and hypoxic signaling in cancer cells [21]. A few studies have addressed the impact of therapeutic agents used against HNSCC on the

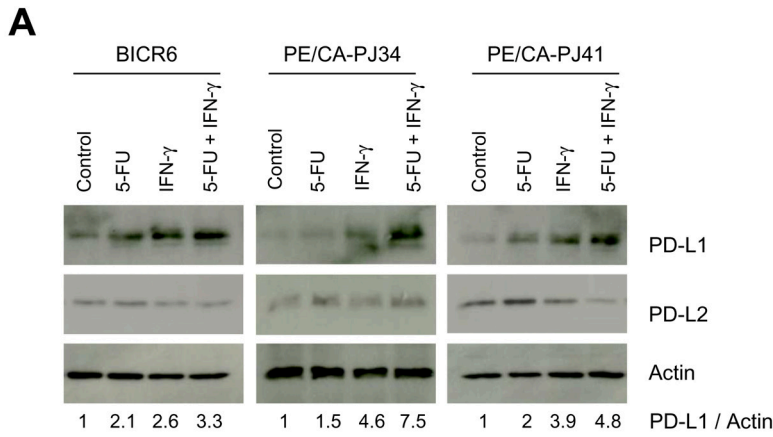


Fig. 4. Expression analysis of PD-L1 upon co-exposure of HNSCC cells to 5-FU and IFN- γ . **A.** BICR6, PE/CA-PJ34 and PE/CA-PJ41 cells were exposed to 5-FU and IFN- γ (10 ng/ml) for 24 h, as indicated. **B.** Immunofluorescence analysis of PD-L1 on BICR6 cells exposed to 5-FU + IFN- γ for 24 h (Red fluorescence: PD-L1, blue fluorescence: DAPI).

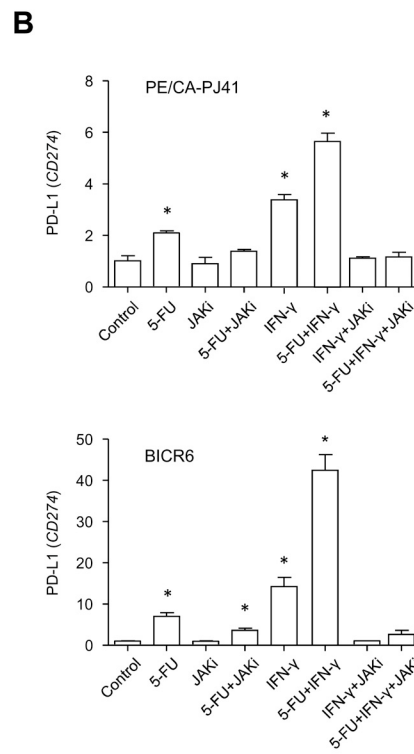
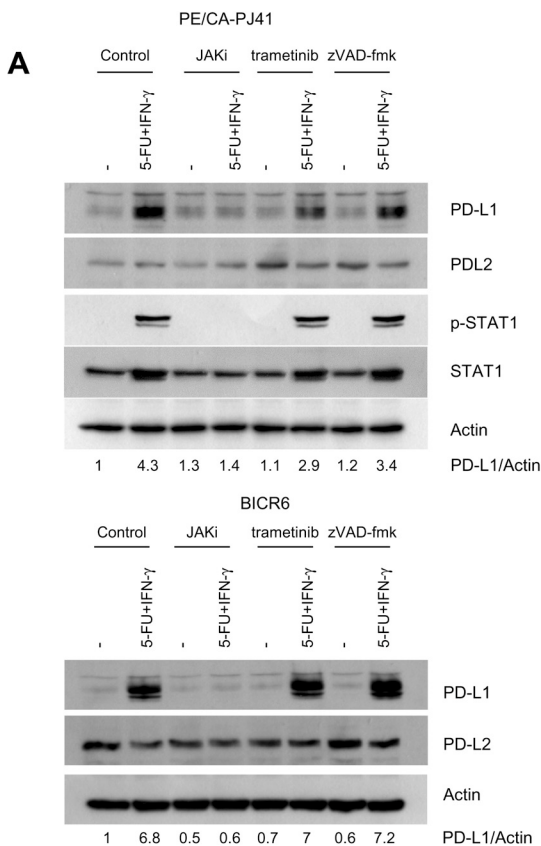
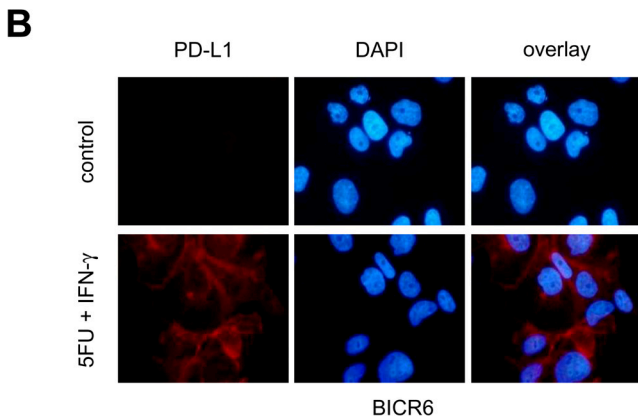


Fig. 5. An immunoblot and QPCR analysis of CD274/PD-L1 mRNA expression in HNSCC cells exposed to 5-FU and IFN- γ . **A.** BICR6 and PE/CA-PJ41 cells were exposed to 5-FU (IC50) and IFN- γ (10 ng/ml) for 24 h. Cells were preincubated with JAK inhibitor-1 (1 μ M), trametinib (1 μ M) or zVAD-fmk (50 μ M) for 1 h as indicated. Complete cellular extracts were used in order to perform the indicated analyses. Note that STAT1 could not be detected in BICR6 cells. **B.** A QPCR analysis of CD274/PD-L1 mRNA expression in PE/CA-PJ41 and BICR6 cells exposed to 5-FU, IFN- γ and JAK inhibitor-1 (1 μ M). * $p < 0.05$ with Student's t-test compared to control.

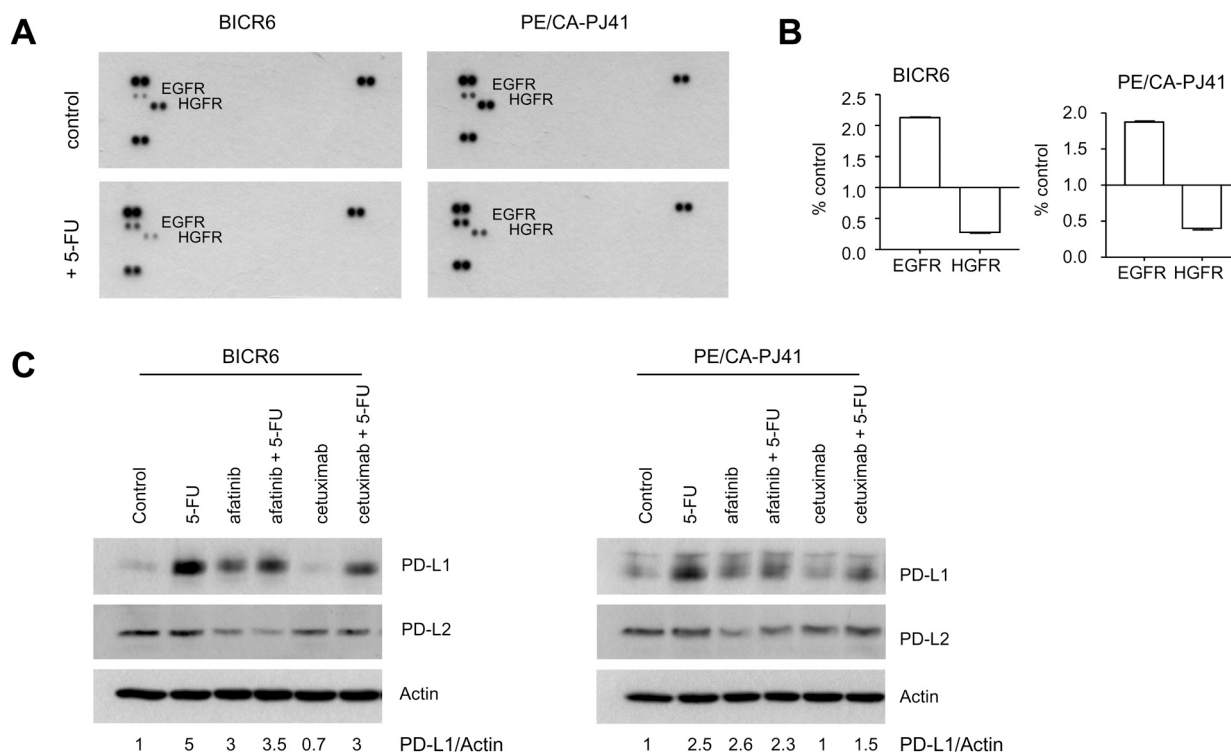


Fig. 6. EGFR as an actionable target for preventing PD-L1 induction by 5-FU in HNSCC cells

A. A phospho-RTK array preformed using cellular extracts prepared from BICR6 and PE/CA-PJ41 cells, either in control conditions or after exposure to 5-FU (IC50) for 48 h **B.** Quantification of EGFR and HGFR phosphorylation after 5-FU treatment, taking control conditions as reference for each cell line. **C.** Immunoblot analysis of cellular extracts prepared from BICR6 and PE/CA-PJ41 cells exposed to 5-FU (IC50), afatinib (5 μ M) and cetuximab (50 μ g/ml) for 48 h, as indicated. The indicated values are normalized densitometric analyses of the PD-L1/Actin ratio, taking control condition as 1.

expression of PD-L1 [13,14,22]. To the best of our knowledge, our report shows for the first time that 5-FU is an inducer of PD-L1 expression in HNSCC cells. Recent studies performed in various types of primary tumors point to similar effects of 5-FU in digestive cancers [23,24]. Another antimetabolite with a related mode of action, pemetrexed, was also recently found to induce PD-L1 in Non-Small Cell Lung Cancer cells [25]. Our observation that the regulation of PD-L1 in cancer cells does not entirely overlap with that of immune cells confirms the data of Chen et al., although the corresponding study did not examine the effects of xenobiotics/chemotherapeutics [18]. We verified that the induction of PD-L1 was not accounted for either by cell senescence or the loss of cancer cell viability in this context (data not shown). Importantly, it was possible to abolish the effect of the dual exposure of HNSCC cells to 5-FU and IFN- γ with a chemical inhibitor active against JAK. JAK signaling in cancer cells might therefore constitute a point of convergence and a key control of the transcriptional induction of PD-L1 in HNSCC cells exposed to chemotherapies. Non-selectively targeting JAK signaling in cancer patients would target tumor infiltrating immune cells in addition to cancer cells [26], and it is therefore difficult to anticipate the therapeutic interest of this strategy.

We examined the possibility of targeting the induction of PD-L1 using already approved anti-cancer drugs. We observed that EGFR signaling is induced by 5-FU and that its inhibition by cetuximab prevents PD-L1 upregulation. Previous studies found that oncogenic signaling downstream of the growth factor receptors (EGFR and HGFR) positively regulates PD-L1 expression in HNSCC cells [20,27,28]. However, the corresponding studies did not address the effects of chemotherapeutics. Importantly, a previous study even reported a striking convergence of EGFR and IFN- γ signaling in the regulation of JAK-STAT and PD-L1 expression in HNSCC [28]. In esophageal cancer cells exposed to a conventional chemotherapy regimen, an induction of PD-L1 was also observed that was prevented by blocking EGFR [29]. While this observation is

reminiscent of our findings, the contribution of 5-FU was not directly addressed in this study [29]. Importantly, the fact that cetuximab counteracts PD-L1 induction suggests that autocrine/paracrine activation of EGFR occurs in this context. Further studies addressing the composition of the cancer cell secretome and the regulation of JAK-STAT axis are warranted. Another key question worth addressing is the role of the DNA damage response in this context [30].

Activation of an adaptive immune response directed against cancer cells is emerging as a mechanism that contributes to the efficacy of chemotherapeutic protocols [10,11]. The present study did not include an *in vivo* experimental part with an immunocompetent animal model. However, based on previous studies that examined the role of PD-L1 in cancer cells in human HNSCC samples [6,7], we postulate that the induction of PD-L1 by 5-FU might limit the adaptive immune response against cancer in patients receiving radio(chemo)therapy. Our study therefore raises interesting possibilities regarding the use of ICB in HNSCC. Chemotherapeutic agents remain an important therapeutic modality and are often combined with ICB against R/M HNSCC [31]. 40% of HNSCC show an enriched inflammatory response with active interferon- γ signaling [32]. The tumor microenvironment is emerging as a key player in the regulation of the adaptive immune response against solid tumors [33]. Our observations further suggest the importance of the tumor microenvironment in the therapeutic context. Our study also provides a biological rationale for targeting PD1 in association with chemotherapeutic regimen containing 5-FU, especially when a tumor has a dense T cell infiltrate/high local production of IFN- γ . Clinical studies are needed to examine this possibility.

Author contributions statement

C.L. Conceptualization, Investigation, Writing: Review & Editing; M.L. Writing: Review & Editing; F.R. Investigation, Writing: Review &

Editing; **C.L.:** Investigation; **C.G.:** Investigation; **B.C.:** Supervision, Funding acquisition, Writing: Review & Editing; **A.G.:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Writing: Original Draft; **Z.S.:** Conceptualization, Project administration, Writing: Original Draft.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose for this work.

Acknowledgments

We thank Amiens University Hospital, Ligue contre le Cancer, comité de la Somme, and APOTAC (Association Picarde pour l'Optimisation des Thérapeutiques Anti-Cancéreuses) for financial support. The funders had no role in the collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and in the decision to publish.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.tranon.2021.101110](https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101110).

References

- [1] L.Q.M. Chow, Head and neck cancer, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 60–72.
- [2] D.E. Johnson, B. Burtneess, C.R. Leemans, V.W.Y. Lui, J.E. Bauman, J.R. Grandis, Head and neck squamous cell carcinoma, *Nat. Rev. Dis. Primers* 6 (2020) 92.
- [3] J.D. Cramer, B. Burtneess, R.L. Ferris, Immunotherapy for head and neck cancer: recent advances and future directions, *Oral Oncol.* 99 (2019) 104460.
- [4] J.D. Cramer, B. Burtneess, Q.T. Le, R.L. Ferris, The changing therapeutic landscape of head and neck cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16 (2019) 669–683.
- [5] E.E.W. Cohen, D. Soulières, C.L. Tourneau, J. Dinis, L. Licitra, M.-J. Ahn, et al., Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study, *Lancet* 393 (2019) 156–167.
- [6] H.R. Kim, S.-J. Ha, M.H. Hong, S.J. Heo, Y.W. Koh, E.C. Choi, et al., PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients, *Sci. Rep.* 6 (2016) 36956.
- [7] M. Sanchez-Canteli, R. Granda-Díaz, N. Del Río-Ibáñez, E. Allonca, F. López-Alvarez, J. Agorreta, et al., PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and better prognosis in patients with HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas, *Cancer Immunol. Immunother.* 69 (2020) 2089–2100.
- [8] A. Lau, W. Yang, K.-Y. Li, Y. Su, Systemic therapy in recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma- a systematic review and meta-analysis, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 153 (2020) 102984.
- [9] S.S. Ito, Y. Nakagawa, M. Matsubayashi, Y.M. Sakaguchi, S. Kobashigawa, T.K. Matsui, et al., Inhibition of the ATR kinase enhances 5-FU sensitivity independently of nonhomologous end-joining and homologous recombination repair pathways, *J. Biol. Chem.* 295 (2020) 12946–12961.
- [10] W.H. Gmeiner, Fluoropyrimidine modulation of the anti-tumor immune response-prospects for improved colorectal cancer treatment, *Cancers (Basel)* (2020) 12.
- [11] L. Galluzzi, J. Humeau, A. Buqué, L. Zitvogel, G. Kroemer, Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17 (2020) 725–741.
- [12] C. Leduc, J. Adam, E. Louvet, T. Sourisseau, N. Dorvault, M. Bernard, et al., TPF induction chemotherapy increases PD-L1 expression in tumour cells and immune cells in head and neck squamous cell carcinoma, *ESMO Open* 3 (2018) e000257.
- [13] C.-Y. Ock, S. Kim, B. Keam, S. Kim, Y.-O. Ahn, E.-J. Chung, et al., Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma, *Oncotarget* 8 (2017) 97920–97927.
- [14] L. Tran, C.T. Allen, R. Xiao, E. Moore, R. Davis, S.-J. Park, et al., Cisplatin alters antitumor immunity and synergizes with PD-1/PD-L1 inhibition in head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Immunol. Res.* 5 (2017) 1141–1151.
- [15] S.V. Puram, I. Tirosh, A.S. Parikh, A.P. Patel, K. Yizhak, S. Gillespie, et al., Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer, *Cell* 171 (2017) 1611–1624 e24.
- [16] H. Mi, A. Muruganujan, J.T. Casagrande, P.D. Thomas, Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1551–1566.
- [17] A. Galmiche, Z. Ezzoukry, C. François, C. Louandre, C. Sabbagh, E. Nguyen-Khac, et al., BAD, a proapoptotic member of the BCL2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 1116–1125.
- [18] S. Chen, G.A. Crabill, T.S. Pritchard, T.L. McMiller, P. Wei, D.M. Pardoll, et al., Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells, *J. Immunother. Cancer* 7 (2019) 305.
- [19] C. Louandre, Z. Ezzoukry, C. Godin, J.-C. Barbare, J.-C. Mazière, B. Chauffert, et al., Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib, *Int. J. Cancer* 133 (2013) 1732–1742.
- [20] C.-C. Cheng, H.-C. Lin, K.-J. Tsai, Y.-W. Chiang, K.-H. Lim, C.G.-S. Chen, et al., Epidermal growth factor induces STAT1 expression to exacerbate the IFN γ -mediated PD-L1 axis in epidermal growth factor receptor-positive cancers, *Mol. Carcinog.* 57 (2018) 1588–1598.
- [21] J.-H. Cha, L.-C. Chan, C.-W. Li, J.L. Hsu, M.-C. Hung, Mechanisms controlling PD-L1 expression in Cancer, *Mol. Cell* 76 (2019) 359–370.
- [22] S.-H. Kang, B. Keam, Y.-O. Ahn, H.-R. Park, M. Kim, T.M. Kim, et al., Inhibition of MEK with trametinib enhances the efficacy of anti-PD-L1 inhibitor by regulating anti-tumor immunity in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncimmunology* 8 (2019) e1515057.
- [23] L. Van Der Kraak, G. Goel, K. Ramanan, C. Kaltenmeier, L. Zhang, D.P. Normolle, et al., 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7-H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers, *J. Immunother. Cancer* 4 (2016).
- [24] T. Doi, T. Ishikawa, T. Okayama, K. Oka, K. Mizushima, T. Yasuda, et al., The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines, *Oncol. Rep.* 37 (2017) 1545–1554.
- [25] C.-S. Lu, C.-W. Lin, Y.-H. Chang, H.-Y. Chen, W.-C. Chung, W.-Y. Lai, et al., Antimetabolite pemetrexed primes a favorable tumor microenvironment for immune checkpoint blockade therapy, *J. Immunother. Cancer* 8 (2020) e001392.
- [26] D. Moreira, S. Sampath, H. Won, S.V. White, Y.-L. Su, M. Alcantara, et al., Myeloid cell-targeted STAT3 inhibition sensitizes head and neck cancers to radiotherapy and T cell-mediated immunity, *J. Clin. Invest.* (2021) 131.
- [27] V. Boschert, J. Teusch, A. Aljaseem, P. Schmucker, N. Klenk, A. Straub, et al., HGF-Induced PD-L1 expression in head and neck cancer: preclinical and clinical findings, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020).
- [28] F. Concha-Benavente, R.M. Srivastava, S. Trivedi, Y. Lei, U. Chandran, R.R. Seethala, et al., Identification of the cell-intrinsic and -extrinsic pathways downstream of EGFR and IFN γ that induce PD-L1 expression in head and neck cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 1031–1043.
- [29] H.Y. Ng, J. Li, L. Tao, A.K.-Y. Lam, K.W. Chan, J.M.Y. Ko, et al., Chemotherapeutic treatments increase PD-L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma through EGFR/ERK activation, *Transl Oncol* 11 (2018) 1323–1333.
- [30] H. Sato, P.A. Jeggo, A. Shibata, Regulation of programmed death-ligand 1 expression in response to DNA damage in cancer cells: implications for precision medicine, *Cancer Sci.* 110 (2019) 3415–3423.
- [31] P. Szturz, J.B. Vermorken, Management of recurrent and metastatic oral cavity cancer: raising the bar a step higher, *Oral Oncol.* 101 (2020) 104492.
- [32] Y.-P. Chen, Y.-Q. Wang, J.-W. Lv, Y.-Q. Li, M.L.K. Chua, Q.-T. Le, et al., Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy, *Ann. Oncol.* 30 (2019) 68–75.
- [33] X. Jiang, J. Wang, X. Deng, F. Xiong, J. Ge, B. Xiang, et al., Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape, *Mol. Cancer* 18 (2019) 10.

Chapitre 3 : Discussion générale et **conclusions**

I. SLC7A11 comme biomarqueur dans les CETC HPV+ve

Dans la première partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'expression d'acteurs clés de la ferroptose. Nous avons comparé les CETC HPV+ve et HPV-ve, étant donné les différences fondamentales qui existent entre ces deux grandes voies de la carcinogenèse (Beck and Golemis, 2016; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Leemans et al., 2018). Les CETC HPV+ve expriment moins les ARNm *SLC7A11* et *SLC3A2*, codant pour les deux sous-unités de l'antiport Cystine/Glutamate Xc-, que les CETC HPV-ve. Nos observations indiquent que la modulation de l'expression de *SLC7A11* est spécifique, car elle est observée dans un contexte de forte expression des gènes ayant une fonction dans l'équilibre oxydoréducteur, tels que *ME1* (Enzyme Malique) et les gènes de la voie des pentoses phosphate (par exemple *G6PD* [Glucose-6-phosphate déshydrogénase] et *PGD* [Phosphogluconate Deshydrogénase]). Par ailleurs, nos observations indiquent que cette différence d'expression a un retentissement important sur les cellules E6/E7. En effet, les cellules de CETC sur-exprimant E6/E7 sont plus susceptibles de subir la ferroptose induite par l'éristine que leurs cellules parentales. Cette vulnérabilité semble spécifiquement liée à *SLC7A11* car la présence d'E6/E7 augmente la ferroptose lors de l'exposition à l'éristine (qui bloque Xc-), mais pas à RSL3 (dont le mode d'action ne passe pas par l'inhibition de Xc-).

La différence d'expression de *SLC7A11* entre tumeurs HPV+ve et HPV-ve que nous avons observée portait sur les niveaux d'ARNm et peut avoir deux explications non exclusives : une baisse d'expression de *SLC7A11* dans les CETC HPV+ve, ou une surexpression de cet ARNm dans les CETC HPV-ve. La régulation épigénétique de *SLC7A11* offre une piste d'étude pour la recherche d'une régulation négative de ce gène, comme cela a pu être mis en évidence dans le contexte de la neuropathologie (Vallerga et al., 2020). Alternativement, nous avons envisagé la possibilité d'une régulation positive de l'expression de *SLC7A11* dans les CETC HPV-ve. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la consommation alcoolique et/ou tabagique chronique est le facteur de risque le plus fréquemment rapporté des CETC

HPV-ve (Cohen et al., 2018). La fumée de tabac contient en outre plusieurs molécules responsables de sa cancérogénicité, dont les deux principales sont les HAP et les nitrosamines, deux familles de mutagènes (Jethwa and Khariwala, 2017). L'alcool, quant à lui, exerce des effets cancérogènes par le biais du métabolisme de l'éthanol en acétaldéhyde, lui aussi mutagène (Mizumoto et al., 2017). Nous avons tenté de moduler l'expression de *SLC7A11* avec le Benzo-[a]-Pyrène, un HAP présent dans la fumée de cigarette. Nous n'avons pas obtenu de résultat indiquant que ce composé induit une variation aigüe de l'expression de *SLC7A11* (données non publiées). Ce type d'expérience pourrait requérir l'exposition soutenue des cellules de CETC, reflétant davantage le tabagisme chronique.

Nos observations confirment la présence d'un stress oxydant dans les CETC HPV+ve par rapport aux CETC HPV-ve, comme cela a déjà été mis en évidence auparavant (Cruz-Gregorio et al., 2018; Marullo et al., 2015). Deux explications à ce stress oxydant sont possibles: la production accrue d'espèces oxydantes dans les CETC HPV+ve, ou bien l'interférence des protéines E6/E7 avec les défenses antioxydantes des cellules. Nous avons mesuré des concentrations plus faibles en GSH total dans les cellules E6/E7 que dans leurs cellules parentales, suggérant des capacités antioxydantes réduites des cellules E6/E7. Par contre, nous n'avons pas observé *in vitro* de baisse d'expression de *SLC7A11* dans les cellules exprimant E6/E7, ce qui laisse supposer que l'expression de *SLC7A11* plus basse dans les CETC HPV+ve n'est pas directement reliée à la baisse du GSH. Nous concluons donc que l'expression de *SLC7A11* et la régulation du glutathion total sont deux régulations biologiques au moins partiellement distinctes dans les CETC HPV+ve. En mettant en évidence l'existence de plusieurs niveaux de régulation du stress oxydant, notre travail pointe la régulation complexe du métabolisme redox (Hosios and Vander Heiden, 2018).

Notre étude permet d'évoquer l'intérêt du ciblage de la ferroptose dans les cancers. On pourrait, en ciblant le transporteur Xc- des cellules cancéreuses, induire leur mort et favoriser des régressions tumorales. Dans notre étude, l'érastine induit une létalité dans deux lignées de CETC mais cette létalité est incomplète (de l'ordre de 20% dans

les cellules parentales et 25 à 45% dans les lignées E6/E7). Pour augmenter ce rendement, il serait intéressant de tester des combinaisons entre des thérapies anticancéreuses approuvées dans les CETC et ayant montré un effet pro-ferroptotique (telles que la radiothérapie et le paclitaxel à faible dose) et l'érastine dans nos cellules (Lei et al., 2020; Roh et al., 2015; Ye et al., 2019). Plusieurs travaux, menés *in vitro* ou dans des modèles animaux, ont en effet mis en évidence une potentialisation des effets des thérapies antitumorales grâce à la combinaison de ces dernières avec un inducteur de la ferroptose. Ainsi, Roh et al. (2016) ont mis en évidence dans les CETC une potentialisation des effets cytotoxiques du cisplatine grâce à l'extinction ou le ciblage de Xc- (Roh et al., 2016). Ye et al. (2020) ont obtenu des résultats similaires et mis en évidence une synergie entre radiothérapie et inducteurs de la ferroptose dans les CETC hypopharyngés (Ye et al., 2020). Enfin, Ye et al. (2019) ont mis en évidence une synergie pro-ferroptotique entre le paclitaxel à faible dose et RSL3 (Ye et al., 2019).

Une limitation importante des travaux actuels est le fait que la ferroptose n'a été testée que dans des modèles immunodéprimés dans lesquels le MT donne un reflet très inexact de celui qui existe dans les tumeurs humaines. Nous souhaitons donc poursuivre notre étude en explorant les liens entre ferroptose et éléments du MT. Pour cela, plusieurs approches sont envisageables. L'utilisation de modèles animaux « avancés », comme ceux qui reposent sur transgénèse chez la souris, et permettent une étude du MT dans un contexte immunocompétent, est envisageable dans ce contexte (Mestre et al., 2020). Des études de génomique, notamment au moyen de l'analyse des données issues de cohortes de RNA-seq, comme le TCGA, et d'outils de biostatistiques, permettraient également d'étudier le lien entre ferroptose et MT (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Ces études pourraient être complétées en anatomopathologie pour étudier d'éventuelles corrélations entre l'expression de SLC7A11 et la qualité de l'infiltrat tumoral ainsi que l'expression de points de contrôles immunitaires. Nous reviendrons sur ces perspectives dans le troisième chapitre de cette discussion. Ces études permettraient de « baliser » l'utilisation de SLC7A11 comme un biomarqueur dans les CETC, soit pour une application pronostique (concernant la progression de la tumeur), soit pour une application prédictive (concernant l'efficacité du traitement).

II. Régulation spécifique de l'expression de la molécule checkpoint PD-L1 par la signalisation JAK/STAT et la DDR dans les cellules de CETC exposées au 5-FU.

Nous avons réalisé une étude biologique, dans la continuité des recherches ayant mis en évidence l'induction de PD-L1 par les chimiothérapies anticancéreuses dans les CETC (Ock et al., 2017; Leduc et al., 2018). Ces travaux précédents n'avaient en effet pas apporté d'explication mécanistique concernant l'induction de PD-L1 (Leduc et al., 2018; Ock et al., 2017). Des effets similaires du 5-FU sur l'expression de PD-L1 avaient été mis en évidence dans des tumeurs gastro-intestinales et pancréatiques (Doi et al., 2017; Van Der Kraak et al., 2016). Notre étude a montré que le 5-FU augmente l'expression de PD-L1 à la fois en termes d'ARNm et de protéine dans les cellules de CETC. Cette induction était retrouvée dans des contextes génomiques différents, sans lien avec la sénescence ou une diminution de la viabilité cellulaire (données non publiées). Nous avons montré que l'induction de PD-L1 par le 5-FU est reliée aux effets génotoxiques de cette chimiothérapie, dans la mesure où elle était inhibée par l'ajout de thymidine et l'utilisation d'un inhibiteur chimique d'ATM/ATR, le VE-821. Notre étude montre ainsi pour la première fois une régulation spécifique de PD-L1 par le 5-FU et la DDR dans les CETC.

L'expression de PD-L1 fait l'objet d'une régulation complexe par les signalisations oncogénique, inflammatoire et hypoxique (Cha et al., 2019). L'existence d'une régulation de l'expression de PD-L1 en aval de la DDR a été mise en évidence pour la première fois par Sato et al. en 2018 dans plusieurs lignées de tumeurs solides (Sato et al., 2017). Nous avons pu montrer que ces conclusions s'appliquent également aux CETC. Dans notre système, la nature exacte des événements qui activent la DDR reste à élucider. Nous avons observé des DSB induites par le 5-FU (mises en évidence par la détection en immunoblot de la protéine γ -H2AX à la suite de l'exposition des cellules au 5-FU). Il est donc possible, mais non démontré, que ces DSB provoqués par le 5-FU activent la DDR et l'expression de PD-L1.

Notre travail nous a conduits à examiner la possibilité d'actionner certains des mécanismes qui contrôlent l'expression de PD-L1 par le 5-FU dans les CETC. Nous avons constaté que le 5-FU agit de façon additive ou synergique avec l'IFN- γ , l'inducteur canonique de l'expression de PD-L1, selon un mécanisme convergeant vers la voie de signalisation JAK/STAT. La voie JAK/STAT est une voie de signalisation essentielle activée dans tous les types cellulaires, transformés ou non, qui constituent les tumeurs. Cette voie fait l'objet de nombreuses recherches en oncologie (Owen et al., 2019). Dans nos conditions expérimentales, l'inhibition de cette voie empêchait efficacement la surexpression de PD-L1 induite par la combinaison 5-FU + IFN- γ . Notre étude ayant été menée sur des cellules en culture, nous n'avons pas envisagé les effets du ciblage de JAK sur le MT, et nous ne pouvons ainsi pas tirer de conclusion concernant un éventuel bénéfice du blocage de JAK dans les tumeurs. De façon notable, les travaux de Moreira et *al.* suggèrent qu'inhiber la voie JAK / STAT dans la ligne myéloïde et les TAM pourrait augmenter la réponse immunitaire antitumorale (Moreira et al., 2021). L'ensemble de ces résultats suggère que l'inhibiteur de JAK pourrait offrir une approche valide dans ce contexte. Certains de ces inhibiteurs sont approuvés chez l'Homme dans d'autres indications, comme le ruxolitinib (JAKAVI®), un inhibiteur sélectif des enzymes JAK1 et JAK2 disposant d'une AMM dans certaines néoplasies myéloprolifératives. La transposition de nos observations, en utilisant dans un premier temps des modèles animaux immunocompétents nous permettrait de vérifier *in vivo* l'implication des voies JAK/STAT et de la DDR dans la régulation de PD-L1. La possibilité d'obtenir une efficacité antitumorale en ciblant JAK pourrait également être vérifiée dans ce type de modèle.

De façon de plus en plus claire, le succès d'une chimiothérapie ne dépend pas uniquement de ses effets cytostatiques et cytotoxiques, mais aussi de sa capacité à déclencher une réponse immunitaire (Galluzzi et al., 2020; Gmeiner, 2020). Notre étude suggère l'existence d'un mécanisme qui pourrait limiter l'efficacité du 5-FU en prévenant l'activation de la réponse immunitaire par cette chimiothérapie. Nous suggérons que les cellules de CETC exposées au 5-FU pourraient favoriser un phénomène d'épuisement parmi les cellules de l'immunité adaptative (Blank et al., 2019). Cette hypothèse mérite d'être explorée et testée, mais notre étude amène un

rationnel pour le ciblage de PD-1 grâce aux ICB lors du traitement par protocole de chimiothérapie incluant le 5-FU. D'autres combinaisons associant ICB et chimiothérapies ont pu être proposées (Tran et al., 2017). L'idée d'associer chimiothérapie et ICB est donc une idée émergente.

En clinique, l'utilisation du 5-FU est encore peu personnalisée, bien qu'un biomarqueur de toxicité du 5-FU soit déjà utilisé : la recherche du déficit en enzyme dihydropyrimidine désydrégénase (DPD), qui est l'enzyme hépatique métabolisant le 5-FU (Wigle et al., 2019). Peu d'études évoquent la possibilité de prédire l'efficacité du 5-FU au moyen de biomarqueurs. Un point intéressant de notre étude était que l'induction de PD-L1 par le 5-FU était additive voire synergique par rapport à celle exercée par l'IFN- γ , l'inducteur canonique de l'expression de PD-L1. Il serait intéressant de voir dans quelle mesure un MT enflammé, constituant une source riche en IFN- γ notamment, pourrait moduler la réponse immunitaire dans les CETC traités par chimiothérapie, voire le bénéfice des chimiothérapies utilisant le 5-FU.

Finalement, notre travail ouvre une autre perspective qui est la possibilité de limiter l'induction de PD-L1 en ciblant l'EGFR grâce au cetuximab, un anticorps monoclonal approuvé dans les CETC. Ng et al. (2018) ont montré que le blocage de l'EGFR prévient la régulation positive de PD-L1 dans des tumeurs œsophagiennes traitées par chimiothérapie (Ng et al., 2018). La régulation positive de PD-L1 par la signalisation des voies en aval de l'EGFR et d'autres RTK a également été rapportée dans les CETC (Boschert et al., 2020; Cheng et al., 2018; Concha-Benavente et al., 2016). L'effet du blocage de l'EGFR par le cetuximab sur la signalisation PD-L1 dans nos cellules en culture souligne par ailleurs le rôle important d'une signalisation auto ou paracrine dans ce contexte. Cette modulation de l'expression de PD-L1 par le cetuximab constitue un mécanisme supplémentaire de modulation de l'immunité antitumorale par cet anticorps. Le cetuximab est déjà connu comme favorisant l'immunité antitumorale, grâce à sa fixation sur les récepteurs CD16 exprimés sur les NK et les cellules dendritiques (Ferris et al., 2018b). Cette fixation favorise la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps médiée par les NK, ainsi que le recrutement et l'activation des cellules T cytotoxiques (Ferris et al., 2018b). La

modulation de l'immunité antitumorale par le cetuximab ainsi que nos résultats amènent un rationnel pour envisager d'étudier le bénéfice d'un protocole thérapeutique associant cet anticorps avec un ICB (Ferris et al., 2018b). Un essai clinique multicentrique de phase 2 évaluant le bénéfice de l'association entre pembrolizumab et cetuximab est par ailleurs en phase de recrutement, pour évaluer notamment la tolérance de cette association dans les CETC récidivants ou métastatiques (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03082534).

III. Perspectives pour l'étude translationnelle du MT des CETC

La ferroptose et le MT entretiennent des liens complexes. La ferroptose est potentiellement déclenchée par les cellules immunitaires, du fait par exemple de l'action de l'IFN- γ (Wang et al., 2019c). Wang et al. ont ainsi mis en évidence que la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺ du MT induisait la ferroptose de cellules de mélanomes en réduisant l'expression de SLC7A11 par les cellules cancéreuses (Wang et al., 2019c). Cette étude a été la première à proposer d'utiliser la combinaison entre ICB et déclencheurs de la ferroptose, avec pour idée que la ferroptose est un effecteur de l'immunité innée (Wang et al., 2019c). Réciproquement, la ferroptose est aussi probablement une source d'inflammation, comme nous l'avons discuté précédemment (Ingold et al., 2018; Kagan et al., 2017; Kim et al., 2019; Yang et al., 2014a). La libération de DAMP par les cellules ferroptotiques, expliquant le caractère inflammatoire de cette mort cellulaire fait entrevoir la possibilité d'une modulation du MT par la ferroptose (Kim et al., 2019; Wen et al., 2019). Cela étant, les rapports entre inflammation et progression tumorale / immunité antitumorale sont complexes (Shalapour and Karin, 2019). Par ailleurs, il n'existe pas encore d'études dans les CETC pour vérifier la solidité des corrélations entre MT inflammatoire et ferroptose. Des études sont requises, aussi bien dans le contexte thérapeutique que dans les conditions « basales », c'est-à-dire en dehors de la thérapeutique. Il reste donc beaucoup de travail pour bien comprendre l'impact et la régulation de la ferroptose dans les CETC.

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, l'étude de la génomique offre des opportunités importantes pour d'étudier la composition, le fonctionnement du MT ainsi que ses interactions avec les cellules cancéreuses, de façon impartiale et à grande échelle (Chen et al., 2019; Liu et al., 2021; Mandal et al., 2016). Pour poursuivre notre étude, une piste intéressante consisterait en l'étude des liens entre l'expression de *SLC7A11* et les éléments du MT, en particulier les cellules immunitaires, l'expression des molécules, cytokines ou points de contrôle qui régulent la réponse immunitaire antitumorale. Dans la mesure du possible, les interactions mises en évidence par les

travaux *in silico* devront être testées *in vitro* grâce aux lignées cellulaires de CETC, ou en collaboration avec des anatomopathologistes.

Par ailleurs, le MT est un ensemble complexe de cellules d'origines différentes, présentant des phénotypes plastiques et qui sont soumises à des conditions biologiques changeantes (Bhat et al., 2021; Sahai et al., 2020; Veglia et al., 2018). Pour accéder à une description qui intègre l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale, nous aurons besoin d'avoir recours à des techniques d'analyse sur cellules uniques (single cells). Nous avons entamé une étude de la régulation de la ferroptose au moyen des données single cells de la cohorte GSE103322 (Puram et al., 2017) (cf. *Figure 21*).

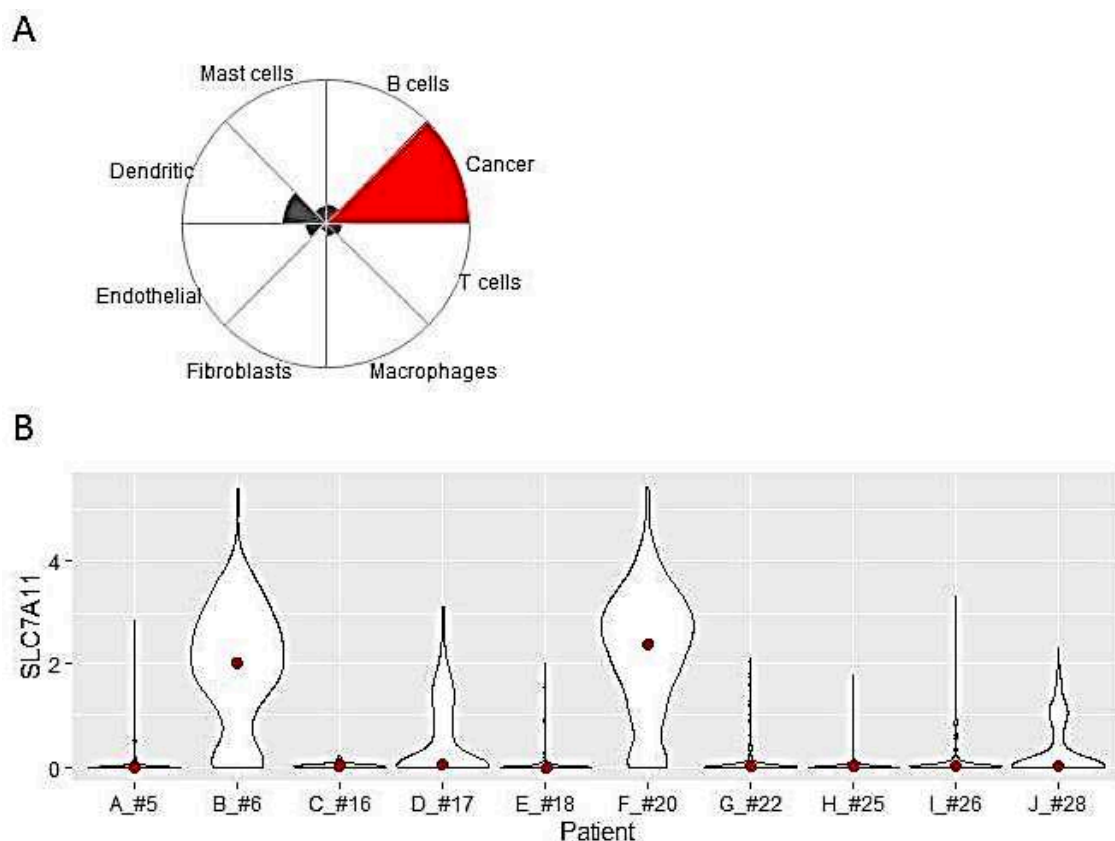


Figure 21: L'expression de SLC7A11 dans les CETC présente une hétérogénéité inter et intra-tumorale.

Les données de séquençage ARNm single cells sont issues de la cohorte GSE103322 (Puram et al., 2017). A) Diagramme polaire représentant l'expression des ARNm de SLC7A11 dans les cellules tumorales et les différents types cellulaires du MT. Les données sont issues de 18 CETC HPV-ve. Le rayon de chaque segment représente le niveau relatif d'ARNm SLC7A11 exprimé en RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) par chaque type cellulaire. L'expression des cellules cancéreuses est

représentée par la couleur rouge. Les cellules cancéreuses sont les seules à exprimer de hauts niveaux d'ARNm SLC7A11. B) Violin Plots représentant l'expression de l'ARNm SLC7A11 au sein des cellules cancéreuses de 10 tumeurs. La médiane d'expression est figurée grâce à un point rouge pour chaque patient.

Les différentes cellules du MT immunitaire ont des sensibilités différentes à la ferroptose (cf. *Tableau 3*) (Xu et al., 2021). Dans le cadre de l'utilisation d'inducteurs de la ferroptose en thérapeutique, l'impact des inhibiteurs de SLC7A11 et de GPx4 diffère selon les types cellulaires (cf. *Tableau 3*) (Xu et al., 2021).

Tableau 3: Vulnérabilité des cellules immunitaires aux inducteurs de la ferroptose (d'après Xu et al., 2021)

C. immunitaires	Inhibiteurs de SLC7A11	Inhibiteurs de GPx4
Cellules T CD8+	Résistance	Ferroptose
Cellules T reg	-	Ferroptose Production IL-1 β
TAM M1	Haute résistance	Ferroptose
TAM M2	Ferroptose / Repolarisation TAM M1	Ferroptose / Repolarisation TAM M1
MDSC	Ferroptose ?	-
C. dendritiques	Inhibition maturation	Inhibition maturation

Notre étude suggère que l'expression de SLC7A11 est surtout restreinte aux cellules cancéreuses (cf. *Figure 21*, panel A). Il serait nécessaire de comparer le ciblage de SLC7A11 dans les différents types cellulaires issus du MT de CETC pour vérifier si le ciblage de SCL7A11 affecte surtout les cellules cancéreuses. Une autre observation importante est l'extrême hétérogénéité de l'expression de SLC7A11, aussi bien entre différentes tumeurs qu'entre les cellules d'une même tumeur (cf. *Figure 21*). Un objectif de recherche consistera à identifier les mécanismes responsables de chacune de ces variabilités.

Pour finir, la ferroptose n'est sans doute pas la fonction exclusive de SLC7A11, qui est un transporteur d'acides aminés (Koppula et al., 2018). L'étude du métabolisme intermédiaire dans les cancers est un domaine prometteur qui dépasse le cadre de notre étude de la ferroptose (Pavlova and Thompson, 2016).

Chapitre 4 : Références bibliographiques

Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400–414.

Ai, L., Vo, Q.N., Zuo, C., Li, L., Ling, W., Suen, J.Y., Hanna, E., Brown, K.D., and Fan, C.-Y. (2004). Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM) Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Promoter Hypermethylation with Clinical Correlation in 100 Cases. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 13, 150–156.

Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D.I., Nguyen-Tân, P.F., Westra, W.H., Chung, C.H., Jordan, R.C., Lu, C., et al. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 363, 24–35.

Atkuri, K.R., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (2007). N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 355–359.

Ayala, G.E., Dai, H., Powell, M., Li, R., Ding, Y., Wheeler, T.M., Shine, D., Kadmon, D., Thompson, T., Miles, B.J., et al. (2008). Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 7593–7603.

Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., Kaufman, D.R., Albright, A., Cheng, J.D., Kang, S.P., Shankaran, V., et al. (2017). IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* 127, 2930–2940.

Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay, N.E.H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W.H., et al. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 465–472.

Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 5591–5596.

Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 2256–2263.

Beck, T.N., and Golemis, E.A. (2016). Genomic insights into head and neck cancer. *Cancers Head Neck* 1, 1.

Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 135–147.

Bhat, A.A., Yousuf, P., Wani, N.A., Rizwan, A., Chauhan, S.S., Siddiqi, M.A., Bedognetti, D., El-Rifai, W., Frenneaux, M.P., Batra, S.K., et al. (2021). Tumor microenvironment: an evil nexus promoting aggressive head and neck squamous cell carcinoma and avenue for targeted therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 12.

Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817.

- Blank, C.U., Haining, W.N., Held, W., Hogan, P.G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R.C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N.P., et al. (2019). Defining 'T cell exhaustion.' *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 665–674.
- Bogdan, A.R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., and Tsuji, Y. (2016). Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 274–286.
- Boschert, V., Teusch, J., Aljaseem, A., Schmucker, P., Klenk, N., Straub, A., Bittrich, M., Seher, A., Linz, C., Müller-Richter, U.D.A., et al. (2020). HGF-Induced PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer: Preclinical and Clinical Findings. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.
- Boussiotis, V.A. (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N. Engl. J. Med.* *375*, 1767–1778.
- Boutelle, A.M., and Attardi, L.D. (2021). p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends Cell Biol.* *31*, 298–310.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., et al. (2009). A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* *10*, 321–322.
- Bowry, A., Kelly, R.D.W., and Petermann, E. (2021). Hypertranscription and replication stress in cancer. *Trends Cancer* *7*, 863–877.
- Brigelius-Flohé, R., and Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* *13*, 1145–1155.
- Bunt, S.K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Res.* *67*, 10019–10026.
- Burtneß, B., Harrington, K.J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., Castro, G. de, Psyrri, A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., et al. (2019). Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* *394*, 1915–1928.
- Campbell, J.D., Yau, C., Bowlby, R., Liu, Y., Brennan, K., Fan, H., Taylor, A.M., Wang, C., Walter, V., Akbani, R., et al. (2018). Genomic, Pathway Network, and Immunologic Features Distinguishing Squamous Carcinomas. *Cell Rep.* *23*, 194-212.e6.
- Cancer Genome Atlas Network (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* *517*, 576–582.
- Cervantes-Villagrana, R.D., Albores-García, D., Cervantes-Villagrana, A.R., and García-Acevez, S.J. (2020). Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. *Signal Transduct. Target. Ther.* *5*, 1–23.

- Cha, J.-H., Chan, L.-C., Li, C.-W., Hsu, J.L., and Hung, M.-C. (2019). Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol. Cell* 76, 359–370.
- Chen, D., Tavana, O., Chu, B., Erber, L., Chen, Y., Baer, R., and Gu, W. (2017). NRF2 Is a Major Target of ARF in p53-Independent Tumor Suppression. *Mol. Cell* 68, 224-232.e4.
- Chen, H., He, Y., Pan, T., Zeng, R., Li, Y., Chen, S., Li, Y., Xiao, L., and Zhou, H. (2021). Ferroptosis-Related Gene Signature: A New Method for Personalized Risk Assessment in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Pharmacogenomics Pers. Med.* 14, 609–619.
- Chen, L., Hambright, W.S., Na, R., and Ran, Q. (2015). Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *J. Biol. Chem.* 290, 28097–28106.
- Chen, Y.-P., Wang, Y.-Q., Lv, J.-W., Li, Y.-Q., Chua, M.L.K., Le, Q.-T., Lee, N., Colevas, A.D., Seiwert, T., Hayes, D.N., et al. (2019). Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *Ann. Oncol.* 30, 68–75.
- Cheng, C.-C., Lin, H.-C., Tsai, K.-J., Chiang, Y.-W., Lim, K.-H., Chen, C.G.-S., Su, Y.-W., Peng, C.-L., Ho, A.-S., Huang, L., et al. (2018). Epidermal growth factor induces STAT1 expression to exacerbate the IFN α -mediated PD-L1 axis in epidermal growth factor receptor-positive cancers. *Mol. Carcinog.* 57, 1588–1598.
- Chow, L.Q.M. (2020). Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* 382, 60–72.
- Chow, L.Q.M., Haddad, R., Gupta, S., Mahipal, A., Mehra, R., Tahara, M., Berger, R., Eder, J.P., Burtneess, B., Lee, S.-H., et al. (2016). Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 3838–3845.
- Cohen, E.E.W., Soulières, D., Tourneau, C.L., Dinis, J., Licitra, L., Ahn, M.-J., Soria, A., Machiels, J.-P., Mach, N., Mehra, R., et al. (2019a). Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* 393, 156–167.
- Cohen, E.E.W., Bell, R.B., Bifulco, C.B., Burtneess, B., Gillison, M.L., Harrington, K.J., Le, Q.-T., Lee, N.Y., Leidner, R., Lewis, R.L., et al. (2019b). The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J. Immunother. Cancer* 7.
- Cohen, N., Fedewa, S., and Chen, A.Y. (2018). Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* 30, 381–395.
- Concha-Benavente, F., Srivastava, R.M., Trivedi, S., Lei, Y., Chandran, U., Seethala, R.R., Freeman, G.J., and Ferris, R.L. (2016). Identification of the Cell-Intrinsic and -

Extrinsic Pathways Downstream of EGFR and IFN γ That Induce PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* **76**, 1031–1043.

Conrad, M., and Friedmann Angeli, J.P. (2015). Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about it? *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e995047.

Cramer, J.D., Burtneess, B., Le, Q.T., and Ferris, R.L. (2019a). The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 669–683.

Cramer, J.D., Burtneess, B., and Ferris, R.L. (2019b). Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. *Oral Oncol.* **99**, 104460.

Cruz-Gregorio, A., Manzo-Merino, J., and Lizano, M. (2018). Cellular redox, cancer and human papillomavirus. *Virus Res.* **246**, 35–45.

Demokan, S., and Dalay, N. (2011). Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clin. Epigenetics* **2**, 123–150.

Deneka, A.Y., Einarson, M.B., Bennett, J., Nikonova, A.S., Elmekawy, M., Zhou, Y., Lee, J.W., Burtneess, B.A., and Golemis, E.A. (2020). Synthetic Lethal Targeting of Mitotic Checkpoints in HPV-Negative Head and Neck Cancer. *Cancers* **12**, 306.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072.

Dixon, S.J., Patel, D.N., Welsch, M., Skouta, R., Lee, E.D., Hayano, M., Thomas, A.G., Gleason, C.E., Tatonetti, N.P., Slusher, B.S., et al. (2014). Pharmacological inhibition of cystine–glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *ELife* **3**.

Doi, T., Ishikawa, T., Okayama, T., Oka, K., Mizushima, K., Yasuda, T., Sakamoto, N., Katada, K., Kamada, K., Uchiyama, K., et al. (2017). The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines. *Oncol. Rep.* **37**, 1545–1554.

Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Imler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., et al. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 91–98.

Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., and Stockwell, B.R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**, 285–296.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I.G., Stoler, M., Broker, T.R., and Stanley, M.A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* **30 Suppl 5**, F55-70.

Dvorak, H.F. (2019). Tumors: Wounds That Do Not Heal-A Historical Perspective with a Focus on the Fundamental Roles of Increased Vascular Permeability and Clotting. *Semin. Thromb. Hemost.* **45**, 576–592.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell* 17, 135–147.

Falanga, A., Russo, L., Milesi, V., and Vignoli, A. (2017). Mechanisms and risk factors of thrombosis in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 118, 79–83.

Feng, H., Schorpp, K., Jin, J., Yozwiak, C.E., Hoffstrom, B.G., Decker, A.M., Rajbhandari, P., Stokes, M.E., Bender, H.G., Csuka, J.M., et al. (2020). Transferrin Receptor Is a Specific Ferroptosis Marker. *Cell Rep.* 30, 3411-3423.e7.

Ferris, R.L., Hunt, J.L., and Ferrone, S. (2005). Human leukocyte antigen (HLA) class I defects in head and neck cancer. *Immunol. Res.* 33, 113–133.

Ferris, R.L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A.D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E.E., Even, C., et al. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* 375, 1856–1867.

Ferris, R.L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A.D., Licitra, L., Harrington, K.J., Kasper, S., Vokes, E.E., Even, C., et al. (2018a). Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol.* 81, 45–51.

Ferris, R.L., Lenz, H.-J., Trotta, A.M., García-Foncillas, J., Schulten, J., Audhuy, F., Merlano, M., and Milano, G. (2018b). Rationale for combination of therapeutic antibodies targeting tumor cells and immune checkpoint receptors: Harnessing innate and adaptive immunity through IgG1 isotype immune effector stimulation. *Cancer Treat. Rev.* 63, 48–60.

Filipe, E.C., Chitty, J.L., and Cox, T.R. (2018). Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* 99, 58–76.

Fleming, J.C., Woo, J., Moutasim, K., Mellone, M., Frampton, S.J., Mead, A., Ahmed, W., Wood, O., Robinson, H., Ward, M., et al. (2019). HPV, tumour metabolism and novel target identification in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 120, 356–367.

Friedmann Angeli, J.P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Hammond, V.J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., et al. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* 16, 1180–1191.

Friedmann Angeli, J.P., Krysko, D.V., and Conrad, M. (2019). Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* 19, 405–414.

Fucikova, J., Kepp, O., Kasikova, L., Petroni, G., Yamazaki, T., Liu, P., Zhao, L., Spisek, R., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2020). Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.* 11, 1–13.

- Fukusumi, T., and Califano, J.A. (2018). The NOTCH Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Dent. Res.* *97*, 645–653.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 97–111.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* *25*, 486–541.
- Galluzzi, L., Humeau, J., Buqué, A., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2020). Immunostimulation with chemotherapy in the era of immune checkpoint inhibitors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *17*, 725–741.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Moreno, B.H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G.A., Zaretsky, J.M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., et al. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* *19*, 1189–1201.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* *161*, 1163–1177.
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., and Vermeulen, W. (2011). DNA Damage Response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a000745.
- Gmeiner, W.H. (2020). Fluoropyrimidine Modulation of the Anti-Tumor Immune Response-Prospects for Improved Colorectal Cancer Treatment. *Cancers* *12*.
- Goesswein, D., Habtemichael, N., Gerhold-Ay, A., Mazur, J., Wünsch, D., Knauer, S.K., Künzel, J., Matthias, C., Strieth, S., and Stauber, R.H. (2018). Expressional analysis of disease-relevant signalling-pathways in primary tumours and metastasis of head and neck cancers. *Sci. Rep.* *8*, 7326.
- Graham, S.V. (2017). The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin. Sci.* *131*, 2201–2221.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 353–363.
- Greten, F.R., and Grivnickov, S.I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* *51*, 27–41.
- Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br. J. Cancer* *120*, 16–25.
- Guo, J., Xu, B., Han, Q., Zhou, H., Xia, Y., Gong, C., Dai, X., Li, Z., and Wu, G. (2018). Ferroptosis: A Novel Anti-tumor Action for Cisplatin. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* *50*, 445–460.

- Halbert, C.L., Demers, G.W., and Galloway, D.A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* *65*, 473–478.
- Hambright, W.S., Fonseca, R.S., Chen, L., Na, R., and Ran, Q. (2017). Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol.* *12*, 8–17.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harden, M.E., and Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *772*, 3–12.
- Harris, R.E. (2009). Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* *17*, 55–67.
- Hedberg, M.L., Peyser, N.D., Bauman, J.E., Gooding, W.E., Li, H., Bhola, N.E., Zhu, T.R., Zeng, Y., Brand, T.M., Kim, M.-O., et al. (2019). Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs predicts improved patient survival for PIK3CA-altered head and neck cancer. *J. Exp. Med.* *216*, 419–427.
- Hegde, P.S., and Chen, D.S. (2020). Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* *52*, 17–35.
- Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J.A., Herrmann, A.L., and Hoppe-Seyler, F. (2018). The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol.* *26*, 158–168.
- Hosios, A.M., and Vander Heiden, M.G. (2018). The redox requirements of proliferating mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *293*, 7490–7498.
- Hu, Z., Yang, R., Li, L., Mao, L., Liu, S., Qiao, S., Ren, G., and Hu, J. (2020). Validation of Gene Profiles for Analysis of Regional Lymphatic Metastases in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front. Mol. Biosci.* *7*.
- Huang, S.H., and O’Sullivan, B. (2017). Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* *18*, 40.
- Huang, C., Chen, L., Savage, S.R., Eiguez, R.V., Dou, Y., Li, Y., da Veiga Leprevost, F., Jaehnig, E.J., Lei, J.T., Wen, B., et al. (2021). Proteogenomic insights into the biology and treatment of HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* *39*, 361-379.e16.
- Ingold, I., Berndt, C., Schmitt, S., Doll, S., Poschmann, G., Buday, K., Roveri, A., Peng, X., Porto Freitas, F., Seibt, T., et al. (2018). Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell* *172*, 409-422.e21.
- Jakobsson, L., Franco, C.A., Bentley, K., Collins, R.T., Ponsioen, B., Aspalter, I.M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., et al. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* *12*, 943–953.

- Jethwa, A.R., and Khariwala, S.S. (2017). Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **36**, 411–423.
- Johnson, D.E., Burtneß, B., Leemans, C.R., Lui, V.W.Y., Bauman, J.E., and Grandis, J.R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* **6**, 92.
- Kagan, V.E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J.P.F., Doll, S., Croix, C.S., Dar, H.H., Liu, B., Tyurin, V.A., Ritov, V.B., et al. (2017). Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 81–90.
- Kajarabille, N., and Latunde-Dada, G.O. (2019). Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.
- Kantidze, O.L., Velichko, A.K., Luzhin, A.V., Petrova, N.V., and Razin, S.V. (2018). Synthetically Lethal Interactions of ATM, ATR, and DNA-PKcs. *Trends Cancer* **4**, 755–768.
- Karakasheva, T.A., Lin, E.W., Tang, Q., Qiao, E., Waldron, T.J., Soni, M., Klein-Szanto, A.J., Sahu, V., Basu, D., Ohashi, S., et al. (2018). IL-6 Mediates Cross-Talk between Tumor Cells and Activated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **78**, 4957–4970.
- Kastenhuber, E.R., and Lowe, S.W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062–1078.
- Kim, E.H., Wong, S.-W., and Martinez, J. (2019). Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation. *Cell Death Differ.* **26**, 25–40.
- Ko, C.-A., Fang, K.-H., Hsu, C.-M., Lee, Y.-C., Chang, G.-H., Huang, E.I., Tsai, M.-S., and Tsai, Y.-T. (2021). The preoperative C-reactive protein-lymphocyte ratio and the prognosis of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*.
- Kopp, H.-G., Placke, T., and Salih, H.R. (2009). Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* **69**, 7775–7783.
- Koppula, P., Zhang, Y., Zhuang, L., and Gan, B. (2018). Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun.* **38**, 12.
- Kortlever, R.M., Sodik, N.M., Wilson, C.H., Burkhart, D.L., Pellegrinet, L., Brown Swigart, L., Littlewood, T.D., and Evan, G.I. (2017). Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* **171**, 1301-1315.e14.
- Kumar, A.T., Knops, A., Swendseid, B., Martinez-Outschoom, U., Harshyne, L., Philp, N., Rodeck, U., Luginbuhl, A., Cognetti, D., Johnson, J., et al. (2019). Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophage Content in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **9**, 656.
- Kumari, R., and Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front. Cell Dev. Biol.* **0**.

Lachaier, E., Louandre, C., Ezzoukhry, Z., Godin, C., Mazière, J.-C., Chauffert, B., and Galmiche, A. (2014a). La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers. *médecine/sciences* 30, 779–783.

Lachaier, E., Louandre, C., Godin, C., Saidak, Z., Baert, M., Diouf, M., Chauffert, B., and Galmiche, A. (2014b). Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res.* 34, 6417–6422.

Lailier, C., Louandre, C., Morisse, M.C., Lhossein, T., Godin, C., Lottin, M., Constans, J.-M., Chauffert, B., Galmiche, A., and Saidak, Z. (2019). ERK1/2 signaling regulates the immune microenvironment and macrophage recruitment in glioblastoma. *Biosci. Rep.* 39.

Lama-Sherpa, T.D., and Shevde, L.A. (2020). An Emerging Regulatory Role for the Tumor Microenvironment in the DNA Damage Response to Double-Strand Breaks. *Mol. Cancer Res. MCR* 18, 185–193.

Lang, X., Green, M.D., Wang, W., Yu, J., Choi, J.E., Jiang, L., Liao, P., Zhou, J., Zhang, Q., Dow, A., et al. (2019). Radiotherapy and Immunotherapy Promote Tumoral Lipid Oxidation and Ferroptosis via Synergistic Repression of SLC7A11. *Cancer Discov.* 9, 1673–1685.

Lecerf, C., Kamal, M., Vacher, S., Chemlali, W., Schnitzler, A., Morel, C., Dubot, C., Jeannot, E., Meseure, D., Klijanienko, J., et al. (2019). Immune gene expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur. J. Cancer* 121, 210–223.

Leduc, C., Adam, J., Louvet, E., Sourisseau, T., Dorvault, N., Bernard, M., Maingot, E., Faivre, L., Cassin-Kuo, M.-S., Boissier, E., et al. (2018). TPF induction chemotherapy increases PD-L1 expression in tumour cells and immune cells in head and neck squamous cell carcinoma. *ESMO Open* 3, e000257.

Lee, H., Zandkarimi, F., Zhang, Y., Meena, J.K., Kim, J., Zhuang, L., Tyagi, S., Ma, L., Westbrook, T.F., Steinberg, G.R., et al. (2020). Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat. Cell Biol.* 22, 225–234.

Lee, J.W., Parameswaran, J., Sandoval-Schaefer, T., Eoh, K.J., Yang, D.-H., Zhu, F., Mehra, R., Sharma, R., Gaffney, S.G., Perry, E.B., et al. (2019). Combined Aurora Kinase A (AURKA) and WEE1 Inhibition Demonstrates Synergistic Antitumor Effect in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 3430–3442.

Lee, K.-W., Tsai, Y.-S., Chiang, F.-Y., Huang, J.-L., Ho, K.-Y., Yang, Y.-H., Kuo, W.-R., Chen, M.-K., and Lin, C.-S. (2011). Lower ataxia telangiectasia mutated (ATM) mRNA expression is correlated with poor outcome of laryngeal and pharyngeal cancer patients. *Ann. Oncol.* 22, 1088–1093.

Leemans, C.R., Snijders, P.J.F., and Brakenhoff, R.H. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 18, 269–282.

Lei, G., Zhang, Y., Koppula, P., Liu, X., Zhang, J., Lin, S.H., Ajani, J.A., Xiao, Q., Liao, Z., Wang, H., et al. (2020). The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. *Cell Res.* 30, 146–162.

- Lelièvre, P., Sancey, L., Coll, J.-L., Deniaud, A., and Busser, B. (2020). Iron Dysregulation in Human Cancer: Altered Metabolism, Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Monitoring and Rationale for Therapy. *Cancers* 12.
- Ley, J., Mehan, P., Wildes, T.M., Thorstad, W., Gay, H.A., Michel, L., Nussenbaum, B., Trinkaus, K., and Adkins, D. (2013). Cisplatin versus Cetuximab Given Concurrently with Definitive Radiation Therapy for Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncology* 85, 290–296.
- Li, C.-W., Lim, S.-O., Xia, W., Lee, H.-H., Chan, L.-C., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., Chang, S.-S., Cha, J.-H., Kim, T., et al. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat. Commun.* 7, 12632.
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., Mao, N., Sun, B., and Wang, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis.* 11.
- Lim, A.M., Young, R.J., Collins, M., Fox, S.B., McArthur, G.A., Corry, J., Peters, L., Rischin, D., and Solomon, B. (2012). Correlation of Ataxia-Telangiectasia-Mutated (ATM) gene loss with outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 48, 698–702.
- Lim, S.B., Chua, M.L.K., Yeong, J.P.S., Tan, S.J., Lim, W.-T., and Lim, C.T. (2019). Pan-cancer analysis connects tumor matrisome to immune response. *Npj Precis. Oncol.* 3, 1–9.
- Lim, S.-O., Li, C.-W., Xia, W., Cha, J.-H., Chan, L.-C., Wu, Y., Chang, S.-S., Lin, W.-C., Hsu, J.-M., Hsu, Y.-H., et al. (2016). Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* 30, 925–939.
- Lin, S.-C., Lin, L.-H., Yu, S.-Y., Kao, S.-Y., Chang, K.-W., Cheng, H.-W., and Liu, C.-J. (2018). FAT1 somatic mutations in head and neck carcinoma are associated with tumor progression and survival. *Carcinogenesis* 39, 1320–1330.
- Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S.R., Dewitz, C., Zen, F.D., Prokai, A., Zuchtriegel, G., Krombach, F., Welz, P.-S., et al. (2014). Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16836–16841.
- Liu, G., Yuan, C., Ma, J., Pan, Y., and Xu, H. (2021). Influence of Immune Microenvironment on Diagnosis and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front. Oncol.* 0.
- Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481, 287–294.
- Lugano, R., Ramachandran, M., and Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 1745–1770.
- Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823–837.

Ma, B., Stepanov, I., and Hecht, S.S. (2019). Recent Studies on DNA Adducts Resulting from Human Exposure to Tobacco Smoke. *Toxics* 7, E16.

Machiels, J.-P., René Leemans, C., Golusinski, W., Grau, C., Licitra, L., Gregoire, V., EHNS Executive Board. Electronic address: secretariat@ehns.org, ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org, and ESTRO Executive Board. Electronic address: info@estro.org (2020). Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 31, 1462–1475.

Magnon, C., Hall, S.J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S.J., and Frenette, P.S. (2013). Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. *Science* 341, 1236361.

Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M., and Rodier, F. (2015). DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet.* 6, 94.

Mandal, R., Şenbabaoğlu, Y., Desrichard, A., Havel, J.J., Dalin, M.G., Riaz, N., Lee, K.-W., Ganly, I., Hakimi, A.A., Chan, T.A., et al. (2016). The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 1, e89829.

Mantovani, A., Ponzetta, A., Inforzato, A., and Jaillon, S. (2019). Innate immunity, inflammation and tumour progression: double-edged swords. *J. Intern. Med.* 285, 524–532.

de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., and Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int. J. Cancer* 141, 664–670.

Martin-Sanchez, D., Ruiz-Andres, O., Poveda, J., Carrasco, S., Cannata-Ortiz, P., Sanchez-Niño, M.D., Ruiz Ortega, M., Egido, J., Linkermann, A., Ortiz, A., et al. (2017). Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 28, 218–229.

Marullo, R., Werner, E., Zhang, H., Chen, G.Z., Shin, D.M., and Doetsch, P.W. (2015). HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis* 36, 1397–1406.

Masucci, M.T., Minopoli, M., and Carriero, M.V. (2019). Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front. Oncol.* 0.

McGranahan, N., Furness, A.J.S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., et al. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 351, 1463–1469.

Mehra, R., Seiwert, T.Y., Gupta, S., Weiss, J., Gluck, I., Eder, J.P., Burtneess, B., Tahara, M., Keam, B., Kang, H., et al. (2018). Efficacy and safety of pembrolizumab in

recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *Br. J. Cancer* 119, 153–159.

Mestre, V.F., Medeiros-Fonseca, B., Estêvão, D., Casaca, F., Silva, S., Félix, A., Silva, F., Colaço, B., Seixas, F., Bastos, M.M., et al. (2020). HPV16 is sufficient to induce squamous cell carcinoma specifically in the tongue base in transgenic mice. *J. Pathol.* 251, 4–11.

Mizumoto, A., Ohashi, S., Hirohashi, K., Amanuma, Y., Matsuda, T., and Muto, M. (2017). Molecular Mechanisms of Acetaldehyde-Mediated Carcinogenesis in Squamous Epithelium. *Int. J. Mol. Sci.* 18, E1943.

Monteran, L., and Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 0.

Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer* 10, 550–560.

Moreira, D., Sampath, S., Won, H., White, S.V., Su, Y.-L., Alcantara, M., Wang, C., Lee, P.P., Maghami, E., Massarelli, E., et al. (2021). Myeloid cell-targeted STAT3 inhibition sensitizes head and neck cancers to radiotherapy and T cell-mediated immunity. *J. Clin. Invest.* 131.

Na, Y.-R., Yoon, Y.-N., Son, D.-I., and Seok, S.-H. (2013). Cyclooxygenase-2 Inhibition Blocks M2 Macrophage Differentiation and Suppresses Metastasis in Murine Breast Cancer Model. *PLOS ONE* 8, e63451.

National Cancer Institute (NCI) (2021). A Phase I Study of M6620 (VX-970) in Combination With Cisplatin and XRT in Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC; SDC 10060121) (clinicaltrials.gov).

Neiva, K.G., Zhang, Z., Miyazawa, M., Warner, K.A., Karl, E., and Nör, J.E. (2009). Cross talk Initiated by Endothelial Cells Enhances Migration and Inhibits Anoikis of Squamous Cell Carcinoma Cells through STAT3/Akt/ERK Signaling. *Neoplasia* N. Y. N 11, 583–593.

Newton, J.M., Hanoteau, A., Liu, H.-C., Gaspero, A., Parikh, F., Gartrell-Corrado, R.D., Hart, T.D., Laoui, D., Van Ginderachter, J.A., Dharmaraj, N., et al. (2019). Immune microenvironment modulation unmasks therapeutic benefit of radiotherapy and checkpoint inhibition. *J. Immunother. Cancer* 7, 216.

Ng, H.Y., Li, J., Tao, L., Lam, A.K.-Y., Chan, K.W., Ko, J.M.Y., Yu, V.Z., Wong, M., Li, B., and Lung, M.L. (2018). Chemotherapeutic Treatments Increase PD-L1 Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma through EGFR/ERK Activation. *Transl. Oncol.* 11, 1323–1333.

Nguyen, N., Bellile, E., Thomas, D., McHugh, J., Rozek, L., Virani, S., Peterson, L., Carey, T.E., Walline, H., Moyer, J., et al. (2016). Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 38, 1074–1084.

Nie, J., Shan, D., Li, S., Zhang, S., Zi, X., Xing, F., Shi, J., Liu, C., Wang, T., Sun, X., et al. (2021). A Novel Ferroptosis Related Gene Signature for Prognosis Prediction in Patients With Colon Cancer. *Front. Oncol.* *11*, 654076.

Nijman, S.M.B. (2011). Synthetic lethality: General principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett.* *585*, 1–6.

Noort, A.R., van Zoest, K.P., Weijers, E.M., Koolwijk, P., Maracle, C.X., Novack, D.V., Siemerink, M.J., Schlingemann, R.O., Tak, P.P., and Tas, S.W. (2014). NF- κ B-inducing kinase is a key regulator of inflammation-induced and tumour-associated angiogenesis. *J. Pathol.* *234*, 375–385.

Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S., and Letellier, E. (2020). In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int. J. Cancer* *146*, 895–905.

Ock, C.-Y., Kim, S., Keam, B., Kim, S., Ahn, Y.-O., Chung, E.-J., Kim, J.-H., Kim, T.M., Kwon, S.K., Jeon, Y.K., et al. (2017). Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *8*, 97920–97927.

O'Connor, M.J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol. Cell* *60*, 547–560.

O'Donnell, R.K., Kupferman, M., Wei, S.J., Singhal, S., Weber, R., O'Malley, B., Cheng, Y., Putt, M., Feldman, M., Ziober, B., et al. (2005). Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene* *24*, 1244–1251.

Oikonomopoulou, K., Ricklin, D., Ward, P.A., and Lambris, J.D. (2012). Interactions between coagulation and complement—their role in inflammation. *Semin. Immunopathol.* *34*, 151–165.

Oweida, A., Lennon, S., Calame, D., Korpela, S., Bhatia, S., Sharma, J., Graham, C., Binder, D., Serkova, N., Raben, D., et al. (2017). Ionizing radiation sensitizes tumors to PD-L1 immune checkpoint blockade in orthotopic murine head and neck squamous cell carcinoma. *Oncolimmunology* *6*, e1356153.

Owen, K.L., Brockwell, N.K., and Parker, B.S. (2019). JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers* *11*, 2002.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 252–264.

Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell Metab.* *23*, 27–47.

Peltanova, B., Raudenska, M., and Masarik, M. (2019). Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol. Cancer* *18*, 63.

Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-Retamozo, V., Garris, C., Pucci, F., Yamazaki, T., Poirier-Colame, V., Newton, A., Redouane, Y., et al. (2016). Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* *44*, 343–354.

Pfister, D.G., Spencer, S., Adelstein, D., Adkins, D., Anzai, Y., Brizel, D.M., Bruce, J.Y., Busse, P.M., Caudell, J.J., Cmelak, A.J., et al. (2020). Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* *18*, 873–898.

Placke, T., Örgel, M., Schaller, M., Jung, G., Rammensee, H.-G., Kopp, H.-G., and Salih, H.R. (2012). Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* *72*, 440–448.

Pundavela, J., Roselli, S., Faulkner, S., Attia, J., Scott, R.J., Thorne, R.F., Forbes, J.F., Bradshaw, R.A., Walker, M.M., Jobling, P., et al. (2015). Nerve fibers infiltrate the tumor microenvironment and are associated with nerve growth factor production and lymph node invasion in breast cancer. *Mol. Oncol.* *9*, 1626–1635.

Puram, S.V., Tirosh, I., Parikh, A.S., Patel, A.P., Yizhak, K., Gillespie, S., Rodman, C., Luo, C.L., Mroz, E.A., Emerick, K.S., et al. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* *171*, 1611-1624.e24.

Qian, J.M., and Schoenfeld, J.D. (2021). Radiotherapy and Immunotherapy for Head and Neck Cancer: Current Evidence and Challenges. *Front. Oncol.* *10*.

Rasmussen, J.H., Lelkaitis, G., Håkansson, K., Vogelius, I.R., Johannesen, H.H., Fischer, B.M., Bentzen, S.M., Specht, L., Kristensen, C.A., von Buchwald, C., et al. (2019). Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* *120*, 1003–1006.

Ricciardi, M., Zanotto, M., Malpeli, G., Bassi, G., Perbellini, O., Chilosi, M., Bifari, F., and Krampera, M. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells. *Br. J. Cancer* *112*, 1067–1075.

Richards, K.L., Zhang, B., Baggerly, K.A., Colella, S., Lang, J.C., Schuller, D.E., and Krahe, R. (2009). Genome-Wide Hypomethylation in Head and Neck Cancer Is More Pronounced in HPV-Negative Tumors and Is Associated with Genomic Instability. *PLOS ONE* *4*, e4941.

Ritprajak, P., and Azuma, M. (2015). Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* *51*, 221–228.

Roger, E., Martel, S., Bertrand-Chapel, A., Depollier, A., Chuvin, N., Pommier, R.M., Yacoub, K., Caligaris, C., Cardot-Ruffino, V., Chauvet, V., et al. (2019). Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGF β signaling. *Cell Death Dis.* *10*, 1–19.

- Roh, J., Muelleman, T., Tawfik, O., and Thomas, S.M. (2015). Perineural Growth in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review. *Oral Oncol.* *51*, 16–23.
- Roh, J.-L., Kim, E.H., Jang, H.J., Park, J.Y., and Shin, D. (2016). Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett.* *381*, 96–103.
- Ryan, E.L., Hollingworth, R., and Grand, R.J. (2016). Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses. *Biomolecules* *6*, 2.
- Sabatini, M.E., and Chiocca, S. (2020). Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br. J. Cancer* *122*, 306–314.
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D.G., Egeblad, M., Evans, R.M., Fearon, D., Greten, F.R., Hingorani, S.R., Hunter, T., et al. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* *20*, 174–186.
- Saidak, Z., Clatot, F., Chatelain, D., and Galmiche, A. (2018). A gene expression profile associated with perineural invasion identifies a subset of HNSCC at risk of post-surgical recurrence. *Oral Oncol.* *86*, 53–60.
- Saidak, Z., Lailier, C., Clatot, F., and Galmiche, A. (2020). Perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma: background, mechanisms, and prognostic implications. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* *28*, 90–95.
- Saidak, Z., Lailier, C., Testelin, S., Chauffert, B., Clatot, F., and Galmiche, A. (2021a). Contribution of Genomics to the Surgical Management and Study of Oral Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*
- Saidak, Z., Soudet, S., Lottin, M., Salle, V., Sevestre, M.-A., Clatot, F., and Galmiche, A. (2021b). A pan-cancer analysis of the human tumor coagulome and its link to the tumor immune microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 70*, 923–933.
- Samstein, R.M., Lee, C.-H., Shoushtari, A.N., Hellmann, M.D., Shen, R., Janjigian, Y.Y., Barron, D.A., Zehir, A., Jordan, E.J., Omuro, A., et al. (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat. Genet.* *51*, 202–206.
- Sasahira, T., Ueda, N., Yamamoto, K., Bhawal, U.K., Kurihara, M., Kirita, T., and Kuniyasu, H. (2013). Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* *30*, 165–176.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* *274*, 11455–11458.
- Sato, H., Niimi, A., Yasuhara, T., Permata, T.B.M., Hagiwara, Y., Isono, M., Nuryadi, E., Sekine, R., Oike, T., Kakoti, S., et al. (2017). DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nat. Commun.* *8*, 1751.

- Sato, H., Jeggo, P.A., and Shibata, A. (2019). Regulation of programmed death-ligand 1 expression in response to DNA damage in cancer cells: Implications for precision medicine. *Cancer Sci.* *110*, 3415–3423.
- Sato, M., Kusumi, R., Hamashima, S., Kobayashi, S., Sasaki, S., Komiyama, Y., Izumikawa, T., Conrad, M., Bannai, S., and Sato, H. (2018). The ferroptosis inducer erastin irreversibly inhibits system xc⁻ and synergizes with cisplatin to increase cisplatin's cytotoxicity in cancer cells. *Sci. Rep.* *8*, 968.
- Scanlon, C.S., Banerjee, R., Inglehart, R.C., Liu, M., Russo, N., Hariharan, A., van Tubergen, E.A., Corson, S.L., Asangani, I.A., Mistretta, C.M., et al. (2015). Galanin modulates the neural niche to favour perineural invasion in head and neck cancer. *Nat. Commun.* *6*, 6885.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* *63*, 1129–1136.
- Seibt, T.M., Proneth, B., and Conrad, M. (2019). Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radic. Biol. Med.* *133*, 144–152.
- Seiwert, T.Y., Burtneess, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J.P., Heath, K., McClanahan, T., Lunceford, J., Gause, C., et al. (2016). Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* *17*, 956–965.
- Seminario, I., Descamps, G., Dupont, S., de Marrez, L., Laigle, J.-A., Lechien, J.R., Kindt, N., Journe, F., and Saussez, S. (2019). Infiltration of FoxP3⁺ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* *11*, 227.
- Shalpour, S., and Karin, M. (2019). Pas de Deux: Control of Anti-tumor Immunity by Cancer-Associated Inflammation. *Immunity* *51*, 15–26.
- Stockwell, B.R., Angeli, J.P.F., Bayir, H., Bush, A.I., Conrad, M., Dixon, S., Fulda, S., Gascon, S., Hatzios, S.K., Kagan, V., et al. (2017). Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* *171*, 273–285.
- Straub, M., Drecoll, E., Pfarr, N., Weichert, W., Langer, R., Hapfelmeier, A., Götz, C., Wolff, K.-D., Kolk, A., and Specht, K. (2016). CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget* *7*, 12024–12034.
- Sun, X., Ou, Z., Chen, R., Niu, X., Chen, D., Kang, R., and Tang, D. (2016a). Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* *63*, 173–184.
- Sun, X., Niu, X., Chen, R., He, W., Chen, D., Kang, R., and Tang, D. (2016b). Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis. *Hepatology* *64*, 488–500.

Sun, Y., Chen, P., Zhai, B., Zhang, M., Xiang, Y., Fang, J., Xu, S., Gao, Y., Chen, X., Sui, X., et al. (2020). The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *127*, 110108.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* *71*, 209–249.

Tan, X., Sivakumar, S., Bednarsch, J., Wiltberger, G., Kather, J.N., Niehues, J., de Vos-Geelen, J., Valkenburg-van Iersel, L., Kintsler, S., Roeth, A., et al. (2021). Nerve fibers in the tumor microenvironment in neurotropic cancer—pancreatic cancer and cholangiocarcinoma. *Oncogene* *40*, 899–908.

Theodoraki, M.-N., Yerneni, S.S., Hoffmann, T.K., Gooding, W.E., and Whiteside, T.L. (2018). Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *24*, 896–905.

Tran, L., Allen, C.T., Xiao, R., Moore, E., Davis, R., Park, S.-J., Spielbauer, K., Van Waes, C., and Schmitt, N.C. (2017). Cisplatin Alters Antitumor Immunity and Synergizes with PD-1/PD-L1 Inhibition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 1141–1151.

Tumban, E. (2019). A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses* *11*.

Vallerga, C.L., Zhang, F., Fowdar, J., McRae, A.F., Qi, T., Nabais, M.F., Zhang, Q., Kassam, I., Henders, A.K., Wallace, L., et al. (2020). Analysis of DNA methylation associates the cystine–glutamate antiporter SLC7A11 with risk of Parkinson’s disease. *Nat. Commun.* *11*, 1238.

Van Der Kraak, L., Goel, G., Ramanan, K., Kaltenmeier, C., Zhang, L., Normolle, D.P., Freeman, G.J., Tang, D., Nason, K.S., Davison, J.M., et al. (2016). 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7-H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers. *J. Immunother. Cancer* *4*.

Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* *19*, 108–119.

Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., et al. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* *359*, 1116–1127.

Viswanathan, M., Tsuchida, N., and Shanmugam, G. (2003). Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* *105*, 41–46.

Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., and Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol. Ther.* *206*, 107447.

- Walker, M., Black, E.J., Oehler, V., Gillespie, D.A., and Scott, M.T. (2009). Chk1 C-terminal regulatory phosphorylation mediates checkpoint activation by de-repression of Chk1 catalytic activity. *Oncogene* 28, 2314–2323.
- Walsh, L., Gillham, C., Dunne, M., Fraser, I., Hollywood, D., Armstrong, J., and Thirion, P. (2011). Toxicity of cetuximab versus cisplatin concurrent with radiotherapy in locally advanced head and neck squamous cell cancer (LAHNSCC). *Radiother. Oncol.* 98, 38–41.
- Wang, H., Yao, H., Li, C., Shi, H., Lan, J., Li, Z., Zhang, Y., Liang, L., Fang, J.-Y., and Xu, J. (2019a). HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell-mediated cytotoxicity. *Nat. Chem. Biol.* 15, 42–50.
- Wang, S., Liu, R., Yu, Q., Dong, L., Bi, Y., and Liu, G. (2019b). Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer. *Cancer Lett.* 452, 14–22.
- Wang, W., Green, M., Choi, J.E., Gijón, M., Kennedy, P.D., Johnson, J.K., Liao, P., Lang, X., Kryczek, I., Sell, A., et al. (2019c). CD8 + T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature* 569, 270–274.
- Warnakulasuriya, S. (2020). Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. *Oral Oncol.* 102, 104550.
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N.W., and Waal, I.V.D. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 36, 575–580.
- Watts, T.L., Cui, R., Szaniszló, P., Resto, V.A., Powell, D.W., and Pinchuk, I.V. (2016). PDGF-AA mediates mesenchymal stromal cell chemotaxis to the head and neck squamous cell carcinoma tumor microenvironment. *J. Transl. Med.* 14, 337.
- Weber, A.M., and Ryan, A.J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* 149, 124–138.
- Wen, Q., Liu, J., Kang, R., Zhou, B., and Tang, D. (2019). The release and activity of HMGB1 in ferroptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510, 278–283.
- Wever, O.D., Nguyen, Q.-D., Hoorde, L.V., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C., and Mareel, M. (2004). Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent proinvasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 18, 1016–1018.
- Wigle, T.J., Tsvetkova, E.V., Welch, S.A., and Kim, R.B. (2019). DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report. *Pharmaceutics* 11, E199.
- Wongergem, N.E., Nauta, I.H., Muijlwijk, T., Leemans, C.R., and van de Ven, R. (2020). The Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: on Subsets and Subsites. *Curr. Oncol. Rep.* 22, 81.

- Wu, T., and Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett.* **387**, 61–68.
- Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., and Tang, D. (2016). Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ.* **23**, 369–379.
- Xu, H., Ye, D., Ren, M., Zhang, H., and Bi, F. (2021). Ferroptosis in the tumor microenvironment: perspectives for immunotherapy. *Trends Mol. Med.* S1471-4914(21)00181-7.
- Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A.J., Yang, W.S., Fridman, D.J., Wolpaw, A.J., Smukste, I., Peltier, J.M., Boniface, J.J., et al. (2007). RAS–RAF–MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* **447**, 864–868.
- Yang, W.S., and Stockwell, B.R. (2008). Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem. Biol.* **15**, 234–245.
- Yang, M., Antoine, D.J., Weemhoff, J.L., Jenkins, R.E., Farhood, A., Park, B.K., and Jaeschke, H. (2014a). BIOMARKERS DISTINGUISH APOPTOTIC AND NECROTIC CELL DEATH DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN MICE. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **20**, 1372–1382.
- Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., et al. (2014b). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317–331.
- Ye, J., Jiang, X., Dong, Z., Hu, S., and Xiao, M. (2019). Low-Concentration PTX And RSL3 Inhibits Tumor Cell Growth Synergistically By Inducing Ferroptosis In Mutant p53 Hypopharyngeal Squamous Carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **11**, 9783–9792.
- Ye, L.F., Chaudhary, K.R., Zandkarimi, F., Harken, A.D., Kinslow, C.J., Upadhyayula, P.S., Dovas, A., Higgins, D.M., Tan, H., Zhang, Y., et al. (2020). Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes with Ferroptosis Inducers. *ACS Chem. Biol.* **15**, 469–484.
- Yu, L.-X., Yan, L., Yang, W., Wu, F.-Q., Ling, Y., Chen, S.-Z., Tang, L., Tan, Y.-X., Cao, D., Wu, M.-C., et al. (2014). Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. *Nat. Commun.* **5**, 5256.
- Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., and Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 1338–1343.
- Zahnreich, S., Gebrekidan, S., Multhoff, G., Vaupel, P., Schmidberger, H., and Mayer, A. (2021). Oxygen Deprivation Modulates EGFR and PD-L1 in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Front. Oncol.* **11**, 623964.

Zhang, B., Tang, C., Yao, Y., Chen, X., Zhou, C., Wei, Z., Xing, F., Chen, L., Cai, X., Zhang, Z., et al. (2021). The tumor therapy landscape of synthetic lethality. *Nat. Commun.* 12, 1275.

Zhang, S., Chang, W., Wu, H., Wang, Y.-H., Gong, Y.-W., Zhao, Y.-L., Liu, S.-H., Wang, H.-Z., Svatek, R.S., Rodriguez, R., et al. (2020a). Pan-cancer analysis of iron metabolic landscape across the Cancer Genome Atlas. *J. Cell. Physiol.* 235, 1013–1024.

Zhang, X., Sui, S., Wang, L., Li, H., Zhang, L., Xu, S., and Zheng, X. (2020b). Inhibition of tumor propellant glutathione peroxidase 4 induces ferroptosis in cancer cells and enhances anticancer effect of cisplatin. *J. Cell. Physiol.* 235, 3425–3437.

Zhang, Z., Dong, Z., Lauxen, I.S., Filho, M.S., and Nör, J.E. (2014). Endothelial cell-secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype. *Cancer Res.* 74, 2869–2881.

Zhao, P., Li, L., Jiang, X., and Li, Q. (2019). Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 12, 54.

Zhao, R., Choi, B.Y., Lee, M.-H., Bode, A.M., and Dong, Z. (2016). Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer. *EBioMedicine* 8, 30–39.

Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J.P., Griesser, M., Conrad, M., and Pratt, D.A. (2017). On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent. Sci.* 3, 232–243.

Annexes

Annexe 1 : L'invasion périneurale dans les CETC : contexte, mécanismes et implications pronostiques.

Zuzana Saidak, **Claire Lailier**, Florian Clatot, Antoine Galmiche (2020). Perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma: background, mechanisms, and prognostic implications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 28(2) : 90-95.

Perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): background, mechanisms, and prognostic implications

Zuzana Saidak ^{1,2,*}, Claire Lailler ^{1,3}, Florian Clatot ^{4,5}, Antoine Galmiche ^{1,3,*}

1: Equipe CHIMERE, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

2: Service d'Oncobiologie Moléculaire, Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, France

3: Service de Biochimie, Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, France

4: Centre Henri Becquerel, Rouen, France

5: INSERM U1245 / IRON team, Rouen, France

* Corresponding authors: Zuzana Saidak, PhD, Laboratoire d'Oncobiologie Moléculaire, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens Cedex, France. Tel:033-(0)322087074; E-mail: Saidak.Zuzana@chu-amiens.fr; Antoine Galmiche, MD-PhD, Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine (CBH), CHU Amiens Sud, Avenue Laennec, 80054 Amiens Cedex, France. Tel: 033-(0)322087017; E-mail: Galmiche.Antoine@chu-amiens.fr

Abstract

Purpose of review. Perineural invasion (PNI) is a pathological feature that is frequently observed in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) tumor samples. The difficulties of pathological standardization and the lack of a simple validated experimental model to study PNI render its analysis complex. Here, we aim to summarize the recent advances in the understanding of the biology of PNI in HNSCC and their potential clinical implications.

Recent findings. PNI is a multistep process leading to a dialogue between cancer cells and nerve fibers in HNSCC. Recent studies have identified some of the active molecular mechanisms involved in PNI. Comprehensive studies addressing the transcriptional regulation of PNI bring interesting perspectives for a standardized molecular diagnosis of PNI and a better assessment of its contribution to the aggressiveness of HNSCC.

Summary. Perineural invasion is a complex process that reflects specific tumor biology. In addition to unveiling new fundamental concepts about the tumor microenvironment, research on PNI promises to identify new biomarkers, enabling progress in therapeutic development against HNSCC.

Keywords: Perineural invasion; Head and neck tumors; transcriptomics; neurotrophins; therapeutic targeting

1. Introduction

The existence of a close physical interaction between tumor cells and nerve fibers is a common observation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). Perineural growth of cancer can be separated into Perineural spread (PNS), *i.e.* gross tumor extension along large nerves (typically the V and VII cranial nerves and their branches) vs Perineural invasion (PNI), occurring at the level of small nerve fibers [1]. Perineural growth of HNSCC is often asymptomatic at the early stages, but can also result in dysesthesia, paresis and pain. Despite the difficulties of imaging and the lack of standardization of pathological diagnosis, PNI is generally recognized as an element of poor prognosis [2,3]. In clinical practice, the diagnosis of PNI usually leads to treatment escalation. Radiotherapy protocols with higher doses of radiation as well as chemotherapy can be applied in order to achieve local control [4].

The difficult standardization of the pathological diagnosis of PNI is arguably one, if not the major hurdle in the study of PNI in HNSCC. In its most commonly applied definition, PNI reflects the presence of tumor cells around more than 33% of the nerve circumference of a nerve > 1 mm in diameter [5]. Depending on the pathologist, there are however substantial differences in the criteria that define PNI, and PNI is either defined as a true invasion of the layers of the nerve tissue, or the wrapping of tumor cells around the nerve [5]. Interpreting histological aspects that result from nerve compression within the tumor, axonal degeneration found within hypoxic regions of the nerves of a tumor, or inflammatory changes within nerve walls can also be challenging. As a consequence, the incidence of PNI can vary greatly depending on the study considered (from 14% to more than 63% of HNSCC tumors, depending on the study) [1]. Immunohistochemical detection of nerve components offers optimised conditions for the detection of PNI, but it is also still unclear which marker(s) should

be used for this purpose. As a consequence, PNI is probably underdiagnosed and its importance is considerably less recognized than that of angiolymphatic invasion and extracapsular spread in HNSCC.

In addition to the difficulties of the pathological diagnosis, PNI has proven difficult to study experimentally [6]. Studying PNI requires expertise in pathology, primary cell culture and cell biology, and few cellular models are available to explore PNI *in vitro* [6]. HNSCC cells can for example be co-cultured with mouse dorsal root ganglion (DRG) cells maintained in a semisolid matrix in order to grow radial neurites [7]. HNSCC cells that are placed peripherally can then move centripetally along the neurites [7]. Although this type of model offers new avenues for the exploration of PNI *in vitro*, it remains difficult to use, for example for systems biology studies.

2. Challenging and extending the actual definition of PNI

Interestingly, PNI is increasingly considered to be the reflection of a cellular dialogue between malignant cells and nerve fibers in the tumor tissue. Based on this premise, Schmitd et al. 2018 recently reconsidered the importance of the physical contact established between malignant cells and nerve fibers in HNSCC [8*]. The study by Schmitd *et al.* found that local proximity between nerves and HNSCC cells is an element of poor prognosis, challenging the actual definition of PNI. In this study, a distance of <5 μm was a strong predictor of reduced OS for tumors of the oral cavity among 71 patients treated with curative intent [8*], leading the authors to propose mitigating the actual criteria of PNI by introducing tumor-nerve distance. The results of this interesting study call for a reconsideration of the pathological criteria for the diagnosis of PNI.

Several studies performed in tumors other than HNSCC have identified nerve inflammation as an early event that gives access to the perineural niche to tumor cells [6]. Active proteases, such as cathepsin B, released by newly-recruited inflammatory monocytes could disrupt the epineurium /

perineurium and allow short distance interactions between cancer cells and nerve cells [9]. PNI is therefore likely to be a multistep process starting with inflammatory remodeling of the nerve tissue itself [9] (Fig. 1). The concept of neural plasticity, *i.e.* the remodeling of the nerve tissue within solid tumours, although poorly studied to date in HNSCC, offers interesting perspectives [10]. In this respect, an important conclusion of the study by Schmitd *et al.* deals with the optimal immunohistochemical labelling of the nerves upon PNI in HNSCC [8*]. The authors suggest that the neuronal marker GAP43 (Growth Associated Protein 43) is valuable for immunohistochemical detection of nerves within HNSCC tumors [8*]. The marker GAP43 is typically expressed during nerve regeneration, when neuritogenesis is induced after nerve damage. Interestingly, the expression of GAP43 appears to be related to nerve-tumor distance in HNSCC, and its high expression in PNI is compatible with the occurrence of tumor-associated neuritogenesis, *i.e.* the outgrowth of an axon or a dendrite from a pre-existing nerve in this setting [8*]. Schwann cells, the glial cells that assemble the myelinated sheath and become activated upon neuronal damage, could also be important protagonists in PNI [11-13]. However, we are still far from understanding their contribution to PNI in HNSCC. These findings globally underline the value of examining tumor innervation as a dynamic process for a better, more standardized and clinically-meaningful diagnosis of PNI.

3. A specific biology associated with PNI in HNSCC: the perineural niche

The realization that neuritogenesis might be important for tumor innervation and PNI provided a frame for the first studies that have explored its mechanisms in HNSCC [1]. Neurotrophic factors and axon guidance molecules were examined in this context, considering the physiological role played by these molecules in the development and repair of normal nerve tissue. Two essential neurotrophins, Nerve Growth Factor (NGF) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) are well-known for their role in embryonic development of nerve tissues and in nerve repair in various contexts. NGF interacts

with its high affinity receptor tyrosine kinase Tropomyosin related kinase A (TrkA) and a low affinity receptor p75NTR (CD271). BDNF on the other hand interacts with the receptor TrkB. Despite early reports suggesting a link between the expression levels of NGF and PNI in HNSCC, recent studies have failed to confirm the existence of a direct correlation with PNI in HNSCC [14]. This might simply reflect the contribution of multiple actors involved in tumor neurogenesis beyond neurotrophins. Meanwhile, several studies point to a possible pro-tumorigenic effect of NGF and BDNF in HNSCC via their respective cognate receptors [13,15]. Interestingly, neurotrophins such as BDNF are produced by Schwann cells, and a paracrine mode of action might account for their potential stimulatory effect on HNSCC cells within the perineural niche [13].

Other molecules implicated in nerve cell repair and function, such as axon guidance molecules including Netrins, Semaphorins, and Ephrins, are likely involved in the perineural niche. Exploring their function in PNI is however difficult, since they are regulated by complex multicellular interactions, and their effects are not limited to nerve regulation and also involve for example angiogenesis [16]. A recent study exploring the interaction of HNSCC with nerve tissue reported the possible role of exosomes in delivering some of these molecules [17*]. Exosomes are small microvesicles released by eukaryotic cells and tumor cells that are produced by a process of invagination of the endocytic vesicles that contain bioactive molecules [18]. Exosomes are currently attracting attention as a potentially important vector for intercellular communication [18]. Using purified exosomes obtained from the plasma of HNSCC patients and from tumor conditioned media, Madeo et al. reported their contribution to tumor sensory innervation in a murine model of HPV-driven oral carcinogenesis [17*]. The exosomes of HNSCC patients were found to promote neurite outgrowth through their capacity to deliver Ephrin B1, a protein member of the Ephrin family and a ligand of Eph-related receptor tyrosine kinases [17*]. Tumor exosomes could therefore be a possible vector for tumor innervation and PNI in HNSCC.

4. Systems biology of PNI

More recently, OMICs strategies have been applied to explore the systems biology of HNSCC. The emblematic study on the landscape of genomic alterations in HNSCC, reported in 2015 by The Cancer Genome Atlas (TCGA) has established a landmark for this type of studies. Importantly, data from TCGA as well as several smaller projects are today freely accessible for use. Using the data from TCGA, Saidak *et al.* performed the first multi-omics study of PNI in HNSCC [19*]. This study was based on 528 HNSCC tumors obtained from surgical resections. While the authors found no association between PNI and the most common genomic alterations often found in HNSCC, a specific transcriptomic profile was identified, consisting of >260 genes whose expression levels were tightly associated with PNI. This gene profile was enriched in genes encoding muscle proteins and did not overlap with the expression profiles associated with angiolymphatic invasion or lymph node extracapsular spread (ECS) [19*]. Using a signature built from these genes, Saidak *et al.* established the contribution of PNI to tumor recurrence and aggressiveness in HNSCC patients [19*]. The conclusions of this first study were later supported and extended in another study addressing the PNI-transcriptome of HNSCC tumors using the same cohort [20]. A gene coexpression module containing 357 genes with 12 hub genes related to tumor invasion and metastasis was identified, once again showing the active nature of PNI in HNSCC [20]. Overall, the conclusions of these TCGA analyses point to the existence of a specific transcriptomic remodeling that takes place during PNI in HNSCC.

How HNSCC cells acquire this PNI gene expression profile is presently unknown, however a role of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is an intriguing possibility. The EMT is a transcriptional program that is induced under conditions of cell stress, or when the integrity of a tissue is compromised. Epithelial cells acquire a mesenchymal phenotype, characterized by the capacity to migrate and invade the surrounding tissues [21,22]. Interestingly, some of the top genes found to be expressed at higher levels in tumors with PNI are typical regulators or markers of the EMT [19*]. For example, the gene *TGFB*, encoding the Transforming Growth Factor β , or the gene *SERPINE1*, encoding

the Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [23] are among these genes. Interestingly, a link between neurotrophin signaling and EMT can be found in the literature, where the p75 neurotrophin receptor CD271, an NGF receptor, is reported as an inducer of EMT in HNSCC [15]. A link between PNI and EMT opens the possibility that PNI might be the product of an integrated stress response of cancer cells. More studies are however required to explore the mechanisms through which EMT and PNI might be linked.

5. Prospects for precision medicine

New biomarkers based on the HPV status or tumor genomics are opening exciting perspectives for better prediction of the response of individual HNSCC tumors to treatments [24*]. Information gained from genomic studies could assist physicians in the choice of primary radiotherapy over surgery or to adapt adjuvant treatment (escalation or deescalation) for each HNSCC patient. In this context, the possibility of analyzing PNI or its associated molecular biomarkers is worth considering.

The study by Saidak *et al.* explored the feasibility of applying the molecular diagnosis of PNI to the follow up of HNSCC patients treated by primary surgery [19*]. The authors examined the potential interest of a signature based on the expression levels of 26 genes associated with PNI in the TCGA cohort. The PNI signature efficiently predicted tumor recurrence and poor overall survival in a subset of locally advanced HNSCC tumors with R0 margins and in the absence of ECS. In a multivariate analysis, the PNI gene signature was the sole predictor of poor disease-free survival, with a hazard ratio=4 [19*]. The authors concluded that analysing PNI gene expression might help to predict post-surgical recurrence in HNSCC patients with a low to moderate risk of tumor recurrence, for which biomarkers are currently lacking [19*]. Interestingly, PNI gene analysis outperformed the histological diagnosis of PNI in this cohort, a finding that might be partially explained by better standardization of genomics

compared to histological analysis of PNI in this large, multicenter cohort [19*]. Although this study did not include a separate validation cohort, its findings are strongly supported by the conclusions of an independent study that aimed to identify genes predictive of post-surgical recurrence after radio(chemo)therapy in locally advanced HNSCC [25*]. Interestingly, Schmidt *et al.* identified a signature of 7 genes, 4 of them forming a single metagene overlapping the PNI profile reported by Saidak *et al.* [19*]. From these studies, a molecular diagnosis of PNI appears to be feasible and potentially useful in the clinical setting. Molecular analyses could help standardize PNI detection and stimulate collaborative and multicentric studies, possibly creating the conditions for faster transposition of PNI analysis to precision medicine for HNSCC.

Computational pathology represents an independent and promising area for research on PNI. This domain has recently greatly benefited from the spectacular developments in artificial intelligence (AI) [26*]. Recently, the application of deep learning and convolutional neural networks has permitted radical progress in the pathological diagnosis and the identification of new clinically-relevant features in pathological images [26*,27-29]. These successful examples of the application of AI to pathological diagnosis raise tremendous hope for improved pathological diagnosis of PNI with enhanced image analysis, leading to more efficient and better standardization of PNI diagnosis in HNSCC.

6. Conclusion

PNI is the result of a multistep process, with complex cellular interactions gradually established within the perineural niche and tumor microenvironment. The study of tumor innervation has brought

to light the « nerve dependence » of some of the most common tumors [30]. The observations that tumors can drive neurogenesis and recruit precursor cells from the central nervous system spectacularly illustrates how cancer cells are able to hijack the nerve to build up the tumor microenvironment [31]. Furthermore, the application of systems biology and new research approaches may potentially lead to novel, fruitful leads for research. In addition to identifying biomarkers, current research could help unveil fundamental concepts about the tumor microenvironment, leading to therapeutic developments against HNSCC with PNI.

Key points

1. The study of PNI is complex because of the difficult standardization of its pathological diagnosis and the lack of simple experimental models.
2. PNI is a multistep process that involves active biological mechanisms and many cell types in the tumor microenvironment
3. PNI is associated with a higher risk of recurrence
4. PNI is associated with a specific gene expression profile in HNSCC and transcriptomics offers promising perspectives for the standardization of PNI diagnosis

Acknowledgements

1. Acknowledgements: none
2. Financial support and sponsorship: Work in our institution is funded by CHU Amiens Picardie and Ligue contre le Cancer, Comité du Nord.
3. conflicts of interest: the authors have no conflict of interest to declare

References

- [1] Roh J, Muelleman T, Tawfik O, Thomas SM. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncol.* 2015;51:16-23.
- [2] Maghami E, Koyfman SA, Weiss J. Personalizing Postoperative Treatment of Head and Neck Cancers. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2018;38:515-522.
- [3] Maihoefer C, Schüttrumpf L, Macht C, et al. Postoperative (chemo) radiation in patients with squamous cell cancers of the head and neck - clinical results from the cohort of the clinical cooperation group "Personalized Radiotherapy in Head and Neck Cancer". *Radiat Oncol.* 2018;13:123.
- [4] Bakst RL, Glastonbury CM, Parvathaneni U, et al. Perineural Invasion and Perineural Tumor Spread in Head and Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;103:1109-1124.
- [5] Liebig C, Ayala G, Wilks JA, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer* 2009;115:3379-3391.
- [6] Amit M, Na'ara S, Gil Z. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:399-408.
- [7] Huyett P, Gilbert M, Liu L et al. A Model for Perineural Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Vis Exp.* 2017;119. doi:10.3791/55043.
- [8*] Schmitd LB, Beesley LJ, Russo N, et al. Redefining Perineural Invasion: Integration of Biology With Clinical Outcome. *Neoplasia.* 2018;20:657-667.**

The results of this interesting study call for a reconsideration of the pathological criteria for the diagnosis of PNI, by putting more emphasis on the functional interaction between nerves and cancer cells than on the application of strict morphological criteria.

[9] Bakst RL, Xiong H, Chen CH, et al. Inflammatory Monocytes Promote Perineural Invasion via CCL2-Mediated Recruitment and Cathepsin B Expression. *Cancer Res.* 2017;77:6400-6414.

[10] Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12:649-59.

[11] Deborde S, Wong RJ. How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:4405-4420.

[12] Salvo E, Saraithong P, Curtin JG, et al. Reciprocal interactions between cancer and Schwann cells contribute to oral cancer progression and pain. *Heliyon.* 2019;5:e01223.

[13] Ein L, Bracho O, Mei C, et al. Inhibition of tropomyosine receptor kinase B on the migration of human Schwann cell and dispersion of oral tongue squamous cell carcinoma in vitro. *Head Neck.* 2019 Sep 9. [Epub ahead of print]

[14] Scanlon CS, Banerjee R, Inglehart RC, et al. Galanin modulates the neural niche to favour perineural invasion in head and neck cancer. *Nat Commun* 2015;6:6885.

[15] Chung MK, Jung YH, Lee JK, et al. CD271 Confers an Invasive and Metastatic Phenotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through the Upregulation of Slug. *Clin Cancer Res* 2018;24:674-683.

[16] Dun XP, Parkinson DB. Classic axon guidance molecules control correct nerve bridge tissue formation and precise axon regeneration. *Neural Regen Res.* 2020;15:6-9.

[17*] Madeo M, Colbert PL, Vermeer DW, et al. Cancer exosomes induce tumor innervation. *Nat Commun.* 2018;9:4284.

A study exploring the regulation of HNSCC innervation by tumor-derived exosomes

[18] Xiao C, Song F, Zheng YL, et al. Exosomes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2019;9:894.

[19*] Saidak Z, Clatot F, Chatelain D, Galmiche A. A gene expression profile associated with perineural invasion identifies a subset of HNSCC at risk of post-surgical recurrence. *Oral Oncol.* 2018;86:53-60.

The first study to explore the systems biology of PNI using multi-omics data from TCGA cohort. The study addresses the possibility of performing a molecular diagnosis of PNI in HNSCC.

[20] Zhang Z, Liu R, Jin R, et al. Integrating clinical and genetic analysis of perineural invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2019;9:434.

[21] Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166:21-45.

[22] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2018;18: 128-134

[23] Pavón MA, Arroyo-Solera I, Céspedes MV, et al. uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck_cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget.* 2016;7:57351-57366.

[24*] Budach V, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2019;20:e313-e326.

A comprehensive review listing all currently available biomarkers for HNSCC.

[25*] Schmidt S, Linge A, Zwanenburg A, et al. Development and Validation of a Gene Signature for Patients with Head and Neck Carcinomas Treated by Postoperative Radio(chemo)therapy. *Clin Cancer Res.* 2018;24:1364-1374.

An important study examining the possibility of predicting recurrence for locally advanced stages of HNSCC using gene expression profiling. Some of the genes identified are regulators of the EMT.

[26*] Abels E, Pantanowitz L, Aeffner F, et al. Computational pathology definitions, best practices, and recommendations for regulatory guidance: a white paper from the Digital Pathology Association. J Pathol. 2019;249:286-294.

A review presenting the promising perspectives and some of the challenges with regards to artificial intelligence and its use for pathological diagnosis.

[27] Coudray N, Ocampo PS, Sakellaropoulos T, et al. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. Nat Med. 2018;24:1559-1567.

[28] Campanella G, Hanna MG, Geneslaw L, et al. Clinical grade computational pathology using weakly supervised deep learning on whole slide images. Nat Med. 2019;25:1301-1309.

[29] Alabi RO, Elmusrati M, Sawazaki-Calone I, et al. Machine learning application for prediction of locoregional recurrences in early oral tongue cancer: a Web-based prognostic tool. Virchows Arch. 2019. [Epub ahead of print]

[30] Boilly B, Faulkner S, Jobling P, Hondermarck H. Nerve Dependence: From Regeneration to Cancer. Cancer Cell 2017;31:342-354.

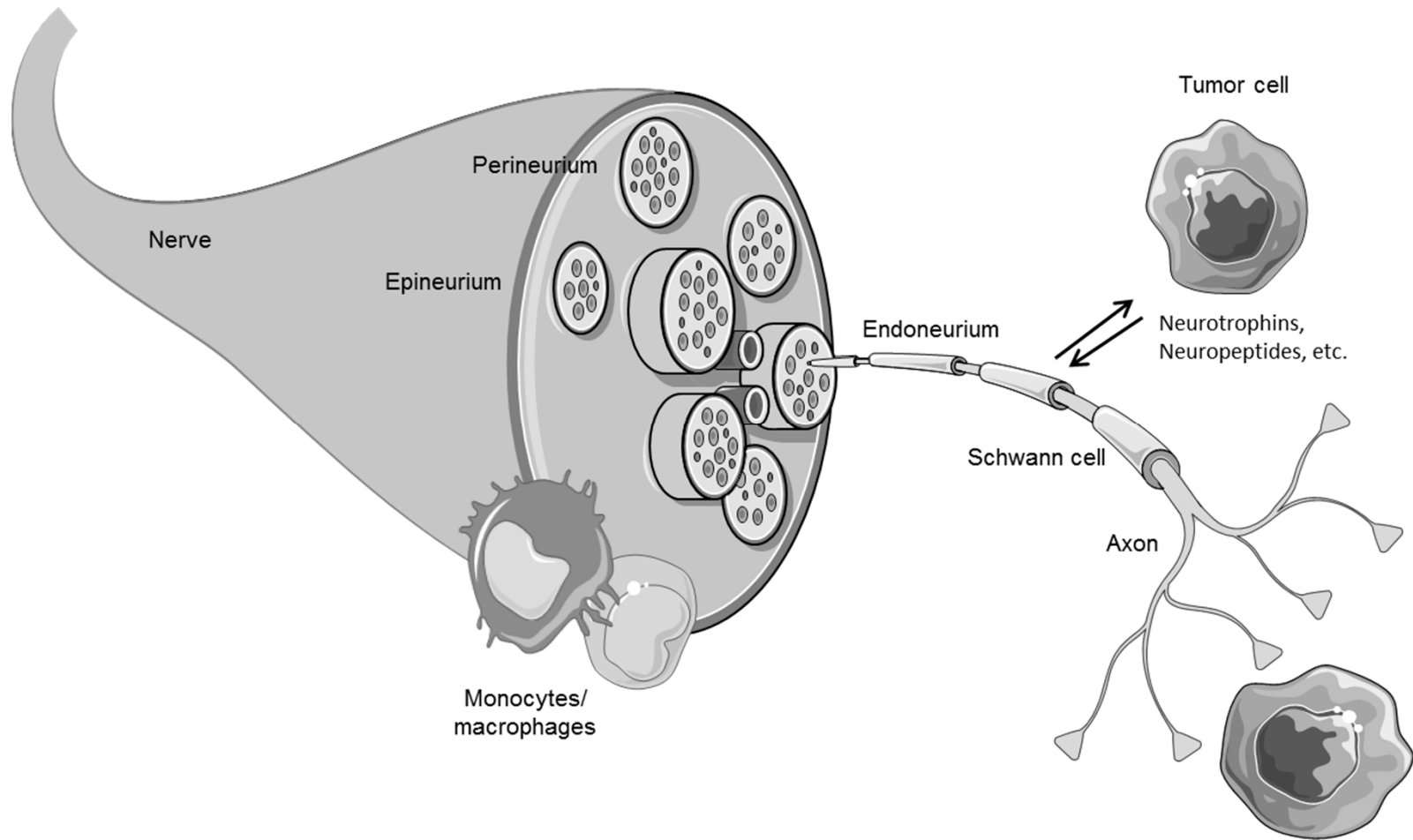
[31] Mauffrey P, Tchitchek N, Barroca V, et al. Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer. Nature. 2019;569:672-678.

Figure Legend

Fig. 1 : Opening the nerve barrier and perineural niche.

The endoneurium is the innermost layer of the nerve and it consists mainly of axons and Schwann cells. The perineurium is a protective layer made up of fibroblasts and collagen fibrils and it surrounds the endoneurium. The epineurium is the outermost layer and it consists of a dense collagen network, together with blood vessels and fibroblasts and eventually immune cells. Cancer cells can eventually be found within the perineural niche, where they can establish functional interactions with neurons and Schwann cells. The recruitment of immune cells (monocytes and macrophages) might be an important initial step required to ensure access of cancer cells to the perineural niche.

Fig. 1



Annexe 2 : La signalisation ERK1/2 régule le microenvironnement tumoral et le recrutement des macrophages dans les glioblastomes.

Claire Lailier, Christophe Louandre, Mony Chenda Morisse, Thomas Lhossein, Corinne Godin, Marine Lottin, Jean-Marc Constans, Bruno Chauffert, Antoine Galmiche, Zuzana Saidak (2019). ERK1/2 signaling regulates the immune microenvironment and macrophage recruitment in glioblastoma. Biosci Rep. 39: 9.

Research Article

ERK1/2 signaling regulates the immune microenvironment and macrophage recruitment in glioblastoma

Claire Lailier^{1,2,*}, Christophe Louandre^{1,2,*}, Mony Chenda Morisse^{1,2}, Thomas Lhossein², Corinne Godin^{1,2}, Marine Lottin³, Jean-Marc Constans^{1,4}, Bruno Chauffert^{1,3},  Antoine Galmiche^{1,2} and  Zuzana Saidak^{1,5}

¹Equipe CHIMERE, EA7516, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France; ²Laboratoire de Biochimie, Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, France; ³Service d'Oncologie Médicale, CHU Amiens, France; ⁴Service de Radiologie, CHU Amiens, France; ⁵Laboratoire d'Oncobiologie Moléculaire, Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, France

Correspondence: Zuzana Saidak (Saidak.Zuzana@chu-amiens.fr)



The tumor microenvironment is an important determinant of glioblastoma (GBM) progression and response to treatment. How oncogenic signaling in GBM cells modulates the composition of the tumor microenvironment and its activation is unclear. We aimed to explore the potential local immunoregulatory function of ERK1/2 signaling in GBM. Using proteomic and transcriptomic data (RNA seq) available for GBM tumors from The Cancer Genome Atlas (TCGA), we show that GBM with high levels of phosphorylated ERK1/2 have increased infiltration of tumor-associated macrophages (TAM) with a non-inflammatory M2 polarization. Using three human GBM cell lines in culture, we confirmed the existence of ERK1/2-dependent regulation of the production of the macrophage chemoattractant CCL2/MCP1. In contrast with this positive regulation of TAM recruitment, we found no evidence of a direct effect of ERK1/2 signaling on two other important aspects of TAM regulation by GBM cells: (1) the expression of the immune checkpoint ligands PD-L1 and PD-L2, expressed at high mRNA levels in GBM compared with other solid tumors; (2) the production of the tumor metabolite lactate recently reported to dampen tumor immunity by interacting with the receptor GPR65 present on the surface of TAM. Taken together, our observations suggest that ERK1/2 signaling regulates the recruitment of TAM in the GBM microenvironment. These findings highlight some potentially important particularities of the immune microenvironment in GBM and could provide an explanation for the recent observation that GBM with activated ERK1/2 signaling may respond better to anti-PD1 therapeutics.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common primary central nervous system malignancy in adults. It is characterized by its poor prognosis, with a median survival of <15 months from diagnosis [1]. The standard therapeutic approach involves primary surgery followed by temozolomide-based chemoradiotherapy [2]. The finding that GBM tumors exhibit frequent genomic alterations of receptor tyrosine kinases (RTK), such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), raised hopes for therapeutic targeting in these tumors [3]. *In vitro* studies exploring the regulation and function of the ERK1/2 kinases, an essential downstream target of the RTK, have reported the role of ERK1/2 signaling in the regulation of GBM cell proliferation, invasion, apoptosis, tumor metabolism, and multiple other facets of tumor cell physiology [4]. Despite this strong rationale, Phase II/III clinical trials aiming to target RTKs, such as the EGFR, have been negative. This has led to skepticism regarding the interest of therapeutic strategies directed against oncogenic signaling in GBM [5].

*These authors contributed equally to this work

Received: 10 May 2019
Revised: 02 August 2019
Accepted: 09 August 2019

Accepted Manuscript Online:
29 August 2019
Version of Record published:
13 September 2019

Tumor immunotherapy based on the inhibition of immune checkpoints has conversely raised high expectations [6]. The first and the best characterized strategy used in clinics is based on the inhibition of the interaction of programmed cell death 1 (PD1) present on the surface of T lymphocytes with its ligands PD-L1/*CD274* and PD-L2/*PDCD1LG2* expressed by tumor cells and antigen presenting cells [6]. Biotherapies directed against PD1, such as nivolumab, were found to bring a significant benefit in the overall survival (OS) in malignant melanoma and other solid tumors by normalizing the tumor microenvironment [6]. The initial results for nivolumab, used as a single agent in recurrent GBM, have however failed to show a significant increase in the OS and objective responses were observed in less than 10% of patients (checkmate-143 study) [7]. It is currently unclear why a small fraction of GBM and other solid tumors respond better to PD1 targeting than others [8]. In addition to the expression of the ligands of PD1 (PD-L1 and PD-L2), other important parameters likely include the presence of immune cells within the tumor tissue, tumor mutational burden, genome repair ability, and the presence of a favorable cytokine context [8]. Single cell analyses suggest that malignant cells can instigate the formation of a ‘cold’ immune microenvironment and able to brake tumor-specific immune responses through active transcriptional mechanisms [9]. Whether oncogenic pathways contribute to these mechanisms is an interesting possibility that has to date been only superficially addressed [8]. Interestingly, a recent study by Zhao et al. identified frequent genomic alterations leading to ERK1/2 activation in a small subpopulation of GBM patients with objective responses to PD1 immunotherapy [10]. The present study opens up the possibility that ERK1/2 activation might be associated with specific properties of the local immune microenvironment in GBM, a possibility that has not yet been addressed.

Tumor-associated macrophages (TAM) represent a major component of the tumor microenvironment in GBM [11]. Several studies have suggested their contribution to the growth and aggressive behavior of GBM [11–14]. GBM cells can actively recruit TAM and promote their functional M2 polarization to a non-inflammatory phenotype, thereby preventing an efficient antitumor immune response [11]. In addition to the production of growth factors or cytokines, the functional polarization of TAM might be induced by metabolic products, such as lactate, produced by cancer cells as was recently shown in malignant melanoma [15,16]. Lactate, the main end product of glycolysis in cancer cells, is released in the tumor microenvironment where it is able to interact with specific receptors, such as the G-protein coupled receptor-65 (GPR65) [15,16]. In highly glycolytic tumors, such as malignant melanoma, Bohn et al. reported that lactate actively contributes to the noninflammatory M2 polarization of TAM via GPR65 activation [16]. GBM tumors are also known to use glycolysis [17]. Interestingly, metabolic regulation in general, and glycolysis in particular, are emerging as important effectors of ERK1/2 signaling in some solid tumors [18,19]. Whether the intermediary metabolism of tumor cells might regulate the immune microenvironment of GBM, possibly in an ERK1/2-dependent manner, has not yet been studied. In the present study, we aimed to address the regulatory role of ERK1/2 on the immune microenvironment of GBM. We retrieved multiomics data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) to explore the GBM immune microenvironment [20,21]. We correlated the local immune characteristics of GBM tumors with ERK1/2 activation and validated our conclusions *in vitro* using human GBM cell lines.

Materials and methods

Patient data and tumor stratification

Basic clinical, pathological, and biological data were retrieved for a total number of 604 GBM tumors using cBioportal at: <http://cbioportal.org> [22,23] in September 2018. Reverse Phase Protein Array (RPPA) data were available for 244/604 GBM ($n=40$ phosphoproteins including phospho-ERK1/2, phospho-EGFR and phospho-MET). RNA Seq data (RNA SeqV2 data normalized using RNA-Seq by expectation maximization: RSEM) were available for 166/604 GBM. Overlapping RNAseq and RPPA data were available for $n=82$ tumors. Basic characteristics of the GBM patients in the RPPA cohort ($n=238$) are described in Table 1. Hierarchical clustering of the raw RPPA data was used to construct a dendrogram (complete, hclust R) in order to study the relatedness between the phosphoproteins and create a heatmap.

Tumor immune infiltration analysis

The Microenvironment Cell Population-counter method was used to quantitate the relative abundance of eight types of immune and stromal cell populations based on RNA seq data [24]. Other immune parameters, such as M1/M2 polarization, were retrieved from Thorsson et al. [20].

Cell culture

The human GBM cell lines A172, H4, and SW1088 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). The cell line A172 carries a tandem duplication of the *EGFR* gene [25]. The SK-MEL3 human melanoma cell line

Table 1 GBM patient characteristics (n=238)

Age, years: median (range)	60 (18–88)
Gender	Male (n=143); female (n=94); NA (n=1)
Karnofsky Performance Score	<70 (n=51); 70–80 (n=101); 90 (n=4) 100 (n=25); NA (n=57)
Gene expression subtype*	Classical (n=53); mesenchymal (n=50) Proneural (n=43); neural (n=30) G-CIMP (n=14); NA (n=48)
IDH1 mutation status	WT (n=172); R132G (n=1); R132H (n=12) NA (n=53)
MGMT status	Methylated (n=69); unmethylated (n=82) NA (n=87)

NA: Not Available; G-CIMP: Glioma CpG island methylator phenotype; MGMT: O6-methylguanine-DNA methyl-transferase

*Defined according to Brennan et al. [3]

carries a heterozygous BRAF V600E mutation and was purchased from ATCC. All cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin, and streptomycin and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Immunoblot analysis and ELISA

Rabbit antibodies directed against ERK1/2, ERK1/2 phosphorylated on Thr202/Tyr204 and EGFR were from Cell Signaling. Rabbit antibodies directed against PD-L1 and PD-L2 were from Abcam. Mouse antiactin was from Sigma. Proteins were precipitated, loaded on SDS/PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes using standard procedures. ECL reaction was used for revelation [26]. Concentrations of the human cytokines CCL2/MCP1 (chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1) and CSF1/MCSF (macrophage colony stimulating factor-1) were measured using ELISA kits, following the manufacturer's instructions (both from R&D Systems, ref. DCP00 and DMC00).

Quantitative PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent and reverse-transcribed using Superscript VILO cDNA synthesis kit (ThermoFisher). Amplification was performed with the TaqMan Universal PCR master Mix on an ABI 7500 Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems) using primers and probe sets specific for *CCL2/MCP1*, *CSF1/MCSF*, and *B2M* as reference (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems).

Lactate measurement

Lactate concentration was determined using a Siemens Vista analyzer and the adapted kit, approved for clinical use (Siemens).

Statistical analyses

All analyses were done as indicated with $P < 0.05$ as threshold of significance, using R version 3.4.2 (<https://www.r-project.org>).

Results

GBM classification and identification of a subgroup of GBM with high activation levels of ERK1/2

In order to address the role of ERK1/2 signaling in GBM tumors, we performed hierarchical clustering using RPPA data from TCGA. Clustering was based on $n=244$ GBM samples (238 patients, see Table 1) and $n=40$ phosphoproteins (including phosphorylated forms of ERK1/2, EGFR, and MET) (Figure 1A,B). Tumors with high levels of phospho-ERK1/2, phospho-EGFR, and phospho-MET were attributed to three separate clusters (Figure 1A,B). In order to provide an experimental support for the existence of this separate subgroup of GBM tumors characterized by high levels of phospho-ERK1/2, we used human GBM cell lines in culture. The GBM cell line A172, carrying a genomic amplification of EGFR [25] was exposed to selective chemical inhibitors of oncogenic signaling. Afatinib, a potent and selective anti-EGFR, radically blocked the phosphorylation of EGFR (Figure 1C). Afatinib, however, only slightly and temporarily inhibited ERK1/2 phosphorylation (Figure 1D). In contrast, the chemical inhibitors MK2206 and trametinib used as Akt/PKB and MEK1/2 inhibitors, respectively, dramatically and specifically blocked

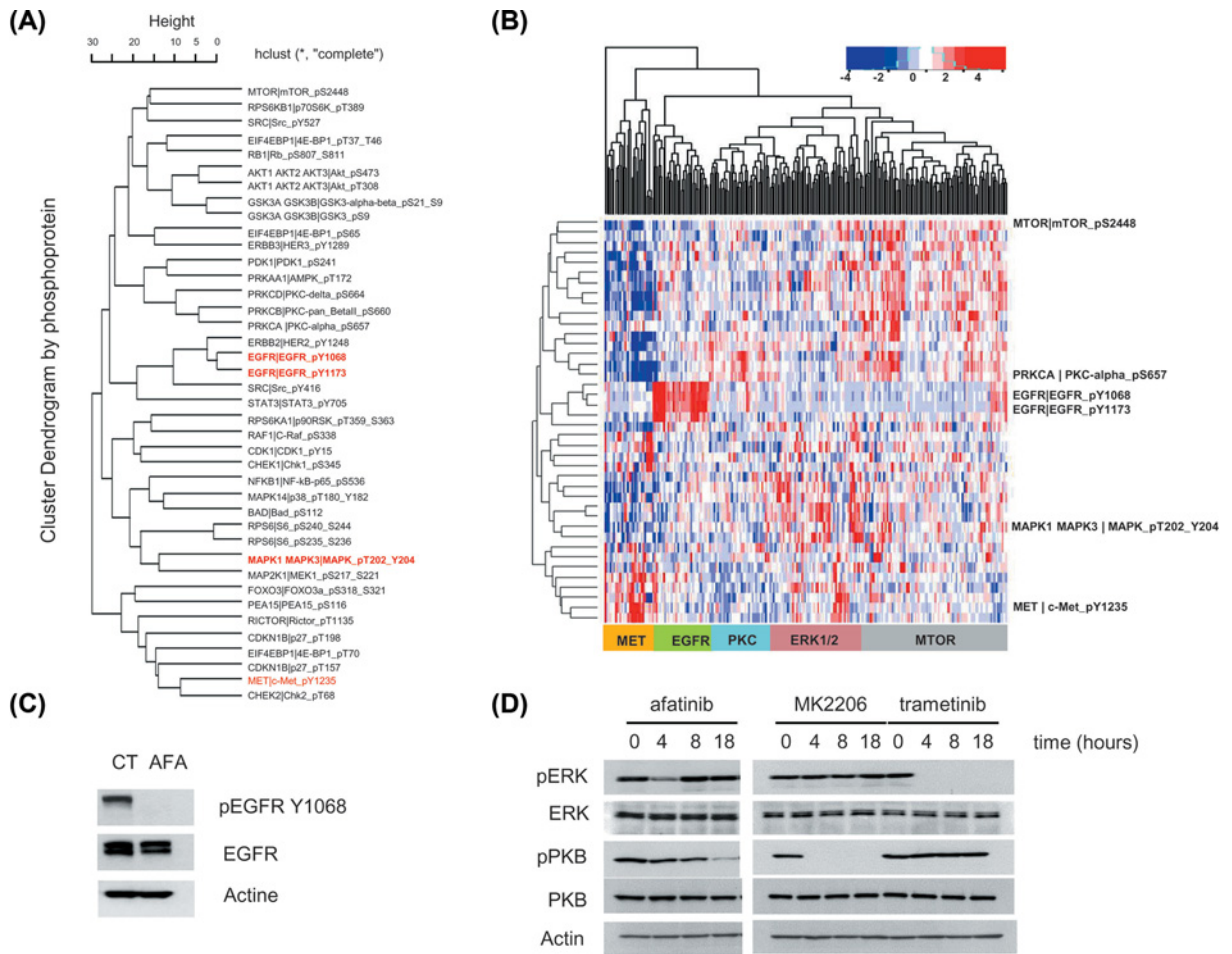


Figure 1. Identification of a subgroup of GBM with high phosphorylation levels of the ERK1/2 kinases

(A) Hierarchical clustering of RPPA data (40 phosphoproteins including phosphorylated forms of ERK1/2, EGFR, and MET, highlighted in red) in GBM tumors from TCGA ($n=244$ samples). (B) Clustered heatmap of RPPA data for GBM with samples (columns) and phosphoproteins (rows). High protein expression is shown in red, low protein expression in blue. The following clusters are labeled at the bottom of the heatmap: MET, EGFR, PKC, ERK1/2 and MTOR. (C) Immunoblot analysis of EGFR phosphorylation in the human GBM cell line A172, carrying an amplified *EGFR* gene. Phosphorylation of EGFR on Y1068 (its major autophosphorylation site) reflects the activation of EGFR. Note the complete inhibition of phosphorylation upon exposure of A172 cells to afatinib (1 μ M, 18 h). (D) A kinetic assessment of oncogenic signaling upon exposure of A172 cells to afatinib, MK2206 (2.5 μ M, Akt/PKB inhibitor) or trametinib (1 μ M, MEK inhibitor) both applied to A172 cells for the indicated time.

downstream signaling in GBM cells (Figure 1D). These findings suggested the existence of some form of functional uncoupling between EGFR and ERK1/2 in GBM cells and supported the existence of a distinct subset of GBM tumors characterized by high levels of phospho-ERK1/2.

GBM tumors with high levels of phospho-ERK1/2 have a dense monocytic infiltrate

A pan-tumor comparison of GBM vs other major types of solid tumors in TCGA, based on transcriptomic analysis, showed that GBM present general characteristics of a « cold » immune microenvironment, with relatively low levels of the main types of immune cells within the tumor tissue (Supplementary Figure S1) [24]. Cells of the monocytic lineage constitute a notable exception because GBM was ranked fifth amongst the major tumor types for the relative content of these cells (Supplementary Figure S1). Using the MCP counter algorithm, we explored the relative content of eight immune and stromal cell types in the clusters that were previously identified (Figure 1A,B). We observed that GBM tumors with high levels of phospho-ERK1/2 were significantly enriched in cells of the monocytic lineage

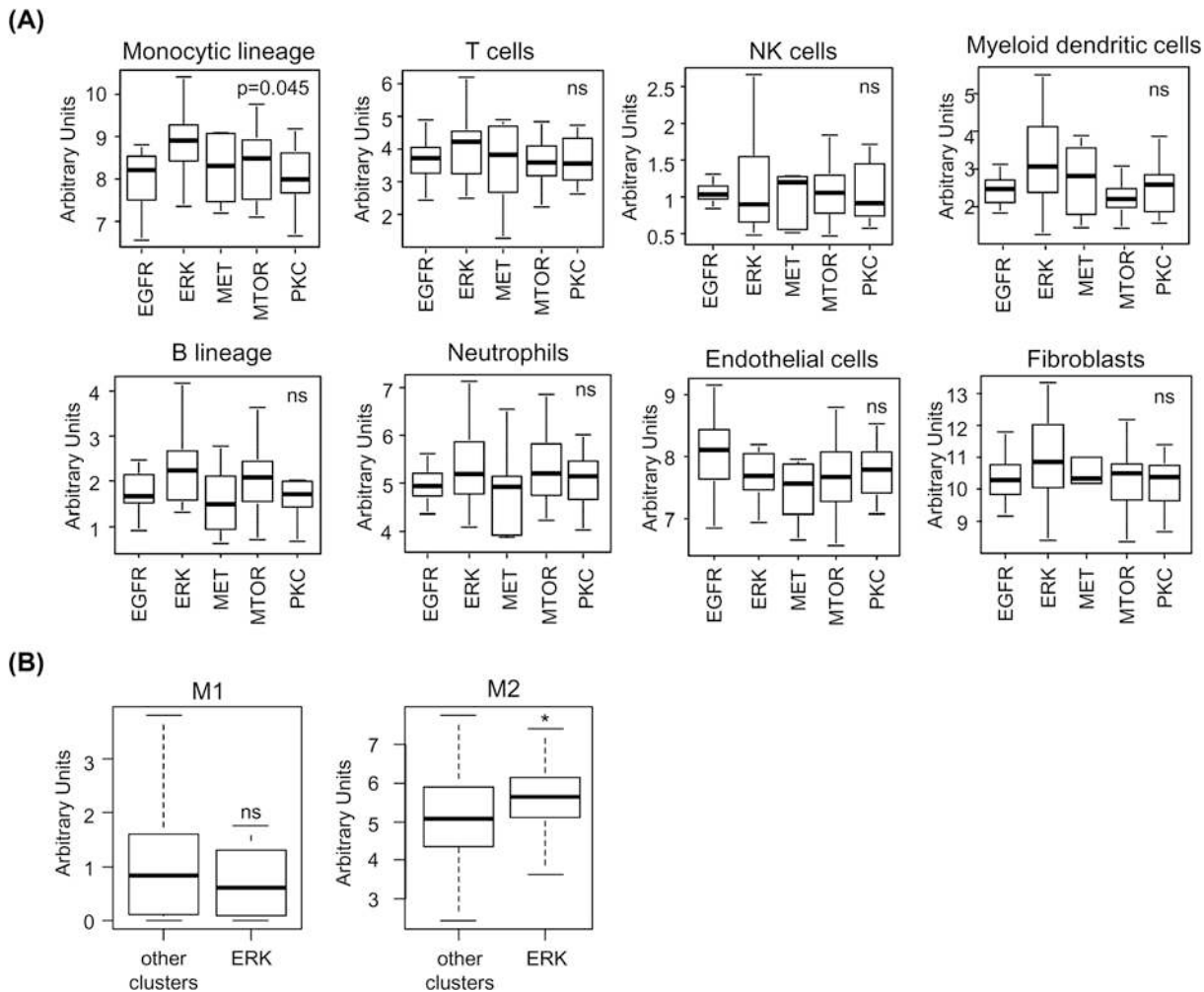


Figure 2. GBM tumors with high levels of phosphorylated ERK1/2 are characterized by a dense monocyte-macrophage infiltrate

(A) Box plot analysis showing the relative levels of tumor infiltration for eight cell types based on transcript level analysis (MCP-counter), for tumors from the indicated GBM clusters: EGFR ($n=12$), ERK ($n=18$), MET ($n=6$), MTOR ($n=23$), and PKC ($n=12$). P values obtained with Kruskal–Wallis analysis; ns: nonsignificant. (B) M1/M2 polarization is based on the comparison of GBM tumors with high levels of ERK1/2 phosphorylation with all other GBM. $*P < 0.05$

($P=0.045$, Kruskal–Wallis) (Figure 2A). Other cell types were not found to be present at significantly higher density in the ERK1/2 subgroup, although a tendency toward higher infiltration levels was also observed for myeloid-dendritic cells ($P=0.118$, Kruskal–Wallis) (Figure 2A). Interestingly, analysis of macrophage polarization using transcriptomic data showed that GBM with higher phosphorylation of ERK1/2 were enriched in monocytes-macrophages with M2, but not M1 polarization (Figure 2B). We concluded that tumors with high phospho-ERK1/2 are characterized by their enrichment in TAM with a non-inflammatory M2 phenotype.

We examined the expression of the two main chemoattractants of monocytes: CCL2/MCP1 and CSF1/M-CSF. Using data from TCGA, we noticed that GBM is one of the solid tumor types that expresses the highest levels of the corresponding mRNA (Figure 3A, Supplementary Figure S2). GBM tumors within the ERK1/2 cluster expressed even higher levels of CCL2/MCP1 mRNA compared with other clusters ($P=0.039$, Wilcoxon–Mann–Whitney) (Figure 3B). We addressed the regulation of the production of this chemokine experimentally in three human GBM cell lines (H4, SW1088, and A172) that were exposed to the MEK inhibitor trametinib, previously shown to block ERK1/2 signaling (Figure 1D). We showed that MEK inhibition significantly decreased CCL2/MCP1 mRNA levels in A172 cells (95% inhibition) and H4 cells (28% inhibition) (Figure 3C). Comparable results were obtained for CSF1 mRNA in GBM cells exposed to trametinib, as shown in Supplementary Figure S2. The protein levels of CCL2/MCP1 and

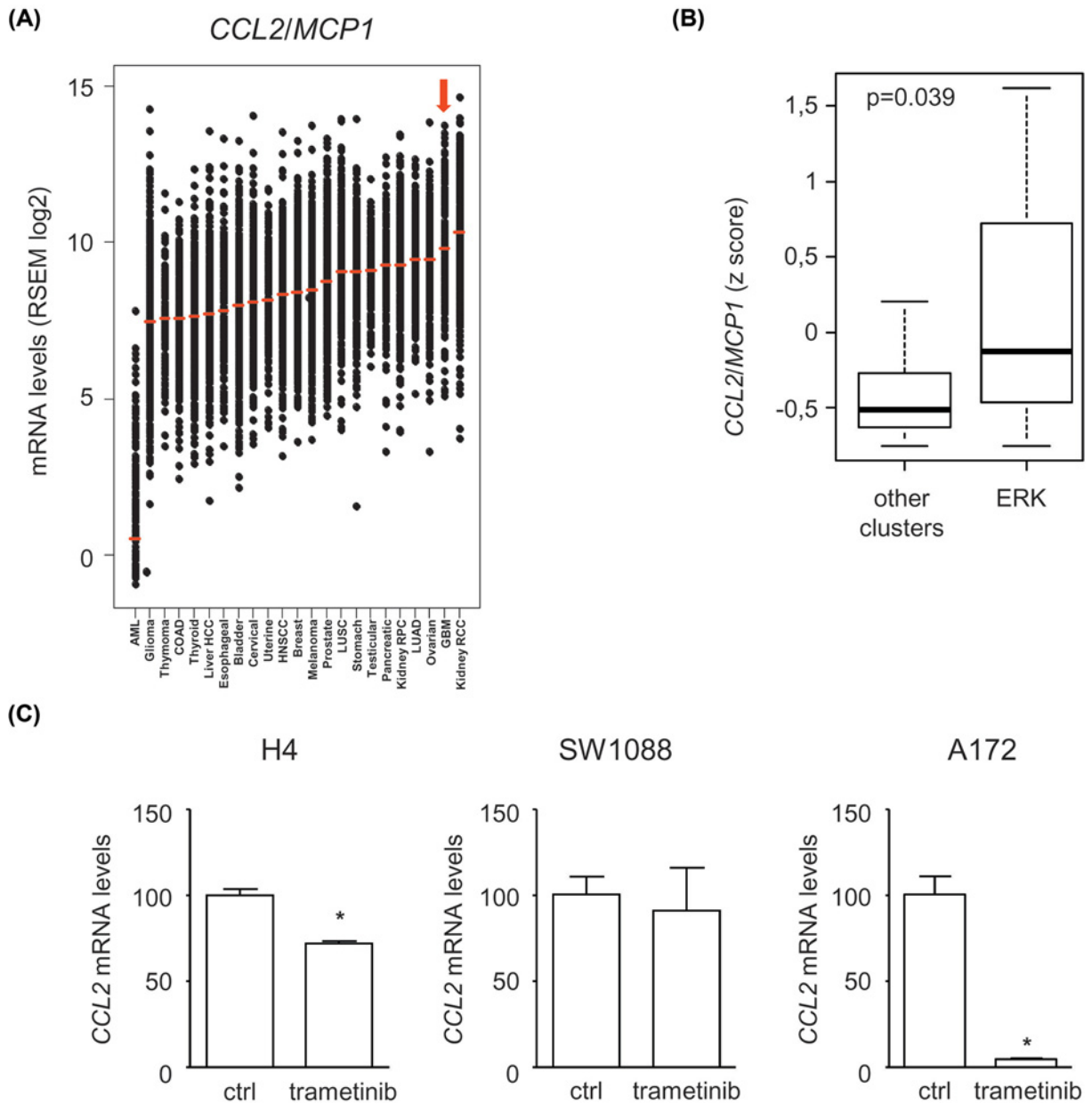


Figure 3. ERK1/2 signaling regulates CCL2/MCP1 expression in GBM

(A) Tumor type ranking according to the expression levels of the *CCL2/MCP1* mRNA. Data were retrieved from TCGA, with $n=23$ tumor types and a total number of $n=8823$ tumors. GBM is indicated with the red arrow. (B) Box plot comparison of *CCL2/MCP1* mRNA in GBM tumors with high ERK1/2 phosphorylation levels vs others ($P=0.039$ using Wilcoxon–Mann–Whitney test). (C) Quantitative PCR analysis of *CCL2/MCP1* mRNA levels in the indicated GBM cell lines (trametinib at $1 \mu\text{M}$ for 24 h). $*P<0.05$

CSF1/MCSF were measured in the cell culture supernatants using specific ELISA (Figure 4). We observed a strong decrease in the concentration of *CCL2/MCP1* upon cell exposure to trametinib (an inhibition of 29–84% after adjustment to the number of cells, depending on the cell line, $P<0.001$ Student's *t* test) (Figure 4A). A similar effect of trametinib was noted with CSF1, although to a less impressive extent, in two cell lines out of three (Figure 4B). MK2206 or afatinib, respectively, also reduced the protein levels of *CCL2/MCP1* and CSF1/MCSF in the three GBM cell lines (Supplementary Figure S3). Importantly, however, in contrast with trametinib or MK2206, afatinib had a strong inhibitory effect on the viability of GBM cells upon prolonged *in vitro* exposure (data not shown). This observation lead us to question the relevance of the effect of afatinib on the production of *CCL2* and CSF1, but at the

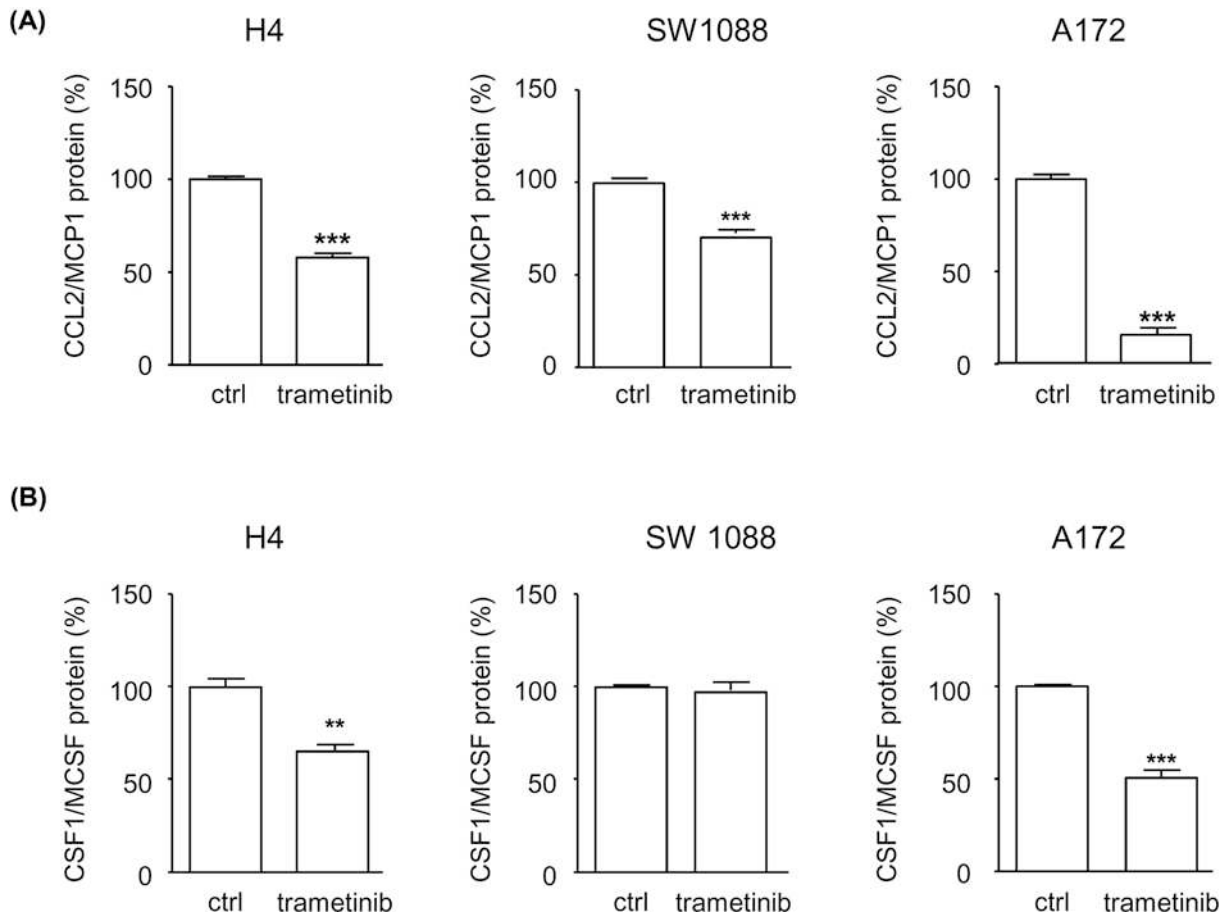


Figure 4. ERK1/2 signaling regulates the production of the cytokines CCL2/MCP1 and CSF1/MCSF in GBM

(A) Protein concentration of CCL2/MCP1 and (B) CSF1/MCSF measured in the cell culture supernatant of GBM cell lines. Trametinib was applied as indicated at a concentration of 1 μ M for 24 h. Each measurement was performed in triplicate. *** P <0.001 compared with control conditions, ** P <0.01 (Student's t test).

same time, it highlighted the specificity of our observations with trametinib. We concluded that oncogenic signaling, especially via ERK1/2 directly regulates the ability of GBM cells to attract monocytes and macrophages.

Lack of evidence for a direct control of PD-L1/PD-L2 expression or lactate metabolism by ERK1/2 signaling in GBM cells

To further explore the potential link between ERK1/2 signaling and the regulation of TAM in GBM, we examined the expression of the mRNA encoding PD-L1/CD274 and PD-L2. A marked particularity of GBM was their high expression of PD-L2: a pan-cancer comparison showed that GBM express average levels of PD-L1 compared with other tumor types, but GBM is the tumor type with the highest relative expression of PD-L2 mRNA (Figure 5A). However, no significant difference in the expression of PD-L1 or PD-L2 mRNA was seen between the different GBM subgroups that we had previously identified (Figure 5B). The observation that GBM express high levels of PD-L2 was confirmed by immunoblot analysis (Figure 5C). We analyzed the human GBM cell lines H4, SW1088, and A172, and detected PD-L2 in all three cell lines, compared with PD-L1 that was found to be expressed at high levels in only one cell line (SW1088) (Figure 5C). Cell exposure to trametinib did not have a detectable effect on the expression of PD-L2, and a modest reduction in PD-L1 expression was detected in SW1088 cells (Figure 5C). Neither MK2206 nor afatinib altered the expression of PD-L1/PD-L2 by GBM cells in these conditions (Supplementary Figure S4).

In order to address the existence of metabolic regulation of the tumor immune microenvironment, we analyzed the expression levels of the lactate receptor GPR65, a cell surface receptor recently reported to dampen local tumor immunity by interfering with the function of TAM [15,16]. GBM was found to be the tumor type with the highest expression levels of the lactate receptor GPR65 at the mRNA level (Figure 6A). Lactate was also detected at high con-

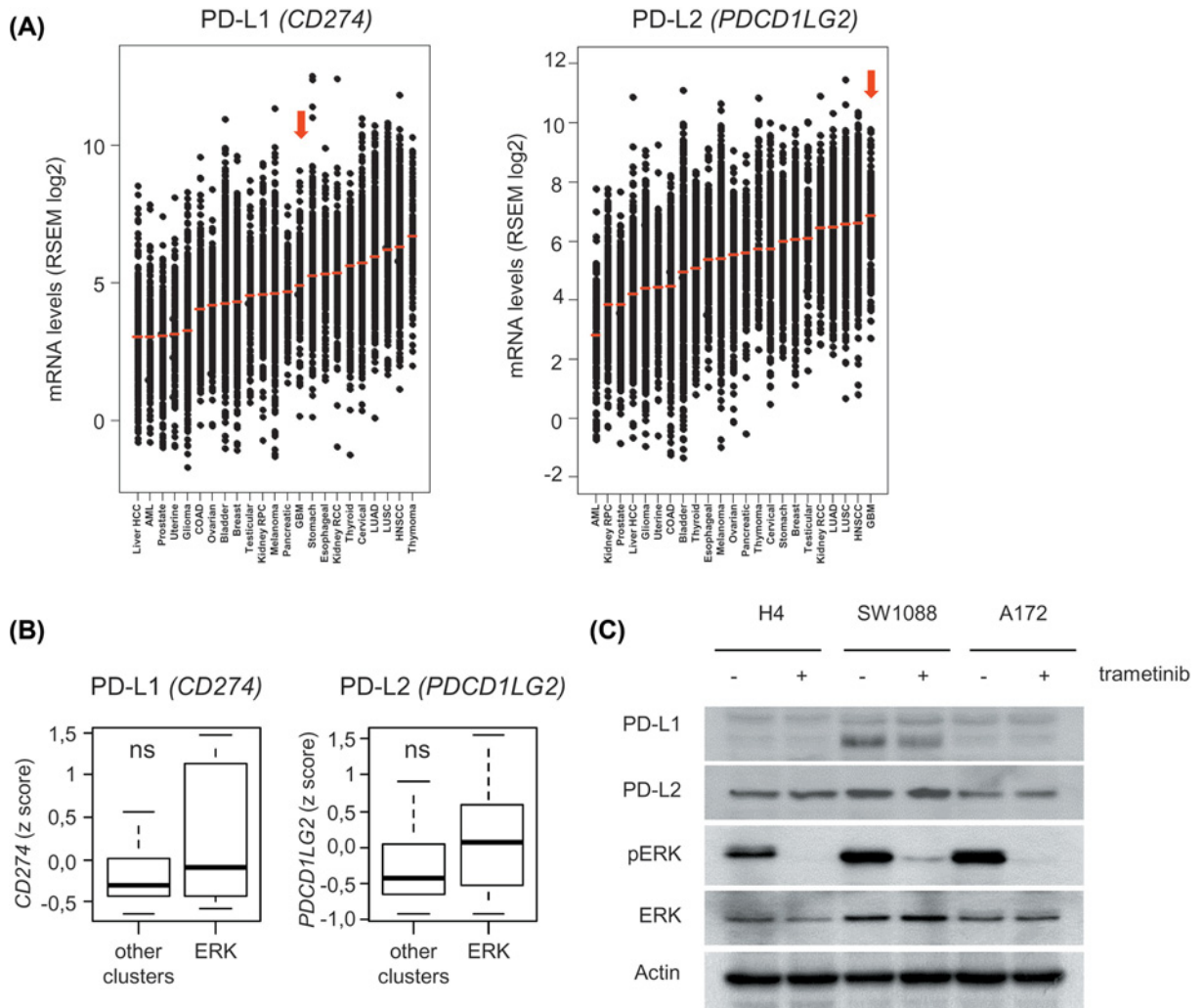


Figure 5. Lack of evidence of a direct regulation of the immune checkpoint ligands PD-L1 / PD-L2 by ERK1/2 signaling in GBM

(A) Pan-cancer analysis of the expression of the immune checkpoint ligands PD-L1/PD-L2. Tumor types are ranked according to their mRNA expression levels of the immune checkpoint ligands PD-L1 (CD274) and PDL2 (PDCD1LG2). Data are from $n=23$ tumor types and a total number of $n=8823$ tumors. GBM is indicated with the red arrow. (B) Box plot comparison of PDL1 and PDL2 mRNA expression levels in GBM tumors with high ERK1/2 phosphorylation levels vs others (ns : nonsignificant; Wilcoxon–Mann–Whitney test). (C) Immunoblot analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in GBM cell lines. Protein extracts were prepared from the indicated cell lines, exposed to trametinib (1 μ M, 24 h) as indicated.

centrations in the cell culture supernatant of GBM cells; in order to compare GBM with the model situation analyzed by Bohn et al. [16], we compared the flux of lactate produced by GBM cells with the malignant melanoma cell line SK-MEL3 (BRAF V600E). Interestingly, GBM systematically produced more lactate *in vitro* than SK-MEL3 cells: a relative difference of 2.5-fold was observed for H4 cells vs SK-MEL3 : 10.5 vs 4.2 pmol lactate/ μ g protein/24 h, respectively ($P<0.001$, Student's t test) (Figure 6B). These findings suggest that lactate signaling is active in the GBM tumor microenvironment. However, we found no indication that this aspect was regulated by ERK1/2 signaling. GBM tumors with high levels of ERK1/2 phosphorylation did not have significantly higher levels of GPR65 (Figure 6C). Similarly, lactate production by GBM cells was only modestly inhibited by trametinib (<10% inhibition for all three GBM cell lines tested, compared with a 30% inhibition in SK-MEL3, $P<0.001$, Student's t test) (Figure 6D). In comparison, lactate production by GBM cells was strongly inhibited by MK2206 (Supplementary Figure S5). We concluded that ERK1/2 signaling is not directly involved in the lactate-related control of the GBM tumor microenvironment.

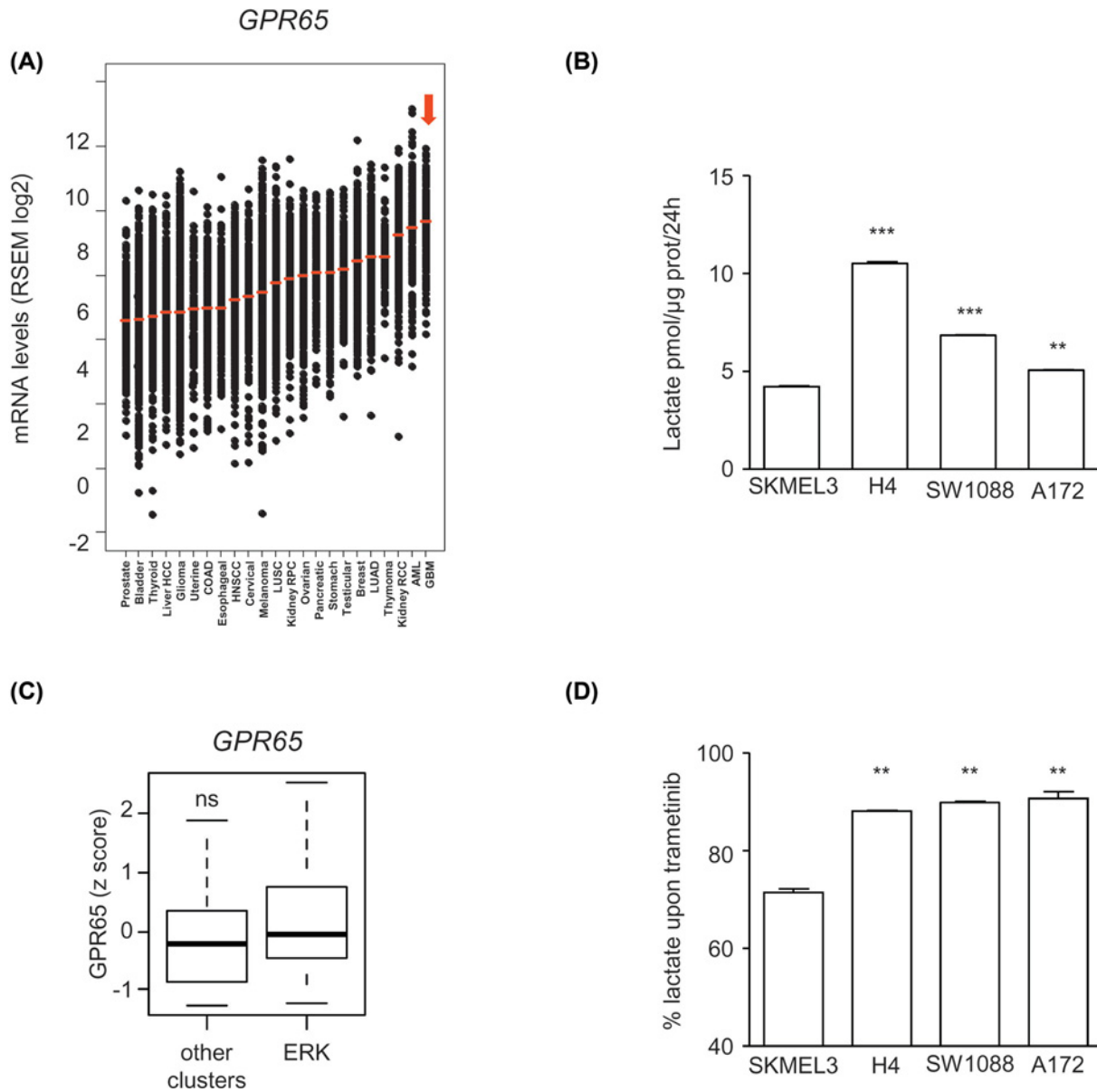


Figure 6. Lack of evidence of modulation of the metabolic inhibitory signaling mediated by lactate and its macrophage receptor *GPR65* by ERK1/2 in GBM

(A) Tumor ranking according to the expression levels of *GPR65* mRNA. Data are from $n=23$ tumor types and a total number of $n=8823$ tumors. GBM is indicated with the red arrow. (B) Lactate concentrations measured in the cell supernatant of GBM cells vs the melanoma cell line SK-MEL3. Lactate concentrations are expressed as pmol/μg prot/24 h. (C) Box plot comparison of GBM tumors with high levels of ERK1/2 phosphorylation vs other GBM (ns: not significant, Wilcoxon–Mann–Whitney test). (D) Inhibition of tumor glycolysis upon ERK1/2 inhibition by trametinib. Data are expressed as percent of lactate production upon exposure to trametinib (1 μM, 24 h), of the indicated GBM cell lines, taking control conditions as 100%. The cell line SK-MEL-3, carrying an activated BRAF V600E oncogene, is given here as positive control. Note the significantly greater inhibition of lactate production in SK-MEL-3 compared with GBM cells. $**P<0.01$, $***P<0.001$ compared with SK-MEL3.

Discussion

The present study aimed to explore the local immunoregulatory function of ERK1/2 signaling in GBM cells. We based our analysis on the comparison of GBM vs other solid tumors, and we also analyzed a subset of GBM with high phosphorylation of ERK1/2. Our study led us to address the regulation of TAM, a major component of the immune

infiltrate in GBM [11]. Interestingly, the presence of TAM has been reported to be an important determinant of GBM aggressiveness and to potentially play a role in the response of GBM to various therapies [11–14]. We found that TAM infiltration was denser in tumors with high levels of ERK1/2 phosphorylation compared with others. We found that GBM produce large amounts of the monocyte chemoattractant cytokines CCL2/MCP1 and CSF1/MCSF, and the inhibition of ERK1/2 strongly reduced this production. To our knowledge, the present study is the first to directly show that ERK1/2 signaling in GBM cells can shape the tumor immune microenvironment. Nevertheless, our conclusions are supported by a previous report examining the impact of *NF1* gene deficiency in GBM [14]. *NF1* deficiency, thought to reduce RAS GTPase activity and activate ERK1/2, was reported to increase TAM infiltration in GBM tumors [14]. These findings collectively highlight the contribution of ERK1/2 signaling in GBM cells in the recruitment of TAM, an essential feature of the immune microenvironment of GBM.

Whether our findings explain why GBM carrying genomic alterations that activate ERK1/2 respond better to anti-PD1 immunotherapy is an interesting possibility that will require further experimental validation [10]. Cancer microenvironment is the product of multiple layers of regulation that converge to produce a setting favorable for tumor progression [27]. Our study was centered on the role of oncogenic signaling in GBM cells and did not consider ERK1/2 signaling in immune cells and TAM in particular [13,28]. In order to precisely define the end result of ERK1/2 inhibition in GBM, *in vivo* experiments will be required. However, *in vivo* targeting of ERK1/2 signaling in GBM remains challenging. In agreement with studies that point to the complex regulation of oncogenic signaling in GBM [29], we observed that EGFR targeting fails to robustly inhibit ERK1/2 signaling, even in a context of genomic amplification of this receptor. Robust inhibition of ERK1/2 signaling was achieved with trametinib, a chemical inhibitor that does not however have an optimal pharmacological profile for clinical use against brain tumors [30].

In addition to our conclusions regarding the recruitment of TAM in GBM, we explored the impact of ERK1/2 signaling on two mechanisms that regulate the activation of TAM in solid tumors [7]: (1) high expression of PD1 ligands (PD-L1 and PD-L2) in GBM cells and (2) the secretion of lactate combined with high expression of the gene encoding its receptor GPR65, recently found to be an essential contributor to the noninflammatory polarization of TAM [16]. Targetting oncogenic signaling to improve antitumor immunity is currently an attractive, yet speculative possibility. Recent studies suggest that in melanoma and breast carcinoma, tumor metabolism may be a key target of oncogenic signaling downstream of ERK1/2 [18,19]. We found however no evidence of a direct control of ERK1/2 signaling over this potentially important aspect of TAM regulation in GBM. Our study therefore suggests that GBM cells exert a negative control over TAM independently of ERK1/2 signaling. Understanding the multiple facets of the regulation of the tumor microenvironment will be essential for successful immunotherapeutic treatment in GBM.

Acknowledgments

We would like to thank Dr Aurélien de Reynies (Paris, France) and Dr Vésteinn Thorsson (Institute for Systems Biology, Seattle, WA, U.S.A.) for their help with data accessibility. The authors also acknowledge the contribution of the patients and researchers involved in TCGA. Work in our laboratory is supported by the CHU Amiens Picardie and Ligue contre le Cancer, comité de la Somme.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

Work in our laboratory is supported by the CHU Amiens Picardie and Ligue contre le Cancer, Comité de la Somme. The funders took no part in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Contribution

C.L., C.L., M.C.M., T.L., C.G., and Z.S. contributed to data acquisition. M.L., J.M.C., and B.C. critically read the manuscript. A.G. and Z.S. designed the study, performed statistical analyses, and wrote the manuscript.

Abbreviations

ATCC, American Type Culture Collection; CCL2/MCP1, chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1; CSF1/MCSF, macrophage colony stimulating factor-1; EGFR, epidermal growth factor receptor; GBM, glioblastoma; RPPA, reverse phase protein array; RTK, receptor tyrosine kinase; TAM, tumor-associated macrophage; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

References

- 1 Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C. et al. (2014) Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **23**, 1985–1996, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>
- 2 Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J. et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- 3 Brennan, C.W., Verhaak, R.G., McKenna, A. et al. (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- 4 Hannen, R., Hauswald, M. and Bartsch, J.W. (2017) A rationale for targeting extracellular regulated kinases ERK1 and ERK2 in glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **76**, 838–847, <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx076>
- 5 Reardon, D.A., Ligon, K.L., Chiocca, E.A. and Wen, P.Y. (2015) One size should not fit all: advancing toward personalized glioblastoma therapy. *Discov. Med* **19**, 471–477
- 6 Sanmamed, M.F. and Chen, L. (2018) A paradigm shift in cancer immunotherapy: from enhancement to normalization. *Cell* **175**, 313–326, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.035>
- 7 Filley, A.C., Henriquez, M. and Dey, M. (2017) Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget* **8**, 91779–91794, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21586>
- 8 Keenan, T.E., Burke, K.P. and Van Allen, E.M. (2019) Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat. Med.* **25**, 389–402, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0382-x>
- 9 Jerby-Arnon, L., Shah, P., Cuoco, M.S. et al. (2018) A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade. *Cell* **175**, 984–997, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.006>
- 10 Zhao, J., Chen, A.X., Gartrell, R.D. et al. (2019) Immune and genomic correlates of response to anti-PD-1 immunotherapy in glioblastoma. *Nat. Med.* **25**, 462–469, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0349-y>
- 11 Morisse, M.C., Jouanneau, S., Dominguez-Villar, M., Sanson, M. and Idbaih, A. (2018) Interactions between tumor-associated macrophages and tumor cells in glioblastoma: unraveling promising targeted therapies. *Expert Rev. Neurother* **18**, 729–737, <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1510321>
- 12 Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J. et al. (2013) CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **19**, 1264–1272, <https://doi.org/10.1038/nm.3337>
- 13 Olson, O.C., Kim, H., Quail, D.F., Foley, E.A. and Joyce, J.A. (2017) Tumor-Associated Macrophages suppress the cytotoxic activity of antimetabolic agents. *Cell Rep.* **19**, 101–113, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.038>
- 14 Wang, Q., Hu, B., Hu, X. et al. (2017) Tumor evolution of Glioma-Intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* **32**, 42–56, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>
- 15 Sekine, H., Yamamoto, M. and Motohashi, H. (2018) Tumors sweeten macrophages with acids. *Nat. Immunol.* **19**, 1281–1283, <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0258-0>
- 16 Bohn, T., Rapp, S., Luther, N. et al. (2018) Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nat. Immunol.* **19**, 1319–1329, <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0226-8>
- 17 Labak, C.M., Wang, P.Y., Arora, R. et al. (2016) Glucose transport: meeting the metabolic demands of cancer, and applications in glioblastoma treatment. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 1599–1608
- 18 Bedognetti, D., Roelands, J., Decock, J., Wang, E. and Hendrickx, W. (2017) The MAPK hypothesis: immune-regulatory effects of MAPK-pathway genetic dysregulations and implications for breast cancer immunotherapy. *Emerg. Top Life Sci.* **1**, 429–445, <https://doi.org/10.1042/ETLS20170142>
- 19 Marchetti, P., Trinh, A., Khamari, R. and Kluza, J. (2018) Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1862**, 999–1005, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.018>
- 20 Thorsson, V., Gibbs, D.L., Brown, S.D. et al. (2018) The immune landscape of cancer. *Immunity* **48**, 812–830, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.023>
- 21 Lau, D., Bobe, A.M. and Khan, A.A. (2019) RNA sequencing of the tumor microenvironment in precision cancer immunotherapy. *Trends Cancer*, (Epub ahead of print), <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.006>
- 22 Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U. et al. (2012) The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- 23 Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U. et al. (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, pii1, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- 24 Becht, E., Giraldo, N.A., Lacroix, L. et al. (2016) Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* **17**, 218, <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1070-5>
- 25 Fenstermaker, R.A., Ciesielski, M.J. and Castiglia, G.J. (1998) Tandem duplication of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and calcium internalization domains in A-172 glioma cells. *Oncogene* **16**, 3435–3443, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202156>
- 26 Ezzoukhray, Z., Louandre, C., Trécherel, E. et al. (2012) EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int. J. Cancer* **131**, 2961–2969, <https://doi.org/10.1002/ijc.27604>
- 27 Laplane, L., Duluc, D., Larmonier, N., Pradeu, T. and Bikfalvi, A. (2018) The multiple layers of the tumor environment. *Trends Cancer* **4**, 802–809, <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.10.002>
- 28 Ebert, P.J., Cheung, J., Yang, Y. et al. (2016) MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade. *Immunity* **44**, 609–621, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.024>
- 29 Wei, W., Shin, Y.S., Xue, M. et al. (2016) Single-cell phosphoproteomics resolves adaptive signaling dynamics and informs targeted combination therapy in glioblastoma. *Cancer Cell* **29**, 563–573, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.012>

30 de Gooijer, M.C., Zhang, P., Weijer, R., Buil, L.C.M., Beijnen, J.H. and van Tellingen, O. (2018) The impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain pharmacokinetics and pharmacodynamics of a panel of MEK inhibitors. *Int. J. Cancer* **142**, 381–391, <https://doi.org/10.1002/ijc.31052>

Annexe 3 : L'apport de la génomique dans la prise en charge chirurgicale et dans l'étude des tumeurs orales.

Zuzana Saidak, **Claire Lailier**, Sylvie Testelin, Bruno Chauffert, Florian Clatot, Antoine Galmiche (2021). Contribution of Genomics to the Surgical Management and Study of Oral Cancer. Ann Surg Oncol.



Contribution of Genomics to the Surgical Management and Study of Oral Cancer

Zuzana Saidak, PhD^{1,2}, Claire Lailier, PharmD^{1,2}, Sylvie Testelin, MD, PhD^{1,3}, Bruno Chauffert, MD, PhD^{1,4}, Florian Clatot, MD, PhD^{5,6}, and Antoine Galmiche, MD, PhD^{1,2}

¹UR7516 “CHIMERE, Université de Picardie Jules Verne”, Amiens, France; ²Centre de Biologie Humaine, CHU Amiens, Amiens, France; ³Department of Maxillofacial Surgery, CHU Amiens, Amiens, France; ⁴Department of Oncology, CHU Amiens, Amiens, France; ⁵Centre Henri Becquerel, Rouen, France; ⁶INSERM U1245/Team IRON, Rouen, France

ABSTRACT

Background. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent type of tumor arising from the oral cavity. Surgery is the cornerstone of the treatment of these cancers. Tumor biology has long been overlooked as an important contributor to the outcome of surgical procedures, but recent studies are challenging this concept. Molecular analyses of tumor DNA or RNA provide a rich source of information about the biology of OSCC.

Methods. We searched for relevant articles using PubMed. We examined in particular the prospect of applying molecular methods for minimally invasive exploration of OSCC biology.

Results. We examined five potential applications of genomics to the surgical management and study of OSCC: i) assessing oral potentially malignant lesions; ii) tumor staging prior to surgery; iii) predicting postoperative risk in locally advanced tumors; iv) measuring minimal residual disease and optimizing the longitudinal monitoring of OSCC; and v) predicting the efficacy of medical treatment.

Conclusions. Genomic information can be harnessed in order to identify new biomarkers that could improve the staging, choice of therapy and management of OSCC. The identification of new biomarkers is awaited for better personalization of the surgical treatment of OSCC.

The oral cavity (lips, buccal mucosa, anterior tongue, hard palate, floor of mouth, and alveolar ridge) constitutes the most frequent primary location of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).^{1,2} Oral squamous cell carcinoma (OSCC) classically occurs in a context of chronic alcohol and tobacco use.^{1,2} Areca nut-chewing also constitutes an established risk factor for OSCC in specific areas of Asia.²

Although human papillomavirus (HPV) has not been established as having a role in the development of OSCC, the oral cavity is characterized by the presence of an oral microbiote, whose contribution to the induction of inflammation and tumor promotion in this location is discussed.³ Management of OSCC involves different medical specialties with complementary expertise, but surgery usually is the first treatment method. Tumor anatomic determinants are in general the main criteria used for the initial prognosis assessment. The final pathologic examination of the tumor establishes the choice of therapy.

The recent revised version of tumor-node-metastasis (TNM) recognizes the increasing importance of features related to tumor biology. For example, the depth of invasion (DOI) is a useful parameter, together with the well-known criteria that determine OSCC prognosis including the presence of invaded surgical margins (SMs), extranodal extension (ENE), lymphovascular invasion (LVI), and perineural invasion (PNI).⁴ Positive SM or ENE identify advanced tumor stages that require heavy medical treatments. Both LVI and PNI play an important role in the choice of treatment for early OSCC, although the corresponding pathologic diagnoses might sometimes be difficult and poorly standardized.⁵ The need to introduce

© The Author(s) 2021

First Received: 15 January 2021

Accepted: 7 March 2021

Z. Saidak, PhD
e-mail: Saidak.Zuzana@chu-amiens.fr

Published online: 12 April 2021

biomarkers and standardize medical practices is fueling a growing interest in tumor biology as a determinant of the OSCC response to surgery.

Oral oncogenesis is driven by the accumulation of genomic alterations in the epithelial cells of the oral cavity^{6–8} (Table 1). The most common driver mutations found in OSCC occur in the *TP53* gene. These mutations occur at an early stage during oral carcinogenesis, possibly in a single adult stem cell. Replacement of the normal epithelium by cellular clonal units prone to accumulation of further genomic alterations accounts for the later steps of malignant transformation.⁹

Genomic analyses of tumor DNA/RNA provide a rich source of information regarding tumor biology and can be performed using a large variety of protocols and platforms. The variety of analytical strategies offers tailored opportunities to explore tumor biology but represents a challenge in the transposition of genomic research to the clinical setting.^{10,11} The number of pre-analytical parameters (e.g., biopsies vs surgically resected samples, frozen vs formalin-fixed specimens, perioperative hypoxia) is a source of variability between studies.

Amplification by polymerase chain reaction (PCR) typically is used as an initial step to amplify DNA and to analyze the sequence or expression of a panel of genes. Microarrays and assays that rely on DNA hybridization, such as the NanoString platform (bar coding of nucleic acids) permit large-scale analysis of DNA and RNA expression profiling. Overall, however, the fast pace of

technological progress has been illustrated by massively parallel sequencing (the so-called next-generation sequencing [NGS]).^{10,11}

The most classical applications of tumor DNA analysis include detection of DNA mutations, copy number alterations (CNA), and the presence of structural modifications in the tumor genome. Functional genomics (i.e., the study of mRNA levels, translated into gene expression signatures) also has gained popularity because it offers opportunities for integrative studies covering virtually any facet of tumor biology^{10,11} (Fig. 1).

More recent applications of functional genomics include the study of the tumor microenvironment¹² and single-cell analyses, increasing the resolution of genomic analyses for the study of cellular heterogeneity within an individual tumor.¹³ Importantly, the revolution of open access data pioneered by The Cancer Genome Atlas (TCGA), a database offering easy access to semi-processed genomic data of tumors, facilitates the confrontation of clinical questioning and genomic analysis. This review discusses the practical applications of genomics in the management and study of OSCC.

ASSESSING THE RISK ASSOCIATED WITH ORAL POTENTIALLY MALIGNANT LESIONS

Oral potentially malignant lesions (OPMLs) are heterogeneous and include leukoplakia, erythroplakia, dysplastic lesions. The OPMLs carry a moderate yet significant risk of malignant transformation, estimated to be approximately 2% to 5% during a lifetime.¹⁴ Their

TABLE 1 A summary of the most common genomic mutations/CNA found in OSCC^a

Gene	Protein/function	Type of alteration (%)
<i>CDKN2A</i>	p16/cell cycle control	Mutations (26%), deep deletion (33%)
<i>TP53</i>	p53/cell cycle control	Mutations (76%), deep deletion (1.3%)
<i>CCND1</i>	cyclin D1/cell cycle control	Amplifications (22%)
<i>EGFR</i>	EGF receptor/growth regulation and oncogenic-signaling	Mutations (5%), amplifications (12%)
<i>PIK3CA</i>	PI3K catalytic subunit/growth regulation and oncogenic-signaling	Mutations (17%), amplifications (14%)
<i>PTEN</i>	PTEN/growth regulation and oncogenic-signaling	Mutations (1.9%)
<i>FAT1</i>	FAT1 protocadherin/growth regulation and oncogenic-signaling	Mutations (27%), deep deletion (7%)
<i>AJUBA</i>	AJUBA/growth regulation and oncogenic-signaling	Mutations (6%)
<i>NOTCH1</i>	NOTCH1/growth regulation and oncogenic-signaling	Mutations (21%), deep deletion (2.9%)
<i>KMT2D</i>	KMT2D histone methyl-transferase/regulation of epigenetic marks	Mutations (13%)
<i>NSD1</i>	NSD1 histone methyl-transferase/regulation of epigenetic marks	Mutations (8%)

CNA, copy number alteration; OSCC, oral squamous cell carcinoma

^aThe list is restricted to 11 biologically significant genes with reported functions as oncogenes and anti-oncogenes. The % of genomic alterations in OSCC was calculated based on data retrieved from The Cancer Genome Atlas (TCGA) ($n = 321$ OSCC). The table shows the % of tumors with mutations or CNAs (amplifications or deep deletions) in selected genes. Note that only alterations found in more than 1% of tumors are shown. Alterations detected in more than 10% of OSCC are in bold

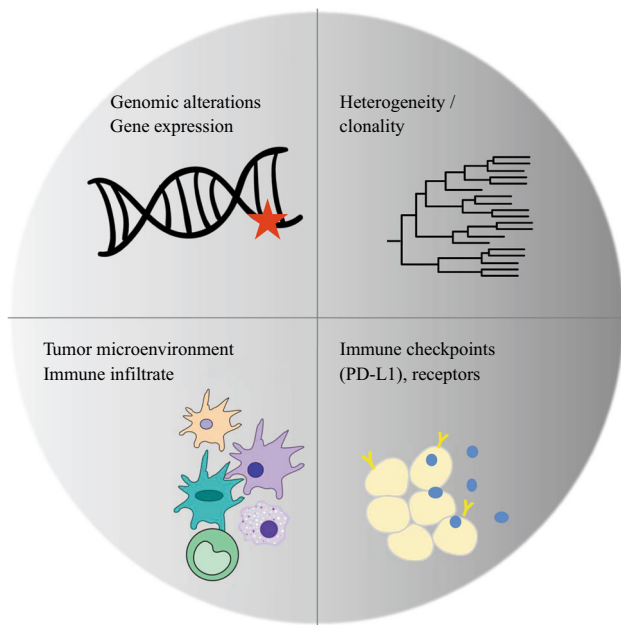


FIG. 1 An overview of the information that can be gained from tumor genomic analysis. DNA/RNA sequencing from tumor material permits identification of genomic mutations and structural rearrangements that define the mutational burden of a tumor, some of which can be targeted therapeutically. Analyzing tumor gene expression also provides information regarding the functional status of the tumor (e.g., the presence of hypoxic areas). Recent practical strategies permit analysis of an individual tumor's clonal structure and the reconstruction of its evolution in a dynamic fashion, potentially providing useful information regarding its response to treatment. Another important aspect is analysis of the composition of the tumor microenvironment (TME), including its infiltration with immune cells. The density of T cell infiltrate, the functionality of T cells, and the immune receptor repertoire can be assessed directly through functional genomics

pathologic diagnosis is difficult because of the multiple cytologic alterations that can be found (e.g., altered epithelial stratification, loss of epithelial polarity, nuclear dysmorphia, dyskeratosis), reflecting the complex biology of tumor development in the oral cavity. It also can be difficult to distinguish between OPMLs and inflamed and regenerative epithelia, which commonly occur in the oral cavity. These difficulties, combined with variability in sampling, explain why the diagnosis is poorly standardized and why the inter-observer agreement is incomplete.¹⁴

Because of the medical burden that OPMLs represent, a great need exists for biomarkers to identify the lesions that require surgical treatment.¹⁴ Loss of heterozygosity (LOH) currently is the most predictive marker of the malignant potential of OPMLs. Typically, LOH is analyzed using microsatellite loci because these short repeated sequences present with a high frequency of polymorphisms. In the prospective study by Zhang et al.,¹⁵ simultaneous LOH of chromosomal regions 3p14 and 9p21 was reported to be associated with more than a 22-fold increased risk for

5-year progression of mild to moderate dysplasia to cancer. The results of this study and others established that OPMLs already exhibit some of the genomic alterations found in OSCC. Although their detection might help to standardize the pathologic diagnosis of malignancy, a key challenge remains to establish minimally invasive strategies applicable to the potentially extensive areas of oral mucosa that need to be screened for “dangerous” lesions eligible for surgical resection.

The study by Graveland et al.¹⁶ examined the possibility of simultaneously detecting common LOH and missense mutations of *TP53* in oral swirls from patients with leukoplakia. More recently, Foy et al.¹⁷ proposed expanding the focus of genomic analyses of OPML by further classifying leukoplakia based on gene expression and the presence of an mRNA profile enriched with genes related to lymphocyte and monocyte function. Analyzing gene expression to define OPML with immunoactive profiles not only might be important to refining the prediction of the malignant risk¹⁸ but also might be useful in the consideration of alternative immunotherapeutic protocols.¹⁹

MicroRNAs are short non-coding single-strand RNAs (usually 19 to 25 nucleotides) that control gene expression at the post-transcriptional level, typically by interacting with the 3'-untranslated region of their target mRNA.²⁰ The recent comprehensive exploration of the miRNome by NGS showed that specific expression profile alterations exist in OSCC.²¹ Importantly, miRNAs also are found in extracellular vesicles that protect them from nucleolytic attack and increase their stability in biological fluids, making them potential biomarkers in plasma or saliva (either as apoptotic bodies, microvesicles produced by membrane budding, or exosomes originating from the endosomal apparatus).^{22,23}

A study by MacLellan et al.²⁴ described the utility of analyzing the serum levels of miRNA in predicting the malignant potential of high-risk oral lesions (OSCC and dysplastic lesions). A more recent study by Yap et al.²⁵ used quantitative PCR (qPCR) to profile the expression of five miRNAs from oral rinses in a cohort of patients with OSCC and OPML. This profiling was able to differentiate robustly between OPML and OSCC (sensitivity, 86.8%; specificity, 81.5%).²¹

The interesting prospect of testing salivary miRNA was explored by Romani et al.,²⁶ who reported that large amounts of one miRNA (miR-432-5p) were detected in the saliva of OSCC patients compared with healthy controls. A combination of three miRNAs analyzed in the saliva was able to robustly diagnose OSCC (area under the curve [AUC], 0.98).²⁶ Because of its noninvasive nature, profiling miRNA in saliva offers promising perspectives as a

way to assist the biological diagnosis of OSCC. The role of salivary miRNA analyses needs to be addressed in future prospective studies.

DNA methylation is a potent and ubiquitous epigenetic modality²⁷ (Fig. 2). In general, DNA methylation of cytosine-guanine dinucleotides (CpG) reduces the transcriptional activity of the methylated promoter. The genome of OSCC cells is characterized by a global reduction of CpG methylation and local spots of hypermethylation.²⁷ Because CpG methylation contributes to the silencing of some important tumor suppressor genes, such as *CDKN2A*, it is a likely motor event during oral carcinogenesis.²⁷

The study of epigenetics is important for two reasons. First, because epigenetics is a biological link to the environment, nutrition, the inflammatory context, and the oral microbiote may contribute to the malignant transformation by altering epigenetic marks.²⁸ Second, epigenetics is a source of potential biomarkers for cancer diagnosis.²⁹ Figure 2 shows the main epigenetic marks and some of the powerful techniques that are applicable in the clinical setting. The study of the DNA methylome of OSCC and OPML has established a landmark for the application of this type of analysis to the early stages of oral carcinogenesis.^{30–32}

Epigenetic analyses can be performed in OSCC noninvasively by oral brushing, mouth rinsing, or saliva samples.³³ Multiple studies have examined the possibility of discriminating OSCC from healthy oral mucosa and non-malignant lesions using this type of samples and methylation-specific PCR (MS-PCR) analysis to target 3 to 13 methylated genomic loci.^{34–38}

In parallel, the emergence of multi-cancer early detection (MCED) blood tests based on cell-free DNA (cfDNA) analysis is an important development.³⁹ The large-scale analyses of epigenetic marks from cfDNA in the serum could significantly help in early diagnosis of cancer.^{40,41} The recent study by Liu et al.,⁴¹ based on the analysis of more than 1 million CpGs and more than 10^5 methylated regions, examined the sensitivity and accuracy of this strategy in diagnosing more than 50 cancer types, including HNSCC. Due to the ubiquitous nature of DNA methylation and its strong link to cell differentiation, DNA methylation detection might be more sensitive and accurate in diagnosing early cancer than mutational/CNA analysis.⁴¹

No data exist regarding the applicability of MCED tests to OPML. Nevertheless, MCED assays are raising considerable interest as an adjunct to population-based screening for the most common cancers.³⁹ Prospective trials to examine the utility of MCED in clinical practice are required.

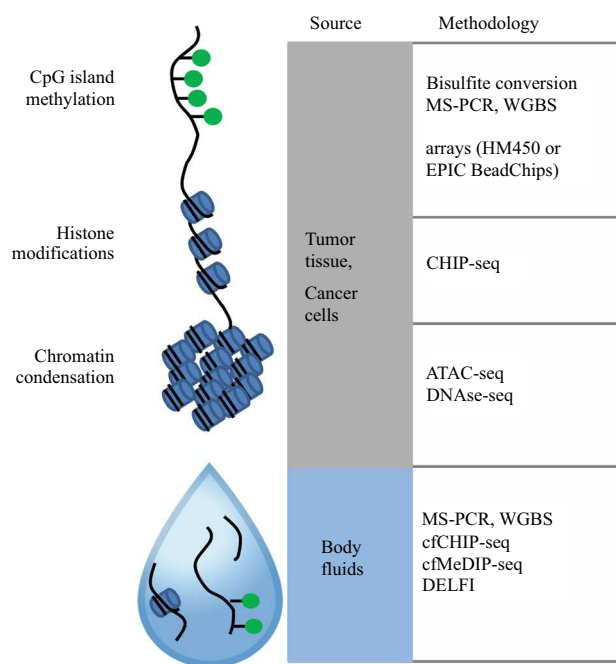


FIG. 2 DNA methylation and histone modifications as epigenetic marks and the corresponding methodologic approaches. The DNA methylation of CpG dinucleotides represses transcriptional activity. Chromatin condensation, typically regulated by post-translational modifications of histones, is another important determinant of gene expression. Various analytical strategies allow for targeted or genome-wide analyses of epigenetic marks. A common strategy used to analyze DNA methylation relies on DNA conversion by sodium bisulfite. Unmethylated cytosine (but not its methylated counterpart) is converted to uracil, which is recognized as thymine in subsequent reactions. Amplification by PCR and sequencing then can be used to perform targeted or genome-wide analyses of DNA methylation (methylation-specific PCR assay [MS-PCR] and whole-genome bisulfite sequencing [WGBS]). Array-based technologies constitute an accessible technique for genome-wide methylation analyses and have been used in The Cancer Genome Atlas (TCGA) (HM450). Chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing (CHIP-seq) can be used to explore the post-translational modifications of histones. To explore chromatin accessibility for research purposes in cells and tissues, DNase-seq (DNase I hypersensitive sites sequencing) and ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin) approaches can be used. A recent development is the possibility of analyzing epigenetic marks in body fluids using cell-free DNA (cfDNA). Most studies to date perform targeted analyses using MS-PCR to analyze DNA methylation of cfDNA from either serum or saliva. A smaller number of studies recently have reported the use of the cfMeDIP-seq or ChIP-Seq strategies using the serum of cancer patients. Another promising strategy based on measuring the size of cfDNA fragments in the serum (DNA evaluation of fragments for early interception [DELFI]) was recently reported. This strategy is based on low-coverage sequencing of the cfDNA released by cancer cells in the blood because DNA packaging modulates the sensitivity of the genome to fragmentation. These new approaches offer the exciting prospect of noninvasive genome-wide exploration of tumor epigenetics, but their use has not been reported in oral squamous cell carcinoma (OSCC)

Importantly, research in epigenetics is a burgeoning field, with several studies and recent technical developments (e.g., the study of cfDNA fragmentation).⁴² The coming years promise to bring a deeper understanding concerning the extent of epigenetic alterations in OSCC and OPML. This knowledge could pave the way to a better, noninvasive biological diagnosis of oral cancer, with practical implications in the monitoring of OPML and in defining of surgical indications.

STAGING OF OSCC BEFORE SURGERY

Early-stage disease (i.e., small tumors without prominent extension to lymph nodes) represent about 30% to 40% of all tumors of the oral cavity.¹ Oral squamous cell carcinomas have a recognized propensity to form node micrometastases that can be missed by imaging.¹ Accurately staging the cN0 OSCC is essential in order to avoid the need of using heavy adjuvant radio(chemo)therapy after an initially planned curative surgery.⁴³ An accurate diagnosis ruling out node invasion also might be useful in the choice between elective neck dissection (END) and clinical surveillance.⁴⁴ Preoperative tumor imaging based on computed tomography (CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI), and positron emission tomography (PET) scan is used, but its discriminative power is not absolute.⁴³ The most recent TNM classification recognizes DOI as a useful parameter, although the discussion is ongoing regarding how it should be combined with imaging and which cutoff would best predict the nodal risk.^{45,46}

Genomic alterations and genome instability are reported in multiple studies to be associated with nodal invasion.⁴⁷⁻⁴⁹ In a recent study, Biswas et al.⁴⁸ defined the following set of genomic OSCC features linked to nodal extension: somatic hotspot mutations in *TP53* and *CASP8* genes, rare germline mutations in *BRCA2* and *FAT1* genes, mutations in DNA repair and mitotic G2-M pathways, and chromosomal instability. Using this information, the authors were able to classify most OSCCs correctly according to nodal metastasis (89% with nodal metastasis vs 80% without nodal metastasis).⁴⁸ Interestingly, cfDNA released by HNSCC was used by other authors to track copy-number alterations (CNAs) and genomic instability with the purpose of predicting their nodal status.⁴⁹ A CNA analysis of cfDNA, expressed as an index had a positive predictive value of 90% for the detection of nodal metastases,⁴⁹ suggesting its possible interest in the clinical setting.

Gene-expression signatures reflecting nodal invasion also have been proposed in this context.⁵⁰⁻⁵² Mes et al.⁵² reported a 22-gene expression signature for the diagnosis of nodal extension in cT1-T2N0 OSCC. The performance of

this signature was analyzed by qPCR and shown to have a negative predictive value (NPV) of 84%, (i.e., close to the NPV required to accurately identify patients for whom END might be superfluous). According to their study, using such a signature may theoretically lead to a two-thirds decrease in END in cT1-T2N0 OSCC, replacing it with surveillance.⁵² More recently, the potential use of miRNA profiling also has been explored. Yi Ping Liu et al.⁵³ identified a 4-miRNA expression signature predicting nodal metastasis with an AUC of 0.88, suggesting its potential clinical utility.

Overall, all these studies show that gene expression and miRNA signatures can accurately distinguish N0 from N^{+ve} OSCC. However, the extent to which these signatures are portable under the conditions of a clinical diagnosis remains to be shown (i.e., upon analysis of small biopsy samples obtained before surgery). Prospective studies are required to validate their use and to address, for example, the possibility of choosing surveillance over END based on tumor genomics.

Another potential application of genomics might be in the assessment of tumor surgical resectability. Currently, the assessment of tumor resectability depends on the surgeon's experience, tumor site and size, previous treatments, and the patient's operability. This initial step of surgical practice does not take into account tumor biology (i.e., pattern of growth, inflammation, grading).⁵⁴ Using data from TCGA, we reported a three-gene expression signature unrelated to the TNM but associated with the presence of positive SMs in resected tongue tumors.⁵⁵ Use of this signature to examine a set of tumors microscopically showed an invasive growth pattern characterized by the presence of immature cancer cells growing as trabeculae, a pattern that might have been missed by initial tumor imaging.⁵⁵ Based on this study, we suggest that analyzing tumor biology with genomics might help in the assessment of tongue tumor resectability.⁵⁵ Although it is unclear at this stage whether tumor biology also is important for other sites of the oral cavity, we suggest that genomics might potentially be useful in determining the nature and extent of the surgical procedure for locally advanced OSCC.⁵⁴ For example, analyzing the propensity of OSCC to invade bone tissue could be useful in determining the extent of mandible resection in case of bone extension.⁵⁴

PREDICTING POSTOPERATIVE RISK IN LOCALLY ADVANCED TUMORS

Locally advanced oral cavity tumors (i.e., large tumors [T3T4] ± node involvement) are the most frequent clinical presentation of OSCC.¹ The main determinants that guide the choice of postoperative adjuvant therapy are the SM

status, the number and size of metastatic lymph nodes, and the presence of ENE.¹ Other criteria such as the PNI and DOI also are important,^{1,2} but assessment of the postoperative risk nevertheless remains challenging. It currently is difficult to predict which patients are most likely to benefit from intense adjuvant therapy or, conversely, from therapeutic de-escalation.

Molecular margin analysis (i.e., assessment of the macroscopically normal area of the mucosa after tumor resection) might improve the pathologic diagnosis.⁵⁶ Various genomic alterations, ranging from single nucleotide mutations to epigenetic alterations, are detected in the histologically normal area of the oral mucosa after an apparently successful surgical resection.⁵⁶ Detection of single nucleotide mutations in *TP53* was for the first time suggested to be useful in the seminal study by Brennan et al.⁵⁷ and later confirmed in an independent study.⁵⁸ Microsatellite alterations also were used to track the origin of local OSCC recurrence with R0-clear SMs.⁵⁹ Molecular margin analysis based on mutation/microsatellite analyses was instrumental in exploring the contribution of residual cancer cells/mucosal fields with preneoplastic changes to local relapse/secondary primary tumors.⁶⁰

The practical application of molecular margin analysis awaits more studies to establish the genomic alterations present in the morphologically normal oral mucosa. The fact that some of these alterations might be detected in wide pre-malignant fields poses questions regarding the optimal sampling protocols to be used. It also complicates the interpretation of molecular SM analysis.⁵⁶

Despite the practical limitations encountered with genomics in the detection of cancer cells within SMs, an increasing number of studies point to the peri-tumoral region as a source of interesting biological information. For example, Liu et al.⁶¹ analyzed SMs to explore the occurrence of microsatellite instability (MSI) in OSCC. An MSI^{+ve} status was detected in 55% of OSCCs, and it was associated with a sevenfold increased risk of local recurrence during a 2-year follow-up period.⁶¹ The biological rationale behind this instability currently is unknown considering that the canonical MSI syndromes produced by defective DNA mismatch repair are rarely found in OSCC.⁶² Nevertheless, detecting microsatellite alterations (either in the tumor or in the peri-tumoral area) might be of interest as an adjunct to prediction of the risk for recurrence and potentially the response of OSCC to immune checkpoint blockers.⁶³ Other studies analyzing gene expression⁶⁴ or specific patterns of DNA methylation⁶⁵ from SMs found that this information potentially predicted a higher risk of postoperative recurrence in patients with R0-clear margins.

Analysis of the tumor itself also is emerging as a valuable source of information to refine risk prediction. For example, the presence of high-risk *TP53* mutations

(identified with the Evolutionary Action (EA) scoring system)⁶⁶ or higher intra-tumor genetic heterogeneity (scored with the mutant allele tumor heterogeneity (MATH) system)⁶⁷ offers exciting perspectives for the identification of aggressive OSCC. The study of PNI provides an example of the power of functional genomics in the assessment of the postoperative risk for OSCC.

Perineural growth and tumor extension along nerve tracts are a frequent pathologic finding in OSCC.⁶⁸ Although PNI is recognized as an aggressive tumor determinant, its pathologic diagnosis is poorly standardized, and morphologic criteria might not be the most accurate reflection of the underlying biology.⁶⁹ Using gene expression data available from TCGA, we constructed a PNI-associated gene-expression signature that we used for a standardized molecular diagnosis in this cohort.⁷⁰ Interestingly, this PNI signature was found to predict post-surgical recurrence in locally advanced HNSCC in the absence of the strongest risk factors (SM or ENE), raising the interesting possibility that it might be an independent contributor to post-surgical recurrence⁷⁰ (Fig. 3).

The study by Schmidt et al.⁷¹ further demonstrates the interest of functional genomics for risk assessment in HNSCC by showing that the expression status of only a few genes ($n = 7$) linked to tumor radiobiology, including genes involved in hypoxia-signaling, predicts postoperative recurrence of locally advanced HNSCC treated with radio(chemo)therapy.⁷¹ Importantly, functional genomics allows the rapid transposition of the most recent research results, from studies exploring genome repair, cellular heterogeneity, cell death regulation, and the like to clinical practice.⁷² The transposition of these tools to the clinic nevertheless awaits validation in independent cohorts and prospective clinical trials.

MEASURING MINIMAL RESIDUAL DISEASE AND OPTIMIZING THE LONGITUDINAL MONITORING OF OSCC

Despite the use of curative treatments, locally advanced OSCCs frequently recur either locally or at distant sites.¹ The concept of measuring minimal residual disease (MRD) was first popularized in oncohematology as a strategy to anticipate cancer recurrence by tracking histologically undetectable cancer cells. Multiple minimally invasive analyses commonly denoted as “liquid biopsies” could be used in this context. In this review, we do not examine the approaches being developed based on the isolation and analysis of circulating tumor cells (CTC) and exosomes.^{73,74} Instead, we focus on analyzing cfDNA/RNA

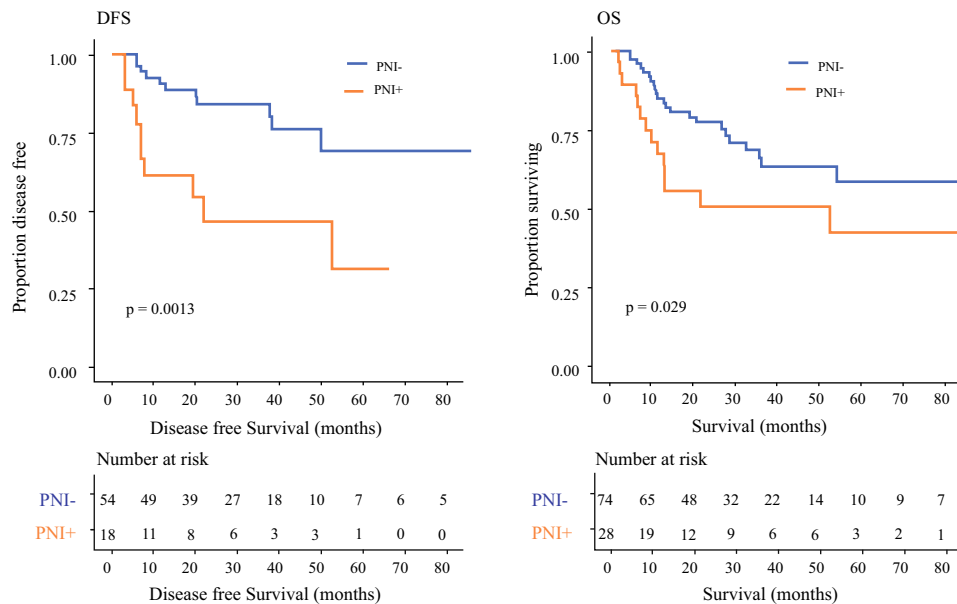


FIG. 3 A perineural invasion (PNI) gene expression profile identifies oral squamous cell carcinoma (OSCC) prone to recurrence. Kaplan–Meier analyses of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in low to intermediate risk OSCC ($n = 102$ from TCGA) are based on the presence or absence of the PNI gene expression profile,

as defined in Saidak et al.⁷⁰ Tumors with low to intermediate risk are defined as T1/2 N2 or T3 N0-2, without extracapsular spread or surgical margins (SMs). Patients are divided into positive/negative PNI gene expression profile groups based on the average z for 26 PNI genes, with the cutoff at 0

shed by tumors as a strategy raising considerable interest for MRD/longitudinal monitoring of OSCC due to the extreme sensitivity of molecular biology techniques.^{75,76}

Compared with the analyses of conventional biopsies, liquid biopsies based on cfDNA/RNA detection are non-invasive and permit repeated sampling during the course of the disease. They also may reflect the cellular heterogeneity of the tumor more accurately than conventional biopsies.⁷⁶

The practical approaches used to analyze cfDNA shed from tumors can be classified into targeted or tumor-agnostic approaches depending on prior knowledge of the tumor mutational status.⁷⁶ The study by Wang et al.⁷⁷ was the first to establish the principle of cfDNA detection by NGS in HNSCC. Using targeted analysis of only a few genes (*TP53*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *NOTCH1*), the authors were able to establish the tumor “fingerprint” and later track the corresponding mutations of cfDNA in the blood and saliva of 63 HPV-negative HNSCC patients.⁷⁷ Tumor-derived cfDNA was detected in all patients with OSCC (80% of plasma samples and 100% of saliva samples).⁷⁷ Interestingly, cfDNA was detected as early as 19 months before recurrence in the saliva and plasma from one surgically treated patient, providing a proof of principle that sensitive and specific detection of cfDNA is possible in OSCC.⁷⁷

The detection of cfDNA in plasma offers interesting perspectives for the detection of MRD and optimizes longitudinal monitoring of HNSCC. However, the studies reported to date are descriptive and based on the follow-up evaluation of a limited number of patients with different tumor stages and primary locations.^{78,79} Nucleic acid analyses of saliva might be more sensitive and better suited for the follow-up evaluation of OSCC in the context of curative therapy, as suggested by the study of Wang et al.⁷⁷ Monitoring postoperative variations in the levels of miRNA in saliva might be useful, as suggested for example with miR-423-5p.²⁶

Recently, the prospect of monitoring tumor suppressor gene methylation in oral rinses using a highly sensitive approach of droplet digital PCR also was suggested by Fung et al.⁸⁰ In this interesting study examining DNA methylation of three genes (*PAX5*, *EDNRB*, and *DCC*) in 50 HNSCC cases (mostly OSCC), the authors observed decreased levels of methylated cfDNA in saliva after surgery. Importantly, a rebound in at least one of the three markers preceded 80% of the local recurrence cases.⁸⁰ Further prospective analyses of tumor cfDNA/RNA in saliva are eagerly awaited considering their possibly superior sensitivity in the monitoring of OSCC.

PREDICTING THE EFFICACY OF MEDICAL TREATMENTS

Therapeutic Targeting of Oncogenic Signaling

Systemic therapies typically are prescribed in the context of recurrent/metastatic HNSCC.^{1,2} This review examines the possible application of therapeutic targeting to the perioperative context in OSCC. As recently discussed in detail elsewhere, neoadjuvant treatments do not confer a benefit in terms of survival, but their application for selected patients might be of interest in the context of organ preservation to facilitate tumor resection, or as a way to reduce local or distant recurrence and facilitate treatment deintensification.⁸¹

Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR), became the first targeted therapy with proven efficacy against HNSCC.^{1,2} A recent phase 1b study describes the good tolerability of neoadjuvant cetuximab given 3–4 weeks before scheduled surgery in HNSCC.⁸² The use of cetuximab, however, illustrates the complexity of therapeutic targeting because its efficacy as a single agent is modest and there are no validated predictive biomarkers.^{1,2} Recent progress in understanding EGFR regulation suggests that better therapeutic stratification might be within reach based on analysis of the abundance of EGFR ligand mRNA rather than EGFR itself.⁸³

Analysis of somatic mutations and CNA might offer other opportunities.^{6–8,84} For example, mutations and amplification of the *PIK3CA* gene are present in one-third of OSCCs (Table 1) and provide a rationale for counteracting PI3K/mTOR-signaling.⁸⁵ Findings show that *CCND1* amplification/*CDKN2A* inactivation also are frequent, providing a rationale for targeting regulators of the cell cycle.⁸³ However, interpreting genomic alterations remains a complex task, as illustrated by the existence of multiple rare genomic alterations converging on Notch signaling in HNSCC.⁸⁶ Future molecular studies combining genomics with functional assays (e.g., patient-derived cell lines and organoids) and proteomics likely will help to better predict signaling actionability in cancer cells.⁸⁷ At the same time, the re-purposing of “old” drugs offers exciting perspectives for their future clinical use in OSCC. For example, Hedberg et al.⁸⁸ recently observed that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) might confer a significant therapeutic benefit in tumors carrying an activating mutation in the oncogene *PIK3CA*. If these findings are confirmed in a prospective trial, using NSAIDs might be envisioned as a possible adjuvant against OSCC with an active PI3K pathway.

An important application of the analysis of cfDNA shed by OSCC is the detection of targetable genomic

alterations.^{75,76} Liquid biopsies are ideally suited for this application considering their noninvasive character and the possibility that they might reflect the most active subclone within the tumors.^{75,76} Braig et al.⁸⁹ reported the occurrence of somatic mutations activating the RAS genes (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*) in the cfDNA of 6 of 13 HNSCC patients receiving cetuximab.⁸⁹ The occurrence of these mutations was correlated with disease progression, suggesting their possible contribution to the emergence of resistance to cetuximab.⁸⁹ Depending on new preclinical findings, new second-line therapeutics might be proposed in this setting.⁹⁰ The integration of liquid biopsies into clinical practice awaits prospective clinical trials examining the use of cfDNA to identify potentially actionable gene alterations.

Targeting Immune Checkpoints

An important clinical development of the past decade has been the introduction of immune checkpoint blockers (ICBs).^{91,92} Nivolumab and pembrolizumab, two monoclonal antibodies targeting the interaction between the molecule PD1 (programmed cell death 1) expressed by immune cells and its receptor PD-L1 (programmed cell death 1-ligand 1, *CD274*) present on the surface of cancer cells, are approved for the treatment of recurrent/metastatic HNSCC.^{91,92} To date, PD1-targeting used alone is considered effective for almost 20% of patients with recurrent/metastatic OSCC.^{91,92}

Importantly, the prospect of applying neoadjuvant immunotherapy is raising considerable interest.^{93,94} For primary tumors other than HNSCC, a single dose of immunotherapy can be safely administered before surgery. The presence of the tumor might promote the efficacy of ICBs, perhaps by supplying tumor antigens in the context of immune normalization.^{93,94} In practice and in the context of OSCC, neoadjuvant ICBs might also be helpful for tumor-debulking, eventually facilitating surgical resection and a reduction in adjuvant therapy.

Two recent phase 2 trials examined the use of pembrolizumab⁹⁵ or nivolumab, either alone or in combination with ipilimumab (an ICB targeting cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 [CTLA-4])⁹⁶ in the neoadjuvant context in OSCC. In both studies, a limited number of patients were recruited (22 and 29 OSCC patients, respectively), and the follow-up period did not exceed 1 year.^{95,96} Objective responses were found at an appreciable frequency, leading to tumor downstaging of more than half of OSCC cases in the study by Schoenfeld et al.⁹⁶ Neoadjuvant immunotherapy, administered as one or two cycles 3 weeks before surgery, appears to be safe in OSCC.^{95,96} These two studies challenge the current surgical practice of proposing a rapid upfront resection of OSCC

TABLE 2 An overview of genomics applied to OSCC

Application	Molecule analyzed	Analysis/genomic region examined	Source	References
Oral potentially malignant lesions, early diagnosis of OSCC	DNA	Loss of heterozygosity (3p14 + 9p21)	Lesion	15
	DNA	Loss of heterozygosity + <i>TP53</i> mutation	Lesion-brushing	16
	mRNA	Microarray, pan-genome expression analysis	Lesion	17
	miRNA	qPCR	Oral rinses, saliva	25,26
	Methylated DNA	MS-qPCR, targeted signatures (3 to 13 genes)	Lesion-brushing, saliva	34–38
Tumor staging before surgery	Methylated DNA	cfDNA NGS, over 1 million methylated CpGs	Plasma	39
	DNA	FISH, <i>CCND1</i> amplification	Tumor	47
	DNA	NGS, mutations (somatic & germinal) + CNA	Tumor	48
	DNA	cfDNA NGS, whole genome/shallow sequencing, CNA	Plasma	49
	mRNA	microarray, qPCR, RNA seq NGS	Tumor	50–52,55
	miRNA	RNA seq NGS	Tumor	53
	DNA	PCR + Sanger sequencing, missense mutations in TP53	Surgical margins	57,58
Predicting postoperative risk	DNA	Microsatellite instability	Surgical margins	61
	mRNA	Nanostring/4-gene signature	Surgical margins	64
	Methylated DNA	Quantitative methylation-specific PCR	Surgical margins	65
	DNA	NGS: missense mutations TP53 (EA score), intratumoral heterogeneity (MATH)	Tumor	66,67
	mRNA	NGS/pan-genome expression analysis: PNI signature	Tumor	70
	mRNA	Nanostring/7-gene expression signature	Tumor	71
	DNA	cfDNA NGS, targeted sequencing (<i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>FBXW7</i> , <i>HRAS</i> , and <i>NRAS</i>)	Saliva, plasma	77
	DNA	cfDNA NGS, whole-exome sequencing. droplet digital PCR	Plasma	78,79
	miRNA	qPCR (miR-423-5p)	Saliva	26
	Methylated DNA	Digital droplet MS-qPCR/gene-methylation (<i>PAX5</i> , <i>EDNRB</i> , <i>DCC</i>)	Oral rinses	80
Predicting the efficacy of medical treatments	DNA	NGS, whole-exome sequencing (<i>PIK3CA</i> mutation)–NSAIDs	Tumor	88
	DNA	NGS, targeted sequencing (<i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i>)–cetuximab	Tumor + plasma	89
	DNA	FISH, <i>CD274</i> /PD-L1 amplification	Tumor	98
	DNA + mRNA	NGS, whole-genome analysis (microsatellite instability, Tumor mutational burden, T cell infiltration and cytokine expression profile)	Tumor	99
	DNA + mRNA	NGS, pan-genome expression analysis	Tumor	100
	mRNA	qPCR, (panel of 46 immune genes)	Tumor	101

OSCC, oral squamous cell carcinoma; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; MS-qPCR, methylation-specific qPCR; cfDNA, cell-free DNA; NGS, next-generation sequencing; FISH, fluorescence in situ hybridization; CNA, copy number alteration; cfDNA, cell-free DNA; EA score, evolutionary action score; MATH score, mutant allele tumor heterogeneity score; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs

and emphasize the need to reliably predict the efficacy of ICBs for surgical patients. The immunohistochemical detection of PD-L1 is the only approved analysis in this setting, but this analysis has limited predictive potential

and poses problems in terms of standardization.⁹⁷ A number of genomic analyses could be of predictive interest in this setting including the occurrence of somatic *CD274/PD-L1* gene amplification,⁹⁸ the detection of mismatch

TABLE 3 Some of the challenges ahead for practical application of genomics to OSCC

Challenges	Proposed solutions
Variety of analytical platforms and strategies used.	Quality programs + cross-laboratory concordance assays
Data complexity: new parameters (gene expression profiles, rare variants and mutations, tumor mutational burden, tumor structure and clonality), necessity to integrate with clinical, radiological and histopathological data	Computer approaches and specialized expertise for data-handling and integrative analysis
Cost & investments required	Technical development/rationalization of the implementation
Facilitate translational research and clinical trials	Organization of large collections, with well-annotated material, develop open access

OSCC, oral squamous cell carcinoma

repair deficiency and the tumor mutational load,⁹⁹ and transcriptional signatures that unveil the presence of an active immune cell infiltrate (T cells, M1 macrophages, and the expression of immune checkpoint molecules other than PD-L1).^{100,101} This list is expanding as novel actors within the tumor microenvironment that modulate the tumor response to ICBs are identified, such as B cells or myeloid-derived suppressor cells.¹⁰²

Interestingly, many facets of immunoregulation are amenable to genomics, such as hypoxia/tumor metabolism or microbial metagenomics.¹⁰² Clonal structure, reconstructed from tumor sequencing, also might be interesting.⁶⁷ Besides the difficulty predicting their efficacy, ICBs challenge the usual procedures used for the follow-up evaluation of OSCC patients, as illustrated by the pseudo-progression that can be observed in some patients.⁹¹ To monitor the response of solid tumors treated by ICBs, cfDNA monitoring could be useful,^{103,104} but no studies to date have reported its use in OSCC.

Importantly, an increasing number of patients with recurrent/metastatic OSCC receive concomitant ICBs and radio(chemo)therapy. Several ongoing trials are exploring the existence of possible synergies between “conventional” treatments, particularly radiotherapy, and ICB.^{105–107} Genomics not only may identify biomarkers of individual sensitivity to ICBs, but also may bring a rationale for their combination with radio(chemo)therapy.^{105–107} This exciting prospect calls for a reexamination of the biological determinants of the OSCC response to radio(chemo)therapy beyond the criteria of local control/survival. For example, predicting OSCC sensitivity to apoptosis induced by radio(chemo)therapy might be useful for the identification of tumors likely to benefit from adjuvant protocols combining conventional therapies and ICBs. This research has the potential to change current medical practice for recurrent/metastatic OSCC. It also illustrates how genomics is well-suited to address the complex biology behind tumor response to ICBs.

PERSPECTIVES AND CONCLUSION

Although DNA/RNA sequencing has become widespread,^{10,11} It still is not used in clinical practice for OSCC.¹ As can be seen from our overview of its potential clinical applications (Table 2), genomics is a powerful research tool that has numerous potential clinical applications. A popular application of genomics lies in the definition of homogeneous cohorts of patients before their recruitment in clinical trials, a key step for testing medical treatments against tumors at advanced stages.¹⁰⁸ We anticipate that the clinical application of genomics will expand in the coming years to earlier “surgical” stages of OSCC. Nevertheless, a number of practical challenges remain before genomics can be routinely used in this setting (Table 3). Further research also is necessary to unfold the complex biology of oral tumor development and transform oral oncology into precision medicine/surgery. In the future, exploration of the non-coding genome, the epigenome, and molecular events at a single-cell resolution with cfDNA/RNAI likely will be a source of new minimally invasive biomarkers.

ACKNOWLEDGMENTS Study at our institution is supported by grants obtained from the Ligue contre le Cancer, comité de la Somme. We thank the Amiens University Hospital and la Ligue contre le Cancer, comité de la Somme for financial support. We apologize to the authors of multiple interesting studies not cited in this review due to space limitations.

AUTHOR CONTRIBUTIONS Z.S. and A.G. wrote the initial version of the manuscript; C.L., B.C. and F.C. provided critical comments on the manuscript.

FUNDING Work in our institution is supported by grants obtained from the Ligue contre le Cancer, comité de la Somme.

DISCLOSURE Florian Clatot received honoraria for expert testimony from Merck Serono, MSD, and BMS. The remaining authors have no conflicts of interest.

OPEN ACCESS This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

REFERENCES

- Chow LQM. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2020;382:60–72.
- Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6:92.
- Zhang L, Liu Y, Zheng HJ, et al. The oral microbiota may have influence on oral cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;9:476.
- Zanoni DK, Patel SG. New AJCC: how does it impact oral cancers? *Oral Oncol*. 2020;104:104607.
- Ivaldi E, Di Mario D, Paderno A, et al. Postoperative radiotherapy (PORT) for early oral cavity cancer (pT1–2, N0–1): a review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;143:67–75.
- Hsu PJ, Yan K, Shi H, et al. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2020;102:104552.
- Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:269–82.
- The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517:576–82.
- Gerstung M, Jolly C, Leshchiner I, et al. The evolutionary history of 2658 cancers. *Nature*. 2020;578:122–8.
- Nangalia J, Campbell PJ. Genome sequencing during a patient's journey through cancer. *N Engl J Med*. 2019;381:2145–56.
- Donoghue MTA, Schram AM, Hyman DM, et al. Discovery through clinical sequencing in oncology. *Nat Cancer*. 2020;1:774–83.
- Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018;24:541–50.
- Puram SV, Tirosch I, Parikh AS, et al. Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell*. 2017;171:1611–24.
- Warnakulasuriya S. Oral potentially malignant disorders: a comprehensive review on clinical aspects and management. *Oral Oncol*. 2020;102:104550.
- Zhang L, Poh CF, Williams M, et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles-validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res Phil*. 2012;5:1081–9.
- Graveland AP, Bremmer JF, de Maaker M, et al. Molecular screening of oral precancer. *Oral Oncol*. 2013;49:1129–35.
- Foy JP, Bertolus C, Ortiz-Cuaran S, et al. Immunological and classical subtypes of oral premalignant lesions. *Oncoimmunology*. 2018;7:e1496880.
- Carenzo A, Serafini MS, Roca E, et al. Gene expression-clustering and selected head and neck cancer gene signatures highlight risk probability differences in oral premalignant lesions. *Cells*. 2020;9:1828.
- Gurizzan C, Lorini L, Bossi P. Oral potentially malignant disorders: new insights for future treatment. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020. <https://doi.org/10.1097/moo.0000000000000695>.
- Momen-Heravi F, Bala S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer. *Cell Signal*. 2018;42:134–43.
- Pedersen NJ, Jensen DH, Lelkaitis G, et al. MicroRNA-based classifiers for diagnosis of oral cavity squamous cell carcinoma in tissue and plasma. *Oral Oncol*. 2018;83:46–52.
- Rapado-González Ó, López-López R, López-Cedrún JL, et al. Cell-free microRNAs as potential oral cancer biomarkers: from diagnosis to therapy. *Cells*. 2019;8:1653.
- Yap T, Pruthi N, Seers C, et al. Extracellular vesicles in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1197.
- MacLellan SA, Lawson J, Baik J, Guillaud M, Poh CF, Garnis C. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med*. 2012;1:268–74.
- Yap T, Seers C, Koo K, et al. Noninvasive screening of a microRNA-based dysregulation signature in oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Oral Oncol*. 2019;96:113–20.
- Romani C, Salviato E, Paderno A, et al. Genome-wide study of salivary miRNAs identifies miR-423-5p as promising diagnostic and prognostic biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Theranostics*. 2021;11:2987–99.
- Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, et al. Current insights into oral cancer epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2018;19:670.
- Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. 2019;571:489–99.
- Leal A, Sidransky D, Brait M. Tissue and cell-free DNA-based epigenomic approaches for cancer detection. *Clin Chem*. 2020;66:105–16.
- Towle R, Truong D, Hogg K, Robinson WP, Poh CF, Garnis C. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. *Oral Oncol*. 2013;49:1033–42.
- Krishnan NM, Dhas K, Nair J, et al. A minimal DNA methylation signature in oral tongue squamous cell carcinoma links altered methylation with tumor attributes. *Mol Cancer Res*. 2016;14:805–19.
- Milutin GN, Ivan S, Ksenija B, et al. DNA methylome distinguishes head and neck cancer from potentially malignant oral lesions and healthy oral mucosa. *Int J Mol Sci*. 2020;21:6853.
- Lim Y, Sun CX, Tran P, Punyadeera C. Salivary epigenetic biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas. *Biomark Med*. 2016;10:301–13.
- Schussel J, Zhou XC, Zhang Z, et al. EDNRB and DCC salivary rinse hypermethylation has a similar performance as expert clinical examination in discrimination of oral cancer/dysplasia versus benign lesions. *Clin Cancer Res*. 2013;19:3268–75.
- Arantes LMRB, de Carvalho AC, Melendez ME, et al. Validation of methylation markers for diagnosis of oral cavity cancer. *Eur J Cancer*. 2015;51:632–41.
- Cao Y, Green K, Quattlebaum S, et al. Methylated genomic loci encoding microRNA as a biomarker panel in tissue and saliva for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics*. 2018;10:43.
- Liyanage C, Wathupola A, Muraleetharan S, Perera K, Punyadeera C, Udagama P. Promoter hypermethylation of tumor-suppressor genes p16INK4a, RASSF1A, TIMP3, and PCQAP/MED15 in salivary DNA as a quadruple biomarker panel for early detection of oral and oropharyngeal cancers. *Biomolecules*. 2019;9:148.

38. Gissi DB, Morandi L, Colella G, et al. Clinical validation of 13-gene DNA methylation analysis in oral brushing samples for detection of oral carcinoma: an Italian multicenter study. *Head Neck*. 2021. <https://doi.org/10.1002/hed.26624>.
39. Liu MC. Transforming the landscape of early cancer detection using blood tests: commentary on current methodologies and future prospects. *Br J Cancer*. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01223-7>.
40. Shen SY, Singhanian R, Fehringer G, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature*. 2018;563:579–83.
41. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, CCGA Consortium. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol*. 2020;31:745–59.
42. Cristiano S, Leal A, Phallen J, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*. 2019;570:385–9.
43. Vassiliou LV, Acero J, Gulati A, et al. Management of the clinically N0 neck in early-stage oral squamous cell carcinoma (OSCC): an EACMFS position paper. *J Craniomaxillofac Surg*. 2020;48:711–8.
44. Feng Z, Cheng A, Alzahrani S, et al. Elective neck dissection in T1N0M0 oral squamous cell carcinoma: when is it necessary? *Oral Maxillofac Surg*. 2020;78:2306–15.
45. Wu K, Wei J, Liu Z, et al. Can pattern and depth of invasion predict lymph node relapse and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2019;19:714.
46. Shan J, Jiang R, Chen X, et al. Machine learning predicts lymph node metastasis in early-stage oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2020;78:2208–18.
47. Noorlag R, Boeve K, Witjes MJH, et al. Amplification and protein overexpression of cyclin D1: predictor of occult nodal metastasis in early oral cancer. *Head Neck*. 2017;39:326–33.
48. Biswas NK, Das C, Das S, et al. Lymph node metastasis in oral cancer is strongly associated with chromosomal instability and DNA repair defects. *Int J Cancer*. 2019;145:2568–79.
49. Schirmer MA, Beck J, Leu M, et al. Cell-free plasma DNA for disease stratification and prognosis in head and neck cancer. *Clin Chem*. 2018;64:959–70.
50. van Hooff SR, Leusink FK, Roepman P, et al. Validation of a gene expression signature for assessment of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:4104–10.
51. Wang W, Lim WK, Leong HS, et al. An eleven-gene molecular signature for extra-capsular spread in oral squamous cell carcinoma serves as a prognosticator of outcome in patients without nodal metastases. *Oral Oncol*. 2015;51:355–62.
52. Mes SW, Te Beest D, Poli T et al. Prognostic modeling of oral cancer by gene profiles and clinicopathological co-variables. *Oncotarget*. 2017;8:59312–23.
53. Yi Ping Liu K, Yuqi Zhu S, Brooks D, et al. Tumor microRNA profile and prognostic value for lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oncotarget*. 2020;11:2204–15.
54. Galmiche A, Saidak Z, Bouaoud J, et al. Genomics and precision surgery for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2020;481:45–54.
55. Saidak Z, Pascual C, Bouaoud J, et al. A three-gene expression signature associated with positive surgical margins in tongue squamous cell carcinomas: predicting surgical resectability from tumour biology? *Oral Oncol*. 2019;94:115–20.
56. Li MM, Puram SV, Silverman DA, et al. Margin analysis in head and neck cancer: state of the art and future directions. *Ann Surg Oncol*. 2019;26:4070–80.
57. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995;332:429–35.
58. Pena Murillo C, Huang X, Hills A, et al. The utility of molecular diagnostics to predict recurrence of head and neck carcinoma. *Br J Cancer*. 2012;107:1138–43.
59. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3607–3613.
60. Gleber-Netto FO, Braakhuis BJM, Triantafyllou A, et al. Molecular events in relapsed oral squamous cell carcinoma: recurrence vs secondary primary tumor. *Oral Oncol*. 2015;51:738–44.
61. Liu SA, Wang CC, Jiang RS, Wang WY, Lin JC. Genetic analysis of surgical margins in oral cavity cancer. *Br J Surg*. 2018;105:e142–9.
62. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, Kim TM, Park PJ. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*. 2017;8:15180.
63. Ciloni M, Locatello LG, Novelli L, Gallo O. The mismatch repair system (MMR) in head and neck carcinogenesis and its role in modulating the response to immunotherapy: a critical review. *Cancers Basel*. 2020;12:3006.
64. Reis PP, Tokar T, Goswami RS, et al. A 4-gene signature from histologically normal surgical margins predicts local recurrence in patients with oral carcinoma: clinical validation. *Sci Rep*. 2020;10:1713.
65. Hayashi M, Wu G, Roh JL, et al. Correlation of gene methylation in surgical margin imprints with locoregional recurrence in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2015;121:1957–65.
66. Sandulache VC, Michikawa C, Kataria P, et al. High-risk TP53 mutations are associated with extranodal extension in oral cavity squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24:1727–33.
67. Mroz EA, Patel KB, Rocco JW. Intratumor heterogeneity could inform the use and type of postoperative adjuvant therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2020;126:1895–904.
68. Saidak Z, Lailler C, Clatot F, et al. Perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma: background, mechanisms, and prognostic implications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2020;28:90–5.
69. Schmitz LB, Beesley LJ, Russo N, et al. Redefining perineural invasion: integration of biology with clinical outcome. *Neoplasia*. 2018;20:657–67.
70. Saidak Z, Clatot F, Chatelain D, et al. A gene expression profile associated with perineural invasion identifies a subset of HNSCC at risk of post-surgical recurrence. *Oral Oncol*. 2018;86:53–60.
71. Schmidt S, Linge A, Zwanenburg A, et al. Development and validation of a gene signature for patients with head and neck carcinomas treated by postoperative radio(chemo)therapy. *Clin Cancer Res*. 2018;24:1364–74.
72. Budach V, Tinhofer I. Novel prognostic clinical factors and biomarkers for outcome prediction in head and neck cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2019;20:e313–26.
73. Yang WY, Feng LF, Meng X, et al. Liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma: circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20:1213–27.
74. Ebnoether E, Muller L. Diagnostic and therapeutic applications of exosomes in cancer with a special focus on head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Int J Mol Sci*. 2020;21:4344.

75. Corcoran RB, Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. *N Engl J Med.* 2018;379:1754–65.
76. Galot R, Machiels JH. Current applications and challenges of circulating tumor DNA (ctDNA) in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Cancer Treat Rev.* 2020;85:101992.
77. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med.* 2015;7:293ra104.
78. Galot R, van Marcke C, Helaers R, et al. Liquid biopsy for mutational profiling of locoregional recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2020;104:104631.
79. Egyud M, Sridhar P, Devaiah A, et al. Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck.* 2019;41:1351–8.
80. Fung SYH, Chan KCA, Wong EWY, et al. Droplet digital PCR of tumor suppressor methylation in serial oral rinses of patients with HNSCC. *Head Neck.* 2021. <https://doi.org/10.1002/hed.26647>.
81. Haddad RI, Posner M, Hitt R, et al. Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: role, controversy, and future directions. *Ann Oncol.* 2018;29:1130–40.
82. Shayan G, Kansy BA, Gibson SP, et al. Phase Ib study of immune biomarker modulation with neoadjuvant cetuximab and TLR8 stimulation in head and neck cancer to overcome suppressive myeloid signals. *Clin Cancer Res.* 2018;24:62–72.
83. Huang C, Chen L, Savage SR, et al. Proteogenomic insights into the biology and treatment of HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.12.007>.
84. Choonoo G, Blucher AS, Higgins S, et al. Illuminating biological pathways for drug-targeting in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2019;14:e0223639.
85. Day TA, Shirai K, O'Brien PE, et al. Inhibition of mTOR-signaling and clinical activity of rapamycin in head and neck cancer in a window of opportunity trial. *Clin Cancer Res.* 2019;25:1156–64.
86. Loganathan SK, Schleicher K, Malik A, et al. Rare driver mutations in head and neck squamous cell carcinomas converge on NOTCH signaling. *Science.* 2020;367:1264–9.
87. Chia S, Low J-L, Zhang X, et al. Phenotype-driven precision oncology as a guide for clinical decisions one patient at a time. *Nat Commun.* 2017;8:435.
88. Hedberg ML, Peyser ND, Bauman JE, et al. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs predicts improved patient survival for PIK3CA-altered head and neck cancer. *J Exp Med.* 2019;216:419–27.
89. Braig F, Voigtlaender M, Schieferdecker A, et al., Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:42988–95.
90. Gilardi M, Wang Z, Proietto M, et al. Tipifarnib as a precision therapy for HRAS-mutant head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther.* 2020;19:1784–96.
91. Cramer JD, Burtneß B, Le QT, et al. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16:669–83.
92. Cramer JD, Burtneß B, Ferris RL. Immunotherapy for head and neck cancer: recent advances and future directions. *Oral Oncol.* 2019;99:104460.
93. O'Donnell JS, Hoefsmit EP, Smyth MJ, et al. The promise of neoadjuvant immunotherapy and surgery for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2019;25:5743–51.
94. Topalian SL, Taube JM, Pardoll DM. Neoadjuvant checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Science.* 2020;367:eaax0182.
95. Uppaluri R, Campbell KM, Egloff AM, et al. Neoadjuvant and adjuvant pembrolizumab in resectable locally advanced human papillomavirus-unrelated head and neck cancer: a multicenter, phase II trial. *Clin Cancer Res.* 2020;26:5140–52.
96. Schoenfeld JD, Hanna GJ, Jo VY, et al. Neoadjuvant nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in untreated oral cavity squamous cell carcinoma: a phase 2 open-label randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2020;6:1563–70.
97. Rasmussen JH, Lelkaitis G, Håkansson K, et al. Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2019;120:1003–6.
98. Straub M, Drecoll E, Pfarf N, et al. CD274/PD-L1 gene amplification and PD-L1 protein expression are common events in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncotarget.* 2016;7:12024–34.
99. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science.* 2018;362:eaar3593.
100. Chen YP, Wang YQ, Lv JW, et al. Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *Ann Oncol.* 2019;30:68–75.
101. Lecerf C, Kamal M, Vacher S, et al. Immune gene expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer.* 2019;121:210–23.
102. Petitprez F, Meylan M, de Reyniès A, et al. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies. *Front Immunol.* 2020;11:784.
103. Bratman SV, Yang SYC, Iafolla MAJ, et al., Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer.* 2020. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-0096-5>.
104. Hofman P, Heeke S, Alix-Panabières C, et al. Liquid biopsy in the era of immuno-oncology: is it ready for prime-time use for cancer patients? *Ann Oncol.* 2019;30:1448–59.
105. Karam SD, Raben D. Radioimmunotherapy for the treatment of head and neck cancer. *Lancet Oncol.* 2019;20:e404–16.
106. Szturcz P, Vermorken JB. Management of recurrent and metastatic oral cavity cancer: raising the bar a step higher. *Oral Oncol.* 2020;101:104492.
107. Miyauchi S, Kim SS, Pang J, et al. Immune modulation of head and neck squamous cell carcinoma and the tumor microenvironment by conventional therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2019;25:4211–23.
108. Murciano-Goroff YR, Taylor BS, Hyman DM, et al. Toward a more precise future for oncology. *Cancer Cell.* 2020;37:431–42.

Résumé

Les Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou (CETC) représentent les septièmes tumeurs les plus fréquentes au niveau mondial en 2020. Si les perspectives thérapeutiques ont évolué favorablement ces dix dernières années, la recherche de biomarqueurs utiles pour la stratification thérapeutique reste un enjeu de taille pour ces tumeurs. En outre, l'induction d'une immunité adaptative antitumorale apparaît comme un mécanisme de plus en plus important pour l'efficacité des thérapeutiques approuvées dans les CETC. Dans cette perspective, l'étude des interactions entre cellules tumorales et cellules immunitaires du microenvironnement tumoral (MT) est incontournable. Plusieurs thérapies anticancéreuses ont été rapportées pour induire la mort des cellules tumorales par ferroptose, une nécrose régulée dépendante du fer survenant lors d'un stress oxydant non résolu par la cellule. Nous nous sommes intéressés dans la première partie de nos travaux à la possibilité d'exploiter la ferroptose dans les CETC positifs au Papillomavirus Humain (CETC HPV+ve), les CETC HPV+ve montrant habituellement un état de stress oxydant supérieur aux CETC négatifs pour l'HPV (CETC HPV-ve). Nous avons mis en évidence une expression faible de SLC7A11, transporteur essentiel de la cellule pour la synthèse du glutathion inhibiteur du stress oxydant, dans les CETC HPV+ve par rapport aux CETC HPV-ve *in silico*. *In vitro*, nous avons mis en évidence une vulnérabilité supérieure à la ferroptose induite par l'érastine dans les lignées de CETC exprimant les protéines transformantes E6/E7 de l'HPV par rapport à leurs lignées parentales. Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons étudié la régulation de l'expression du ligand PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) par différentes thérapies approuvées dans les CETC. L'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et inflammatoires du MT est en effet responsable en partie de l'inactivation fréquente des cellules T cytotoxiques du MT, et représente donc un obstacle pour l'induction de l'immunité adaptative antitumorale. Nous avons mis en évidence une régulation spécifique de PD-L1 par le 5-fluorouracile (5-FU) dépendante de la réponse aux dommages de l'ADN ainsi que de la voie JAK / STAT.

Mots-clefs : Cancers Epidermoïdes de la Tête et du Cou, Microenvironnement Tumoral, Ferroptose, Papillomavirus Humain, SLC7A11, 5-fluorouracile, PD-L1.

Abstract

Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC) were the seventh most frequent tumors worldwide in 2020. Although therapeutic perspectives have evolved favorably over the last ten years, the search for useful biomarkers for therapeutic stratification remains a major challenge for these tumors. In addition, the induction of antitumor adaptive immunity seems to be an increasingly important mechanism for the efficacy of approved therapies in HNSCC. In this perspective, the study of the interactions between tumor cells and immune cells of the tumor microenvironment (TM) is essential. Several anticancer therapies have been reported for the induction of tumor cell death by ferroptosis, an iron-dependent regulated necrosis that occurs during unresolved oxidative stress in the cell. In the first part of our work we focused on the possibility of exploiting ferroptosis in Human Papillomavirus positive HNSCC (HPV+ve HNSCC), which usually show higher oxidative stress than HPV negative HNSCC (HPV-ve HNSCC). Using *in silico* analyses, we observed low expression of SLC7A11, an essential transporter in the cell for the synthesis of glutathione, an inhibitor of oxidative stress, in HPV+ve HNSCC compared to HPV-ve HNSCC. *In vitro*, HNSCC cell lines expressing HPV E6/E7 transforming proteins showed higher sensitivity to erastin-induced ferroptosis compared to their parental cell lines. In the second part of our work, we studied the regulation of PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) expression by different approved therapies in HNSCC. The expression of PD-L1 by tumor and inflammatory cells of the TM is indeed partly responsible for the frequent inactivation of cytotoxic T cells of the TM, and thus represents an obstacle for the induction of antitumor adaptive immunity. We observed a specific regulation of PD-L1 by 5-fluorouracil (5-FU) that was dependent on the DNA damage response and the JAK / STAT pathway.

Keywords: Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, Tumor Microenvironment, Ferroptosis, Human Papillomavirus, SLC7A11, 5-fluorouracil, PD-L1.