



HAL
open science

Cavéoline-1 prédictive de la métastase et de la rechute locorégionale des cancers des voies aérodigestives supérieures

Aude Jehl

► **To cite this version:**

Aude Jehl. Cavéoline-1 prédictive de la métastase et de la rechute locorégionale des cancers des voies aérodigestives supérieures. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ070 . tel-03902829

HAL Id: tel-03902829

<https://theses.hal.science/tel-03902829v1>

Submitted on 16 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ – ED414

Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, CNRS UMR7021

Faculté de Pharmacie d'ILLKIRCH – GRAFFENSTADEN

THÈSE

présentée par :

Aude JEHL

soutenue le : **13 octobre 2022**

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

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Cavéoline-1 prédictive de la métastase et de la rechute locorégionale des cancers des voies aérodigestives supérieures

THÈSE dirigée par :

Madame MARTIN Sophie

Dr., Université de Strasbourg, CNRS UMR7021

RAPPORTEURS :

Madame DUFIES Maeva

Dr., Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillessement (IRCAN), Nice

Monsieur POULAIN Laurent

Dr., Université de Caen Normandie, Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, INSERM U1086 ANTICIPE

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame PONS Françoise

Pr., Université de Strasbourg, CNRS UMR7199 CAMB

A tous ceux qui m'entourent et m'accompagnent,

A ma famille,

A mes amis

« La grande affaire et la seule qu'on doive avoir, c'est de vivre heureux. »

« Plus les hommes seront éclairés, et plus ils seront libres. »

Voltaire

« La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés. »

« Ayez le culte de l'esprit critique. »

Louis PASTEUR

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour l'évaluation de ce travail de thèse. J'adresse mes remerciements au Docteur Maeva DUFIES pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail de thèse et d'en être l'un des rapporteurs. Mes remerciements vont également au Professeur Françoise PONS pour avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse. Je remercie sincèrement le Docteur Laurent POULAIN pour l'évaluation de ce travail de thèse en qualité de rapporteur.

Je remercie ensuite le Professeur Yves MELY, directeur du laboratoire de Bioimagerie et Pathologies CNRS UMR7021 et le Docteur Monique DONTENWILL, directrice de l'équipe Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques pour leur accueil durant ces trois dernières années.

Merci au Docteur Sophie MARTIN d'avoir permis ces travaux et pour l'encadrement de mon stage de master 2 ainsi que la direction de ce travail de thèse.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont accompagnée depuis l'initiation de mes études supérieures à la Faculté de Pharmacie jusqu'à cette thèse d'Université. Merci à vous pour vos conseils et le partage de votre expérience.

Tout particulièrement, un grand merci à Hélène BURCKEL pour ton aide depuis mon stage de master 2. Tu as toujours été là pour me soutenir et me coacher notamment pour la préparation de mon master 2 et le concours de l'Ecole doctorale. Tes conseils avisés et ton oreille attentive ont été très précieux pour moi, je te remercie pour ta générosité et le partage de ton expérience. Merci également à Carole MURA pour tout ce que tu m'as appris notamment en culture cellulaire. Tu as toujours pris le temps de me montrer et de m'expliquer les choses avec beaucoup de patience et de bienveillance, avec Hélène vous faites une équipe de choc, sur qui on peut toujours compter !

Merci à Anne CASSET et Carole RONZANI pour votre partage d'expérience autour des enseignements. Après avoir été votre étudiante, j'ai eu l'opportunité de passer de l'autre côté du pupitre durant ces trois dernières années. J'ai eu la chance d'évoluer à vos côtés, et de prendre de l'assurance grâce à vos conseils plus qu'avisés, un grand merci à vous.

Un petit mot pour Françoise, je voulais vous remercier pour vos conseils durant mon parcours universitaire et pour votre confiance lorsque vous m'avez proposé d'intégrer votre équipe pour les enseignements durant mes trois années de thèse.

Merci à Emmanuel BOUTANT et Eléonore REAL pour votre aide lors de la préparation du concours de l'Ecole doctorale qui m'a ainsi permis d'obtenir le financement de ces trois années de recherche, merci également pour votre bonne humeur.

Merci à Waisse WAISSI, tu as pris le temps tout au long de mon stage de master 2 pour m'initier à la recherche en cancérologie tout en partageant avec moi ton expérience de la clinique.

Merci à Mickaël BURGUY pour tes conseils et le partage de ton expertise médicale.

Je remercie également le Professeur Françoise PONS et le Docteur Alain JUNG pour m'avoir accompagnée durant ces trois années en tant que membres de mon comité de suivi de thèse, merci pour vos conseils.

Merci aux membres de l'équipe : Sophie FOPPOLO, pour ton support technique particulièrement performant et ton oreille attentive ; Véronique BRUBAN-SCHANN, pour tes conseils ; Nelly ETIENNE-SELOUM ; Ingrid BARTHEL ; sans oublier Melissa MESSE et Chloé BERNHARD pour votre optimisme et votre sourire.

Merci également à Alice CARIOU et Alexia CHARAMEL, vous avez été d'une grande aide durant votre court passage au laboratoire, je vous souhaite tout le meilleur pour votre parcours futur.

Une petite ligne particulièrement à vous monsieur Philippe ANDRE, voisin de bureau qui tout au long de ces trois dernières années avait eu des petites phrases de sympathie et d'encouragement, merci.

A toi également Laurence CHOULIER, merci d'avoir pris le temps d'échanger avec moi autant sur le plan scientifique que personnel, j'étais ravie de pouvoir te côtoyer durant ces trois années.

A ma binôme de stage, ma co-doctorante et dorénavant mon amie. Chère Omblin CONRAD, depuis notre première rencontre nous avons mis en exergue une belle complicité autant sur le plan professionnel que personnel. Je te remercie pour tous nos échanges intellectuels autour de nos projets respectifs, des conseils que tu as pu me donner et de tes avis précieux. L'évolution et l'aboutissement de cette thèse et de ce travail scientifique n'auraient pas été les mêmes sans toi. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Evidemment je ne vous oublie pas, vous mes acolytes de la première heure, mes copains de fac et de la *Dream team* ! Encore une thèse où vous apparaissez dans les remerciements, mais promis cette fois c'est la dernière (je pense). Merci à Marie HENTZ, Sophie ROUVIER, Florent FOISSET, Thomas KUNTZEL, Sophie LINCK, Catherine KAPPEL, Thibault STAERLE, Céline STUTZ, Juliette KAEFFER, Elisabeth KREMER, Lucille BOUSINIERE, Céline FORTIER, Catherine NACHBAR, Inès SCHMIDT-MORGENROTH, Cynthia MEYER et Alexandre ROSENZWEY. Merci d'être toujours là dans les bons mais aussi les moins bons moments, merci pour vos encouragements et vos oreilles attentives, merci à certains d'entre vous pour votre avis sur ce manuscrit.

A toi Marie, depuis notre rencontre sur les bancs de la fac une réelle complicité s'est installée entre nous et une vraie amitié a pu naître. Je peux toujours compter sur toi malgré la distance qui nous sépare désormais. Merci pour ton aide plus que précieuse et tes encouragements, je te souhaite de s'épanouir dans ta profession et tout le meilleur pour ton avenir personnel qui promet d'être rempli de très beaux moments.

Un petit mot tout particulier pour toi Sophie, tu m'as montré ce qu'est le vrai métier du pharmacien, aux côtés de ses patients afin d'exercer toujours dans leur intérêt et celui de la santé publique. Tu as fait partie de mon jury pour ma thèse d'exercice afin de devenir l'une de tes consœurs. Et aujourd'hui une belle amitié nous lie. Je te remercie pour ta présence même à distance, pour tes petits mots réconfortants, ton optimisme indéfectible et ta bonne humeur que tu partages sans compter. Je te souhaite tout le meilleur dans ta prochaine aventure à trois.

Un grand merci à tous les membres de ma famille et tout particulièrement à mes parents. Depuis toujours vous m'accompagnez dans mes projets et ponctuez mon chemin par vos conseils, il est évident que sans vous à mes côtés je n'aurais pas pu réaliser ce parcours universitaire aujourd'hui clôturé par cette deuxième thèse. Je ne serais pas devenue la femme que je suis aujourd'hui sans les valeurs que vous m'avez inculquées depuis mon enfance. Je vous remercie d'être toujours là pour moi et cette fois, promis, les études c'est fini !

A toi ma petite sœur, nous voilà aujourd'hui toutes les deux en fin de parcours universitaire, et quels parcours ! Tu peux être fière de ce que tu as réalisé et de ce que tu es en train de construire. Je te souhaite tout le meilleur pour ton avenir.

A mes grands-parents, Mamie & Papi Caline et Mamie & Papi Chouquette ; merci pour votre présence, pour votre aide, pour vos petits plats et petits biscuits réconfortants. Sans vous à mes côtés je ne serais pas devenue la personne que je suis aujourd'hui. Vous avoir près de moi est une véritable chance que je savoure chaque jour.

Merci à toi, toi qui te reconnaitras à nouveau, toi qui a su m'épauler durant ces dernières années, m'accompagner dans mes projets fous. Après la pharma et une première thèse, tu as trouvé la patience de me supporter tout au long de ces trois dernières années bien chargées jusqu'à l'aboutissement final par cette thèse, cette dernière thèse cette fois... Désormais, place à de nouveaux projets, à de nouvelles aventures et à un avenir prometteur à tes côtés !

Et enfin, merci à mes boules de poils à quatre pattes qui égayent mon quotidien.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I) EPIDEMIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	2
1) INCIDENCE ET MORTALITE DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	2
2) SURVIE DES PATIENTS ATTEINTS D'UN CANCER DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	8
3) FACTEURS ETIOLOGIQUES DECRITS POUR LES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	11
a- <i>Consommation de tabac.....</i>	<i>12</i>
b- <i>Consommation d'alcool.....</i>	<i>15</i>
c- <i>Noix d'arec et chique de Bétel.....</i>	<i>16</i>
d- <i>Polluants atmosphériques.....</i>	<i>18</i>
e- <i>Agents pathogènes : Papilloma virus humain.....</i>	<i>20</i>
f- <i>Autres facteurs étiologiques</i>	<i>25</i>
II) LES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES : CANCEROGENESE ET CLASSIFICATIONS MOLECULAIRES.....	29
1) DU TISSU SAIN VERS UNE TUMEUR PRIMITIVE DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	29
a- <i>Altérations cytogénétiques dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou : aneuploidie et anomalies chromosomiques</i>	<i>31</i>
b- <i>Altérations épigénétiques.....</i>	<i>34</i>
c- <i>Les anti-oncogènes et oncogènes.....</i>	<i>34</i>
d- <i>Anomalies cellulaires.....</i>	<i>37</i>
e- <i>Microenvironnement tumoral</i>	<i>39</i>
2) EVOLUTION DE LA TUMEUR PRIMITIVE VERS LA METASTASE	46
a- <i>Invasion cellulaire</i>	<i>47</i>
b- <i>Intravasation et migration intravasculaire.....</i>	<i>49</i>
c- <i>Survie cellulaire</i>	<i>50</i>
d- <i>Extravasation.....</i>	<i>51</i>
e- <i>Colonisation du site secondaire.....</i>	<i>53</i>
3) CLASSIFICATIONS MOLECULAIRES DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES ISSUES DE LA LITTERATURE	53
a- <i>Classifications moléculaires à visée pronostique des cancers des voies aérodigestives supérieures.....</i>	<i>53</i>
b- <i>Classifications moléculaires à visée pronostique et prédictive des cancers des voies aérodigestives supérieures</i>	<i>60</i>
c- <i>Classifications moléculaires des cancers des voies aérodigestives supérieures à visée prédictive et identification de nouvelles cibles thérapeutiques.....</i>	<i>63</i>

III) DIAGNOSTIC ET PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	70
1) DIAGNOSTIC DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	70
2) CLASSIFICATION TNM ET ARBRES DECISIONNELS DE PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	75
3) PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES EN FRANCE	77
<i>a- Chirurgie.....</i>	<i>78</i>
<i>b- Radiothérapie.....</i>	<i>79</i>
<i>c- Chimiothérapie.....</i>	<i>83</i>
<i>d- Thérapie ciblée</i>	<i>88</i>
<i>e- Immunothérapie</i>	<i>92</i>
4) ESSAIS CLINIQUES SUR LES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	94
<i>a- Chimiothérapies.....</i>	<i>94</i>
<i>b- Thérapies ciblées</i>	<i>96</i>
<i>c- Immunothérapie</i>	<i>102</i>
IV) LA CAVEOLINE-1 DANS LES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	106
1) LES CAVEOLES ET LA CAVEOLINE-1	106
2) LA CAVEOLINE-1 COMME BIOMARQUEUR DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE DANS LES CANCERS	112
3) IMPLICATION DE LA CAVEOLINE-1 DANS LES CANCERS	114
<i>a- Cavéoline-1 et survie cellulaire.....</i>	<i>114</i>
<i>b- Cavéoline-1 et angiogénèse.....</i>	<i>116</i>
<i>c- Cavéoline-1 et effet Warburg inversé</i>	<i>116</i>
4) LA CAVEOLINE-1 IMPLIQUEE DANS LA RESISTANCE AUX TRAITEMENTS UTILISES DANS LES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	121
<i>a- Implication de l'expression de la cavéoline-1 dans la résistance aux traitements anti-tumoraux.....</i>	<i>121</i>
<i>b- Implication de la cavéoline-1 dans la résistance aux thérapies anti-EGFR</i>	<i>122</i>
5) ROLE DE LA CAVEOLINE-1 DANS LA REGULATION DES MORTS CELLULAIRES PROGRAMMEES IMPLIQUEES DANS LA RESISTANCE AUX TRAITEMENTS ANTI-TUMORAUX	131
<i>a- Autophagie.....</i>	<i>131</i>
<i>b- Ferroptose.....</i>	<i>137</i>
OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE.....	148
MATERIELS ET METHODES	151
I) LA CULTURE CELLULAIRE	152
1) LES LIGNEES CELLULAIRES COMMERCIALES DES CANCERS DES VOIES AERODIGESTIVES SUPERIEURES	152
2) MATERIEL TISSULAIRE HUMAIN : LE MODELE TUMOROÏDE	154
3) ÉCHANTILLONS DE TISSUS HUMAINS	159
4) TRANSFECTIONS	161
<i>a- Surexpression de la cavéoline-1</i>	<i>161</i>
<i>b- Inhibition d'expression d'EREG et surexpression de YAP.....</i>	<i>161</i>

II) TRAITEMENTS.....	162
1) RADIOTHERAPIE	162
2) CETUXIMAB	163
3) RSL-3	163
4) METFORMINE	163
III) TESTS PHENOTYPIQUES	164
1) TEST DE SURVIE CLONOGENIQUE A LONG TERME	164
a- <i>Test de survie clonogénique à long terme après traitement par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison cétuximab et radiothérapie.....</i>	<i>164</i>
b- <i>Test de survie clonogénique à long terme après transfection</i>	<i>165</i>
c- <i>Test de survie clonogénique à long terme après transfection et traitement au cétuximab en association ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine</i>	<i>165</i>
2) TEST DE CROISSANCE CELLULAIRE	166
a- <i>Croissance cellulaire après traitement par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison cétuximab et radiothérapie.....</i>	<i>167</i>
b- <i>Croissance cellulaire après transfection et/ou traitement.....</i>	<i>168</i>
c- <i>Croissance cellulaire des tumeurs.....</i>	<i>169</i>
3) ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE ET DE L' APOPTOSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX	169
4) TESTS SUR LE METABOLISME CELLULAIRE	170
a- <i>Test de mesure de la production d'ATP (ATP rate assay)</i>	<i>171</i>
b- <i>Test de stress glycolytique (Glycolytic Stress Test).....</i>	<i>173</i>
c- <i>Test du stress mitochondrial (Mito Stress Test).....</i>	<i>174</i>
5) TEST D'EVASION CELLULAIRE	176
6) TESTS DE MISE EN EVIDENCE DU PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE PAR FERROPTOSE	178
a- <i>Test de mise en évidence des ions ferreux intracellulaires : FerroOrange, Dojindo.....</i>	<i>178</i>
b- <i>Test de mise en évidence de lipides peroxydés : Liperfluo, Dojindo.....</i>	<i>179</i>
IV) TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	180
1) WESTERN BLOT	180
2) RT-QPCR	181
V) ANALYSES STATISTIQUES.....	184
RESULTATS.....	185
ARTICLE SCIENTIFIQUE N°1 PUBLIE LE 18 JUIN 2021 DANS <i>CANCERS</i>.....	186
CAV1 / EREG / YAP AXIS IN THE TREATMENT RESISTANCE OF CAV1 –EXPRESSING HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA.....	186
ARTICLE SCIENTIFIQUE N°2, 2022 <i>SOUMIS</i>	221
BLOCKING EREG / GPX– 4 SENSITIZES HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA TO CETUXIMAB THROUGH FERROPTOSIS INDUCTION	221
CONCLUSION GENERALE.....	263

Liste des figures

Figure 1 : Représentation transversale des voies aérodigestives supérieures, d'après une représentation proposée par (Ligue contre le Cancer, 2009).....	2
Figure 2 : Incidence globale des cancers de la tête et du cou à travers le monde en 2020, d'après les données du dernier rapport du GLOBOCAN (International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2022)	4
Figure 3 : Mortalité des cancers de la tête et du cou à travers le monde en 2020, d'après les données du dernier rapport du GLOBOCAN (International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2022)	5
Figure 4 : Mortalité par cancers de la lèvre, de la cavité orale et du pharynx sur la période 2004-2008 selon les départements en France métropolitaine et les départements d'Outre-Mer, infographie réalisée par (Institut National du Cancer, 2011)	6
Figure 5 : Survie à 1 et 5 ans pour des patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx, selon l'âge du patient (Guizard et al., 2020).....	8
Figure 6 : Survie à 1, 5, 10 ans pour les patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx, selon l'année du diagnostic (Guizard et al., 2020).....	9
Figure 7 : Survie à 1 et 5 ans pour les patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx, selon l'année du diagnostic (1990, 2005 et 2015) et par âge au moment du diagnostic (Guizard et al., 2020)	9
Figure 8 : Survie à 1, 5 et 10 ans représentée selon l'année du diagnostic et l'âge du patient (Guizard et al., 2020)	10
Figure 9 : Facteurs de risque des cancers des voies aérodigestives supérieures (HPV-négatifs) (Johnson et al., 2020).....	11
Figure 10 : Exposition au tabagisme dans la population française en 2013, données publiées au sein du bulletin épidémiologique hebdomadaire (Bonaldi et al., 2016)	13
Figure 11 : Photographies de la noix d'Arec et de la chique de Bétel utilisées à Taïwan (Chen et al., 2008)	16
Figure 12 : Taux d'incidence des cancers des voies aérodigestives supérieures au sein de la population taïwanaise entre 1991 et 2003 (Chen et al., 2008)	17
Figure 13 : Taux de mortalité des cancers des voies aérodigestives supérieures dans la population taïwanaise entre 1995 et 2006 (Chen et al., 2008)	17
Figure 14 : Mécanismes envisagés dans l'induction du stress oxydatif, des dommages et de l'inflammation par les particules de pollution atmosphérique (Danielsen et al., 2011).....	20
Figure 15 : Incidence des cancers liés à l'infection par les Papilloma virus humains, en France, en 2015, selon le sexe (Institut National du Cancer, 2018)	21
Figure 16 : Infection par un Papilloma virus humain et cancérogénèse des voies aérodigestives supérieures (Johnson et al., 2020)	23
Figure 17 : Infection d'une cellule par un Papilloma virus humain et par l'Epstein Barr virus – infographie proposée par (Blanco et al., 2021)	24
Figure 18 : Nombre de cancers liés à la défavorisation sociale en France en 2012, selon la localisation anatomique (Bryere et al., 2017)	27
Figure 19 : Evolution du tissu sain vers un carcinome des voies aérodigestives supérieures (Pai and Westra, 2009)	30

<i>Figure 20 : Altérations génomiques décrites dans la cancérogénèse des voies aérodigestives supérieures (Johnson et al., 2020)</i>	<i>33</i>
<i>Figure 21 : Description de la progression du cycle cellulaire dans les cancers ORL (Leemans et al., 2018).....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 22 : Antigènes tumoraux décrits dans les cancers de la tête et du cou (von Witzleben et al., 2020).....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 23 : Régulation de la glycolyse dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (Kumar, 2017).....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 24 : Etapes conduisant de la tumeur primitive vers la métastase (Reymond et al., 2013).....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 25 : Description de l'étape d'intravasation dans le processus métastatique (Reymond et al., 2013)</i>	<i>49</i>
<i>Figure 26 : Description de l'étape d'extravasation dans le processus métastatique (Reymond et al., 2013).....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 27 : Survie observée dans les groupes des cancers des voies aérodigestives supérieures proposés par la classification de (Chung et al., 2004)</i>	<i>54</i>
<i>Figure 28 : Survie sans récurrence dans les sous-types des cancers des voies aérodigestives supérieures proposés par les travaux de (Walter et al., 2013)</i>	<i>55</i>
<i>Figure 29 : Survie pour les cinq sous-types des cancers des voies aérodigestives supérieures décrits dans les travaux de (Keck et al., 2015).....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 30 : Survie observée pour les sous-groupes des cancers des voies aérodigestives supérieures décrits dans les travaux de (De Cecco et al., 2015).....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 31 : Résumé des caractéristiques des patients des trois sous-types de l'étude sur les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou présentés dans les travaux de (Zhang et al., 2021)</i>	<i>62</i>
<i>Figure 32 : Caractéristiques cliniques, pathologiques et étiologiques associées à chaque groupe de signature mutationnelle décrit dans les travaux de (Su et al., 2017).....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 33 : Gènes altérés et voies à visée thérapeutique dans les cancers de la tête et du cou mis en évidence par les travaux de (Su et al., 2017)</i>	<i>65</i>
<i>Figure 34 : Chronologie des manipulations de la collecte des échantillons au séquençage de l'ARN messager en cellule unique (Puram et al., 2017).....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 35 : Hétérogénéité des cellules non malignes dans les cancers de la tête et du cou (Puram et al., 2017)</i>	<i>67</i>
<i>Figure 36 : Nouvelle classification des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou proposée par les travaux de (Puram et al., 2017).....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 37 : Affiche de la campagne Make sense proposée par l'European Head and Neck Society (European Head and Neck Society, 2022)</i>	<i>71</i>
<i>Figure 38 : Effets des rayonnements ionisants en radiothérapie – infographie proposée par (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), 2019)</i>	<i>80</i>
<i>Figure 39 : Mécanisme d'action du 5-fluorouracile (Longley et al., 2003)</i>	<i>85</i>
<i>Figure 40 : Encombrement stérique du récepteur du facteur de croissance épidermique par le cétuximab proposé dans les travaux de (S. Li et al., 2005)</i>	<i>89</i>
<i>Figure 41 : Signalisation nucléaire du récepteur du facteur de croissance épidermique (Bazzani et al., 2018)</i>	<i>90</i>
<i>Figure 42 : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC médiée par le cétuximab (Ferris et al., 2018)</i>	<i>91</i>
<i>Figure 43 : Mécanismes d'action du pembrolizumab et du nivolumab (Elmusrati et al., 2021).....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 44 : Inhibiteurs et anticorps monoclonaux ciblant les voies des ErbB et du VEGFR présentés dans les travaux de (Goel et al., 2022)</i>	<i>96</i>

<i>Figure 45 : Inhibiteurs et anticorps monoclonaux ciblant les voies ALK1 et Cycline D utilisés dans les essais cliniques sur les cancers des voies aérodigestives supérieures présentés au sein de la revue de (Goel et al., 2022)</i>	<i>101</i>
<i>Figure 46 : Molécules inhibitrices exprimées sur les cellules cancéreuses et immunitaires infiltrées dans le microenvironnement de la tumeur (Goel et al., 2022)</i>	<i>102</i>
<i>Figure 47 : Représentation schématique d'une caveolae et imagerie par microscopie électronique issues des travaux de (Parton and Simons, 2007)</i>	<i>106</i>
<i>Figure 48 : Représentation schématique de la cavéoline-1 insérée au niveau de la membrane plasmique proposée par (Goetz et al., 2008)</i>	<i>108</i>
<i>Figure 49 : Protéines interagissant avec la cavéoline-1 (Goetz et al., 2008)</i>	<i>109</i>
<i>Figure 50 : Mécanosensation et remodelage de la matrice extracellulaire (Parton and del Pozo, 2013)</i>	<i>110</i>
<i>Figure 51 : Organisation des domaines membranaires et cavéoline-1 (Goetz et al., 2008)</i>	<i>110</i>
<i>Figure 52 : Trafic membranaire des cavéolines proposé par (Parton and del Pozo, 2013)</i>	<i>111</i>
<i>Figure 53 : Expression des cavéolines-1 et 2 au sein de 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines (Ravid et al., 2006) ..</i>	<i>112</i>
<i>Figure 54 : Modifications de l'expression de la cavéoline-1 lors de la cancérogénèse (Ravid et al., 2006)</i>	<i>113</i>
<i>Figure 55 : Modulation de la transcription de la COX-2 et de la survivine par la cavéoline-1 (Rodriguez et al., 2009)</i>	<i>114</i>
<i>Figure 56 : Intrication de la cavéoline-1 et de l'Akt dans les fibroblastes de la fibrose pulmonaire idiopathique (Xia et al., 2010)</i>	<i>115</i>
<i>Figure 57 : Influence de l'expression de la cavéoline-1 sur le phénotype métabolique des fibroblastes associés à la tumeur (Martinez-Outschoorn et al., 2015)</i>	<i>117</i>
<i>Figure 58 : Effets de la diminution de l'expression de la cavéoline-1 (Martinez-Outschoorn et al., 2015)</i>	<i>118</i>
<i>Figure 59 : Expression de la cavéoline-1 dans des échantillons de tissus humains issus de patients atteints d'un cancer des voies aérodigestives supérieures (Jung et al., 2015)</i>	<i>119</i>
<i>Figure 60 : Implication de l'expression de la cavéoline-1 dans divers cancers (Chen and Che, 2014)</i>	<i>120</i>
<i>Figure 61 : Récepteurs, ligands et dimères de la famille des ErbB (Hynes and Lane, 2005)</i>	<i>124</i>
<i>Figure 62 : Mécanisme de dimérisation de l'EGFR induit par un ligand (S. Li et al., 2005)</i>	<i>125</i>
<i>Figure 63 : Dimérisation de l'EGFR après liaison à un ligand (Huang et al., 2021)</i>	<i>125</i>
<i>Figure 64 : Représentation schématique des principaux sites d'autophosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (Hynes and Lane, 2005)</i>	<i>126</i>
<i>Figure 65 : Voies de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique (Scaltriti and Baselga, 2006)</i>	<i>127</i>
<i>Figure 66 : Découvertes sur la transduction du signal des récepteurs tyrosine kinases et la thérapie des cancers (Gschwind et al., 2004)</i>	<i>129</i>
<i>Figure 67 : Implication du récepteur orphelin 1 de type tyrosine kinase dans la formation des cavéoles et la transmission des signaux intracellulaires (Yamaguchi et al., 2016) (Yamaguchi et al., 2019)</i>	<i>130</i>
<i>Figure 68 : Mécanistique de la mort cellulaire programmée par autophagie (Dikic and Elazar, 2018)</i>	<i>133</i>
<i>Figure 69 : Historique des découvertes des morts cellulaires de 1978 à 2018 (Tang et al., 2019)</i>	<i>138</i>
<i>Figure 70 : Mécanismes impliqués dans le processus de mort cellulaire par ferroptose (Greco et al., 2021)</i>	<i>139</i>
<i>Figure 71 : Mécanismes intervenant dans la mort cellulaire par ferroptose dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Raudenská et al., 2021)</i>	<i>142</i>
<i>Figure 72 : Mécanisme de la ferroptose induite par le RSL3 et renforcée par le cétuximab (Jiawen Yang et al., 2021)</i>	<i>143</i>

<i>Figure 73 : Implication de la metformine dans l'induction de la ferroptose (Jingjing Yang et al., 2021)</i>	<i>145</i>
<i>Figure 74 : Imagerie par microscopie optique des lignées cellulaires CAL27, CAL33 et SCC9.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 75 : Schématisation du protocole de mise en culture des pièces de résection chirurgicale de patients.....</i>	<i>157</i>
<i>Figure 76 : Programmation des tests de survie clonogénique à long terme pour les cellules traitées par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison des deux.....</i>	<i>164</i>
<i>Figure 77 : Programmation des tests de survie clonogénique à long terme pour les cellules transfectées.....</i>	<i>165</i>
<i>Figure 78 : Programmation des tests de survie clonogénique à long terme pour les cellules traitées par du cétuximab en associant ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine</i>	<i>165</i>
<i>Figure 79 : Exemple de résultats des tests clonogéniques de la lignée cellulaire des SCC9.....</i>	<i>166</i>
<i>Figure 80 : Programmation des tests de croissance cellulaire pour les cellules traitées par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison des deux.....</i>	<i>167</i>
<i>Figure 81 : Exemple du masque de confluence créé avec le logiciel Incucyte Zoom[®] pour la lignée cellulaire des SCC9.....</i>	<i>167</i>
<i>Figure 82 : Programmation des tests de croissance cellulaire pour les cellules transfectées et/ou traitées par du cétuximab en association ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine.....</i>	<i>168</i>
<i>Figure 83 : Photographie des plaques dédiées à l'analyse de flux extracellulaire XFp (SeaHorse Bioscience, Agilent) (Agilent Technologies, 2018).....</i>	<i>171</i>
<i>Figure 84 : Profil des mesures des taux de consommation d'oxygène (OCR) et d'acidification du milieu (ECAR) – Infographie de (Agilent Technologies, 2018)</i>	<i>172</i>
<i>Figure 85 : Schéma représentatif du test Agilent Seahorse XFp Real-Time Glycolytic Stress Test – Infographie de (Agilent Technologies, 2017).....</i>	<i>174</i>
<i>Figure 86 : Mécanisme d'action des réactifs utilisés dans le test du stress mitochondrial, Mito Stress Test – Infographie de (Agilent Technologies, 2019)</i>	<i>175</i>
<i>Figure 87 : Profil du test Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test, montrant les paramètres clés de la fonction mitochondriale – Infographie de (Agilent Technologies, 2019).....</i>	<i>175</i>
<i>Figure 88 : Programmation des tests d'évasion cellulaire pour les cellules traitées par du cétuximab et/ou de la radiothérapie et pour des cellules transfectées.....</i>	<i>176</i>
<i>Figure 89 : Exemple d'un résultat d'un test d'évasion avec une sphère formée à partir de la lignée cellulaire des CAL33..</i>	<i>177</i>
<i>Figure 90 : Sonde FerroOrange, Dojindo pour la détection des ions ferreux intracellulaires (Dojindo Molecular Technologies, 2019).....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 91 : Molécule Liperfluo proposée par Dojindo dans l'étude de la ferroptose par mise en évidence des lipides peroxydés (Dojindo Molecular Technologies, 2020).....</i>	<i>179</i>
<i>Figure 92 : Schéma récapitulatif des conclusions apportées par l'article scientifique Cav1 / EREG / YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Burgy and Jehl et al., 2021).....</i>	<i>220</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau I : Taux de survie à cinq ans de 1982 à 2006 (Pulte and Brenner, 2010)</i>	<i>3</i>
<i>Tableau II : Principales caractéristiques des sous-groupes de cancers des voies aérodigestives supérieures identifiés par les travaux de (De Cecco et al., 2015).....</i>	<i>57</i>
<i>Tableau III : Signes cliniques selon la localisation anatomique du cancer des voies aérodigestives supérieures (Haute Autorité de Santé (HAS), 2009).....</i>	<i>72</i>
<i>Tableau IV : Examens d'imagerie à réaliser lors du bilan initial selon la localisation anatomique du cancer ORL (Haute Autorité de Santé (HAS), 2009).....</i>	<i>74</i>
<i>Tableau V : Définition du stade du cancer des voies aérodigestives supérieures selon la classification TNM 8^{ème} édition (Anticancer Fund and European Society for Medical Oncology, 2015).....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau VI : Récapitulatif des caractéristiques des pièces opératoires recueillies pour la réalisation de tumoroïdes en cours de culture au sein du laboratoire de Bioimagerie et Pathologies.....</i>	<i>159</i>
<i>Tableau VII : Récapitulatif des caractéristiques des patients et des échantillons prélevés (Burgy and Jehl et al., 2021).....</i>	<i>160</i>
<i>Tableau VIII : Anticorps utilisés durant le travail de recherche des trois années de thèse</i>	<i>181</i>
<i>Tableau IX : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR durant le travail de recherche des trois années de thèse ..</i>	<i>183</i>

Liste des annexes

<i>Annexe 1 : Publication en 3ème auteur – miR-30a/e-3p restores tumor immunity in HNSCC by targeting TGFβ/BMP/PD-L1, en cours de finalisation</i>	<i>320</i>
<i>Annexe 2 : Communication poster présentée lors des Journées du Campus d’Illkirch primée par les membres du jury les 23 et 24 mai 2022, Faculté de Pharmacie, Illkirch – Strasbourg</i>	<i>322</i>
<i>Annexe 3 : Communication poster présentée lors du 4ème congrès SUNRISE (The 4th SUNRISE Meeting : Tumor Solid Cancer Stem Cell Network) primée par les membres du jury les 08 et 09 juin 2022, Institut Curie, Paris</i>	<i>326</i>
<i>Annexe 4 : Liste des publications scientifiques et des communications orales réalisées durant les trois années de thèse..</i>	<i>328</i>

Liste des abréviations

A

AA : Acide Arachidonique

ACSL : Acyl-CoA synthétases à longue chaîne

ACTA2 : ACTine Alpha 2

ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* (Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)

ADGRE1 : *ADhesion G protein-coupled Receptor E 1* (Récepteur E 1 couplé à la protéine G d'adhésion)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGPI : Acides Gras Polyinsaturés

AJCC : *American Joint Committee on Cancer*

ALAT : ALanine AminoTransférerase

ALDH : ALdehyde DehyHrogénase

ALK : *Anaplastic lymphoma kinase* (Lymphome kinase anaplasique)

ALOX : Arachidonates LipOXygénases

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : *AMP-activated protein Kinase* (Protéine kinase activée par l'AMP)

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARF : *ADP-ribosylation factor 1* (Facteur d'ADP-ribosylation 1)

ARN : Acide RiboNucléique

AREG : AmphiREGuline

ARNlnc : ARN long non codant

ARNm : ARN messager

ASAT : ASpartate AminoTransférerase

ATCC[®] : *American Type Culture Collection*

ATG : *AuTophagy* apparented (Protéines liées à l'autophagie)

ATP : Adénosine TriphosPhate

B

BAX : *Bcl-2-Associated X protein* (Protéine X associée à Bcl-2)

BCR : *B-Cell Receptor* (Récepteurs des cellules B)

BGLAP : *Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein* (Protéine gamma-carboxyglutamate osseuse)

BME : *Basement Membrane Extract* (Extrait de la membrane basale)

BR : *BReast* (Sein)

BSA : *Bovine Serum Albumin* (Albumine sérique bovine)

C

CAF : *Cancer Associated Fibroblasts*

(Fibroblastes associés à la tumeur)

CAL : Centre Antoine Lacassagne

CASP8 : CASPase 8

Cav1 : Cavéoline-1

CBM : *Caveolin-Binding Motif* (Motif de liaison à la cavéoline)

CDK : *Cyclin-Dependent Kinase* (Kinase dépendante des cyclines)

CDKN : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor* (Inhibiteur de kinase cycline-dépendant)

CDH6 : CaDHérine-6

CEA : *CarcinoEmbryonic Antigen* (Antigène carcino-embryonnaire)

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CHRU : Centre Hospitalier Régional

Universitaire

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

CIRC : Centre International de la Recherche sur le Cancer

CLCC : Centre de Lutte Contre le Cancer

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Corps MultiVésiculaires

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

CNS : *Central Nervous System* (Système nerveux central)

CO : *COlon* (Côlon)

CO₂ : Dioxyde de carbone

CODECOH : COnservation D'Eléments du COrps Humain

COX-2 : Cyclo-OXYgénase-2

CPS : *Combined Positive Score* (Score positif combiné)

CSD : *Cav1 scaffolding domain* (Domaine d'échafaudage de la Cav1)

CRB : Centre de Ressources Biologiques

CTA : Cancer Testis Antigen (Antigène testiculaire du cancer)

CTGF : *Connective Tissue Growth Factor* (Facteur de croissance du tissu conjonctif)

CTLA4 : *Cytotoxique-T-Lymphocyte- Antigen 4 protein* (Antigène associé aux lymphocytes T Cytotoxiques-4)

D

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

2-DG : 2-désoxy-D-Glucose

DAG : 1,2-DiAcylGlycérol

DAPK1 : *Death-Associated Protein Kinase 1* (Protéine kinase 1 associée à la mort)

DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern* (Modèle moléculaire associé aux dommages)

DOI : *Depth of invasion* (Profondeur de l'invasion)

DPD : DihydroPyrimidine Déshydrogénase

DPP4 : DiPeptidyl Peptidase 4

E

EBV : Epstein-Barr Virus

ECAR : *ExtraCellular Acidification Rate*
(Taux d'acidification extracellulaire)

ECOG : *Eastern Cooperative Oncology Group*

ED414 : Ecole Doctorale 414

EDI : *European Deprivation Index* (Indice européen de pauvreté)

EGF : *Epithelial Growth Factor* (Facteur de croissance épidermique)

EGFR : *Epithelial Growth Factor Receptor*
(Récepteur du facteur de croissance épidermique)

EHNS : *European Head and Neck Society*
(Société Européenne de la Tête et du Cou)

EIG : Effet Indésirable Grave

EMA : *European Medicines Agency* (Agence européenne du médicament)

EMT : *Epithelial-Mesenchymal Transition*
(Transition épithélio-mésenchymateuse)

ENE : *ExtraNodal Extension* (Extension extra-ganglionnaire)

eNOS : Isoforme endothéliale de la synthèse du monoxyde d'azote

EREG : EpiREGuline

ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinases*
(Kinases régulées par le signal extracellulaire)

ESBS : Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg

F

5-FU : 5-FluoroUracile

Fab : *Fragment Antigen Binding* (Liaison des fragments à l'antigène)

FAK : *Focal Adhesion Kinase* (Kinase d'adhésion focale)

FAP : Fibroblast Activation Protein (Protéine d'activation des fibroblastes)

FCCP : Fluoro-Carbonyl-Cyanide
Phénylhydrazone

FDA : *Food and Drug Administration*
(Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments)

Fe²⁺ : ions ferreux

FGF : *Fibroblast Growth Factor* (Facteur de croissance des fibroblastes)

FGF-BP : *Fibroblast growth factor binding protein* (Protéine de liaison au facteur de croissance des fibroblastes)

FGFR : *Fibroblast Growth Factor Receptor*
(Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes)

FTH1 : *Ferritin Heavy Chain 1* (Chaîne lourde de la ferritine 1)

FTL : *Ferritin Light Chain* (Chaîne légère de la ferritine 1)

G

GDP : Guanosine DiPhosphate

GDR : Groupement De Recherche

GLS1 : GLutaminaSe-1

Glu : Glutamate

GLUT : *Glucose transporter* (Transporteur de glucose)

glycoATP : Glycolytic ATP

glycoPER : *Glycolytic Proton Efflux Rate* (Taux de l'efflux de protons glycolytiques)

GOLPH3 : *GOLgi PHosphoprotein 3*

GPX4 : Glutathion PeroXydase 4

GRB2 : *Growth factor Receptor-Bound protein 2* (Protéine 2 liée aux récepteurs des facteurs de croissance)

GSH : Glutathion

GSSG : Glutathion oxydé

GSVA : *Gene Set Variation Analysis*

GTP : Guanosine TriPhosphate

Gy : Gray

H

1-HOP : 1-HydrOxyPyrene

4-HNE : 4-Hydroxy-2-NonEnal

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HB-EGF : *Heparin-binding EGF-like growth factor* (Facteur de croissance de type EGF lié à l'héparine)

HER : *Human Epidermal growth factor Receptor* (Récepteur du facteur de croissance épidermique humain)

HERV : *Human Endogenous RetroViruses* (Rétrovirus endogènes humains)

HGF : *Hepatocyte Growth Factor* (Facteur de croissance des hépatocytes)

HIF-1 : *Hypoxia Inducible Factor-1* (Facteur 1 inductible par l'hypoxie)

HK-II : HexoKinase II

HLA : *Human Leukocyte Antigen* (Antigène leucocytaire humain)

HMGB : *High Mobility Group Box*

HMGCS2 : 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl Coenzyme A Synthase 2

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPV : *Human Papilloma virus* (Papilloma virus humain)

HSP : *Heat shock proteins* (Protéines de choc thermique)

hTERT : *human TElomerase Reverse Transcriptase* (Téломérase transcriptase inverse humaine)

I

ICAM : *InterCellular Adhesion Molecule*

(Molécule d'adhésion intercellulaire)

ICANS : Institut de Cancérologie Strasbourg Europe

ICGC : *International Cancer Genome Consortium* (Consortium international sur la génomique du cancer)

IDO : Indolamin-2,3-DiOxygénase

IFN : InterFérons

Ig : ImmunoGlobuline

IGF-IR : Insulin-like Growth Factor 1

Receptor (Récepteur de facteur de croissance I analogue à l'insuline)

IL : InterLeukine

INCa : Institut National du Cancer

INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

IP3 : Inositol 1,3,5-triPhosphate

IPF : *Idiopathic Pulmonary Fibrosis* fibrose (Fibrose pulmonaire idiopathique)

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

J

JAK : Janus kinase

K

KDa : kiloDalton

KPS : *Karnofsky Performance Score*

L

LAG-3 : *Lymphocyte-Activation Gene 3* (Gène 3 d'activation des lymphocytes)

LAMP : *Lysosomal-Associated Membrane Protein* (Protéine membranaire associée aux lysosomes)

LC : *Lung Carcinoma* (Carcinome pulmonaire)

LDH-A : Lactate DésHydrogénase A

LE = *LEukemia* (Leucémie)

LIP : *Labile Iron Pool* (Réserve de fer labile)

LKB1 : *Liver Kinase B1* (Kinase B1 du foie)

LOH : *Loss Of Heterozygosity* (Perte d'hétérozygotie)

LOX : *Lipoxygenases*

LOOH : *Lipid peroxides* (péroxydes lipidiques)

LPCAT : LysoPhosphatidylCholine AcylTransférase

M

3-MA : 3-methyladenine

MCT : *MonoCarboxylate Transporter*

(Transporteur de mono-carboxylate)

MAGE : *Melanoma-Associated antiGEn*

(Antigène associé au mélanome)

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

(Protéine kinase activée par les mitogènes)

MDA : MalonDiAldéhyde

ME : *MElanoma* (Mélanome)

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MGMT : 6-O-MéthylGuanine-ADN

MéthylTransférase ou MéthylGuanine

MéthylTransférase

miARN : micro-ARN

mitoATP : ATP mitochondrial

MMP : *Matrix MetalloProteinase*

(Métalloprotéinase matricielle)

MSC : *Mutational Signature Cluster* (Groupe de signature mutationnelle)

MSF : *Migration-Stimulating Factor* (Facteur de stimulation de la migration)

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

(Cible mammalienne de la rapamycine)

MUC1 : *MUCin-1*

MYC : *MYeloCytomatosis*

MYLK : *MYosin Light Chain Kinase* (Kinase de la chaîne légère de la myosine)

N

Na3VO4 : Sodium orthovanodate

NAF : Natriumfluorid

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide

PHosphate

NaPPi : Sodium pyrophosphate tétrabasic decahydrate

NCCD : *Nomenclature Committee on Cell*

Death (Comité sur la nomenclature des mort cellulaires)

NCOA4 : *Nuclear Receptor Coactivator 4*

(Coactivateur des récepteurs nucléaires)

NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B* (Facteur nucléaire kappa B)

NKT : *Natural Killer T* (« Tueur naturel » T)

N-MAD : *N-terminal Membrane Attachment Domain* (Domaine d'attachement membranaire N-terminal)

NNAL : 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol

NNN : N'-NitrosonorNicotine

Nrf2 : *Nuclear factor erythroid2-Related Factor2* (Facteur 2 lié au facteur nucléaire érythroïde-2)

NRGs : *NeuReGulines*

NY-ESO-1 : *New York Esophageal Squamous cell carcinoma-1*

O

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

OCR : *Oxygen Consumption Rate* (Taux de consommation de l'oxygène)

OCT4 : *OCTamer-binding transcription factor4*

ORL : Oto-Rhino-Laryngée

OV : *OVarian* (Ovaire)

P

PAH : PolyAromatic Hydrocarbons

PAI : *Plasminogen Activator Inhibitor*
(Inhibiteur de l'activateur du plasminogène)

PAL : Phosphatases ALcalines

PAS : *Pre-Autophagosomal Structure*
(Structure pré-autophagosomale)

PBS : *Phosphate-Buffered Saline* (Tampon phosphate salin)

PCR : *Polymerase Chain Reaction*
(Amplification en chaîne par polymérase)

PD-1 : *Programmed cell Death protein 1*
(Protéine 1 de la mort cellulaire programmée)

PD-L1 : *Programmed death-ligand 1* (Ligand de mort programmée 1)

PDPN : PoDoPlaNine

PE : *Plating Efficiency* (Efficacité d'ensemencement)

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PKC : Protéine Kinase C

PKM2 : Pyruvate Kinase M2

PLC : PhosphoLipase C

pRb : protéine du Rétioblastome

PR : *PRostate* (Prostate)

PRR : *Pattern Recognition Receptor*
(Récepteur de reconnaissance de forme)

PSMA : *Prostate-Specific Membrane Antigen*
(Antigène de la membrane spécifique de la prostate)

PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*
(Homologue de la phosphatase et de la tensine)

R

RE : Réticulum Endoplasmique

RIPK1 : *Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1* (Protéine kinase 1 interagissant avec les récepteurs à base de sérine/thréonine)

ROR1 : *Receptor tyrosine kinase like Orphan Receptor 1* (Récepteur tyrosine kinase de type Orphan Receptor 1)

ROS : *Reactive Oxygen Species* (Espèces réactives de l'oxygène)

RT-qPCR : *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction* (Transcription

inverse et amplification en chaîne par polymérase quantitative

S

SCC9 : *Squamous Cell Carcinoma-9*

SEER : *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (Surveillance, épidémiologie et résultats finaux)

Ser : Sérine

SF : *Surviving Fraction* (Fraction de survie)

SHC : *Src homology and collagen*

SLC : *SoLute Carrier*

α SMA : *α -Smooth Muscle Actin*

SOD2 : Superoxyde Dismutase

SOS : *Son Of Sevenless*

SPHK1 : *SPHingosine Kinase 1*

SSX : *Synovial Sarcoma X* (Sarcome synoviale X)

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription* (Transducteur et activateur de signaux de transcription)

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

TCR : *T-Cell Receptor* (Récepteurs des cellules T)

TDM : TomoDensitoMétrie

TEM : *Tumour Endothelial Marker* (Marqueur endothélial tumoral)

TEP-scan : Tomographie par Emission de Positons couplée à un scanner

TFR1 : *TransFerrin Receptor 1* (Récepteur 1 de la transferrine)

TGF : *Transforming Growth Factor* (Facteur de croissance transformant)

TKTL1 : *TranKeTolase-Like protein 1* (Protéine 1 de type transcétolase)

TLR3 : *Toll-Like Receptor 3* (Récepteur de type Toll 3)

TNF : Tumor Necrosis Factor (Facteur de nécrose tumorale)

TNM : Tumor, Node, Metastasis

TPS : *Tumor Proportion Score* (Score de proportion tumoral)

TRF : *Telomeric Repeat Factor* (Facteur de répétition télomérique)

Tyr : Tyrosine

U

UGT : Uridine 5'-diphospho-
GlucuronosylTransferase

UMR : Unité mixte de recherche

UN : *UNidentified* (Non identifié)

ULK1 : Unc-51-Like Kinase 1

V

VADS : Voies AéroDigestives Supérieures

VDAC2 : *Voltage-Dependent Anion-selective
Channel protein 2* (Protéine 2 de canal sélectif
anionique dépendante de la tension)

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
(Facteur de croissance de l'endothélium
vasculaire)

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIM : VIMentine

W

WPOI : *Worst Pattern of Invasion* (Pire
modèle d'invasion)

X

XRCC1 : X-Ray Repair Cross
Complementing1

Introduction générale

I) Épidémiologie et facteurs de risque des cancers des voies aérodigestives supérieures

1) Incidence et mortalité des cancers des voies aérodigestives supérieures

En se basant sur les dernières données issues du GLOBOCAN 2020 (base de données en ligne regroupant des statistiques mondiales sur les cancers avec la mention des incidences et mortalités de ces derniers dans 185 pays), les cancers de la tête et du cou également trouvés sous la terminologie cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) ou cancers oto-rhino-laryngée (ORL) (*Figure 1*) se positionnent au 6^{ème} rang mondial des cancers les plus fréquemment observés¹. Ainsi, en 2018, près de 890 000 cas ont été recensés et un nombre de décès dépassant 450 000 à travers le monde a été relevé (Ferlay et al., 2019). *Mais que représentent les cancers des VADS ?* Il s'agit de cancers qui se développent à partir de l'un des organes qui composent les VADS à savoir les lèvres, la cavité buccale, le pharynx (nasopharynx, oropharynx et hypopharynx) et le larynx.

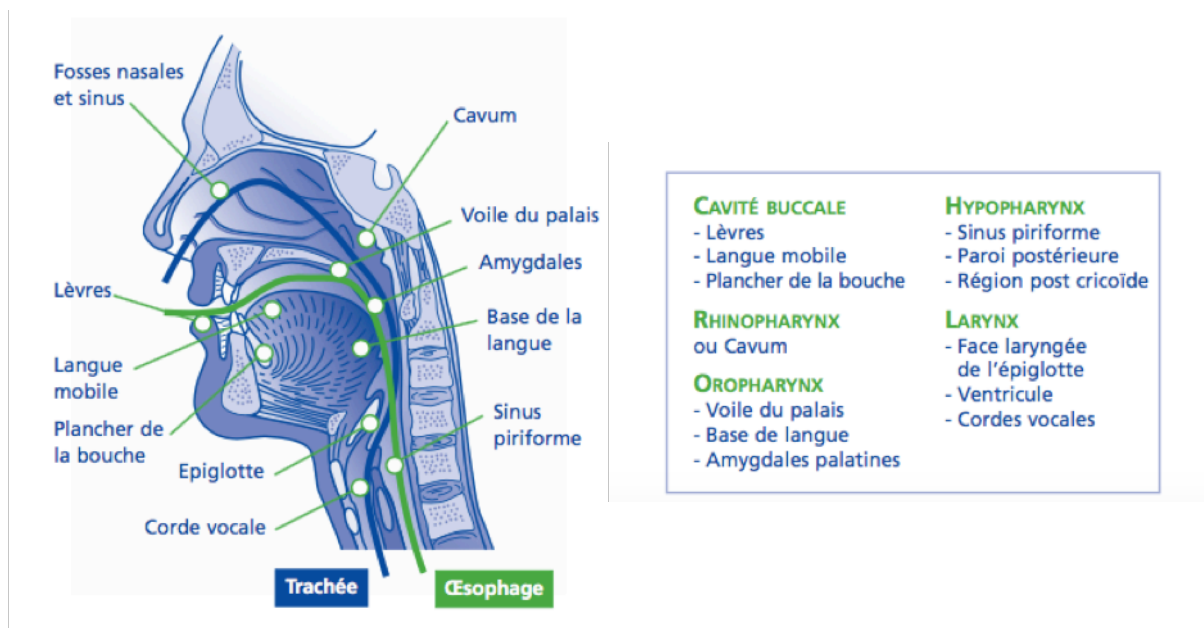


Figure 1 : Représentation transversale des voies aérodigestives supérieures, d'après une représentation proposée par (Ligue contre le Cancer, 2009)

¹ « Le taux d'incidence rapporte le nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période donnée - population incidente - à la population dont sont issus les cas (pendant cette même période) - population cible - », d'après (Institut National de la Statistique et des études économiques, 2016).

L'évolution de la survie entre le XX^{ème} et le XXI^{ème} siècle a été étudiée par Pulte et Brenner à travers un article dont les données ont été extraites du programme *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) du *National Cancer Institute* (Institut National du Cancer des Etats-Unis) couvrant la période de 1973 à 2006. Ainsi, un peu plus de 68 000 patients atteints d'un cancer de la tête et du cou ont été suivis en termes de survie durant cette période. D'après cette étude, il est à noter une augmentation de la survie à 5 ans passant de 54,7% en 1992-1996 à 65,9% en 2002-2006. Cette évolution favorable est particulièrement notable pour les localisations : amygdale, langue et cavité buccale. A l'inverse, une très faible évolution est observée pour les cancers de la lèvre et du larynx (*Tableau 1*) (Pulte and Brenner, 2010).

Tableau 1 : Taux de survie à cinq ans de 1982 à 2006 (Pulte and Brenner, 2010)

Table 3. Five-year relative survival rate by period analysis

Location	Calendar period					Difference ^a	p-value ^b
	1982–1986 PE (SE)	1987–1991 PE (SE)	1992–1996 PE (SE)	1997–2001 PE (SE)	2002–2006 PE (SE)		
All	52.7 (0.5)	53.2 (0.5)	54.7 (0.5)	58.6 (0.5)	65.9 (0.5)	+11.2	<.0001
Lip	92.5 (1.3)	95.6 (1.4)	95.5 (1.4)	90.9 (1.5)	97.4 (1.7)	+1.9	.5
Tongue	45.2 (1.2)	48.1 (1.2)	50.5 (1.2)	55.6 (1.1)	64.9 (1.0)	+ 14.4	<.0001
Oral cavity	53.6 (1.0)	52.6 (1.0)	51.1 (1.0)	56.6 (1.1)	62.9 (1.2)	+11.8	<.0001
Nasopharynx	47.1 (2.2)	47.6 (2.1)	53.8 (2.1)	58.3 (1.9)	62.3 (1.9)	+8.3	.002
Tonsil	39.7 (1.7)	41.8 (1.7)	47.6 (1.7)	56.5 (1.5)	69.8 (1.3)	+22.2	<.0001
Oropharynx	26.2 (2.9)	23.4 (2.6)	33.3 (3.2)	37.8 (3.1)	42.2 (3.1)	+8.9	.2
Hypopharynx	24.2 (1.4)	26.2 (1.5)	29.8 (1.6)	29.7 (1.6)	33.8 (2.0)	+4.0	.3
Larynx	66.8 (0.8)	66.3 (0.8)	64.9 (0.9)	64.3 (0.9)	66.8 (0.9)	+1.9	.2

^aDifference between values in 1992–1996 and those in 2002–2006.

^bp-value for trend 1992–1996 to 2002–2006.

Abbreviations: PE, point estimate; SE, standard error.

L'incidence (*Figure 2*) et la mortalité (*Figure 3*) de ces cancers ne sont pas égales à travers le monde. En effet, il est à noter une incidence plus importante de ces cancers en Eurasie et en Inde ainsi que dans la zone Pacifique. Pour autant, les taux les plus défavorables de mortalité ne se superposent pas à ces mêmes zones géographiques. Il est ainsi possible d'envisager plusieurs pistes d'explication, comme par exemple le développement disparate du système de santé selon les régions du monde, la facilité d'accès aux soins variable selon les pays ou encore la mise à disposition inégale des moyens de prévention selon la zone géographique.

Les cartes présentées ci-dessous ont été réalisées grâce à l’outil de cartographie disponible sur la plateforme numérique du [GLOBOCAN](https://gco.iarc.fr/today)² en paramétrant les localisations anatomiques suivantes : hypopharynx, larynx, lèvres et cavité buccale, nasopharynx et oropharynx (*Figures 2 et 3*) .

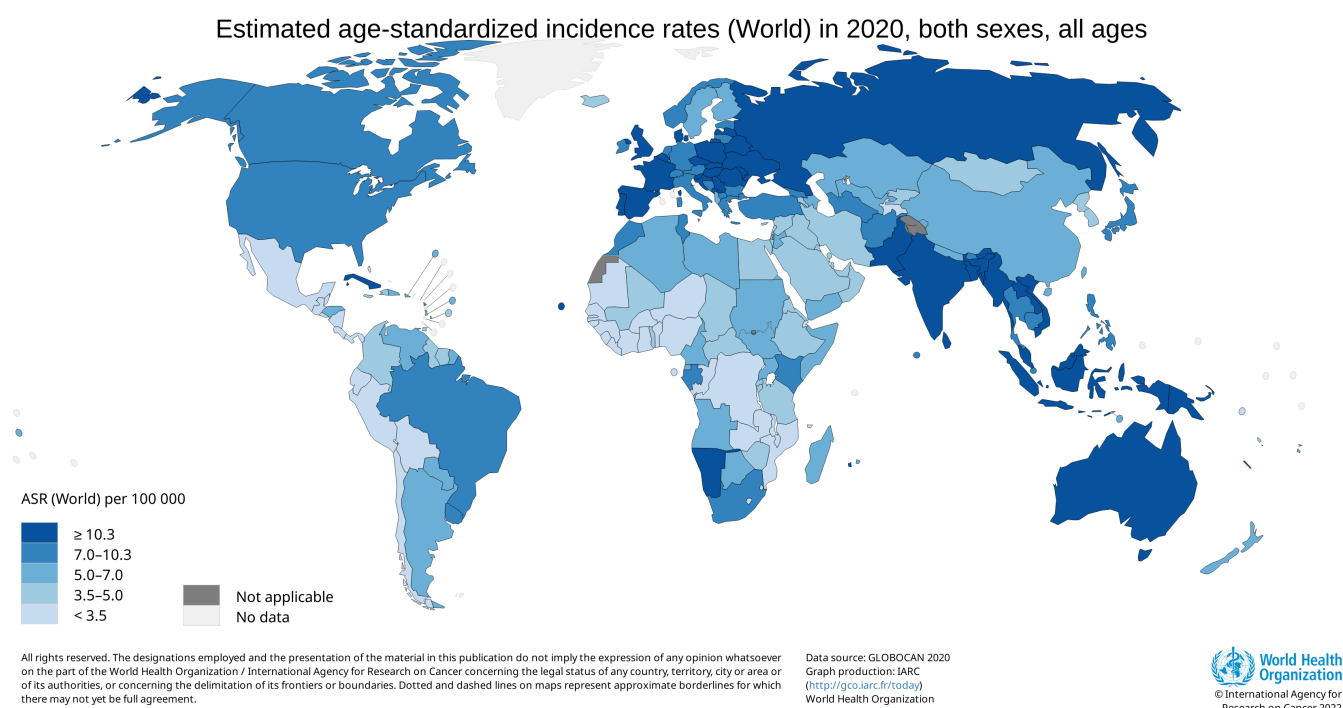


Figure 2 : Incidence globale des cancers de la tête et du cou à travers le monde en 2020, d’après les données du dernier rapport du GLOBOCAN (International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2022)

L’incidence globale des deux sexes à travers le monde, normalisée selon l’âge (0 à 85 ans) est présentée sous forme de carte proposée par le site internet du GLOBOCAN, d’après les chiffres de 2020. Pour générer cette carte, nous avons notifié les cancers suivants : hypopharynx, larynx, lèvres et cavité buccale, nasopharynx et oropharynx (<https://gco.iarc.fr/today/home>).

² URL cartes du GLOBOCAN : https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%252D

Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, both sexes, all ages

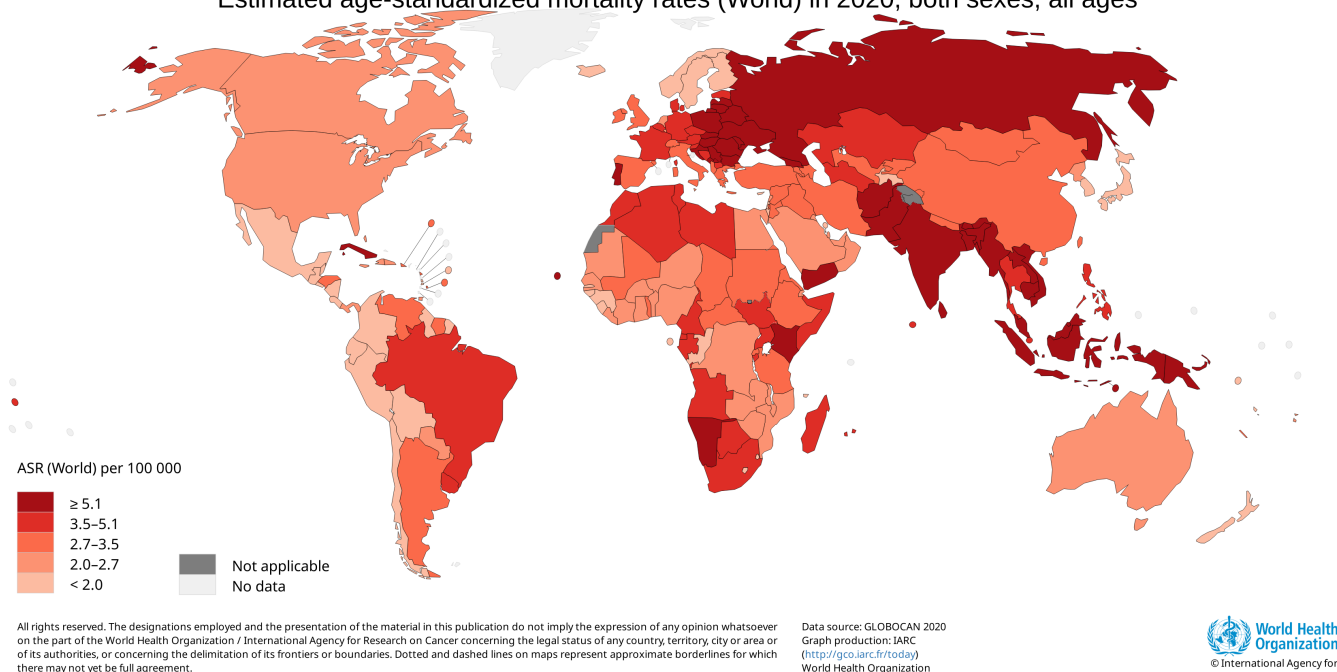


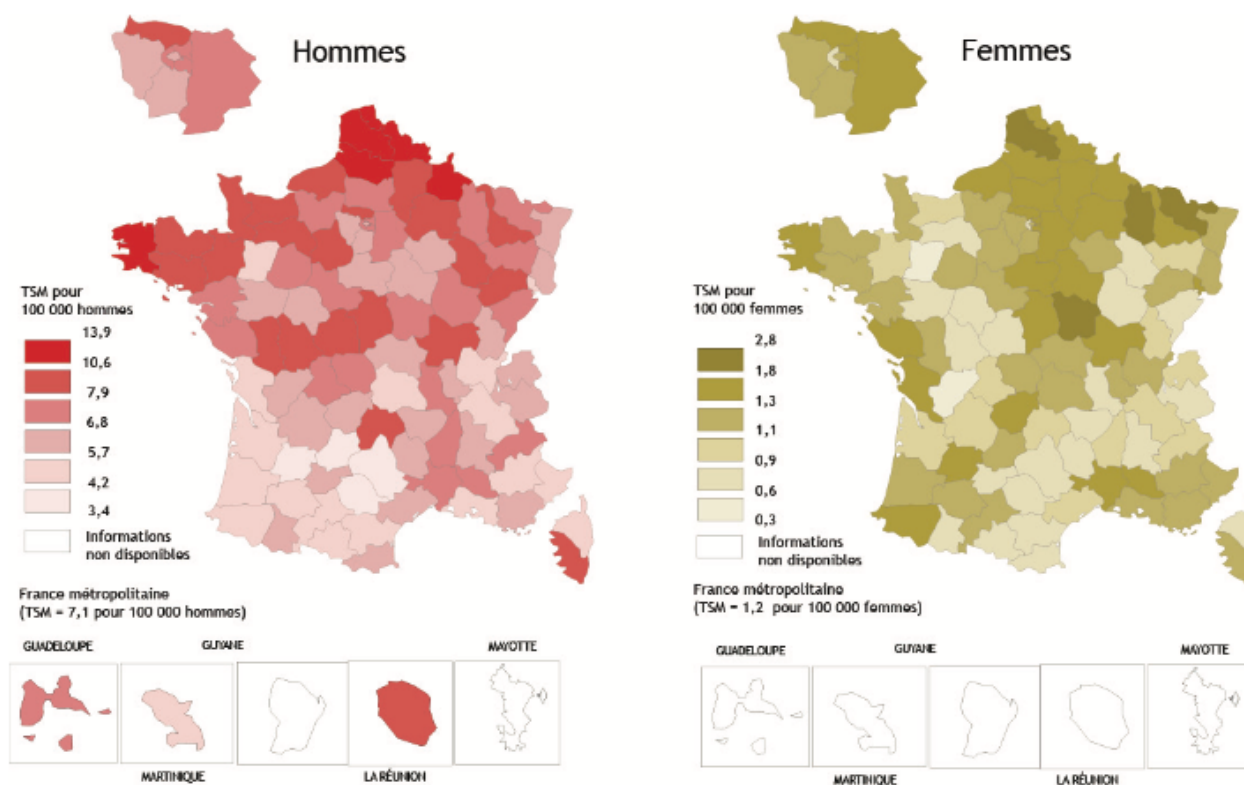
Figure 3 : Mortalité des cancers de la tête et du cou à travers le monde en 2020, d'après les données du dernier rapport du GLOBOCAN (International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2022)

La mortalité des deux sexes à travers le monde, normalisée selon l'âge (0 à 85 ans) est présentée sous forme de carte proposée par le site internet du GLOBOCAN, d'après les chiffres de 2020. Pour générer cette carte, nous avons notifié les cancers suivants : hypopharynx, larynx, lèvres et cavité buccale, nasopharynx et oropharynx (<https://gco.iarc.fr/today/home>).

Si nous nous focalisons désormais plus spécifiquement sur la France, d'après les dernières estimations nationales, en 2018 le nombre de nouveaux cas de cancers s'élevait à 382 000 (204 600 chez l'homme et 177 400 chez la femme) et 157 400 décès ont été dénombrés la même année. En ce qui concerne les cancers ORL, nous pouvons tout d'abord notifier que ceux-ci sont regroupés sous la terminologie cancers lèvre – bouche – pharynx en ajoutant le groupe larynx. L'Institut National du Cancer (INCa) a proposé en 2011 une infographie représentant la mortalité par « *cancers de la lèvre, de la bouche et du pharynx* » sur le territoire français. Grâce à cette figure, nous pouvons observer une disparité de répartition sur le territoire mais également une différence de répartition géographique selon le sexe (régions décrites avant le remaniement de 2016) (*Figure 4*). Ainsi, chez les hommes sept régions présentent une surmortalité par rapport au territoire national, à savoir : Nord-Pas-de-Calais avec une surmortalité de +85%, Bretagne avec +32%, Picardie avec une surmortalité de +20%, Basse-Normandie avec +17%, Haute-Normandie et Champagne-Ardenne avec +16%, et enfin Lorraine avec +13%.

A l'inverse, certaines régions témoignent d'une sous-mortalité, il s'agit de l'Alsace, de l'Aquitaine, de l'Auvergne, du Languedoc-Roussillon, de la région Midi-Pyrénées, de la Provence-Alpes-Côte d'Azur et de la région Rhône-Alpes.

Toutefois, les cartes de la répartition régionale sur le territoire français du taux de mortalité entre les hommes et les femmes ne se superposent pas. En effet, concernant les femmes, une surmortalité par rapport à la moyenne nationale de +40% est à noter dans la région Nord-Pas-de-Calais, +33% dans la région Lorraine, +20% dans la région Picardie et +12% dans la région Bourgogne. A l'inverse, la mortalité dans les régions Poitou-Charentes, Rhône-Alpes, Pays de la Loire, Midi-Pyrénées et Languedoc Roussillon est diminuée comparée aux données nationales. Il y a donc pour ces cancers, une disparité en termes de mortalité à la fois géographique mais également selon le sexe (Institut National du Cancer, 2011).



Source : InVS, CépiDc-Inserm

Infographie : INCa 2011

Figure 4 : Mortalité par cancers de la lèvre, de la cavité orale et du pharynx sur la période 2004-2008 selon les départements en France métropolitaine et les départements d'Outre-Mer, infographie réalisée par (Institut National du Cancer, 2011)

Les derniers chiffres épidémiologiques en France sont ceux de 2018, que nous proposons de décrire ci-après.

Ainsi, le nombre de nouveaux cas en 2018 était de 12 808 chez les hommes (10 055 pour les cancers lèvre – bouche – pharynx et 2 753 pour le cancer du larynx) et de 4 044 chez les femmes (3 637 pour les cancers lèvre – bouche – pharynx et 407 pour le cancer du larynx). Concernant le nombre de décès imputable à ces cancers, il s'élevait à 7 434 chez les hommes (2 898 pour les cancers lèvre – bouche – pharynx et 819 pour le cancer du larynx) et de 1 055 chez les femmes (924 pour les cancers lèvre – bouche – pharynx et 131 pour le cancer du larynx). Il est également important de notifier l'évolution de l'incidence et de la mortalité de ces cancers sur les périodes de 1990 à 2018 et de 2010 à 2018. En effet, chez les hommes l'incidence tout comme la mortalité se sont améliorées, ainsi de 1990 à 2018 l'incidence des cancers lèvr – bouche – pharynx a diminué de 2,6% et la mortalité de 3,5%, cette diminution était cependant moindre sur la période récente de 2010 à 2018 avec une baisse de l'incidence de 1,9% et de 2,8% pour la mortalité. De manière plus accentuée, l'incidence des cancers du larynx de 1990 à 2018 a diminué de 3,1% et la mortalité de 6,3%.

Ces diminutions étaient cependant moindres sur la période récente de 2010 à 2018 avec une baisse de l'incidence des cancers lèvre – bouche – pharynx de 1,9% et de 2,8% pour la mortalité. Concernant les cancers du larynx, là encore la diminution de l'incidence et celle de la mortalité étaient moindres sur la période de 2010 à 2018 avec une baisse respective de 2,8% et de 5,5%.

En revanche chez les femmes, l'incidence des cancers lèvre – bouche – pharynx se voit augmenter de 1,8% sur la période de 1990 à 2018 et de 1,7% sur la période de 2010 à 2018, la mortalité quant à elle diminue timidement de 0,4% de 1990 à 2018 mais augmente de 0,2% de 2010 à 2018. En ce qui concerne les cancers du larynx, la mortalité baisse de 2,4% sur la période de 1990 à 2018 et de 2,3% sur celle de 2010 à 2018 (Defossez et al., 2019).

Malgré une survie qui s'est améliorée à partir du début des années 2000, elle reste cependant faible ce qui peut s'expliquer par les récurrences notamment locorégionales qui s'élèvent à 50% des cas, mais également par la survenue de métastases à distance (terminologie explicitée ci-après) pour 20 à 30% des patients (Vermorken and Specenier, 2010). De plus, la survie à 5 ans chute à 54% chez les patients atteints de métastases ganglionnaires et à 32% chez les patients présentant des métastases à distance.

2) Survie des patients atteints d'un cancer des voies aérodigestives supérieures

Poursuivons notre descriptif de l'épidémiologie par la survie des patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx en France métropolitaine entre 1989 et 2018, grâce au document proposé par l'INCa en septembre 2020.

Globalement, ces cancers sont de pronostic défavorable en termes de survie à 5 ans, qui d'après ce rapport, est de 45% avec une disparité selon le sexe. En effet, la survie à 5 ans est de 41% chez les hommes contre 56% chez les femmes. Cette survie faible peut notamment trouver une explication dans le diagnostic tardif chez des personnes de surcroît âgées avec un état général altéré ce qui rend la prise en charge compliquée.

La survie à 1 et 5 ans est diminuée lorsque l'âge augmente (*Figure 5*) (Guizard et al., 2020).

	1 an			5 ans		
	Hommes	Femmes	Ensemble	Hommes	Femmes	Ensemble
Survie observée	72 [72 ; 73]	78 [77 ; 79]	74 [73 ; 74]	38 [38 ; 39]	52 [51 ; 54]	42 [41 ; 42]
Survie nette	74 [73 ; 75]	79 [78 ; 81]	75 [75 ; 76]	42 [41 ; 43]	57 [55 ; 58]	46 [45 ; 47]
Survie nette standardisée	71 [71 ; 72]	79 [77 ; 80]	73 [73 ; 74]	41 [40 ; 42]	56 [54 ; 58]	45 [44 ; 46]
Survie nette par âge						
50 ans	80 [79 ; 81]	86 [84 ; 88]	81 [80 ; 82]	48 [46 ; 49]	62 [60 ; 65]	51 [49 ; 52]
60 ans	76 [75 ; 77]	82 [80 ; 84]	77 [76 ; 78]	42 [41 ; 43]	58 [56 ; 60]	45 [44 ; 46]
70 ans	72 [70 ; 73]	80 [78 ; 82]	74 [73 ; 75]	40 [39 ; 42]	56 [54 ; 59]	44 [43 ; 46]
80 ans	63 [61 ; 65]	73 [71 ; 76]	66 [64 ; 68]	36 [33 ; 38]	51 [47 ; 55]	41 [39 ; 43]

Figure 5 : Survie' à 1 et 5 ans pour des patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx, selon l'âge du patient (Guizard et al., 2020)

Survies exprimées en pourcentage et intervalle de confiance à 95% (Guizard et al., 2020).

Ce rapport propose également d'évaluer la survie à 1, 5 et 10 ans et notifie son amélioration globale depuis 2005. En effet, il est à noter une augmentation de la survie à 1 an de 9% entre 1990 et 2015 et de 5% entre 2005 et 2015 contre 12% d'amélioration de la survie à 5 ans sur la période 1990 et 2015 et 7% dans l'intervalle 2005 à 2015 (*Figure 6*).

³ « La **survie globale** à 5 ou à 10 ans correspond à la proportion de patients survivants 5 ou 10 ans après la date de diagnostic, quelle que soit la cause possible du décès (cancer ou autre cause) » (Bossard et al., 2013).
« La **survie nette** est définie comme la survie qui serait observée si la seule cause de décès possible était le cancer étudié » (Bossard et al., 2013).

Année	1 an	5 ans	10 ans
1990	67 [66 ; 69]	36 [34 ; 37]	23 [21 ; 25]
1995	69 [67 ; 70]	36 [35 ; 38]	24 [23 ; 26]
2000	70 [69 ; 70]	38 [37 ; 39]	26 [25 ; 27]
2005	71 [70 ; 72]	40 [39 ; 41]	28 [27 ; 29]
2010	73 [72 ; 74]	44 [43 ; 45]	32 [30 ; 34]
2015	76 [74 ; 78]	48 [46 ; 50]	ND
Diff. 2015-1990	9 [7 ; 11]	12 [9 ; 15]	ND
Diff. 2015-2005	5 [3 ; 7]	7 [5 ; 10]	ND

*Les survies (en %) sont arrondies à l'unité dans ces tables mais les différences de survie ont été calculées à partir des valeurs exactes et arrondies ensuite ; ND : Non Disponible; Diff. : différence absolue en points de %

Figure 6 : Survie à 1, 5, 10 ans pour les patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx, selon l'année du diagnostic (Guizard et al., 2020)

Survie nette standardisée exprimée en pourcentage et intervalle de confiance de 95% (Guizard et al., 2020).

De plus, il est important de préciser que l'augmentation de la survie à 5 ans est la plus notable chez les personnes de 50 ans avec une amélioration de 21% entre 1990 et 2015 contre seulement 6% pour des patients de 80 ans et plus (*Figure 7*).

Age	1990	2005	2015	Diff. 2015-1990	Diff. 2015-2005
Survie nette à 1 an					
50	75 [73 ; 77]	79 [77 ; 80]	84 [82 ; 86]	9 [6 ; 12]	6 [3 ; 8]
60	73 [71 ; 75]	75 [74 ; 77]	80 [77 ; 81]	7 [4 ; 10]	4 [2 ; 6]
70	67 [64 ; 69]	70 [68 ; 71]	76 [74 ; 79]	10 [6 ; 13]	6 [4 ; 9]
80	59 [55 ; 62]	63 [61 ; 65]	69 [65 ; 72]	10 [5 ; 15]	6 [2 ; 10]
Survie nette à 5 ans					
50	36 [33 ; 38]	44 [42 ; 46]	57 [54 ; 60]	21 [17 ; 26]	13 [9 ; 17]
60	34 [32 ; 36]	41 [40 ; 43]	47 [45 ; 50]	14 [10 ; 17]	6 [3 ; 10]
70	35 [32 ; 38]	37 [35 ; 39]	45 [42 ; 48]	10 [6 ; 14]	8 [4 ; 12]
80	37 [33 ; 41]	37 [34 ; 39]	43 [39 ; 47]	6 [0 ; 12]	6 [2 ; 11]

*Les survies (en %) sont arrondies à l'unité dans ces tables mais les différences de survie ont été calculées à partir des valeurs exactes et arrondies ensuite ; Diff. : différence absolue en points de %

Figure 7 : Survie à 1 et 5 ans pour les patients atteints d'un cancer lèvre – bouche – pharynx, selon l'année du diagnostic (1990, 2005 et 2015) et par âge au moment du diagnostic (Guizard et al., 2020)

Survie nette exprimée en pourcentage et intervalle de confiance de 95%, l'âge est en années (Guizard et al., 2020).

L'amélioration de la survie observée entre 1990 et 2015 peut trouver des pistes d'explication évoquées dans le rapport de l'INCa. D'une part, les diagnostics sont plus précoces et d'autre part, la prise en charge thérapeutique est plus performante avec notamment la « généralisation des réunions de concertation pluridisciplinaires, une meilleure prise en compte de l'état nutritionnel, l'introduction de la radio-chimiothérapie concomitante dans les années 90, puis l'introduction de la thérapie ciblée » (Guizard et al., 2020).

Néanmoins, la survie à 20 ans reste très faible, elle n'est que de 12% chez les patients de 50 ans contre 9 à 10% pour les personnes d'un âge plus avancé (Guizard et al., 2020).

En parallèle, malgré une précocité du diagnostic et une meilleure prise en charge thérapeutique des patients, 20 à 30% de ceux-ci présentent des récurrences locorégionales et des métastases à distance qui ne peuvent être pris en charge que de manière palliative (Vermorken and Specenier, 2010). La récurrence locorégionale correspond à une rechute du cancer dans la même zone géographique que le cancer initial alors que les métastases à distance traduisent la présence de cellules cancéreuses ayant la capacité d'atteindre d'autres organes *via* les réseaux lymphatiques et sanguins. Le poumon correspond à la principale localisation anatomique des métastases dans ce cancer avec 50 à 75% des cas métastatiques, puis les os entre 10 et 44%, le foie entre 4 et 34%, le cerveau entre 3 et 13%, la peau à hauteur de 3 à 31% et enfin les tissus mous entre 2 et 9% (Ferlito et al., 2001) - (Pisani et al., 2020). Les mécanismes inhérents aux rechutes dans les cancers des VADS sont détaillés dans la partie qui porte sur la cancérogénèse, à la suite de ce manuscrit. Enfin, il est également intéressant de se pencher sur la survie dépendante de l'année du diagnostic et de l'âge du patient. En effet, la survie nette à 1 an s'est améliorée dans tous les groupes d'âge d'environ 10% pour les patients diagnostiqués en 2015 comparés aux patients diagnostiqués en 1990. La survie à 5 ans, dont le diagnostic a été réalisé en 2015, chez les patients de 50 ans s'est particulièrement améliorée, de près de 21% comparée aux patients de 50 ans diagnostiqués en 1990. Enfin, la survie nette à 10 ans est augmentée de 14% pour les patients de 50 ans dont le cancer a été mis en évidence en 2010 comparée aux patients diagnostiqués en 1990 (*Figure 8*) (Guizard et al., 2020).

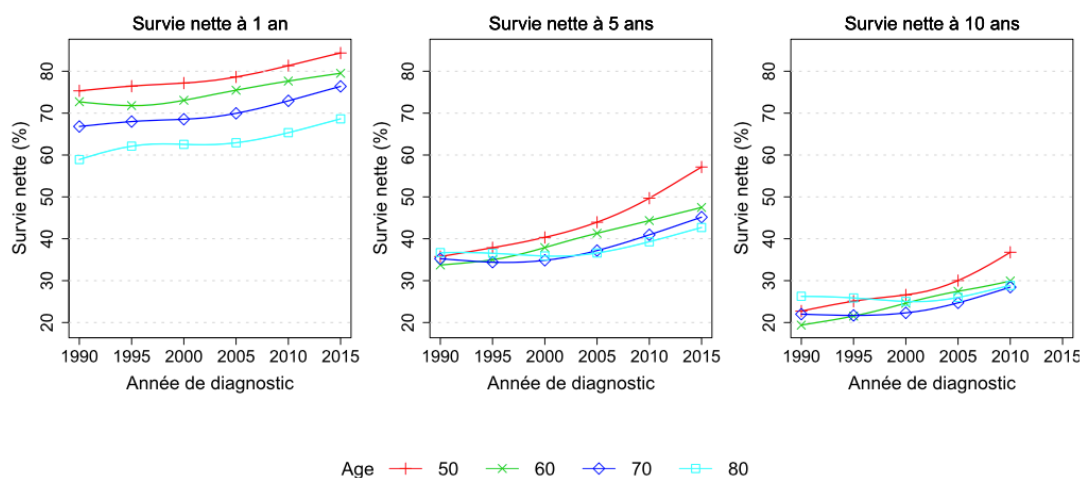


Figure 8 : Survie à 1, 5 et 10 ans représentée selon l'année du diagnostic et l'âge du patient (Guizard et al., 2020)

En définitive, cette partie traitant de l'épidémiologie des cancers de la tête et du cou permet de mettre en évidence la disparité géographique de l'incidence et de la mortalité à travers le monde mais également sur le territoire national français. Une différence également constatée selon le sexe et l'âge, et pour la survie une perte de chance pour les personnes diagnostiquées avant les années 2015. Ces cancers sont causés par plusieurs facteurs de risque que nous proposons de détailler au sein de la partie qui suit.

3) Facteurs étiologiques décrits pour les cancers des voies aérodigestives supérieures

Les cancers des VADS sont causés par divers facteurs de risque, à savoir, la consommation de tabac, d'alcool, la consommation concomitante de tabac et d'alcool, la pratique culturelle de la mastication de la noix d'Arec (*Areca catechu*), la pollution atmosphérique (Figure 9) et par certains agents infectieux dont le *Papilloma* virus humain (*Human Papilloma Virus* ou HPV).

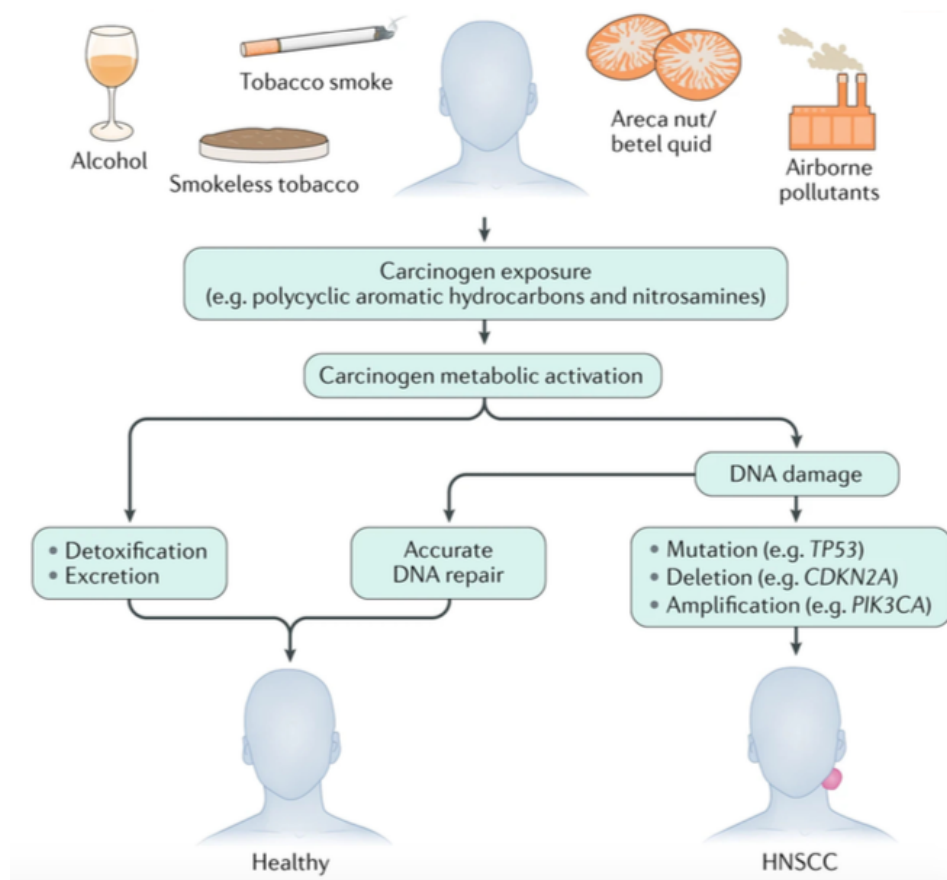


Figure 9 : Facteurs de risque des cancers des voies aérodigestives supérieures (HPV-négatifs) (Johnson et al., 2020)

a- Consommation de tabac

L'un des facteurs de risque principal décrit pour les cancers de la tête et du cou correspond au tabac. En effet, d'après le bulletin épidémiologique hebdomadaire qui traite des décès attribuables au tabagisme en France sur la période de 2000 à 2013, il est indiqué que pour la population de plus de 35 ans en 2013, 75% des cancers des VADS sont attribuables au tabac chez les hommes contre 44% chez les femmes. De plus, pour cette même année, 6 792 décès ont été notifiés chez les hommes par cancers des VADS liés à la consommation de tabac et 1 714 pour les femmes.

Il est tout de même à préciser une nette disparité selon les classes d'âge avec pour les hommes 293 décès entre 35 et 49 ans, 2 675 entre 50 et 64 ans, 2 576 entre 65 et 79 ans et 1 248 à 80 ans et plus. Pour les femmes, 64 décès entre 35 et 49 ans, 519 entre 50 et 64 ans, 567 entre 65 et 79 ans et 624 à 80 ans et plus (Bonaldi et al., 2016).

Concernant la diminution de l'incidence des cancers ORL chez l'homme observée ces dernières années en France, cela peut notamment s'expliquer par une baisse de la consommation de tabac dans la population masculine depuis les années 70 accentuée dans les milieux socio-économiques favorisés. Cette diminution s'est renforcée encore davantage par l'instauration de mesures visant à lutter contre le tabagisme à partir des années 2000 et le premier plan cancer en 2013 (*Figure 10*). Ainsi entre 2010 et 2016, la prévalence⁴ de la consommation de tabac quotidienne chez les hommes de 25 à 34 ans a nettement diminué alors que pour les femmes il y a une réelle disparité selon la classe d'âge. En effet, la prévalence du tabagisme chez les femmes tend à diminuer chez les 15 à 24 ans alors que celle-ci augmente chez les 55 à 75 ans.

De plus, l'écart qui existait entre les hommes et les femmes quant à la consommation quotidienne de tabac s'est largement amoindri depuis les années 70. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, la diminution de l'incidence des cancers des VADS chez les hommes est en partie imputée à la baisse de la consommation de tabac et à l'inverse l'augmentation de l'incidence des cancers des VADS chez les femmes s'explique par une augmentation de la consommation de tabac depuis les années 70 (Bonaldi et al., 2016) - (Andler et al., 2018).

⁴ Nombre de cas dans une population à un moment donné.

Les conditions socio-économiques sont également à mettre en avant puisque près de 27% des cas de cancers lèvre – bouche – pharynx sont attribuables au désavantage social chez les hommes et près de 23% chez les femmes (Marant-Micallef et al., 2018).

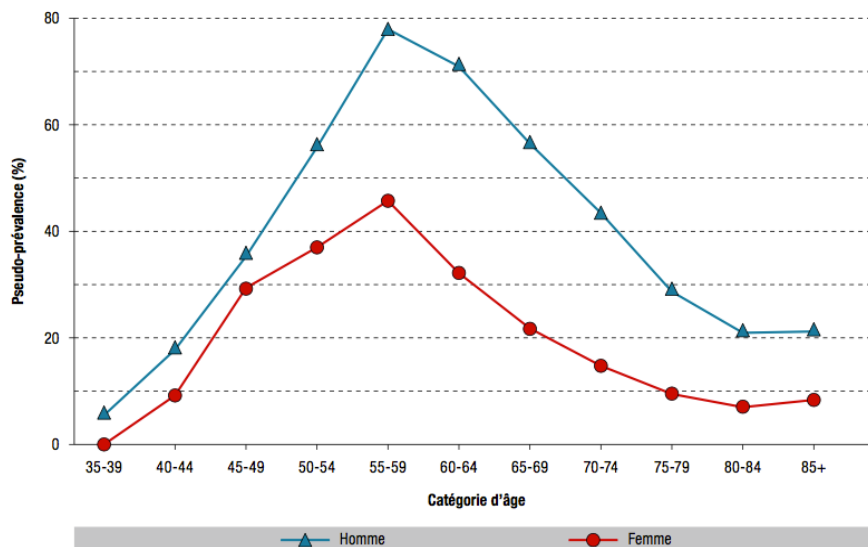


Figure 10 : Exposition au tabagisme dans la population française en 2013, données publiées au sein du bulletin épidémiologique hebdomadaire (Bonaldi et al., 2016)

La consommation de tabac a pendant longtemps été un fait commun dans de nombreux pays développés et même à la mode, c'est seulement à partir des années 60 que des chercheurs se sont intéressés à ses propriétés toxiques avec notamment le premier rapport en 1964 sur le lien entre le tabac et la santé : *Surgeon General's report on smoking and health*. Ce rapport met en exergue pour la première fois les effets cancérigènes des produits du tabac. Depuis, les recherches se sont évidemment intensifiées avec une identification moyenne à ce jour de plus de 70 agents cancérigènes connus et décrits dans les produits du tabac et les fumées. Pour n'en citer que certains, nous pouvons évoquer les plus étudiées en termes d'exposition et de cancérogénicité. Il s'agit premièrement de la famille des nitrosamines dont sept ont été identifiées comme spécifiques des produits du tabac qui se trouvent à la fois dans les produits du tabac mais également dans la fumée de ceux-ci. D'après des études *in vivo* réalisées sur des rats par administration de nitrosamines sous-cutanée ou par gavage, c'est la molécule N'-nitrosonornicotine de cette famille qui entraîne de manière reproductible et systématique des cancers de la tête et du cou avec une prédominance de la zone nasale post-administration sous-cutanée et par gavage contre une localisation orale, œsophagienne et nasale par administration dans l'eau de boisson (Jethwa and Khariwala, 2017) - (Hecht, 1998).

Secondement, l'autre famille décrite comme présentant un lien avec la cancérogénèse des cancers de la tête et du cou est composée par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) caractérisés par la présence de plusieurs cycles benzéniques. Là encore, d'après des études *in vivo*, l'exposition par administration *per os* des HAP provoque des cancers des VADS et du pré-estomac. Ces études *in vivo* sur l'animal ont été complétées par des données issues de suivi de patients. Notamment l'étude discutée par Khariwala *et al.*, qui traite de la quantification des taux urinaires de nitrosamines (N'-nitrosornicotine (NNN) et 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)) et d'HAP (1-hydroxypyrene (1-HOP)) chez des patients fumeurs nouvellement diagnostiqués pour un cancer contre des fumeurs sans cancer. Les résultats sont notables : les niveaux urinaires de 1-HOP et de NNN sont significativement plus élevés chez les patients fumeurs atteints d'un cancer des VADS comparés aux fumeurs sans cancer (en tenant compte de l'âge, du sexe et du nombre de paquets-années⁵ déclarés) (Jethwa and Khariwala, 2017) - (Khariwala et al., 2017) - (Humans, 2004). Pour autant, toute personne qui vient à consommer du tabac ne développera pas forcément un cancer de la tête et du cou. En effet, plusieurs autres paramètres rentrent en jeu et favorisent le développement des cancers ORL comme par exemple des altérations génétiques ayant des impacts sur la biotransformation (enzymes clés touchées : cytochrome P450, glutathion S-transférases, uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase ou UDP-glucuronosyltransferase ou UGT, aldéhyde déshydrogénase et alcool déshydrogénase), la détoxification et l'élimination des substances cancérogènes, mais également l'altération des mécanismes de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (réparation par excision de base ou de nucléotide, réparation par mésappariement et réparation par recombinaison sont associés aux cancers), enfin la perturbation des voies liées à l'apoptose (notamment : p53, *Cyclin-Dependent Kinase 4* ou CDK4, *Epithelial Growth Factor Receptor* ou récepteur du facteur de croissance épidermique ou EGFR, PhosphoInositide 3-Kinase ou PI3K, mTOR ou *mammalian Target Of Rapamycin* ou cible mammalienne de la rapamycine et NOTCH) (Lacko et al., 2014).

⁵ Unité de mesure de la consommation de tabac qui correspond à la multiplication du nombre de paquets consommés par jour par le nombre d'années de consommation de ce nombre de paquet par le patient, d'après l'INCa.

Deux phénomènes principaux provoquent le processus de cancérisation lors de la consommation de produits de tabac. D'une part, les agents cancérigènes ou leurs métabolites entraînent la formation d'adduits covalents à l'ADN qui peuvent conduire, si une réparation efficace n'a pas lieu, à des mutations et donc à un processus potentiel de cancérisation. D'autre part, lors de la consommation de produits de tabac, il est à noter une production de cytokines et de chimiokines témoins de l'inflammation des tissus exposés aux produits du tabac, cette production favorise également un processus d'oncogenèse (Jethwa and Khariwala, 2017). Les altérations moléculaires décrites dans les cancers ORL liés à la consommation de tabac seront traitées dans la suite de ce manuscrit.

b- Consommation d'alcool

Malgré une diminution de la consommation d'alcool en France depuis environ 80 ans, le territoire national se classe parmi les pays avec le plus de consommation d'alcool au monde comme en témoigne sa 6^{ème} position mondiale pour une consommation chez les plus de 15 ans au sein des pays membres de l'Organisation de coopération et de développement économiques⁶ (OCDE). La baisse a été importante puisque la consommation quotidienne d'alcool pur chez les plus de 15 ans était de 65 grammes en 1930 puis de 57 en 1957 et est descendue à 26 en 2013. Pour autant, depuis la fin des années 1950, 7% des décès par cancers des plus de 15 ans sont imputables à la consommation d'alcool, soit 580 000 décès en 2015. Concernant plus spécifiquement les cancers de la tête et du cou, il est à noter une disparité par sexe, ainsi chez les hommes 2 823 décès (927 : bouche / 1 380 : pharynx et 516 : larynx) sont imputables à la consommation d'alcool contre 380 chez les femmes (203: bouche / 143 : pharynx et 34 : larynx) (Bonaldi and Hill, 2018). Le lien entre la consommation d'alcool et les processus de cancérisation est connu depuis plusieurs dizaines d'années. En effet, l'alcool, qui n'est pas lui-même cancérigène, est métabolisé en acétaldéhyde décrit comme apte à former des adduits à l'ADN, c'est donc lui qui présente un caractère cancérigène (Brooks and Theruvathu, 2005).

De plus, un autre point intéressant est à soulever, il s'agit de l'aptitude de l'alcool à potentialiser les effets générés par les produits du tabac.

⁶ OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques.

En effet, une consommation concomitante de produits du tabac (deux paquets de cigarettes par jour) et d'alcool (plus de quatre boissons alcoolisées par jour) multiplie par 35 le risque de développer un cancer des VADS (Blot et al., 1988). En effet, l'alcool de par sa nature de solvant chimique, augmente et prolonge l'exposition des muqueuses et des cellules épithéliales aux carcinogènes présents dans la fumée des produits du tabac (Pai and Westra, 2009).

c- Noix d'arec et chique de Bétel

La consommation traditionnelle de la noix d'Arec (*Areca catechu*) et de la chique de Bétel (*Piper betle*) par mastication est une pratique qui s'est développée et accentuée depuis près d'un siècle en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique, ainsi qu'en Inde. Cette dernière correspond à un mélange réalisé à partir de la noix d'Arec, de feuilles de Bétel, de chaux éteinte et/ou de tabac associé ou non à des épices afin d'en améliorer la saveur (*Figure 11*).

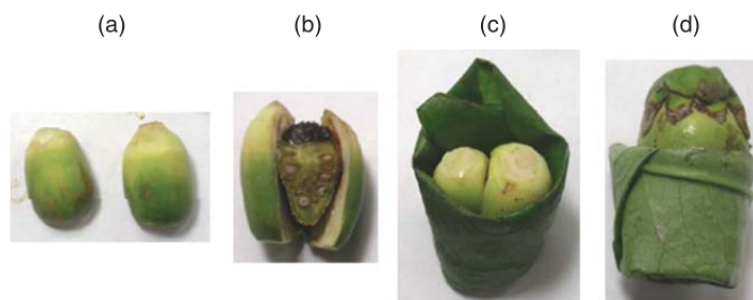


Figure 11 : Photographies de la noix d'Arec et de la chique de Bétel utilisées à Taïwan (Chen et al., 2008)

(a) *Areca catechu* non mûre (b) Ching-a (c) Shuang-zi-sing et (d) Bao-hyeo (Chen et al., 2008).

D'après le Centre International de la Recherche sur le Cancer (CIRC), la noix d'Arec, la chique de Bétel avec ajout de tabac et la chique de Bétel sans ajout de tabac sont considérées comme cancérigène pour l'Homme pour la cavité buccale et le pharynx (Centre de Lutte Contre le Cancer Leon Bernard, 2022). Malgré cette classification, le poids des pratiques sociales encourage encore la consommation de noix d'Arec et de chique de Bétel notamment dans la population masculine. D'un point de vue épidémiologique, en parallèle de cette consommation accrue, il est à noter une prévalence importante des cancers de la tête et du cou dans ces régions géographiques du monde. En effet, ils représentent 35 à 40% des cancers en Inde, 9% à Taïwan contre 2 à 4% pour les pays occidentaux.

De manière plus précise, une étude de l'incidence et de la mortalité des cancers de la tête et du cou au sein de la population taïwanaise a été réalisée sur la période de la fin du XX^{ème} siècle et le début du XXI^{ème} siècle (*Figures 12 et 13*). Grâce à ces chiffres, il est possible de constater une augmentation importante de l'incidence mais également de la mortalité des patients atteints de ces cancers pour la population masculine. L'explication réside dans la consommation quotidienne de la noix d'Arec et/ou de la chique de Bétel. Pour appuyer ce lien, il est à préciser que 85% des patients atteints d'un cancer de la bouche consomment régulièrement de la noix d'Arec et/ou de la chique de Bétel. (Chen et al., 2008) - (Chen et al., 2017) - (Li et al., 2019).

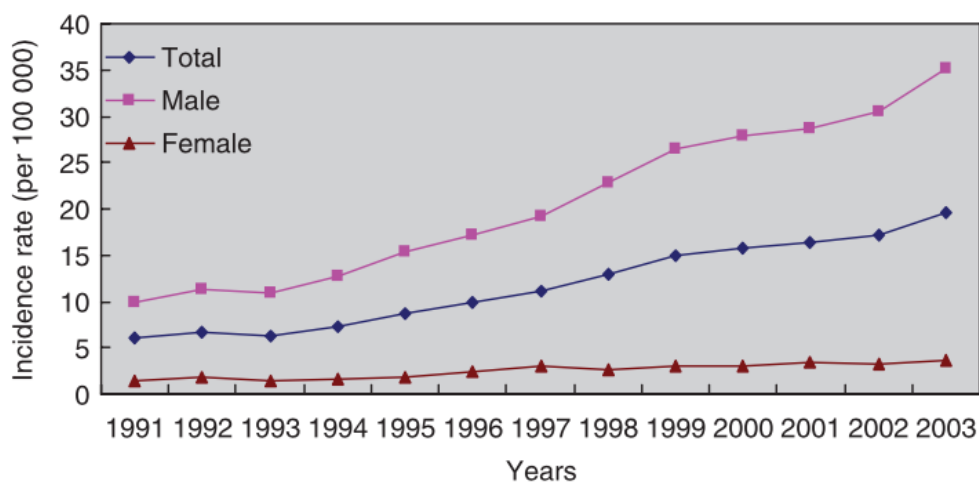


Figure 12 : Taux d'incidence des cancers des voies aérodigestives supérieures au sein de la population taïwanaise entre 1991 et 2003 (Chen et al., 2008)

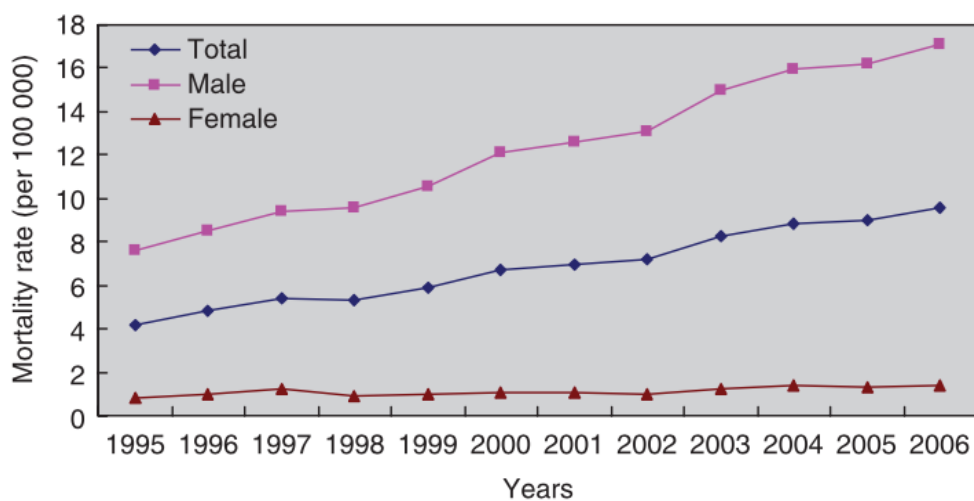


Figure 13 : Taux de mortalité des cancers des voies aérodigestives supérieures dans la population taïwanaise entre 1995 et 2006 (Chen et al., 2008)

Pour expliquer le caractère cancérigène de la noix d'Arec, il est nécessaire de s'intéresser à sa composition. En effet, différents composants sont à notifier, comme des saccharides, des polyphénols, des graisses, des fibres, des tanins mais surtout divers alcaloïdes. Un de ces alcaloïdes, l'arécoline est métabolisé en arécaïdine grâce aux enzymes salivaires, le dernier métabolite formé correspond à un dérivé nitroso qui est la cause des lésions de la muqueuse de la sphère orale (Li et al., 2019). De plus, la consommation de la noix d'Arec est souvent associée à une exposition au tabac qui vient compléter la constitution traditionnelle de la chique de Bétel, accentuant encore le risque de cancérogénèse des VADS.

d- Polluants atmosphériques

Concernant l'exposition aux polluants atmosphériques, dont les produits chimiques organiques et inorganiques, mais également les particules fines qui représentent un facteur de risque de développer un cancer de la tête et du cou. Les études menées sont principalement réalisées dans les pays à fort développement industriel notamment l'Inde ou encore la Chine. En effet, pour la France, d'après le dernier bulletin épidémiologique hebdomadaire, la pollution atmosphérique n'est pas considérée comme un facteur de risque de développement des cancers de la lèvre, de la cavité buccale et du pharynx (Marant-Micallef et al., 2018). De nombreuses études ont été menées à travers les pays asiatiques ainsi qu'en Inde où une corrélation a pu être établie entre la progression de l'incidence des cancers de la bouche, du larynx et du pharynx et la pollution de l'air ambiant en lien avec l'industrialisation et l'urbanisation galopantes. L'étude de Sapkota *et al.*, a d'ailleurs permis de mettre en évidence l'impact de la combustion de charbon et de bois comme moyen de chauffage sur le risque augmenté de cancers ORL (Wong et al., 2014) - (Sapkota et al., 2008).

Afin d'illustrer cette partie, nous proposons de présenter l'étude de l'équipe de Yu-Hua Chu *et al.* qui visait à déterminer le lien entre l'exposition aux particules fines et les cancers ORL chez les hommes taïwanais dont l'incidence est en constante augmentation. Cette progression est d'ores et déjà expliquée par d'autres facteurs de risque, à savoir, la consommation de tabac, d'alcool ou encore de la noix d'Arec et de la chique de Bétel. Néanmoins, il est déjà établi que la pollution atmosphérique et notamment les particules fines inférieures ou égales à 2,5 microns de diamètre entraînent des maladies cardiovasculaires ainsi que des cancers du poumon.

Cet impact sur la santé est en lien avec leur petite taille, puisqu'elles sont effectivement capables de progresser à travers le tractus aérien et d'accéder aisément jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Or, pour accéder aux alvéoles, elles entrent tout d'abord en contact avec les VADS, d'où l'idée de cette équipe taïwanaise, de mettre en avant un lien entre les particules fines inférieures ou égales à 2,5 microns de diamètre et les cancers ORL.

Pour ce faire, ils se sont basés sur la mesure de la pollution atmosphérique en termes de concentrations de particules fines inférieures ou égales à 2,5 microns de diamètre (plomb, cadmium, arsenic, chrome et nickel, ainsi que des composés organiques comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, notamment). Ces données ont été recueillies grâce à 66 stations de surveillance de la qualité de l'air réparties au sein de 64 villes, les données choisies pour cette étude sont celles de l'année 2009, car elles représentent les données médianes de la période de 1998 à 2011. Les données liées à la santé sont extraites du registre du cancer de Taïwan, de la base de données des services médicaux préventifs pour adultes, de la base de données de recherche de l'assurance maladie nationale et de la base de données de surveillance de la qualité de l'air, la population étudiée est ainsi composée de près de 483 000 hommes âgés de 40 ans et plus. Ainsi, la valeur de référence d'exposition aux particules fines de 2,5 microns de diamètre a été déterminée à $26,74 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En ajustant les données pour éviter les facteurs de confusion potentiels, les *odds ratio*⁷ déterminés sont les suivants : 0,91 pour une exposition comprise entre $26,74$ et $32,37 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 1,01 pour une exposition de $32,37$ à $40,37 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et 1,43 pour une exposition à plus de $40,37 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Donc, une exposition aux particules fines de 2,5 microns de diamètre de plus de $40,37 \mu\text{g}/\text{m}^3$ est associée à un risque accru de développer un cancer de la cavité buccale chez les hommes taïwanais (Chu et al., 2019).

Il est cependant assez complexe de mettre en avant l'étiologie spécifique liée à la pollution atmosphérique, en raison de la pluralité des composants chimiques. Au même titre que le tabac, l'exposition aux produits chimiques trouvés dans l'atmosphère polluée entraîne des lésions de l'ADN tout en conduisant à une réponse inflammatoire et à un stress oxydatif de manière localisée, au sein des VADS (*Figure 14*), ce qui, au moins en partie, permet de donner des pistes d'explications des processus de cancérisation suite à l'exposition à des polluants présents dans l'air (Risom et al., 2005).

⁷ L'odds ratio ou risque relatif rapproché correspond, en statistique, à la dépendance entre variables aléatoires quantitatives, il s'agit d'un rapport des chances de la survenue d'événements.

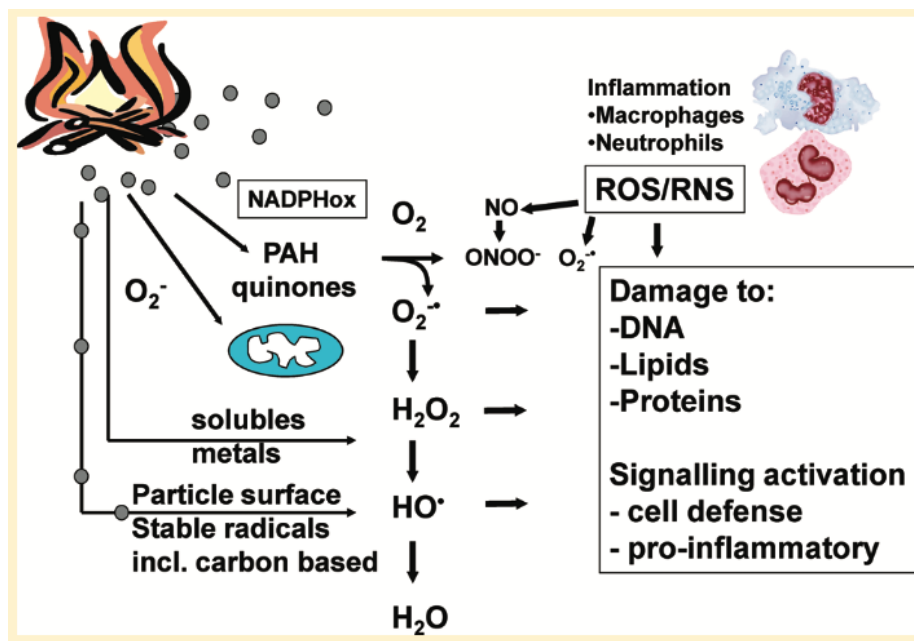


Figure 14 : Mécanismes envisagés dans l'induction du stress oxydatif, des dommages et de l'inflammation par les particules de pollution atmosphérique (Danielsen et al., 2011)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

e- Agents pathogènes : Papilloma virus humain

Les Papilloma virus humain (HPV), également trouvés sous la terminologie virus du papillome humain (PVH) correspondent à une famille de virus qui se distingue en deux groupes principaux. D'une part, les HPV dits à tropisme cutané et d'autre part, les HPV à tropisme muqueux.

Pour le premier groupe, ceux à tropisme cutané, ils ciblent les cellules épithéliales de la peau et entraînent soit des tumeurs bénignes (verrues plantaires) soit des tumeurs malignes comme des cancers spinocellulaires (cancers de la peau). En ce qui concerne le second groupe, les HPV à tropisme muqueux, il se scinde encore en deux sous-groupes. Premièrement, les HPV de bas risque cancérigène qui peuvent provoquer des tumeurs bénignes ou des condylomes (verrues génitales). Secondement, les HPV dits de haut risque cancérigène tels que les HPV 16 ou 18 qui sont alors qualifiés d'oncogènes et qui provoquent des lésions précancéreuses pouvant évoluer sur plusieurs dizaines d'années.

Il s'agit des infections sexuellement transmissibles les plus communes. En effet, il est estimé que 80% des femmes et des hommes y sont exposés durant leur vie. Néanmoins, seuls 10% des cas d'infection sont caractérisés par une persistance du virus dans l'organisme.

Lorsqu'il s'agit d'un HPV oncogène cela peut aboutir à des lésions précancéreuses voire cancéreuses. Les localisations anatomiques sont variées : col de l'utérus, vulve, vagin, pénis, anus, oropharynx, cavité buccale et larynx, elles sont liées notamment aux pratiques sexuelles.

En France, en 2015, 2% des cancers ont été estimés avec une étiologie liée à l'infection persistante par HPV soit près de 6 300 cas, la localisation anatomique oropharyngée (amygdale et base de la langue) se classe au 3^{ème} rang des cancers causés par une infection à HPV, derrière le cancer du col de l'utérus et de l'anus (*Figure 15*) (Institut National du Cancer, 2018). A l'échelle internationale, 26% des cancers des VADS sont causés par une infection à l'HPV (Dayyani et al., 2010).

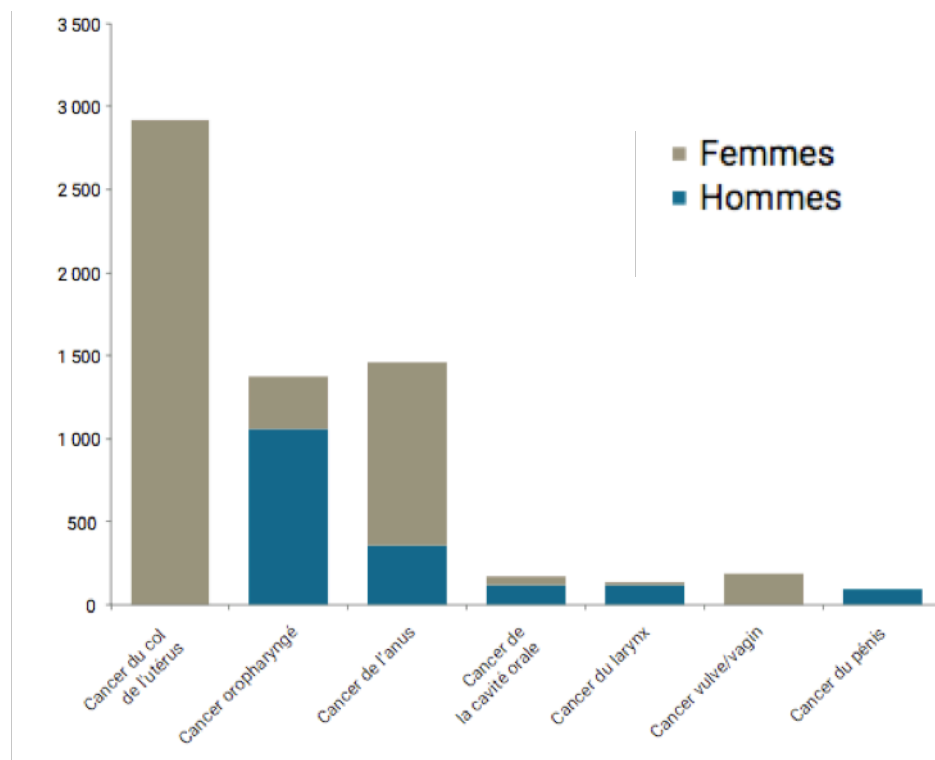


Figure 15 : Incidence des cancers liés à l'infection par les Papilloma virus humains, en France, en 2015, selon le sexe (Institut National du Cancer, 2018)

Si nous portons notre attention plus spécifiquement sur les cancers oropharyngés qui représentent 35% des cancers liés à une infection persistante à HPV, nous pouvons évoquer une étude française de 2017 qui s'est intéressée à l'évolution de l'incidence des cancers de la tête et du cou liés ou non à une infection par HPV selon le sexe.

D'après cette étude, l'incidence standardisée selon l'âge des cancers ORL chez les hommes entre 2005 et 2012 a reculé de 5,4% pour les cancers non-HPV induits contre un recul de seulement 3,5% pour les cancers HPV-induits. Concernant les femmes, l'incidence a diminué de 0,4% pour les cancers non HPV-induits alors qu'elle a augmenté de 1,9% pour les cancers HPV-induits. Ainsi, il est à noter une disparité de l'évolution de l'incidence entre les hommes et les femmes, avec une incidence qui recule chez les hommes mais de manière moins importante lorsque le cancer est HPV-induit alors que chez les femmes l'incidence progresse lorsque le cancer est HPV-induit (Jéhannin-Ligier et al., 2017).

Afin de se placer à l'échelle internationale, nous pouvons évoquer les chiffres recueillis aux Etats-Unis, malgré une baisse générale de l'incidence des cancers ORL, le *National Cancer Institute* a mis en exergue une augmentation de l'incidence du cancer des amygdales sur la période de la fin du XX^{ème} siècle, de 1975 à 1998 de près de 2 à 3% chez les hommes de moins de 60 ans (Hennessey et al., 2009). De plus, sur la période de 2008 à 2012, les Etats-Unis dénombrent 12 638 cas de cancers ORL chez les hommes contre 3 100 cas de cancers ORL chez les femmes causés par une infection persistante à l'HPV (Viens, 2016). A l'heure actuelle, il est établi que l'infection par HPV de haut risque oncogénique est retrouvée dans 15 à 25% des cancers ORL avec une incidence qui augmente au cours de ces dernières années et qui pourrait en partie expliquer pourquoi l'incidence des cancers ORL augmente alors que les autres facteurs étiologiques jusque là prédominant tendent à diminuer (Guihard et al., 2012). De plus, malgré les caractéristiques agressives de cette étiologie, les données épidémiologiques témoignent d'une meilleure réponse de ces tumeurs au traitement et d'une survie sans récurrence améliorée (Allen et al., 2010).

Le tropisme de l'infection par l'HPV au niveau ORL correspond à l'oropharynx et plus précisément aux cryptes profondes des amygdales palatines et linguales qui sont riches en cellules souches. Au sein de ces cryptes, des fissures sont décrites permettant aux lymphocytes d'interagir avec d'éventuels antigènes (viraux). Plusieurs sérotypes de HPV ont été décrits, notamment les sérotypes 16, 18, 31, 33 et 52. Mais le sérotype 16 est le principal, décrit à haut risque, retrouvé chez les patients atteints d'un cancer ORL. Pour décrire chronologiquement les événements nous allons donc utiliser l'exemple de l'infection des cryptes amygdaliennes. En effet, celles-ci sont décrites comme présentant des fissures favorisant la rencontre des cellules immunitaires et notamment des lymphocytes avec des antigènes viraux (*Figure 16 – A*).

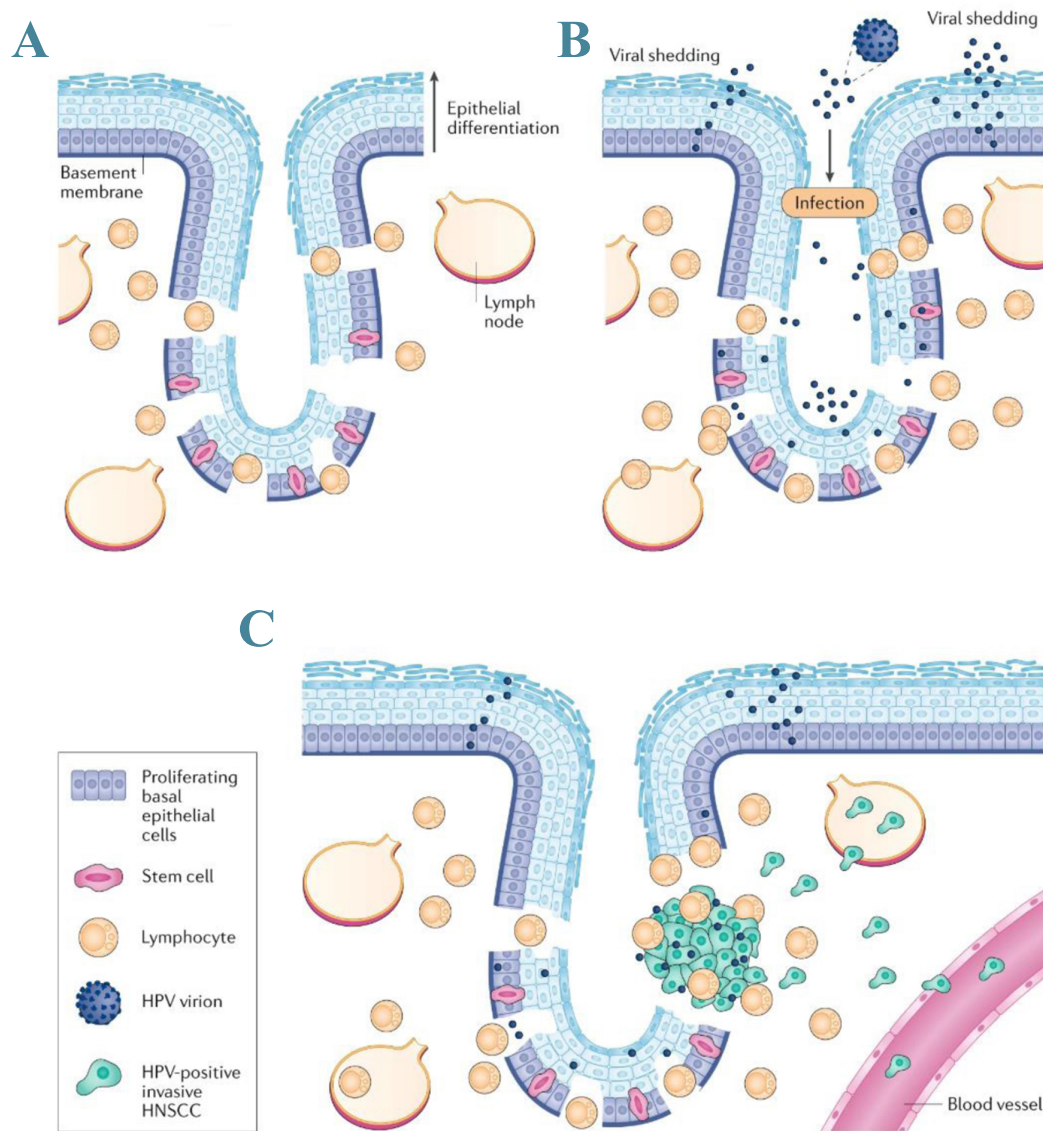


Figure 16 : Infection par un Papilloma virus humain et cancérogénèse des voies aérodigestives supérieures (Johnson et al., 2020)

Lors d'un contact avec un HPV de haut risque oncogénique, celui-ci va commencer par infecter les cellules basales de l'épithélium par production de particules virales. Ces particules atteignent alors les cellules basales des cryptes qui sont en prolifération mais également les cellules souches et bien sûr les cellules immunitaires (*Figure 16 – B*). Ce sont ces cellules qui sont à l'origine des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou HPV-induits. Ainsi, après intégration du génome viral par ces cellules en prolifération ou encore par des cellules souches, une transformation cellulaire est observée avec des altérations génétiques qui s'accumulent permettant l'acquisition de phénotypes invasif et métastatique (*Figure 16 – C*) (Johnson et al., 2020).

Une fois le virus entré dans la cellule par endocytose, le génome viral composé de sept gènes précoces : E1 à E7 (codent pour des protéines de la réplication et de la transcription) et de deux gènes tardifs : L1 et L2 (codent pour les protéines de la capside virale) intègre le génome de l'hôte infecté. Parmi les gènes viraux cités, deux sont qualifiés d'oncogènes car ils sont essentiels à la cancérisation. Tout d'abord, il s'agit de E6 qui se lie à la protéine ubiquitine ligase afin de former un complexe capable de se lier à la protéine p53 qui est alors dégradée par la voie dépendante du protéasome. Lorsque p53 est dégradée, elle ne peut plus jouer son rôle de gardien du génome notamment en induisant les réparations des dommages causés à l'ADN ou encore l'induction de l'apoptose. La mort cellulaire programmée ainsi empêchée, les mutations et autres aberrations chromosomiques générées vont s'accumuler provoquant l'apparition d'un phénotype pro-tumoral. Ensuite, E7 se lie et inactive une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, il s'agit de la protéine associée au rétinoblastome : pRb et libère des facteurs de transcription de la famille E2F. Cette dernière ainsi libre provoque le passage du cycle de la phase G1 vers la phase S. De plus, pRb régule elle-même d'autres protéines suppressives de tumeurs par régulation négative de l'expression de p16, inhibiteur de la kinase cycline-dépendante. Ainsi, la détection de p16 est un outil dans la classification des tumeurs ORL HPV positives (*Figure 17*) (Allen et al., 2010) - (Guihard et al., 2012) - (Johnson et al., 2020) - (Blanco et al., 2021).

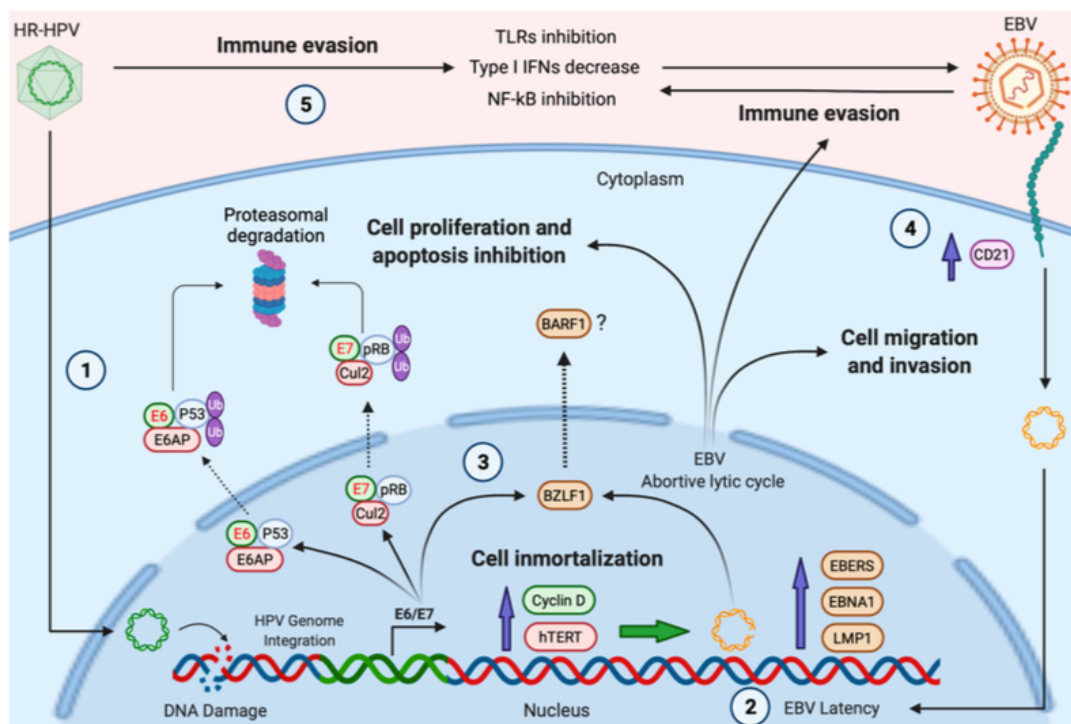


Figure 17 : Infection d'une cellule par un Papilloma virus humain et par l'Epstein Barr virus – infographie proposée par (Blanco et al., 2021)

Nous décidons pour la suite des propos de ce manuscrit de ne pas détailler davantage les processus de cancérisation lors d'une infection par l'HPV étant donné que cette étiologie est exclue de notre travail de recherche.

Afin de prévenir les risques d'infection par l'HPV et le risque de développer un cancer, diverses méthodes de prévention existent mais celles-ci sont plus focalisées sur les cancers génitaux. En effet, il est possible de réaliser des dépistages du cancer du col de l'utérus par frottis ou encore, selon l'âge des patients, des vaccins sont aujourd'hui disponibles sur le marché. Concernant les vaccins, la France se positionne comme un cas atypique étant donné le pourcentage faible de la couverture vaccinale avec seulement 26,2% des jeunes de 15 ans vaccinés et 21,4% des jeunes de 16 ans. Globalement, la couverture vaccinale ne dépasse pas 30%, pour aucune des classes d'âge. A l'inverse d'autres pays, notamment européens tels que le Royaume-Uni, le Portugal, la Suède, la Norvège ou encore la Finlande qui présentent une couverture vaccinale supérieure à 80%.

La France recommande depuis 2019 une vaccination étendue aux garçons, ce qui est déjà le cas de pays tels que l'Australie, les Etats-Unis, l'Italie, le Canada, la Norvège ou encore l'Argentine. Néanmoins, ces vaccins n'ont d'indications que pour les cancers du col de l'utérus, de l'anus, de la vulve, du vagin et pour les condylomes. En effet, malgré une classification par le CIRC des infections par l'HPV comme cancérogène (sérotypage 16), les indications de ces vaccins ne sont pas étendus aux cancers oropharyngés en raison d'un manque de données cliniques (Institut National du Cancer, 2018).

f- Autres facteurs étiologiques

Pour faire suite à la partie portant sur l'infection par HPV, un autre agent pathogène peut également être impliqué dans le développement de cancers ORL mais plus précisément au niveau du nasopharynx, il s'agit de l'Epstein-Barr virus (EBV) (*Figure 17*). En effet, de nombreuses études menées notamment en Chine attestent de la présence du génome de l'EBV signant une infection par ce virus associée à la localisation nasopharyngée du cancer. La mise en évidence et le suivi du génome viral dans le plasma des patients sont d'ailleurs utilisés dans la prise en charge de ceux-ci allant du dépistage au suivi post-traitement en Chine (Fung et al., 2016).

De plus, nous pouvons également citer comme facteur de risque des cancers de la tête et du cou, une mauvaise hygiène bucco-dentaire. En effet, une étude sur les données de la santé bucco-dentaire et son impact sur la prévalence des cancers de la tête et du cou a été menée sous forme de deux études cas-témoin multicentriques, l'une en Europe centrale (924 patients atteints d'un cancer ORL et 928 témoins) et l'autre en Amérique latine (2 286 patients atteints d'un cancer ORL et 1 824 témoins).

Ces études s'étalent sur une période de 5 ans : de 1998 à 2003. L'un des paramètres retenu pour l'étude correspond à l'état de la bouche. Celui-ci est établi selon un questionnaire proposé aux participants avec des scores attribués selon la fréquence du brossage des dents, l'utilisation de produits de prothèses dentaires ou encore la régularité des visites chez le dentiste. De plus, ce questionnaire est complété par un examen réalisé par un professionnel odontologiste afin d'objectiver le nombre de dents manquantes, la présence de tartre, des saignements de gencives ou encore des dents cariées.

Ainsi, un mauvais état de la bouche entraîne 2,89 fois plus de cancers de la cavité buccale, du pharynx ou du larynx comparé au groupe présentant un bon état général de la bouche en Europe centrale. Pour l'Amérique latine, un mauvais état de la bouche entraîne 1,89 fois plus de cancers de la cavité buccale, du pharynx ou du larynx comparé au groupe témoin (Guha et al., 2007).

Enfin, parmi les derniers facteurs de risque que nous pouvons évoquer, il s'agit d'une part de l'alimentation pauvre en légumes et en fruits qui favorise le développement des cancers de la tête et du cou (Freedman et al., 2008) mais également l'exposition de certains travailleurs à la poussière de bois.

L'ensemble des facteurs de risque présenté ci-dessus est influencé à la fois par le contexte social mais également par l'éducation. En effet, selon le bulletin épidémiologique hebdomadaire portant sur l'impact de l'environnement socioéconomique sur l'incidence des cancers en France, 15 000 cas de cancers seraient évitables chaque année par l'amélioration des conditions de vie et par la promotion de la santé au sein des populations défavorisées en termes socioéconomiques (Bryere et al., 2017).

L'analyse réalisée s'est basée sur les données des registres des cancers membres du réseau Francim⁸ entre 2006 et 2009 et l'environnement socioéconomique a été évalué selon l'indice européen agrégé de défavorisation sociale⁹ (capital financier, culturel et social des individus).

Tout d'abord, ce bulletin nous apprend que le cancer est l'une des pathologies la plus impactée par le contexte socioéconomique, c'est pourquoi les plans cancers de 2009-2013 et de 2014-2019 ont orienté l'une de leur priorité sur la réduction des inégalités sociales en matière de santé. Concernant les résultats de cette étude, l'incidence pour les cancers lèvre – bouche – pharynx augmente en parallèle de l'observation d'une défavorisation sociale. De manière plus précise, la part des cancers lèvre – bouche – pharynx attribuable au contexte social défavorable est de 26,6% chez les hommes et de 22,7% chez les femmes (*Figure 18*) (Bryere et al., 2017).

Localisation	Hommes	Femmes	Total
Estomac	368	368	736
Foie	597	252	849
Larynx	850	*	850
Lèvres-bouche-pharynx	2 132	746	2 878
Œsophage	577	**	577
Pancréas	117	*	117
Poumon	5 614	1 639	7 253
Vessie	934	**	934
Col de l'utérus	–	640	640
Total	11 189	3 645	14 834

* Non calculé car incidence trop faible.

** Non calculé car relation non significative entre l'incidence et l'EDI.

Figure 18 : Nombre de cancers liés à la défavorisation sociale en France en 2012, selon la localisation anatomique (Bryere et al., 2017)

⁸ Réseau Francim : « Réseau français des registres des cancers ; Calvados, Côte-d'Or, Doubs, Finistère, Gironde, Isère, Loire-Atlantique, Manche, Bas-Rhin, Haut-Rhin, Saône-et-Loire, Somme, Tarn, Vendée et Haute-Vienne, ainsi que Lille et sa région » (Bryere et al., 2017).

⁹ « European Deprivation Index – EDI » (Bryere et al., 2017).

Cette étude permet à nouveau de mettre en évidence l'importance et la nécessité d'accentuer la promotion de la santé et de la prévention mais en orientant les discours et en les adaptant de manière à ce qu'ils soient audibles et compréhensibles pour toute la population et en particulier pour les plus défavorisés qui voient là une réelle perte de chance en termes de cancers évitables. Evidemment cette étude est à mettre en relief avec les autres facteurs de risque souvent davantage fréquents dans les milieux défavorisés, notamment la consommation de tabac et l'alcool (Bryere et al., 2017). Il est également possible de mettre en avant l'urbanisation intensive, les emplois exposant les salariés à davantage de polluants (exemple des salariés exerçant leur activité sur ou en bordure de route), ou encore certains transports comme les métros où la circulation et le renouvellement de l'air ne sont pas optimaux, tous ces paramètres influencent également le niveau d'exposition de certaines populations à davantage d'agents cancérigènes.

La stratégie décennale de lutte contre les cancers 2021 à 2030, en France, propose un axe complet sur la prévention. Les points clés évoqués, et en lien avec les cancers des VADS, sont : l'arrêt du tabac, la réduction de la consommation de l'alcool, l'accessibilité accentuée à une alimentation équilibrée, la prévention des risques infectieux, la réflexion sur l'environnement mais également la prévention à l'école.

A travers la description des différents facteurs de risque, la tendance générale semble aller dans le sens de la diminution de l'incidence des cancers des VADS par diminution globale des facteurs de risque, et notamment une diminution de la consommation de tabac et d'alcool. Néanmoins, le dernier rapport du GLOBOCAN, 2020, projette une incidence augmentée des cancers ORL de 30% d'ici à 2030, notamment en raison de l'exposition accentuée à la pollution atmosphérique. Ce facteur de risque nécessitera donc dans les prochaines années davantage d'études et de suivi.

II) Les cancers des voies aérodigestives supérieures : cancérogénèse et classifications moléculaires

Après avoir présenté en détails les cancers de la tête et du cou en termes d'épidémiologie et de facteurs de risque, nous proposons dans la suite de notre propos de décrire la cancérogénèse aboutissant à un cancer des VADS ainsi que les classifications moléculaires décrites dans la littérature.

1) Du tissu sain vers une tumeur primitive des voies aérodigestives supérieures

D'un point de vue histologique, 90% des cancers des VADS correspondent à des carcinomes de sous-type épidermoïde, trouvés également sous la terminologie : carcinomes malpighiens. Il s'agit là de cancers qui se développent au niveau des cellules squameuses qui forment la surface notamment des muqueuses des VADS. D'autres sous-types histologiques existent dans ces cancers que nous nous proposons d'évoquer sans les détailler davantage : l'adénocarcinome de l'éthmoïde (reconnu fréquemment comme maladie professionnelle des travailleurs du bois), les carcinomes du nasopharynx (fréquemment liés à l'infection par l'EBV) et les tumeurs malignes des glandes salivaires (adénocarcinomes, carcinomes adénoïdes kystiques, carcinomes muco-épidermoïdes à cellules acineuses et tumeurs malignes mixtes) (Anticancer Fund and European Society for Medical Oncology, 2015). Pour la suite de notre propos, l'attention sera centralisée sur le sous-type histologique des carcinomes épidermoïdes.

D'un point de vue chronologique et histologique, il est possible de notifier quatre étapes aboutissant *in fine* à un carcinome invasif. Tout d'abord, une hyperplasie des cellules épithéliales (prolifération excessive des cellules), puis une dysplasie (développement et organisation anormaux des cellules) (Fondation contre le Cancer, 2022), suivi d'un développement d'un carcinome *in situ* et enfin d'un carcinome invasif (*Figure 19*).

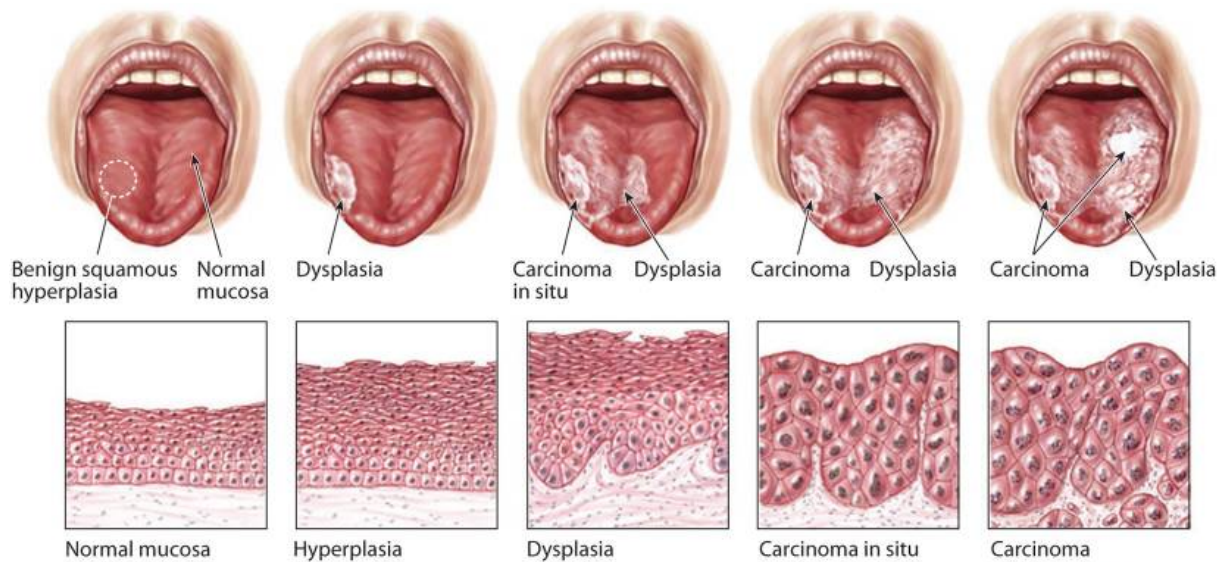


Figure 19 : Evolution du tissu sain vers un carcinome¹⁰ des voies aérodigestives supérieures (Pai and Westra, 2009)

Grâce aux données présentées dans la première partie de ce manuscrit, il est aisé de percevoir la nature hétérogène des cancers de la tête et du cou à la fois d'un point de vue de la localisation géographique mais également de l'étiologie. Afin de décrire plus en détail la cancérogénèse des cancers des VADS, nous focaliserons ce propos sur l'étiologie non liée à l'infection par HPV. Ainsi, les processus permettant d'aboutir à un cancer ORL correspondent à plusieurs étapes dont chacune est caractérisée par l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques. Ces altérations résultent soit du hasard, liées à l'hérédité, soit plus fréquemment d'une exposition à des composants cancérogènes comme ceux présentés dans la partie des facteurs de risque.

Effectivement, les substances classées cancérogènes, ou leurs métabolites, peuvent causer des dommages à l'ADN, qui sans réparation ou en cas de mauvais remaniements entraînent un certain nombre de mutations et d'altérations génétiques. Celles-ci peuvent notamment entraîner l'activation de proto-oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou encore l'altération des gènes régulateurs de l'apoptose, le tout favorisant la prolifération anormale des cellules.

¹⁰ Origine : figure illustrée par Robert Morreale, CMI et contribution de Joseph Califano, MD (Pai and Westra, 2009).

Une fois les mutations présentes, il est décrit une expansion clonale, qui associée à l'angiogénèse, l'échappement au système immunitaire et l'acquisition de nouvelles mutations qui permet d'aboutir à une tumeur. Cette expansion clonale semble s'initier, d'après la littérature, au sein d'une seule cellule souche adulte porteuse de mutations au niveau du gène TP53 (Leemans et al., 2018). Parmi les altérations décrites pour les cancers ORL, nous pouvons citer celles dites constitutionnelles. Il s'agit d'altérations impactant le gène XRCC1 en cas de présence de polymorphisme de celui-ci (XRCC1 26304) ou la baisse d'expression du gène hMLH1. Le premier participe aux réparations des cassures double brin de l'ADN et le second est impliqué dans la correction des erreurs, c'est son dysfonctionnement qui favorise l'apparition de l'instabilité ou de la perte d'hétérozygotie microsatellitaire¹¹ (Wei et al., 1998) - (Sturgis et al., 1999). La fréquence des altérations microsatellites dans les cancers ORL est fluctuante avec des études qui l'estiment entre 3 à 88% (De Schutter et al., 2007).

a- Altérations cytogénétiques dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou : aneuploïdie et anomalies chromosomiques

Dans tous les types de cancer, l'aneuploïdie est décrite comme correspondant à une modification du contenu nucléaire en ADN. Cette modification est témoin de l'instabilité chromosomique qui règne au sein des cellules cancéreuses.

De plus, les altérations génétiques évoquées dans le préambule de cette seconde partie du manuscrit peuvent prendre plusieurs formes, telles que des variations du nombre de copies, des gains ou des pertes d'hétérozygotie (LOH : *loss of heterozygosity*) (Ha et al., 2009). L'initiation d'un cancer peut simplement résider dans l'altération génétique critique au sein d'une cellule unique qui présente alors un avantage en termes de phénotype de croissance ou encore de migration en comparaison aux autres cellules. Elle peut alors se développer au niveau de la muqueuse tout en accumulant d'autres altérations permettant l'acquisition d'un phénotype agressif. Une expansion clonale est alors observée où les clones présentent les mêmes altérations sans pour autant laisser paraître des caractéristiques histopathologiques de dysplasie (Califano et al., 2000). La description actuelle faite de la cancérogénèse ORL est composée de cinq étapes décrites chacune par des modulations génétiques.

¹¹ Les microsatellites correspondent à de petites séquences d'ADN nucléaire présentent au niveau des zones non codantes de manière préférentielle et se caractérisent par la répétition de 2 à 4 nucléotides identiques. Ils peuvent faire l'objet d'altérations, soit d'une instabilité soit d'une perte d'hétérozygotie (De Schutter et al., 2007).

▲ Tout d'abord, il s'agit de la transition d'une **muqueuse normale vers une hyperplasie**. Cette étape est caractérisée par une perte de l'hétérozygotie du chromosome 9p et par un changement génétique au niveau de la localisation chromosomique 9q21¹², qui correspond à la région qui héberge les gènes suppresseurs de tumeurs tels que le CDKN2A (inhibiteur de kinase cycline-dépendant 2A) ou encore l'ARF (*ADP-ribosylation factor 1* codant pour p14, un stabilisateur de p53) (*Figure 20*) (Pai and Westra, 2009) - (Johnson et al., 2020). De plus, l'inactivation de P16 est également décrite lors de cette transition ainsi que la surexpression de l'EGFR. Enfin, lors du développement de la muqueuse normale vers l'hyperplasie, l'inactivation des télomérases est également décrite (*Figure 20*) (Pai and Westra, 2009) - (Johnson et al., 2020). Les télomères correspondent à des séquences d'ADN répétées en tandem avec 5'-TTAGGG-3' présentes aux extrémités des chromosomes. Deux facteurs sont associés à ces éléments, d'une part le facteur de répétition télomérique 1 : TRF1 et d'autre part le facteur de répétition télomérique 2 : TRF2. La longueur des télomères est maintenue par la télomérase dont l'activité est régulée *via* l'expression de la transcriptase inverse de la télomérase humaine : hTERT. Le dysfonctionnement des télomères constitue un marqueur prédictif de la radio-résistance des cellules tumorales des VADS. De plus, une surexpression de hTERT est de mauvais pronostic (Sasahira and Kirita, 2018).

▲ Ensuite, **l'hyperplasie évolue vers une dysplasie** caractérisée par la perte de l'hétérozygotie des chromosomes 3p et 17p et par un changement génétique au niveau de la localisation chromosomique 17p13. Néanmoins, le locus spécifique responsable du phénotype suppresseur de tumeur de 3p n'est pas caractérisé, seules des régions de perte allélique sont décrites. Parmi les régions de perte allélique, nous pouvons citer : 3p14 (contient le gène de la triade histidine fragile, gène suppresseur de tumeurs), 3p21 (région du gène suppresseur de tumeur RSBF1A) ou encore 3p22, 3p24 et 3p26. Concernant 17p13, il s'agit de la localisation du gène suppresseur de tumeurs : TP53, ainsi plus de 50% des cancers des VADS présentent une inactivation du gène TP53 (*Figure 20*) (Pai and Westra, 2009) - (Johnson et al., 2020).

¹² Dans la suite des descriptions des altérations génétiques, les localisations de ces dernières sur les chromosomes utilisent la nomenclature p ou q, pour respectivement, le bras court ou le bras long du chromosome impliqué.

▲ L'étape suivante permet la transition de la **dysplasie vers un carcinome *in situ*** par perte des localisations chromosomiques 13q21 et 14q32. De plus, une amplification de la région 11q13 dans 30 à 60% des cas de tumeurs primaires ORL a été rapportée, ces tumeurs présentent un profil particulier associé à un mauvais pronostic et des récurrences locorégionales ainsi que des métastases à distance. Cette région comprend notamment le gène CCND1 qui code pour la protéine cycline D1 qui active sa kinase pour permettre la phosphorylation du Rb pour le passage de la phase G1 du cycle cellulaire vers la phase S (*Figure 20*) (Pai and Westra, 2009) - (Johnson et al., 2020).

▲ Le **carcinome *in situ* évolue ensuite en tumeur maligne** lorsque des altérations chromosomiques sont présentes sur les bras 8q, 6q et 4q et notamment des délétions. Mais également, lorsque le gène PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), suppresseur de tumeur, est inactivé (*Figure 20*) (Pai and Westra, 2009) - (Johnson et al., 2020).

▲ La tumeur maligne peut ensuite acquérir des caractéristiques invasives aboutissant à des **métastases** lors d'altérations chromosomiques sur le bras 8q aboutissant à la dérégulation du gène CSMD1 (*Figure 20*) (Pai and Westra, 2009) - (Johnson et al., 2020).

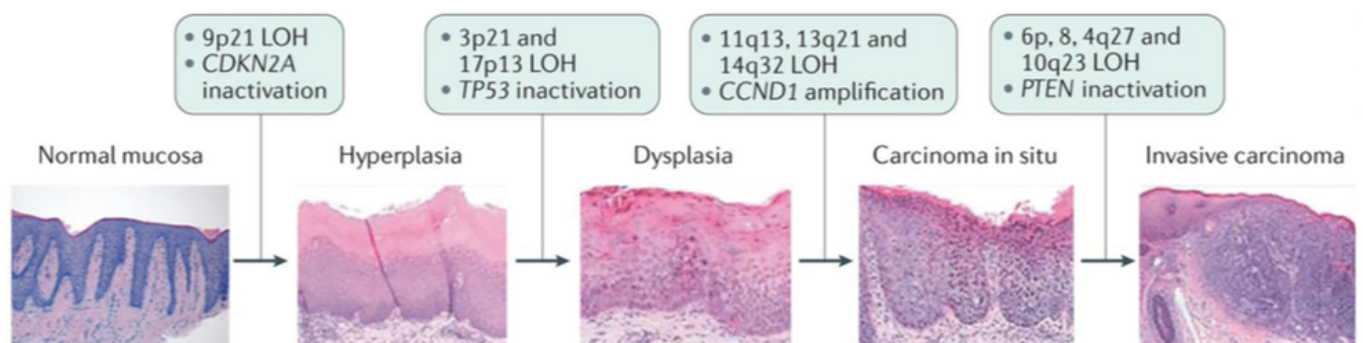


Figure 20 : Altérations génomiques décrites dans la cancérogénèse des voies aérodigestives supérieures¹³ (Johnson et al., 2020)

¹³ Les images de la figure histopathologiques proviennent de la référence 250250, Springer Nature Limited (Johnson et al., 2020).

b- Altérations épigénétiques

Les altérations génétiques sont liées, tout au long du processus de cancérogénèse, aux altérations épigénétiques. Ces dernières correspondent à un ensemble de modifications transmises durant les divisions cellulaires afin de modifier l'activité du génome sans pour autant perturber la séquence nucléotidique (Bird, 2002). Il existe trois types d'altérations épigénétiques : la méthylation de l'ADN et de l'ARN, la modification des histones avec notamment une acétylation post-traductionnelle et enfin l'activité des ARN non codants comme par exemple celle des microARNs (miARN ou miR) (Roberti et al., 2019) - (Romanowska et al., 2020). Parmi les altérations épigénétiques par méthylation les plus documentées pour les cancers des VADS et impliquées dans les processus de la progression tumorale, nous pouvons évoquer CDKN2A à hauteur de 33% des cas de cancers ORL (rôle dans le cycle cellulaire) dont l'hyperméthylation favorise la progression de la tumeur ainsi que les processus de la métastase. Il y a également le 6-O-méthylguanine-ADN ou méthyltransférase ou méthylguanine méthyltransférase dans 31% des cas (MGMT impliqué dans la réparation de l'ADN) où son hyperméthylation est associée à un risque de développer un cancer des VADS. Ou encore la méthylation de la protéine kinase 1 associée à la mort cellulaire par apoptose dans 19% des cas (DAPK = *Death-Associated Protein Kinase*) qui est observée lors d'un stade précoce de cancers ORL (Maruya et al., 2004) - (Romanowska et al., 2020). Nous pouvons également citer quelques exemples de l'implication des miARNs dans la progression tumorale des cancers des VADS, avec par exemple une hyperactivation du miR34 ce qui influence l'apoptose, ou encore la régulation négative du miR26 qui impacte l'inflammation et enfin la régulation diminuée du miR125b qui influence le métabolisme en préservant les cellules du stress oxydatif (Romanowska et al., 2020).

c- Les anti-oncogènes et oncogènes

Dans cette sous-partie nous allons discuter des principaux anti-oncogènes et oncogènes décrits dans la cancérogénèse des VADS et de la conséquence de leur dérégulation sur le cycle cellulaire, la voie WNT et la prolifération.

▲ Commençons par la progression au sein du **cycle cellulaire** qui est normalement régulée par deux points de contrôle, l'un entre les phases G1 et S, et l'autre entre les phases G2 et M.

En ce qui concerne ce premier site de contrôle, il est sous la dépendance du facteur de transcription E2F et de la pRb qui vont ainsi réguler les complexes Cycline D1 / CDK4 mais également Cycline D1 / CDK6. Concernant le second site de contrôle, celui-ci est régi par le complexe Cycline B / CDK1. L'ensemble est modulé par différentes protéines, telles que p16^{INK4A}, p21 et p53. Or, dans les cancers de la tête et du cou la dérégulation du cycle cellulaire est connue pour favoriser la carcinogénèse. En effet, plusieurs anomalies portant sur des oncogènes et des anti-oncogènes engagent les cellules de manière anarchique dans la progression au sein du cycle cellulaire (*Figure 21*) (Leemans et al., 2018).

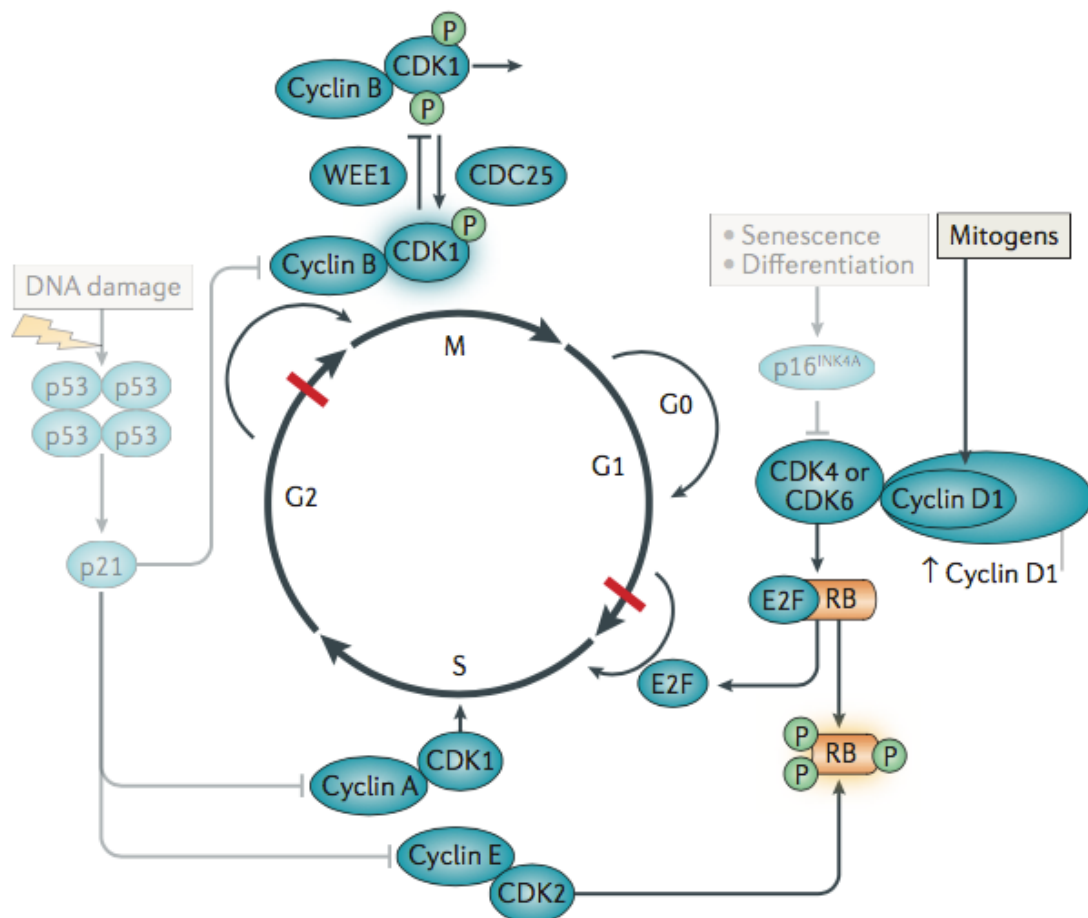


Figure 21 : Description de la progression du cycle cellulaire dans les cancers ORL (Leemans et al., 2018)

Traits en rouge correspondent au point de contrôle.

Parmi les dérégulations les plus connues, nous pouvons tout d'abord évoquer l'altération du gène CDKN2A connu comme étant un suppresseur de tumeur. Sa régulation négative provoque une diminution de l'expression de sa protéine : p16^{INK4A} dont la fonction consiste à se lier aux complexes Cycline D1 / CDK4 et Cycline D1 / CDK6.

De plus, l'amplification du gène CCND1 favorise l'expression de la Cycline D1. Et enfin, l'inactivation du gène TP53 limite la veille quant à la réplication non programmée des cellules cancéreuses et ne permet plus l'expression de la protéine p21 qui normalement joue un rôle d'inhibiteur des CDK. Ces trois points participent donc à la levée du premier point de contrôle permettant donc le passage des cellules de la phase G1 vers la phase S, et ce de manière incontrôlée favorisant donc la progression tumorale (*Figure 21*) (Leemans et al., 2018).

▲ Poursuivons par la voie WNT décrite comme impliquée dans le maintien des cellules souches au sein des tissus dont l'effecteur principal est la β -caténine. Celle-ci agit d'une part, avec la E-cadhérine pour permettre des adhésions entre les cellules et d'autre part, elle peut se lier sur des facteurs de transcription afin de dynamiser leur rôle.

Récemment, FAT1 a été identifié comme impliqué dans la voie WNT. En effet, il appartient à la famille des cadhérines et code pour la protéine FAT1 qui contient des domaines identiques à ceux de la E-cadhérine présente au niveau des tissus épithéliaux. FAT1 est impliquée dans le trafic cellulaire *via* l'actine mais également dans les contacts entre les cellules. Elle peut, comme la E-cadhérine, interagir avec la β -caténine et la bloquer au niveau de la membrane plasmique, cette dernière ne peut alors plus jouer son rôle de stimulation sur des facteurs de transcription. Or, ce blocage est levé en cas de mutations inactivatrices de FAT1 comme celles observées dans les cancers des VADS (mutations dans 23% des cas de cancers ORL et absence du gène dans 8% des cas), permettant ainsi de restaurer les fonctions de la β -caténine. En parallèle, un autre acteur de la voie WNT a été décrit, il s'agit du gène AJUBA qui code pour la protéine AJUBA3 impliquée dans diverses fonctions comme l'adhésion et qui peut notamment réguler à la hausse les niveaux d'expression de la β -caténine. Dans les cancers ORL il a été démontré une concomitance des mutations des gènes FAT1 et AJUBA dont l'impact en termes de cancérogénèse reste à déterminer. Pour finir, NOTCH1 est également un point important, il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur impliqués dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Une fois activé par ses ligands, le récepteur Notch1 voit son domaine intracellulaire migrer jusqu'au noyau, où il agit comme un facteur de transcription pour la régulation des niveaux de β -caténine. Il existe donc une intrication moléculaire entre la voie WNT faisant intervenir plusieurs gènes tels que FAT1, AJUBA et NOTCH1 (Leemans et al., 2018).

▲ Terminons par les voies impliquées dans la transition d'une cellule quiescente vers une cellule proliférative. En effet, dans un contexte de cancer, les cellules sont capables de générer leurs propres signaux de **prolifération**, tels que des oncogènes surexprimés qui codent pour des facteurs de transcription à l'origine de boucles d'autostimulation. Les facteurs de croissance décrits dans les cancers ORL correspondent tout d'abord aux facteurs de croissance fibroblastiques, notamment le FGF3 (*Fibroblast Growth Factor 3*) qui est surexprimé en raison de l'amplification de la région chromosomique 11q13 (Muller et al., 1994). De plus, nous pouvons également citer le facteur de croissance épidermique : l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) ou encore le facteur de croissance tumorale α : TGF- α , dont les implications dans la cancérogénèse sont précoces (Grandis and Tweardy, 1993a). Ces facteurs vont effectivement se fixer au niveau de divers récepteurs, notamment des récepteurs aux facteurs de croissance souvent surexprimés que sont les récepteurs de l'EGF : EGFR. En effet, l'ARNm (acide ribonucléique messager) de l'EGFR a été décrit comme 69 fois plus élevé dans 92% des tumeurs en comparaison avec la muqueuse normale (Grandis and Tweardy, 1993b).

Les voies liées à l'EGFR (développées davantage dans la suite de ce manuscrit) sont particulièrement importantes dans la prolifération des cellules tumorales des cancers des VADS, il en existe trois principales, à savoir, la voie RAS / RAF / MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), la voie PI3K et la voie JAK (*Janus kinase*) / STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) / PKC. L'hyperactivation de l'EGFR peut être liée à des modifications génétiques et moléculaires de deux de ces voies sans pour autant présenter une surexpression de l'EGFR. En effet, RAS peut présenter un gain de fonction, mais cela est rare dans les cancers ORL. De plus, l'amplification du bras long du chromosome 3 dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou peut entraîner une mutation du gène PIKC3A qui code pour la sous-unité catalytique de PI3K (Redon et al., 2001).

d- Anomalies cellulaires

Des anomalies cellulaires sont également décrites dans les cancers des VADS, telles que celles impactant la mort cellulaire par apoptose ou encore l'angiogénèse.

▲ D'une part, l'**apoptose** est décrite dans les cancers ORL comme dérégulée notamment par la perturbation des effecteurs pro-apoptotiques que sont TP53, FAS et TNF- γ (*Tumor Necrosis Factor γ* ou facteur de nécrose tumorale γ) favorisant ainsi la prolifération des cellules. Les signaux atteignent ensuite la mitochondrie qui relargue alors le cytochrome-c dans le cytoplasme de la cellule sous le contrôle des membres de la famille des Bcl-2 (Bax, Bak, Bid et Bim ont une activité pro-apoptotique alors que Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et Bcl-W ont une activité anti-apoptotique) ce qui entraîne la formation de l'apoptosome et *in fine* l'apoptose. Ainsi, la moindre modification d'expression des protéines précitées peut conduire à la dérégulation de cette mort cellulaire. Par exemple, la réduction concomitante des expressions de Bcl-X_L et de Mcl-1 engage les cellules cancéreuses de l'ovaire vers l'apoptose (Brotin et al., 2010). De plus, la surexpression de Bcl-2 et une diminution de l'expression de Bax influencent la régulation de l'apoptose et conduisent à un mauvais pronostic dans les cancers ORL notamment lié à une résistance à la radiothérapie (Xie et al., 1999) - (Ito et al., 1999) - (Leemans et al., 2018). D'autres voies de morts cellulaires programmées sont décrites comme impliquées dans la cancérogénèse des VADS, notamment l'autophagie ou la ferroptose que nous développerons dans la suite de ce manuscrit.

▲ D'autre part, lorsque la tumeur prolifère, les cellules requièrent alors une augmentation des apports en oxygène et en nutriments. Afin de répondre au défaut d'oxygène, c'est-à-dire à l'hypoxie, les cellules déclenchent plusieurs voies de signalisation sous le contrôle du facteur induit par l'hypoxie (HIF = *hypoxia inducible factor*) dans le but de favoriser l'expression de facteurs pro-angiogéniques notamment les membres de la famille du facteur endothélial vasculaire (VEGF = *vascular endothelial growth factor*). Ainsi, le processus d'**angiogénèse** est enclenché par l'acquisition d'un caractère angiogénique par certaines cellules tumorales. La néovascularisation ou néoangiogénèse s'active alors avec une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), une prolifération des cellules endothéliales, une migration et un remodelage de cette matrice. Ces phénomènes sont possibles grâce à une balance entre stimulation et inhibition de la néovascularisation. Ainsi, les marqueurs liés à l'angiogénèse dans les cancers de la tête et du cou correspondent au VEGF, à l'interleukine-8 (IL-8) et aux FGF (Bancroft et al., 2001) - (Riedel et al., 2000) - (Chin et al., 2004). De plus, des inhibiteurs des signaux de l'angiogénèse interviennent également, à savoir la thrombospondine-1. Cette protéine se lie au CD36 qui correspond à un récepteur transmembranaire des cellules endothéliales (Chin et al., 2004).

Il y a également l'expression des effecteurs de la famille du VEGF : VEGF-A et VEGF-C, pour qui leur niveau d'expression a été corrélé avec un risque accru de métastase des ganglions lymphatiques (Chin et al., 2004).

e- Microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral dans les cancers des VADS est multi-acteur, il est tout d'abord composé de cellules, à savoir des cellules tumorales, des cellules stromales telles que des cellules endothéliales, des fibroblastes associés aux tumeurs (CAF : *Cancer Associated Fibroblasts*) dans un état d'activation persistant et exprimant l' α SMA (*α -smooth muscle actin*) ainsi que des cellules immunitaires. Ce microenvironnement englobe ensuite une matrice acellulaire garante de la structure physique, elle apparaît également comme étant un réservoir de facteurs solubles. Elle est composée de collagènes, de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes, de glycoprotéines et de protéases (Pickup et al., 2014).

Concernant les CAF, l'élévation du taux d' α SMA est associée à un mauvais pronostic dans ces cancers (Marsh et al., 2011). De plus, les CAF sont également capables de produire divers facteurs de croissance (EGF, VEGF et HGF : *hepatocyte growth factor* ou facteur de croissance des hépatocytes) mais également des cytokines telles que l'IL-6 ou encore des chimiokines qui dynamisent la croissance tumorale, le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives et l'angiogénèse. Pour accentuer encore l'ensemble de ces caractéristiques, les CAF sont la principale source de métalloprotéases matricielles (MMP : *matrix metalloproteinase*) qui permettent la dégradation mais également le remodelage de la MEC favorisant ainsi la libération de facteurs de croissance comme le FGF, le VEGF ou encore le TGF- β . Grâce à la production de VEGF par les cellules tumorales et par les CAF, des cellules endothéliales sont recrutées afin de permettre la néovascularisation et donc, l'apport de composants nécessaires à la progression tumorale, c'est-à-dire de l'oxygène et des nutriments (Canning et al., 2019) - (Peltanova et al., 2019).

▲ **Echappement immunitaire et inflammation**

Comme dans tous les cancers, celui de la tête et du cou exprime un certain nombre d'antigènes tumoraux. Ceux-ci peuvent être classés en deux grands sous-groupes : les antigènes tumoraux viraux que nous ne développerons pas ici et les antigènes tumoraux non viraux. Pour ces derniers, il existe encore deux ramifications, à savoir : les antigènes mutés que sont les antigènes spécifiques à la tumeur et les antigènes non mutés qui correspondent aux antigènes associés à la tumeur (*Figure 22*) (von Witzleben et al., 2020).

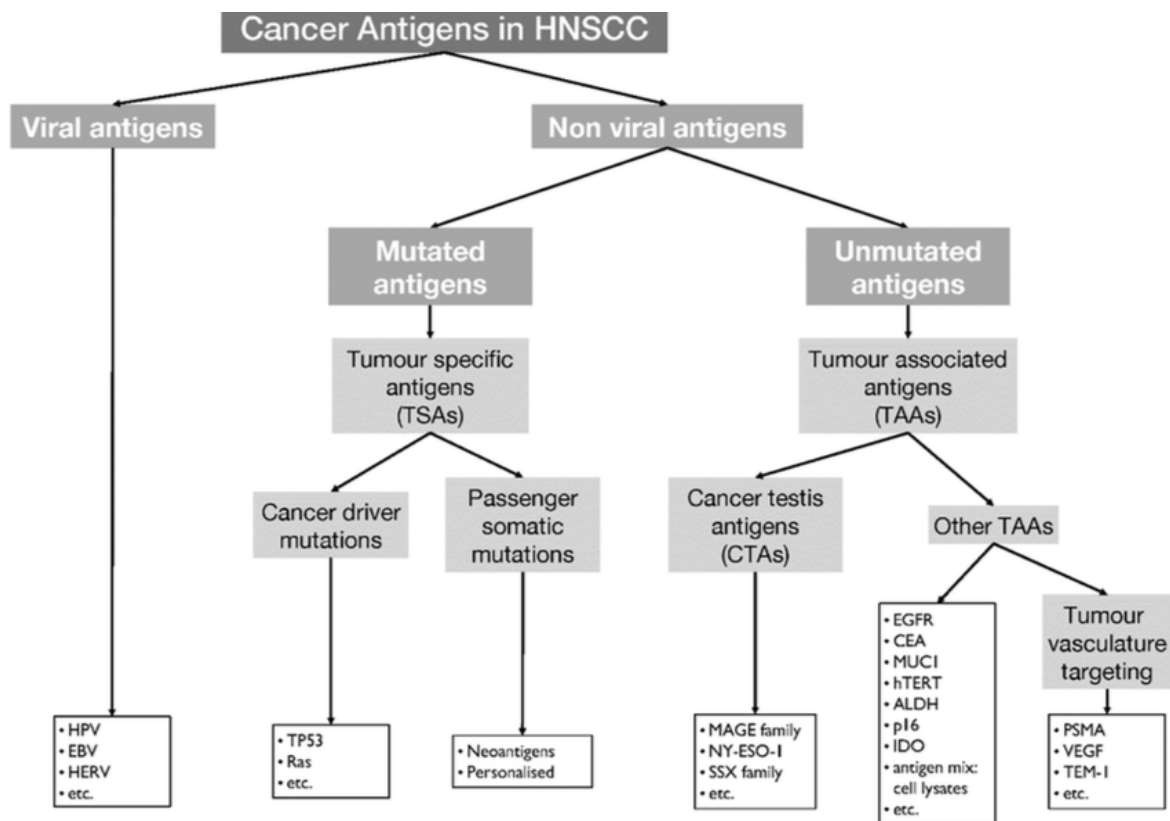


Figure 22 : Antigènes tumoraux décrits dans les cancers de la tête et du cou (von Witzleben et al., 2020)

« TSA = tumour-specific antigen, TAA = tumour-associated antigen, CTA = cancer testis antigen, HPV = human papilloma virus, EBV = Epstein–Barr virus, HERV = human endogenous retroviruses, MAGE = melanoma-associated antigen, NY-ESO-1 = New York esophageal squamous cell carcinoma-1, SSX = synovial sarcoma X, EGFR = epithelial growth factor receptor, CEA = carcinoembryonic antigen, MUC1 = mucin-1, hTERT = human telomerase reverse transcriptase, ALDH = aldehyde dehydrogenase, IDO = indolamin-2,3-dioxygenase, PSMA = prostate-specific membrane antigen, VEGF = vascular endothelial growth factor, TEM-1 = tumour endothelial marker 1 », d'après la légende de la figure issue de la revue de cou (von Witzleben et al., 2020)

Nous allons donc pouvoir discuter de ces différents acteurs à commencer par la famille des antigènes MAGE. Ces antigènes sont associés aux tumeurs et représentent une cible pour l'attaque des cellules T de l'immunité avec une réponse médiée par les anticorps IgG (Immunoglobuline G) dirigée contre les MAGEs présents dans le sérum des patients atteints d'un cancer ORL (Atanackovic et al., 2006). Les expressions de MAGEA1 et MAGEA4 sont associées à une moins bonne survie (Laban et al., 2014) - (Laban et al., 2019). Il existe également l'antigène NY-ESO-1 (*New York esophageal squamous cell carcinoma 1 antigen*) qui est présent dans environ 6% des cancers ORL (Atanackovic et al., 2006). Sa surexpression est associée à un risque plus élevé de récurrences, à des résistances au traitement et à une survie plus courte (Cuffel et al., 2011) - (Laban et al., 2014).

Enfin, nous pouvons également évoquer la famille SSX (*Synovial Sarcoma X breakpoint*) composée de SSX1, SSX2 et SSX4 exprimée par le tissu tumoral dans les cancers de la tête et du cou (Atanackovic et al., 2006) - (Türeci et al., 1998).

Poursuivons maintenant par la description des autres antigènes associés à la tumeur, ceux-ci sont non mutés mais surexprimés par les cellules cancéreuses donc également présents au sein du tissu sain. Les plus étudiés dans les cancers des VADS correspondent à l'EGFR, à l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), à la mucine 1 (MUC1), à l'hTERT, à l'aldéhyde dehydrogenase (ALDH), à P16 ou encore à l'indolamin-2,3-dioxygénase (IDO) (Liu et al., 2010) - (Barak et al., 2015) - (von Witzleben et al., 2020).

L'immunité anti-tumorale peut être représentée comme une balance entre les cellules T effectrices et les cellules T régulatrices. En effet, la première étape consiste en la prise en charge de ces antigènes tumoraux sécrétés par la tumeur par les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène dédiées au système immunitaire. Ces antigènes sont ensuite présentés par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ensuite, la seconde étape correspond au transport des antigènes par les cellules dendritiques vers les ganglions afin d'activer les lymphocytes T. Il s'en suit une troisième étape, où les lymphocytes T transitent alors par les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Puis, ils s'infiltrent jusqu'à atteindre la tumeur où ils reconnaissent alors les cellules comme étant cancéreuses, ils ont la capacité de lyser ces cellules, qui vont alors relarguer des antigènes tumoraux. Il s'agit là de la phase dite d'immunosurveillance où il y a une élimination compétente de la tumeur.

Néanmoins, il est possible que les cellules cancéreuses opèrent des changements notamment morphologiques ou une modification de l'expression d'antigènes suite à des mutations. Chaque clone va alors s'expandre et à nouveau connaître des mutations, ainsi ces multiples variants des cellules tumorales vont progressivement échapper au système immunitaire et s'adapter à ce dernier, c'est la phase d'équilibre.

Cette phase peut *in fine* progresser vers l'échappement immunitaire de la tumeur, notamment par un déséquilibre de la balance en faveur des lymphocytes T régulateurs (autres cellules régulatrices : cellules suppressives myéloïdes, macrophages associés à la tumeur, cellules dendritiques tolérogènes et les cellules NKT : *Natural Killer T* de type III) qui inhibent la réponse anti-tumorale.

Généralement, dans le cas des cancers des VADS, un important infiltrat immunitaire composé de cellules régulatrices est décrit (Partlová et al., 2015) - (Mandal et al., 2016). L'immunité antitumorale est réalisée par les lymphocytes T effecteurs et par les cellules *natural killer* alors que l'immunosuppression est sous la supervision des lymphocytes T régulateurs, des cellules suppressives dérivées des myéloïdes et des macrophages de polarisation M2. Un certain nombre d'études a mis en exergue que la plupart des tumeurs de la tête et du cou présente un microenvironnement immunosuppresseur (Mandal et al., 2016) - (Whiteside, 2005). Aussi, des niveaux importants de cellules T régulatrices CD8⁺ et de cellules *natural killer* sont corrélés à une meilleure survie alors que des niveaux élevés de cellules T régulatrices, de cellules suppressives dérivées des myéloïdes, de neutrophiles et de macrophages M2 sont associés à un stade avancé et de mauvais pronostic dans ces cancers (Peltanova et al., 2019).

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. En effet, le microenvironnement tumoral présente des quantités importantes de facteurs de croissance et de cytokines immunosuppressives, à savoir l'IL-6, l'IL-10, le VEGF et le TGF- β (Canning et al., 2019). L'ensemble de ces molécules permet le recrutement et l'activation des cellules immunosuppressives, à l'inverse ces molécules ne favorisent en rien l'arrivée des lymphocytes T effecteurs ni celle des cellules *natural killer* au niveau de la tumeur. Nous pouvons également indiquer que certaines altérations génétiques des cellules tumorales provoquent une diminution des niveaux d'antigènes leucocytaires humains (HLA) de classe I et des antigènes tumoraux. Cette diminution entraîne une baisse de la reconnaissance possible par les cellules immunitaires (lymphocytes T cytotoxiques) et de ce fait une limitation de la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire. Cet échappement permet donc aux cellules cancéreuses de poursuivre leur croissance (Ferris et al., 2006) - (Ferris et al., 2005) - (Johnson et al., 2020). De plus, il est à noter une régulation positive de PD-L1 (*programmed death-ligand 1* : ligand de mort programmée 1) dans les tumeurs localement avancées ce qui diminue l'action cytolytique des cellules immunitaires T (Ferris et al., 2016) - (Seiwert et al., 2016). Il est également à préciser que les cellules suppressives dérivées des myéloïdes expriment PD-L1 alors que les lymphocytes T régulateurs présents dans le microenvironnement tumoral expriment l'antigène 4 des lymphocytes T : CTLA4. Ces deux points favorisant également l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire (Johnson et al., 2020).

L'inflammation joue un rôle central dans la progression locale et le stade clinique de la tumeur ainsi que dans l'invasion et l'extension extranodale dans les cancers de la tête et du cou. Deux acteurs principaux sont d'ores et déjà identifiés, l'un comme marqueur pronostique et l'autre comme marqueur prédictif de la réponse défavorable à la chimio-radiothérapie. Il s'agit d'une part de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) qui correspond à une enzyme pro-inflammatoire convertissant l'acide arachidonique (AA) en prostaglandines, celle-ci favorise l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses de la tête et du cou. Et d'autre part, il s'agit de la surexpression de l'IL-6 (Sasahira and Kirita, 2018).

▲ Régulation de la glycolyse

Depuis 1927 et la description de la glycolyse aérobie par Otto Warburg, nous savons que les cellules tumorales répondent à leurs besoins énergétiques préférentiellement *via* la glycolyse (Warburg et al., 1927) - (Warburg, 1956) - (Kumar, 2017). Les explications sont multiples, à commencer par des perturbations des mitochondries, une adaptation au microenvironnement tumoral hypoxique et l'expression anormale d'enzymes du métabolisme (*Figure 23*) (Pelicano et al., 2006).

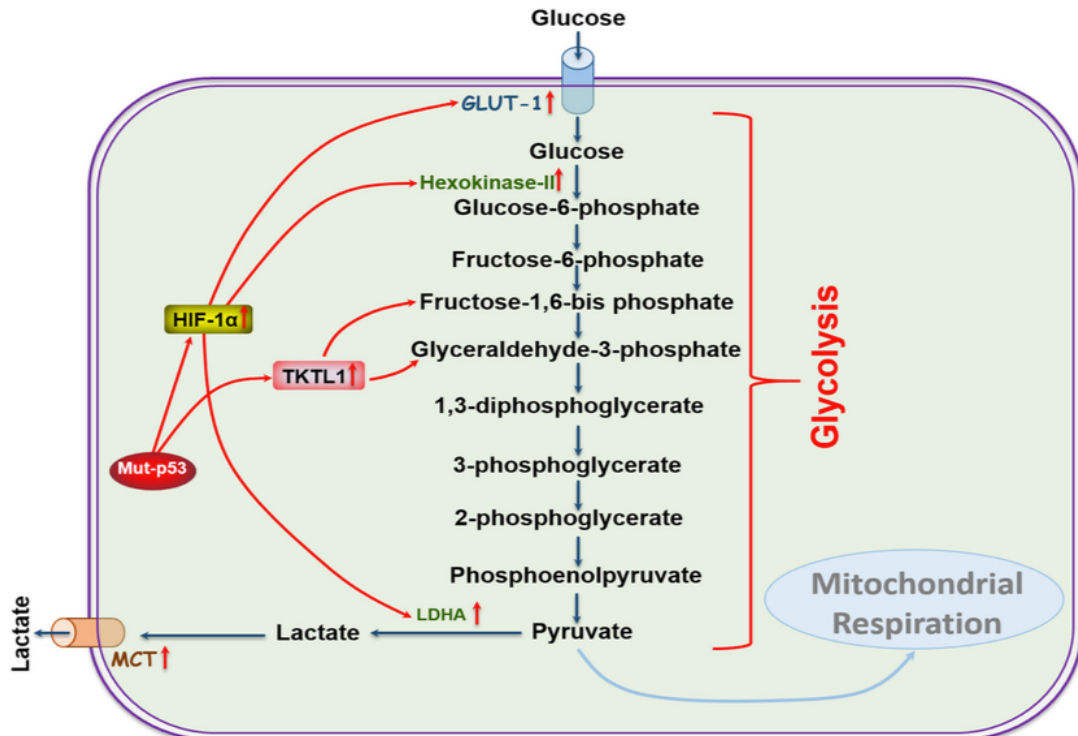


Figure 23 : Régulation de la glycolyse dans les cancers des voies aérodigestives supérieures (Kumar, 2017)

Différents acteurs opèrent dans le processus de glycolyse, à commencer par l'activation de **HIF-1** (*Figure 23*). Il s'agit d'un hétérodimère qui joue le rôle de facteur de transcription qui vise à reprogrammer et réguler le métabolisme vers la glycolyse aérobie ou anaérobie (Denko, 2008) - (Semenza, 2010). La sous-unité α est particulièrement exprimée dans les cancers de la tête et du cou et est capable de se lier à des éléments de réponse à l'hypoxie au niveau de la région promotrice de gènes cibles. Parmi les gènes cibles, il y a notamment ceux codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse, la modulation du pH, telles que la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (Semenza et al., 1994), les anhydrases carboniques CA9 et 12 (Wykoff et al., 2000), l'hexokinase (Mathupala et al., 2001), la lactate déshydrogénase A (Firth et al., 1995) et les transporteurs de glucose tel que GLUT-1 (Ebert et al., 1995). Ainsi, HIF-1 permet l'augmentation de l'absorption du glucose par l'induction de ses transporteurs et provoque la phosphorylation du glucose *via* l'augmentation de l'activité de l'hexokinase-I (HK-I) (Mathupala et al., 2001). Effectivement, lors du processus de glycolyse, du lactate est produit par les cellules et est relargué dans le microenvironnement tumoral favorisant donc la progression métastatique mais également la radiorésistance dans les cancers des VADS (Sattler et al., 2010) - (Quennet et al., 2006). HIF-1 a été décrit comme le pivot de la régulation des enzymes impliquées dans la glycolyse et dans l'exportation de son déchet, le lactate (Seagroves et al., 2001) - (Kumar, 2017).

Ensuite, il s'agit de l'implication de la **protéine hétérodimérique 1 de type transcétolase** (TKTL1 ou *transketolase-like protein 1*) (*Figure 23*) (Coy et al., 1996). Lorsque cette protéine est surexprimée il est à noter un dynamisme de la croissance cellulaire, de la consommation de glucose et de la production de lactate par induction de la fructose-6-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (Smith et al., 2009), elle est même décrite comme un proto-oncogène dans les cancers. De plus, il a été identifié que la surexpression de TKTL1 est négativement corrélée avec la survie des patients atteints d'un cancer ORL (Grimm et al., 2014). La surexpression de cette protéine a été décrite comme favorisant la production de lactate par stabilisation d'HIF-1 α (Sun et al., 2010) - (Kumar, 2017).

A nouveau, nous retrouvons **p53** comme acteur cette fois dans le métabolisme des cellules cancéreuses. Son implication réside dans sa capacité à réguler de manière transcriptionnelle les gènes en aval du métabolisme notamment le régulateur de la glycolyse induite par TP53 : TIGAR (Wanka et al., 2012).

Lorsque p53 est muté avec un gain de fonction, il est connu aujourd'hui que cela favorise la glycolyse et l'effet Warburg par augmentation de l'expression de GLUT-1 *via* l'activation de la voie de signalisation RhoA / ROCK dans plusieurs cancers (Zhang et al., 2013) - (Kumar, 2017).

Nous avons évoqué le **transporteur-1 du glucose** ou GLUT-1 (*Figure 23*), il s'agit d'un transporteur codé par le gène SLC2A1 (*Solute Carrier 2A1*) qui permet l'absorption du glucose par les cellules, il est notamment surexprimé dans les cancers ORL (Mellanen et al., 1994) - (Kumar, 2017). Une corrélation entre une absorption élevée de glucose et une faible survie des patients atteints d'un cancer des VADS a été mise en évidence. En effet, il est alors à noter une surexpression de GLUT-1 à la fois dans la tumeur primitive mais également au niveau des cellules issues de la rechute tumorale (S.-J. Li et al., 2008).

Concernant l'**hexokinase II** ou HK-II (*Figure 23*), il s'agit d'une enzyme glycolytique permettant la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate (Kumar, 2017).

Dans les cancers de la tête et du cou, il a été démontré que cette enzyme est surexprimée notamment pour la localisation laryngée. De plus, elle est impliquée dans l'apoptose, la viabilité cellulaire, la progression du cycle cellulaire, elle joue donc un rôle important à la fois dans la régulation à la hausse de la glycolyse mais également dans la progression du cancer (Chen et al., 2014) - (Kumar, 2017).

Poursuivons maintenant par la **lactate déshydrogénase A** ou LDH-A (*Figure 23*) qui catalyse la dernière étape de la glycolyse anaérobie et qui permet la conversion du pyruvate en lactate, cette enzyme est particulièrement surexprimée dans les cancers (Miao et al., 2013) - (Shi et al., 2014). Ses fonctions reposent sur cinq isoenzymes, chacune d'elle est tétramétrique et composée de sous-unités majeures : A et B. Celles-ci sont codées par les gènes LDH-A et LDH-B, respectivement. L'efficacité des isoenzymes pour catalyser la conversion du pyruvate en lactate est la meilleure lorsque les chaînes A sont excédentaires par rapport aux chaînes B. La LDH-A est centrale dans l'effet Warburg et dans le maintien de la glycolyse dans les cellules cancéreuses (Fantin et al., 2006). Il a été mis en évidence que les cellules des cancers ORL sont particulièrement dépendantes de l'accumulation des chaînes A (Grimm et al., 2014) - (Fantin et al., 2006). Un lien a également été établi entre des taux élevés de lactate au niveau des cellules tumorales ORL et une survie médiocre (Blatt et al., 2016) - (Kumar, 2017).

Enfin, il est également important de présenter les **transporteurs monocarboxylates** ou MCT (*Figure 23*) et leur importance dans la glycolyse. Ces transporteurs permettent d'évacuer le lactate produit lors de la glycolyse hors des cellules et de moduler le pH des cellules cancéreuses glycolytiques (Pinheiro et al., 2012). Il est décrit une surexpression des transporteurs MCT1 (transporteur bidirectionnel de lactate) et MCT4 (transporteur d'efflux du lactate) dans les cancers des VADS, surexpression mise en corrélation avec un mauvais pronostic (Pinheiro et al., 2010) - (Curry et al., 2013) - (Zhu et al., 2014). MCT1 et son caractère bidirectionnel est favorisé dans des conditions hypoxiques par la perte de p53 (Boidot et al., 2012). Ce transporteur présente un intérêt afin d'importer du lactate à partir d'autres cellules tumorales particulièrement glycolytiques ou à partir des CAF afin d'approvisionner la respiration mitochondriale et de préserver les ressources en glucose dans un contexte d'hypoxie (Bonuccelli et al., 2010) - (Whitaker-Menezes et al., 2011) - (Kumar, 2017).

Il est cependant important de préciser que dans le cas des cellules cancéreuses des VADS, il semblerait, d'après la littérature, qu'elles s'engagent davantage vers la voie de la glutaminolyse dont nous parlerons dans la suite de ce manuscrit (Gao and Jiang, 2018).

2) Evolution de la tumeur primitive vers la métastase

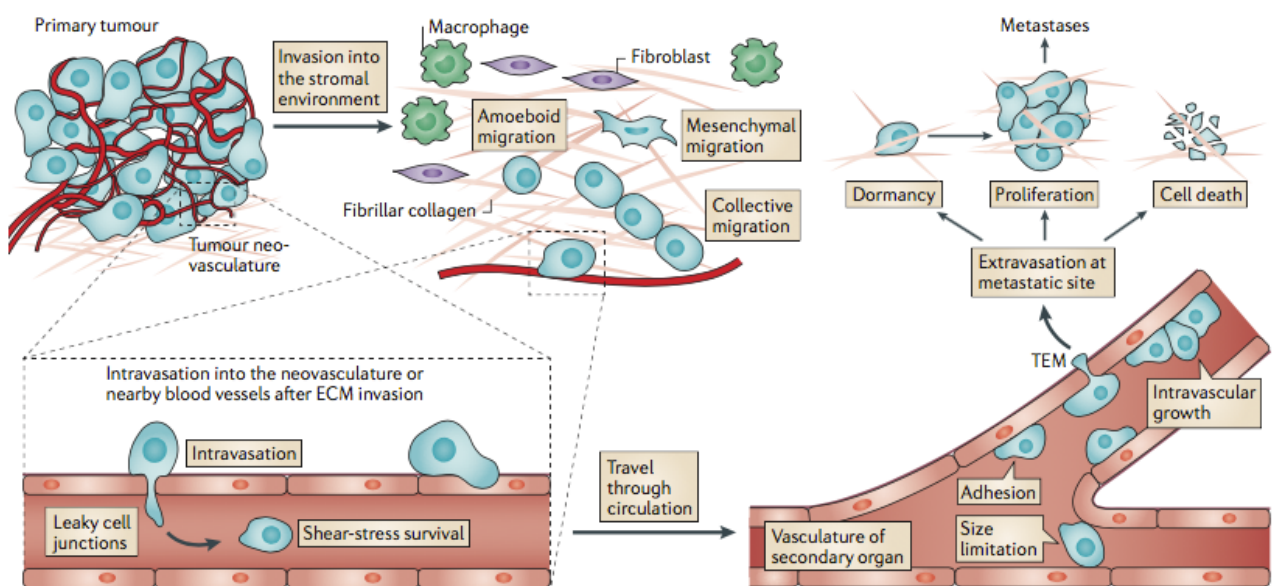


Figure 24 : Etapes conduisant de la tumeur primitive vers la métastase (Reymond et al., 2013)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

Le dernier stade décrit dans les cancers ORL consiste à la transition de la tumeur vers la métastase où les cellules cherchent à envahir le stroma sous-jacent par franchissement de la membrane basale (Ziober et al., 2001) - (Reymond et al., 2013). Cette transition est possible lorsque les cellules tumorales acquièrent certaines caractéristiques présentées dans la suite de cette partie (*Figure 24*) (Reymond et al., 2013).

a- Invasion cellulaire

Tout d'abord, le processus de métastase commence par une perte de contact cellule à cellule. Il s'en suit l'acquisition de la motilité cellulaire par une transition du phénotype tumoral vers un phénotype invasif. Ainsi, la présence de cellules cancéreuses unitaires ou en groupes de moins de cinq cellules hors de la tumeur primitive appelées alors *bourgeoisement tumoral* ou *germination* constitue vraisemblablement la première étape engageant la tumeur vers le processus métastatique (Mäkitie et al., 2019). La notion de bourgeoisement tumoral est à l'heure actuelle présentée comme un marqueur pronostique prometteur dans les cancers de la tête et du cou. En effet, des études sur des cohortes de patients atteints de cancers de la bouche (Almangush et al., 2018) - (Xie et al., 2019), du nasopharynx (Luo et al., 2012), de l'hypopharynx et du larynx ont rapportées qu'une intensité élevée de bourgeoisement tumoral est associée à des métastases dans les ganglions lymphatiques cervicaux.

Un autre paramètre a également été mis en avant comme un éventuel marqueur pronostique de la métastase des cancers de la tête et du cou, il s'agit du : *Worst Pattern of Invasion* ou WPOI qui diffère du bourgeoisement étant donné que là un critère s'ajoute : la mesure de la distance entre la tumeur principale et l'îlot tumoral le plus proche. Ce WPOI divise l'invasion tumorale en cinq types de 1 à 5. Néanmoins, les recherches récentes n'ont pas permises de mettre en lumière l'intérêt de l'utilisation de ce marqueur dans l'évaluation pronostique des cancers des VADS (Mäkitie et al., 2019).

Ensuite, le processus métastatique nécessite une transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT (*epithelial-mesenchymal transition*) particulièrement plastique et adaptative, elle peut avoir lieu au sein de populations distinctes de cellules et à des endroits divers de la tumeur (Williams et al., 2019) - (Puram et al., 2017). Elle provoque au sein des cellules une régulation négative de l'expression de l'E-cadhérine par l'intervention de facteurs de transcription que sont TWIST, SNAIL et SLUG (Yang et al., 2008) - (Zhang et al., 2012).

De plus, lors de cette transition, les cellules présentent une augmentation de l'expression de la vimentine, une diminution de l'adhésion cellulaire et une augmentation des capacités de migration et d'invasion. Il existe un lien intime entre les conditions hypoxiques et l'EMT étant donné que le facteur HIF-1 induit l'expression de la vimentine, de TWIST et de SNAIL. Il n'est donc pas surprenant que dans les cancers ORL particulièrement hypoxiques, des métastases soient trouvées (Brizel et al., 1997) - (Yang et al., 2008). L'EMT est médiée par les CAF *via* la sécrétion du TGF- β mais également par les forces physiques exercées sur les cellules tumorales modifiant les propriétés de la membrane basale. Les CAF vont alors tirer et étirer la membrane basale afin de modifier les propriétés physiques de celle-ci et de la rendre permissive pour l'invasion cellulaire.

En complément des propriétés déjà présentées ci-dessus, les cellules acquièrent également des propriétés dites *cellules souches*. Ainsi, il existe une corrélation entre les métastases des cancers ORL et l'expression de CD44, CD133 et ALDH1 ou encore de OCT3, OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*) et NANOG qui dynamise le caractère invasif de ces cellules (Yu and Cirillo, 2020).

Enfin, un dernier élément est impliqué dans l'EMT et dans le processus de métastases. Il s'agit de la production de MMP qui jouent un rôle pivot dans la dégradation et le remodelage de la MEC mais également dans le processus invasif des cellules tumorales (Kisoda et al., 2022). Lors de ce processus, un remodelage des adhésions cellulaires est observé notamment celles soutenues par les intégrines (ancrage des cellules épithéliales normales de la muqueuse buccale à la membrane basale) mais également par les cadhérines (adhésions intercellulaires) (Ziober et al., 2001). Ainsi, des niveaux élevés de MMP2, MMP9 et MMP13 dans les cancers ORL sont mis en corrélation avec des métastases et un mauvais pronostic (Virós et al., 2013). De plus, MMP9 est liée au marqueur CD44 présent à la surface des cellules souches cancéreuses des cancers ORL. En effet, ce marqueur sert de site d'ancrage à la MMP9 favorisant ainsi son activité. Tous deux se situent au niveau du front invasif et leurs expressions sont corrélées aux métastases (Samanna et al., 2007) - (Sterz et al., 2010) - (Faber et al., 2011) - (Johnson et al., 2020).

Les CAF tout comme les macrophages de polarisation M2 participent à la dégradation de la MEC. De plus, les macrophages relarguent également des facteurs pro-angiogéniques afin de stimuler à la fois l'angiogenèse mais également la lymphangiogenèse (Majidpoor and Mortezaee, 2021) - (Reymond et al., 2013).

b- Intravasation et migration intravasculaire

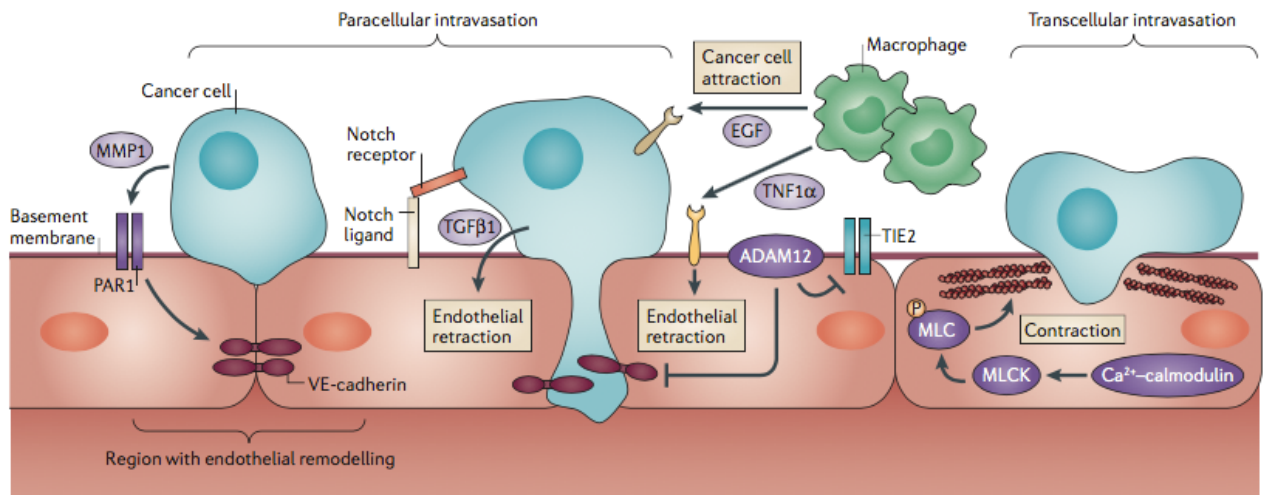


Figure 25 : Description de l'étape d'intravasation dans le processus métastatique (Reymond et al., 2013)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

La seconde étape du processus métastatique correspond à l'intravasation, il s'agit de l'entrée des cellules au sein des circulations sanguine ou lymphatique (*Figure 25*). Une fois que les cellules tumorales ont réalisé leur EMT, elles acquièrent des invadopodes.

Ces invadopodes correspondent à des protubérances riches en actine qui permettent de traverser la MEC en libérant des protéases, telles que les MMP. Ainsi, tout en libérant ces protéases, les cellules tumorales pourvues de leurs invadopodes peuvent traverser la MEC afin de pénétrer dans la circulation. L'intravasation dépend de facteurs intrinsèques tels que les neutrophiles pro-tumoraux (type N2), les macrophages de type 2 et les CAF. La liaison des cellules tumorales aux cellules endothéliales est possible par l'interaction du ligand 12 de la chimiokine au motif C-X-C (CXCL12) présent à la surface des cellules endothéliales et du récepteur 4 de cette chimiokine (CXCR4) exprimé par les cellules tumorales inducibles. Etant donné l'implication de ce binôme dans le processus métastatique, il pourrait être envisagé de cibler pharmacologiquement le CXCR4 afin de limiter le développement de métastases (Hachet-Haas et al., 2008). L'hypoxie joue également un rôle majeur dans l'intravasation étant donné qu'elle conduit à l'induction de CXCL12. Enfin, les macrophages quant à eux interviennent dans l'intravasation en sécrétant de l'EGF et la MMP9 (Reymond et al., 2013) - (Majidpoor and Mortezaee, 2021).

En ce qui concerne les cancers de la tête et du cou, l'infiltration lymphatique est particulièrement importante et constitue un facteur pronostique. La lymphangiogénèse est notamment sous le contrôle du VEGF (de Sousa et al., 2015) - (Xing et al., 2016).

c- Survie cellulaire

Il s'agit ensuite pour les cellules tumorales de développer des stratégies de survie en évitant la mort cellulaire par *anoïkis*, en échappant au système immunitaire, en s'adaptant aux flux mécaniques et enfin en adaptant leur métabolisme. En effet, les cellules tumorales circulantes ont une demi-vie d'environ 2,4 heures chez les sujets humains. Tout d'abord, au sein de la circulation, les cellules tumorales sont confrontées à plusieurs stress environnementaux, tels que le stress oxydatif, les forces de cisaillement et les attaques par le système immunitaire. Seules les cellules ayant développé des mécanismes de survie peuvent atteindre leur site secondaire. Ainsi, les cellules tumorales circulantes doivent adapter leur métabolisme afin de répondre aux apports nutritionnels dont elles ont besoin, tout comme elles l'ont fait au sein de la tumeur primitive (cf. partie ci-dessus dédiée). Pour poursuivre, le processus conduisant vers la métastase ne serait pas possible sans l'acquisition par les cellules de la capacité à se détacher de la membrane basale et des composants de la MEC. Or, dans le cas d'une cellule normale qui opère cette rupture, les capacités de survie sont perdues et la mort cellulaire par *anoïkis* s'enclenche (Nirmala and Lopus, 2020). Ainsi, les cellules métastatiques présentent une résistance à l'*anoïkis* leur permettant donc de survivre notamment dans la circulation. Pour ce faire, elles bénéficient des facteurs de croissance et des cytokines fournis lors de la EMT par les CAF, notamment *via* la signalisation impliquant le TGF- β qui augmente l'activité de la kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinases*) afin de favoriser la régulation positive de SLUG et l'inhibition de l'E-cadhérine qui en résulte. Les cellules endothéliales, les cellules immunitaires infiltrées et les cellules tumorales participent également à cette résistance par libération de l'IL-6, de l'EGF et de l'HGF qui permettent l'activation des voies RAS / MAPK, mais également PI3K / AKT / mTOR et STAT3 (Peltanova et al., 2019) - (Zeng et al., 2002) - (Neiva et al., 2009).

L'expression d'HIF-1 α (la présence d'oxygène dans le sang n'est pas suffisante pour lever l'hypoxie et diminuer les niveaux d'expression d'HIF-1 α) par les cellules tumorales circulantes inhibe également l'*anoïkis* en lien avec la reprogrammation métabolique réalisée par la cellule.

Il existe un lien intime entre le TGF- β et HIF-1 α puisque l'expression de ce dernier est influencée par le TGF- β . La résistance à la mort cellulaire par *anoikis* provient également d'une inhibition de la voie Hippo avec une augmentation de l'expression de YAP par augmentation du facteur de transcription : protéine ZFN387.

Les cellules doivent également s'adapter et survivre face aux flux mécaniques qu'elles subissent au sein des systèmes circulatoires lymphatique et sanguin. En effet, ces flux perturbent le trafic des cellules à destination de leur site secondaire, aussi la taille des vaisseaux, la vitesse d'écoulement et les contraintes de cisaillement peuvent potentiellement influencer la survie des cellules cancéreuses et leur ensemencement au sein d'une destination secondaire. Ainsi, dans les artères où la vitesse d'écoulement et les forces de cisaillement sont élevées, le stress mécanique est particulièrement important et cause aisément la mort des cellules cancéreuses. En ce qui concerne les veines, elles présentent une vitesse et des forces de cisaillement modérées ce qui engage l'arrêt intravasculaire des cellules tumorales circulantes et leur extravasation. Il existe néanmoins un bouclier qui favorise l'extravasation, celui-ci consiste au recrutement de plaquettes qui vont alors les entourer pour lutter contre la contrainte de cisaillement mais également face au système immunitaire. L'échappement au système immunitaire est là encore un point central de la survie des cellules circulantes, celles-ci bénéficient d'une expression plus élevée des gènes épithéliaux et des marqueurs d'adhésion intercellulaire ce qui atténue l'activation des cellules *natural killer*.

L'évaluation et le suivi des cellules tumorales circulantes au moyen de biopsies liquides peuvent être utilisés comme des marqueurs diagnostiques et prédictifs de l'efficacité d'un traitement, comme notamment dans les cancers de l'utérus ou encore du poumon (Reymond et al., 2013) - (Majidpoor and Mortezaee, 2021).

d- Extravasation

Ensuite, les cellules opèrent une extravasation qui consiste en la sortie de la ou des cellules tumorales de la circulation sanguine ou de la circulation lymphatique (voie de dissémination majoritaire) à destination d'un tissu ou d'un organe adjacent (*Figure 26*) (Reymond et al., 2013).

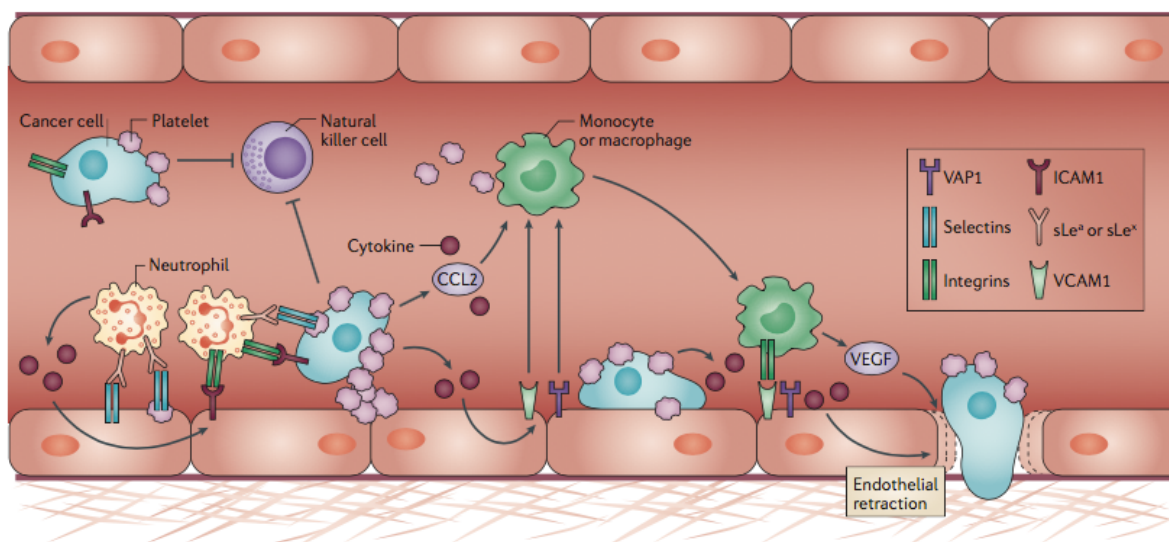


Figure 26 : Description de l'étape d'extravasation dans le processus métastatique (Reymond et al., 2013)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

Au sein de la circulation sanguine où les forces physiques sont plus fortes que dans la circulation lymphatique, les cellules sont entourées de plaquettes qui peuvent alors perturber la coagulation et favoriser cette dernière en permettant le contact avec l'endothélium. Jusqu'à présent ces cellules étaient circulantes et deviennent désormais disséminatives pour pénétrer la MEC du site métastatique. En complément, les plaquettes libèrent du TGF- β qui va perturber les jonctions cellule – cellule et donc affaiblir la barrière endothéliale. De plus, l'extravasation est aussi dynamisée par le VEGF qui provient des neutrophiles et des macrophages de type 2 à distance qui soutiennent les cellules tumorales en cours d'EMT.

En parallèle, des conditions physiques du ralentissement voire de l'arrêt de la circulation, des facteurs biologiques interviennent pour d'une part faciliter la liaison des cellules tumorales à l'endothélium et d'autre part permettre l'extravasation. Les cellules vont ensuite devoir interagir à nouveau avec la MEC mais cette fois celle du site secondaire par le biais des intégrines. Les cellules présentent alors à nouveau des invadopodes pour s'introduire dans les jonctions endothéliales et réaliser une extravasation vers le site secondaire. Le tropisme pour un organe ou organotropisme correspond au « choix » d'une cellule d'aller coloniser un site plutôt qu'un autre. Ce tropisme dépend d'une part, de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires par la cellule tumorale et par la MEC de l'organe secondaire et d'autre part, il dépend de la présence de récepteurs de chimiokines au sein des invadopodes des cellules tumorales qui les conduit préférentiellement vers un site plutôt que vers un autre (Majidpoor and Mortezaee, 2021).

e- Colonisation du site secondaire

Seulement 0,01% des cellules tumorales parviennent à atteindre leur site secondaire et forment alors une seconde tumeur. Les cellules peuvent rester en dormance ou proliférer et coloniser ce nouvel espace tout d'abord en formant une micro-colonie puis une lésion macroscopique, là encore la reprogrammation métabolique est essentielle aux cellules tout comme l'angiogénèse (Majidpoor and Mortezaee, 2021).

Un cancer avancé peut se localiser de manière locorégionale dans la majorité des cas, c'est-à-dire dans la zone anatomique de la tumeur primitive, en l'occurrence au sein des VADS. Elle peut également se localiser à distance dans 4 à 26% des cas avec un tropisme particulier pour le foie, les os et les poumons (Yegya-Raman et al., 2018).

3) **Classifications moléculaires des cancers des voies aérodigestives supérieures issues de la littérature**

Les cancers des VADS sont des cancers particulièrement hétérogènes caractérisés par différents sous-groupes moléculaires et par des caractéristiques cliniques variées. A travers la revue de la littérature nous proposons de présenter certaines classifications à visée pronostique ou prédictive ou identifiant de nouvelles pistes de cibles thérapeutiques selon un ordre de citation chronologique.

a- Classifications moléculaires à visée pronostique des cancers des voies aérodigestives supérieures

Cinq classifications à visée pronostique sont décrites dans la suite de ce manuscrit par ordre chronologique.

▲ Commençons tout d'abord par la classification proposée par l'équipe de **Chung et al. en 2004**. Pour réaliser leur classification, ils ont analysé le profil génétique de 60 échantillons de cancers des VADS à l'aide de puces à ADN.

Le premier groupe décrit correspond à celui présentant le plus mauvais pronostic, il est caractérisé par une surexpression de l'EGFR. L'activation des voies de ce récepteur est d'ailleurs prouvée avec la mise en évidence d'une importante quantité de gènes qui codent pour le TGF- α : ligand de l'EGFR.

Mais également la présence d'une protéine kinase impliquée dans la cascade de signalisation de l'EGFR : MKK6 et enfin la présence d'une molécule de commutation angiogénique FGF-BP (*FGF-binding protein* : protéine de liaison au FGF) induite par l'EGFR. Ainsi, les patients qui présentent une tumeur avec une importante expression de l'EGFR devraient se voir pris en charge avec des agents ciblant l'EGFR. Le second sous-groupe présente une signature mésenchymateuse par la présence de nombreux fibroblastes et l'absence de caractéristiques de différenciation épithéliale. Le troisième groupe présente des caractéristiques de l'épithélium normal à la différence d'une expression protéique importante et disparate de cytokératines 14 et 15. Enfin, le quatrième et dernier groupe est décrit avec des niveaux élevés de codage de transcription pour les enzymes antioxydantes et de détoxification (en lien avec une exposition à la fumée de cigarette).

L'ensemble de ces groupes a des différences en termes de survie sans récurrence, permettant de légitimer au moins partiellement une considération clinique (*Figure 27*) (Chung et al., 2004).

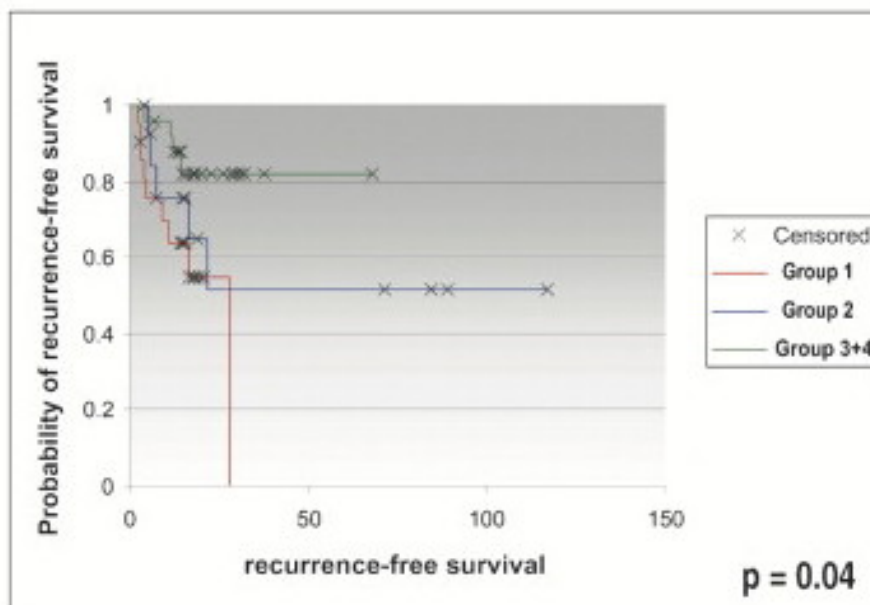


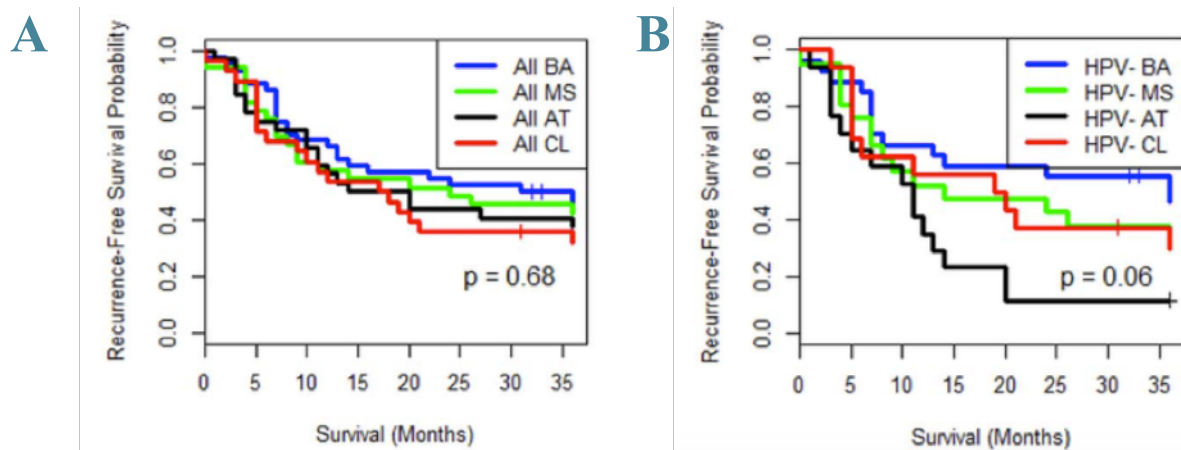
Figure 27 : Survie observée dans les groupes des cancers des voies aérodigestives supérieures proposés par la classification de (Chung et al., 2004)

Graphiques de Kaplan-Meier et valeurs p du test de Log-Rank.

▲ Un peu plus tard, en **2013**, l'équipe de **Walter *et al.*** propose une autre classification basée sur une analyse génomique de lignées cellulaires des cancers de la tête et du cou. A nouveau quatre sous-types sont proposés : basal, mésenchymateux, atypique et classique.

Concernant tout d'abord le sous-type basal, celui-ci présente des caractéristiques d'expression protéique similaire aux cellules épithéliales basales. Ensuite, le sous-type classique quant à lui présente des altérations génomiques allant de paire avec un carcinome épidermoïde, à savoir : la délétion des régions chromosomiques 3p et 9p, l'amplification de la région 3q et la surexpression de l'EGFR et de CCND1. Pour poursuivre, le sous-type mésenchymateux a été choisi en raison du profil type EMT. Enfin, le sous-type atypique correspond au groupe où une absence d'amplification de l'EGFR et de délétion de la région chromosomique 9p a été montrée.

L'équipe a pu établir que la proposition de cette classification a une pertinence à la fois biologique mais également clinique en termes de survie sans récurrence, néanmoins il est nécessaire de considérer, au-delà de cette classification, une éventuelle infection à l'HPV (*Figure 28*) (Walter *et al.*, 2013).



*Figure 28 : Survie sans récurrence dans les sous-types des cancers des voies aérodigestives supérieures proposés par les travaux de (Walter *et al.*, 2013)*

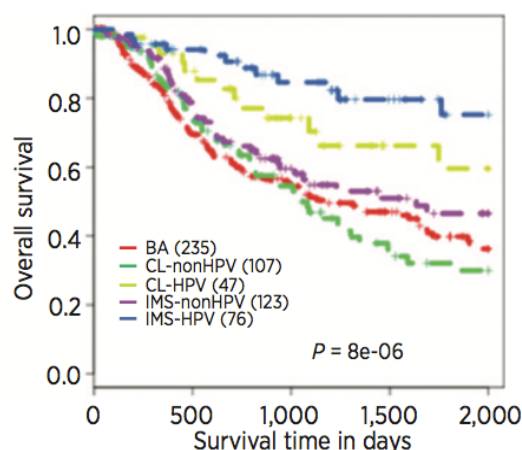
(A) Graphiques de Kaplan-Meier et valeurs p du test de Log-Rank comparant les survies sans récurrence dans tous les sous-types d'expression décrits dans ces travaux (B) et dans tous les sous-types d'expression chez les sujets HPV.

▲ Ensuite, l'équipe de **Keck *et al.*** a poursuivi les investigations et propose en **2015** une nouvelle classification basée sur l'expression génétique, le profilage du nombre de copies et le statut HPV sur une cohorte totale de 938 tumeurs. Ils concluent alors sur l'existence de 5 sous-types, dont 2 avec un profil positif à l'HPV.

Le point innovant, comparé aux classifications précédentes, porte sur le profilage des cas de cancers HPV-induits. En effet, cette équipe propose tout d'abord de distinguer 2 sous-types de cancers HPV-induits. D'une part, les tumeurs HPV dites CL pour classique : CL-HPV. Elles présentent, dans 40% des cas, une kératinisation augmentée signant une différenciation importante, la prolifération est particulièrement élevée, enfin elle signe davantage d'aberrations génomiques associées au carcinome spinocellulaire (amplification de la région 3q26-27). A l'inverse, le sous-type HPV-IMS pour inflammatoire et mésoenchymateux est caractérisé par une expression importante de marqueurs mésoenchymateux, ce profil est favorable à la survie.

Ensuite, concernant les cancers non HPV-induits, ils décrivent trois sous-types. Premièrement le sous-type basal caractérisé par une signalisation importante de HIF1- α , une surexpression de l'EGFR et de MYC (*myelocytomatosis*) ainsi qu'une importante expression d'immunosuppresseurs et donc un défaut de marqueurs liés à l'immunité. Secondement, le sous-type inflammatoire et mésoenchymateux est décrit comme ayant une infiltration de cellules T CD8+ importante. Et troisièmement : le sous-type classique.

Là encore, un lien direct est fait entre cette classification et la survie sans récurrence (*Figure 29*) (Keck *et al.*, 2015).



*Figure 29 : Survie pour les cinq sous-types des cancers des voies aérodigestives supérieures décrits dans les travaux de (Keck *et al.*, 2015)*

Graphiques de Kaplan-Meier et valeurs p du test de Log-Rank.

▲ La même année, en 2015, c'est au tour de l'équipe de **De Cecco *et al.*** de proposer une classification composée de 6 sous-groupes. L'équipe s'est basée sur une analyse de métadonnées afin de travailler sur les disparités génomiques, de là elle a extrait 6 groupes, à savoir : les immunoréactifs, les inflammatoires, les HPV-induits, les classiques, les tumeurs liées à l'hypoxie et les mésenchymateux. Les principales spécificités des sous-groupes sont présentées au sein du tableau ci-après réalisé et proposé par les travaux de De Cecco *et al.* (*Tableau II*).

*Tableau II : Principales caractéristiques des sous-groupes de cancers des voies aérodigestives supérieures identifiés par les travaux de (De Cecco *et al.*, 2015)*

Association to:	HNSCC subtypes ordered according to progression of disease					
	Cluster 6	Cluster 4	Cluster 1	Cluster 5	Cluster 3	Cluster 2
Functional pathways	IFN response Immune response Airway epithelium Cellular Homeostasis Xenobiotic met.	IFN response Immune response	HPV infection Cell proliferation Airway epithelium	Cell motility Xenobiotic met.	Cell motility Hypoxia Drug metabolism Biotic response	Cell motility EMT Angiogenesis
Onco-signatures	ALK	ALK	None	Multiple: WNT E2F3 TGF beta	Multiple: TGF beta EGFR Ras Cyclin D1	Multiple: WNT TGF beta EGFR Ras NOTCH
Previously reported subtypes	AT	BA, G1	AT, G3	CL, G4	BA, G1	MS, G2
Clinic-pathological parameters			Oropharynx cases	Smoking		
Outcome			Best RFS Best OS		Worst RFS Worst OS	Worst RFS Worst OS
Previously reported classifiers			Best outcome		Worst outcome	Worst outcome
Final designation	Immunoreactive	Defense response	HPV-like	Classical	Hypoxia	Mesenchymal

Ainsi, le sous-groupe 1 correspond au seul groupe avec une signature marquant une infection par l'HPV sans signature oncogénique, il est qualifié d'HPV-induit. Le sous-groupe 2 est le plus éloigné de l'état normal avec une signature par des marqueurs de l'EMT associée à des marqueurs de l'angiogénèse et des cellules souches, ce sous-groupe est donc établi comme mésenchymateux.

Ensuite, le sous-groupe 3 se caractérise par l'activation des voies de l'hypoxie d'où son appellation de sous-groupe hypoxique. Le sous-groupe 4 présente une perte des caractéristiques normales de l'épithélium et de l'homéostasie cellulaire avec une importante réponse aux interférons et avec un niveau important de réponse immunitaire. En général, ce sous-groupe est associé à une signature oncogénique liée à ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*), il est qualifié de classique. Le sous-groupe 5 présente une co-signature oncogénique WNT et E2F, ce sous-type est fortement représenté par la population des fumeurs, il est dit inflammatoire. Enfin, le sous-groupe 6, qui est celui nommé immunoréactif, présente des caractéristiques proches de l'épithélium avec une activation des voies liées à l'immunité avec pour seule signature oncogénique celle liée à la voie ALK (De Cecco et al., 2015).

Cette classification a été mise en regard de la survie globale (*Figure 30*) (De Cecco et al., 2015).

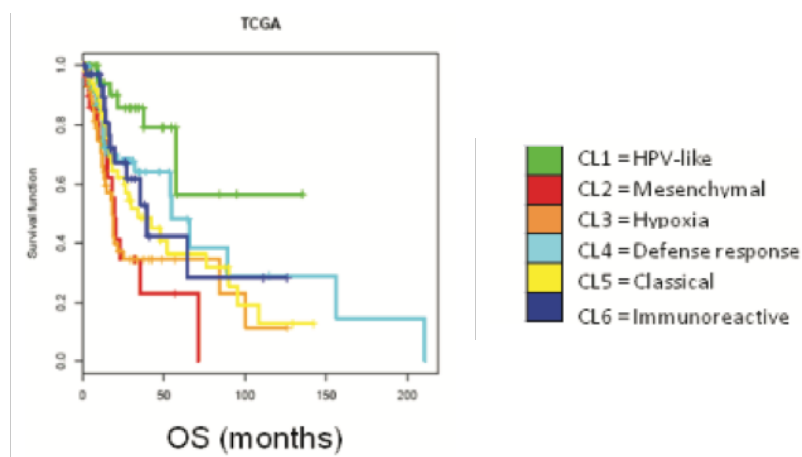


Figure 30 : Survie observée pour les sous-groupes des cancers des voies aérodigestives supérieures décrits dans les travaux de (De Cecco et al., 2015)

Graphiques de Kaplan-Meier et valeurs p du test de Log-Rank.

▲ Enfin, l'équipe de **Wu et al.** en 2019 est partie du constat que jusqu'à présent les classifications se basant sur l'analyse de l'ARN ne l'était qu'en se focalisant sur un seul type d'ARN alors qu'ici, ils proposent de réaliser une analyse multi-type des ARN, à savoir : les ARNm, les ARNlnc¹⁴ (ARN long non codant) et les miARN¹⁵ (micro-ARN). Le but ultime étant de déterminer des profils d'expression pronostiques pour les cancers de la tête et du cou.

¹⁴ Les ARN longs non codants correspondent à des ARN de plus de 200 nucléotides ne codant pas pour une protéine.

Grâce à leur étude, ils ont identifié 23 ARNm, 15 lncRNA et 1 miRNA comme étant associés à la survie globale et présentant un caractère pronostique. Par des analyses plus poussées (analyses de régression multivariée de Cox), seulement 15 de ces 39 gènes ont été conservés comme biomarqueurs génétiques pronostiques. Il s'agit notamment de ceux associés au développement et au pronostic du cancer, à savoir ADGRE1 (*Adhesion G Protein-Coupled Receptor E*) qui code pour l'antigène F4/80 exprimé dans les cellules immunitaires et utilisé comme marqueur des monocytes/macrophages chez la souris ou encore KRT84 identifié comme surexprimé dans les carcinomes épidermoïdes et impliqué dans les voies métaboliques. Il y a également, la CDH6 (cadhérine-6) particulièrement exprimée chez les patients atteints de tumeurs thyroïdiennes et qui pourrait être étiquetée comme un régulateur de l'invasivité des tumeurs thyroïdiennes. Parmi les autres gènes d'intérêt identifiés nous pouvons évoquer l'hsa-mir-4664 qui est surexprimé dans huit types de cancers ou encore la faible expression de LINC00968 cohérente avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein par limitation de la résistance aux médicaments.

De plus, ils ont réalisé une signature pronostique ARN multi-type nommée 15SigRS, 15 pour les 15 gènes pronostiques sélectionnés, chacun a été associé à un coefficient de régression de Cox multivarié¹⁶, dont voici l'équation :

$$\ll 15\text{SigRS}=(0.5344*CDH6)+(1.0462*CYP19A1)+(0.4723*TRPA1)+(0.2764*PPARG)+(0.0068*KR T8)+(-0.2291*FGD3)+(0.3113*ADGRE1)+(-0.7948*SLC25A45)+(0.4878*OXCT2)+(-4.0659*OT UD7A)+(1.2231*FAM198B-ASI)+(-0.3978*LINC00968)+(1.8352*LINC01123)+(0.1240*ZBED5- ASI)+(-0.0602*MIR4664) \gg \text{(S. Wu et al., 2019)}.$$

Cette signature pronostique basée sur les ARNs multi-types est déterminée par l'équation 15SigRS pour l'ensemble des patients et permet de les classer dans deux groupes, à savoir le groupe à haut risque et le groupe à faible risque. Le groupe à haut risque est caractérisé par un temps de survie plus court que celui à faible risque.

¹⁵ Les micro-ARN (*miARN*) sont de petits ARN d'environ 20-22 nucléotides régulateurs de l'expression génique.

¹⁶ La régression de Cox crée un modèle de prévision pour les données de la durée à l'événement. Ce modèle exprime la fonction de risque instantané d'un événement en fonction du temps t et des covariables.

Ils ont également pu mettre en avant l'indépendance de l'utilisation de la signature 15SigRS par rapport aux facteurs clinicopathologiques comme l'âge, le sexe, le stade, le grade, la race, le tabagisme et la consommation d'alcool. Enfin, la signature 15SigRS pourrait également être impliquée dans la fonction biologique liée à l'immunité ou au métabolisme (S. Wu et al., 2019).

b- Classifications moléculaires à visée pronostique et prédictive des cancers des voies aérodigestives supérieures

Deux classifications à visée pronostique et prédictive sont décrites dans la suite de cette partie, il s'agit des travaux de l'équipe de Zhang *et al.* et de Li *et al.* tous deux publiés en 2021.

▲ En 2021, Zhang *et al.* réalisent des analyses bioinformatiques afin de proposer une nouvelle stratégie de classification selon les résultats de survie, les caractéristiques moléculaires et les profils immunologiques. Ainsi, leur étude vise à mettre en évidence des voies et des gènes à visée pronostique pour les cancers des VADS. Pour ce faire, ils réalisent une analyse des variations de l'ensemble des gènes et une annotation fonctionnelle ou analyse GSVA (*gene set variation analysis*) sur les données issues du TCGA (*the cancer genome atlas* = atlas du génome du cancer). Par ce biais, ils identifient 13 voies oncogènes dont huit sont régulées à la hausse, notamment la voie mTOR associée à une survie plus courte que pour les cinq autres voies identifiées comme régulées à la baisse, avec notamment la voie NOTCH. Trois voies sont mises en avant comme pronostiques, à savoir la voie mTOR, la voie UPR et la voie UV-UP. De par ces analyses, 101 gènes impliqués dans ces voies sont dérégulés dans des processus tels que le stress du réticulum endoplasmique (RE), l'hypoxie, le cycle cellulaire, les dommages à l'ADN et la réparation de celui-ci. Afin d'avoir une application clinique, l'idée dans ce travail est de définir des sous-types dans ces cancers, ils ont donc tâché de regrouper les profils sous forme de *cluster*. Trois *clusters* se sont profilés, le C1 (*cluster 1*), le C2 (*cluster 2*) et le C3 (*cluster 3*).

Le C1 est celui qui présente la meilleure survie et en parallèle celui avec le score GSVA le plus bas pour les voies mTOR, UPR et UP-UV. Les C1 et C2 sont ceux avec un dynamisme important des voies liées à l'immunité et un dynamisme moindre des voies liées aux oncogènes (PI3K / AKT / mTOR et les cibles MYC).

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces *clusters*, une comparaison du profil mutationnel est réalisée. Les gènes TP53, TTN, CSMD3 et LRP1B présentent un taux de mutations variables selon les *clusters*. Ainsi, TP53 est fréquemment muté dans les C2 et C3 et le gène LRP1B est faiblement muté dans le C2. De plus, grâce à l'analyse du microenvironnement, ils ont montré que le C2 présente des scores stromal et immunitaire élevés comparé au C3 témoin d'une participation plus active du système immunitaire. C'est le C3 qui présente le score immunitaire le plus bas avec une importante population de macrophage M0 (en latence).

L'ensemble de ces données permet donc à l'équipe de Zhang *et al.* de prédire les stratégies de traitement potentiellement réactives pour différents sous-types. En effet, en raison de leur profil variable, la réponse aux traitements sera différente notamment pour l'immunothérapie. Ainsi, le C1 est le plus répondeur aux inhibiteurs de points de contrôle étant donné qu'il présente les niveaux les plus élevés d'expression de CD274 (PD-L1), de PDCD1LG2 (PD-L2), de PDCD1 (PD1) et de CTLA4 (CD152) comparé au C3. De plus, les CI_{50} (concentration inhibitrice 50) nécessaires pour la prise en charge thérapeutique du méthotrexate, de la bléomycine, du cisplatine, de la gemcitabine et de l'entinostat sont les plus faibles pour les tumeurs du C1 en comparaison avec les deux autres présageant d'une sensibilité plus importante à ses chimiothérapies. Pour le C2, les cellules semblent être les plus sensibles à l'inhibiteur HSP90 : luminespib et à l'inhibiteur MEK1/2 : selumetinib. Enfin, les tumeurs du C3 sont les plus sensibles aux agents perturbant l'homéostasie du RE, à savoir : l'inhibiteur de la pompe SERCA : thapsigargin, l'inhibiteur de la phosphatase eIF2 α : salubrinal et à l'inhibiteur de mTOR : AZD8055.

En reprenant la classification proposée par le TCGA mais également les classifications en lien avec l'immunité, les données de cette étude permettent de regrouper 83% des tumeurs du C1 dans le sous-type atypique. Celui-ci présente un profil immunitaire avec une importante infiltration de lymphocytes T cytotoxiques et des cellules *natural killer*. Alors que les tumeurs du C3 correspondent préférentiellement au sous-type classique avec un profil immunitaire suppressif.

Enfin, le C2 est bivalent, à la fois appartenant au sous-type mésenchymateux mais également basal. Les C1 et C2 ont tous deux une présence dominante de la classe IFN- γ à l'inverse du C3. *In fine*, les tumeurs du C1 sont caractérisées par une réponse immunitaire active et une agressivité tumorale plus faible, alors que les tumeurs du C3 présentent une réponse immunosuppressive et une agressivité plus élevée (*Figure 31*) (Zhang et al., 2021).

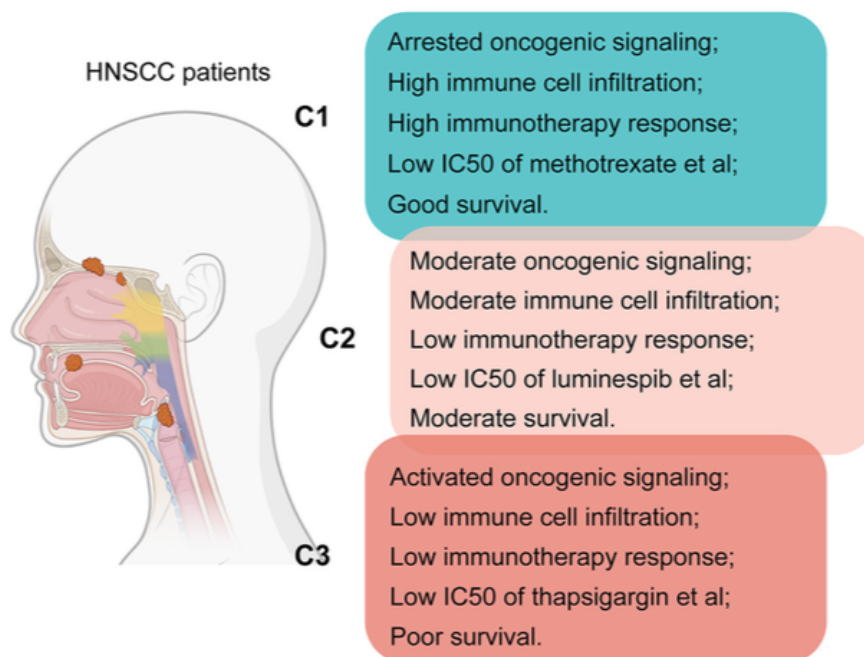


Figure 31 : Résumé des caractéristiques des patients des trois sous-types de l'étude sur les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou présentés dans les travaux de (Zhang et al., 2021)

▲ Les travaux de **Li et al.** publiés en **2021** visent à aider les cliniciens dans la stratification des patients immunodéprimés en étudiant les mécanismes génétiques qui sous-tendent l'immunosuppression. Les données utilisées pour cette étude sont extraites du TCGA et du *Consortium* international du génome du cancer (ICGC). Les gènes d'immunosuppression sont issus des bases de données *HisgAtlas* et *DisGeNET*. Ainsi, 317 échantillons de cancers de la tête et du cou sont étudiés et 11 gènes d'immunosuppression sont mis en lumière comme présentant une corrélation importante avec la survie des patients immunodéprimés et donc à caractère pronostic.

Parmi les gènes mis en évidence, nous pouvons citer BGLAP, CALCA, CTLA4, CXCL8, FGFR3, HPRT1, IL22, ORMDL3, TLR3, SPHK1 et INHBB. De ces données, deux sous-groupes de survie se distinguent : Sub1 et Sub2. Tout d'abord, le sous-groupe Sub1 qui présente une probabilité de survie plus faible avec une nature plus agressive par rapport au sous-groupe Sub2. De plus, au sein du sous-groupe Sub1, les gènes d'immunosuppression sont enrichis dans les voies liées aux cellules immunitaires infiltrant la tumeur mais également dans les voies liées à la progression du cancer. Concernant les voies liées aux cellules immunitaires, il s'agit des voies de signalisation des récepteurs des cellules B (BCR : *B-cell receptor*) et des récepteurs des cellules T (TCR : *T-cell receptor*).

Pour les voies liées à la progression de la tumeur, il s'agit des voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire, l'apoptose, p53, MAPK, NOTCH, des chimiokines, le récepteur Toll et JAK-STAT. Alors que pour le sous-groupe Sub2, les gènes d'immunosuppression sont enrichis dans les voies liées au métabolisme, avec notamment le métabolisme des xénobiotiques par le cytochrome P450 ou encore celui de l'AA et de la tyrosine. L'ensemble des voies citées pourrait représenter de futures cibles thérapeutiques pour les patients atteints d'un cancer ORL et immunodéprimés (Li et al., 2021).

c- Classifications moléculaires des cancers des voies aérodigestives supérieures à visée prédictive et identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Deux classifications à visée prédictive et définissant de nouvelles cibles thérapeutiques sont décrites dans la suite de ce manuscrit, il s'agit des travaux de Su *et al.* et de ceux de Puram *et al.* tous deux publiés en 2017.

▲ En 2017, Su *et al.* réalisent un séquençage de l'exome entier de 120 échantillons de cancers de la tête et du cou provenant de patients masculins taïwanais. Les groupes ont été constitués en tenant compte des aspects clinico-pathologiques et étiologiques, tels que l'âge, le stade de la tumeur, la taille, l'invasion ganglionnaire, les facteurs de risque, le niveau des mutations et les *driver* gènes (Figure 32).

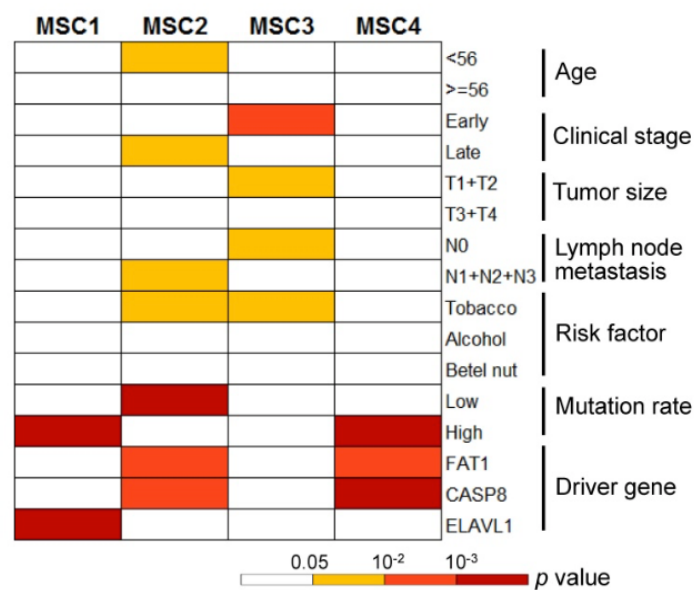


Figure 32 : Caractéristiques cliniques, pathologiques et étiologiques associées à chaque groupe de signature mutationnelle décrit dans les travaux de (Su et al., 2017)

Cette étude permet alors de révéler cinq signatures mutationnelles (signatures 13, 7, 1, 6 et 5) orientant vers l'identification de quatre groupes de tumeurs, ces mutations impliquent différents gènes, à savoir : TP53, FAT1, EPHA2, CDKN2A, NOTCH1, CASP8, HRAS, RASA1, PIK3CA, CHUK, ELAVL1, CCND1 et MAP4K2. Ainsi, ils attribuent au groupe MSC1 (groupe de signature mutationnelle ou *mutational signature cluster*) les mutations ELAVL1 comme étant fréquentes sans pour autant être différentes des autres groupes. MSC2 se caractérise par des patients jeunes au moment du diagnostic et présente un faible taux de mutations avec un stade histologique tardif et une forte implication ganglionnaire. Concernant MSC3, il s'agit de patients avec un profil de petite tumeur sans propagation au sein des ganglions lymphatiques. Enfin, MSC4 est associé à la présence de mutations des gènes FAT1 et CASP8 (*Figure 32*) (Su et al., 2017).

Aussi, à travers leur analyse, l'équipe a réussi à identifier un nouveau gène impliqué dans les cancers des VADS, il s'agit du gène CHUK qui code pour une kinase : l'IKK α qui bloque l'activation de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*). De plus, ils ont mis en évidence l'importance du gène ELAVL1 qui code pour un membre de la famille Hu (protéine de liaison à l'ARN favorisant ou réprimant la traduction de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur) dans les cancers de la tête et du cou. En effet, ils avancent l'hypothèse qu'il pourrait jouer un rôle de suppresseur de tumeur de la même manière que NOTCH1. ASXL1 fait également parti des gènes mis en évidence par cette équipe comme présentant des mutations, celui-ci code pour un facteur de transcription décrit comme muté dans les syndromes myélodysplasiques et dans d'autres tumeurs malignes myéloïdes. Mais également, RPTN, CHUK et ELAVL1 sont intriqués avec la différenciation épithéliale.

Ensuite, ils ont mis en exergue deux groupes de gènes altérés présentant un certain degré de corrélation fonctionnelle. Le premier groupe de tumeurs comprend des régulateurs du cycle cellulaire, à savoir : TP53, CCND1 et CDKN2A. Un second groupe accumule des mutations dans des gènes tels que FAT1, CASP8, EPHA2 et NOTCH1. D'après leurs données, il existerait donc une synergie des principaux acteurs de la tumorigénèse orale offrant donc des perspectives de nouvelles prises en charge thérapeutiques. Ils mettent cependant en avant que les données mises en exergue par leur étude présentent des disparités avec celle du TCGA notamment sur TP53. L'explication donnée réside principalement dans la population qu'ils ont choisie, à savoir des hommes taïwanais qui présentent majoritairement des cancers de la bouche en lien avec la mastication de la chique de Bétel, quasiment non consommée en Occident (Su et al., 2017).

Enfin, cette étude a également abouti à l'identification de cibles thérapeutiques au sein selon les profils mutationnels (*Figure 33*) (Su et al., 2017).

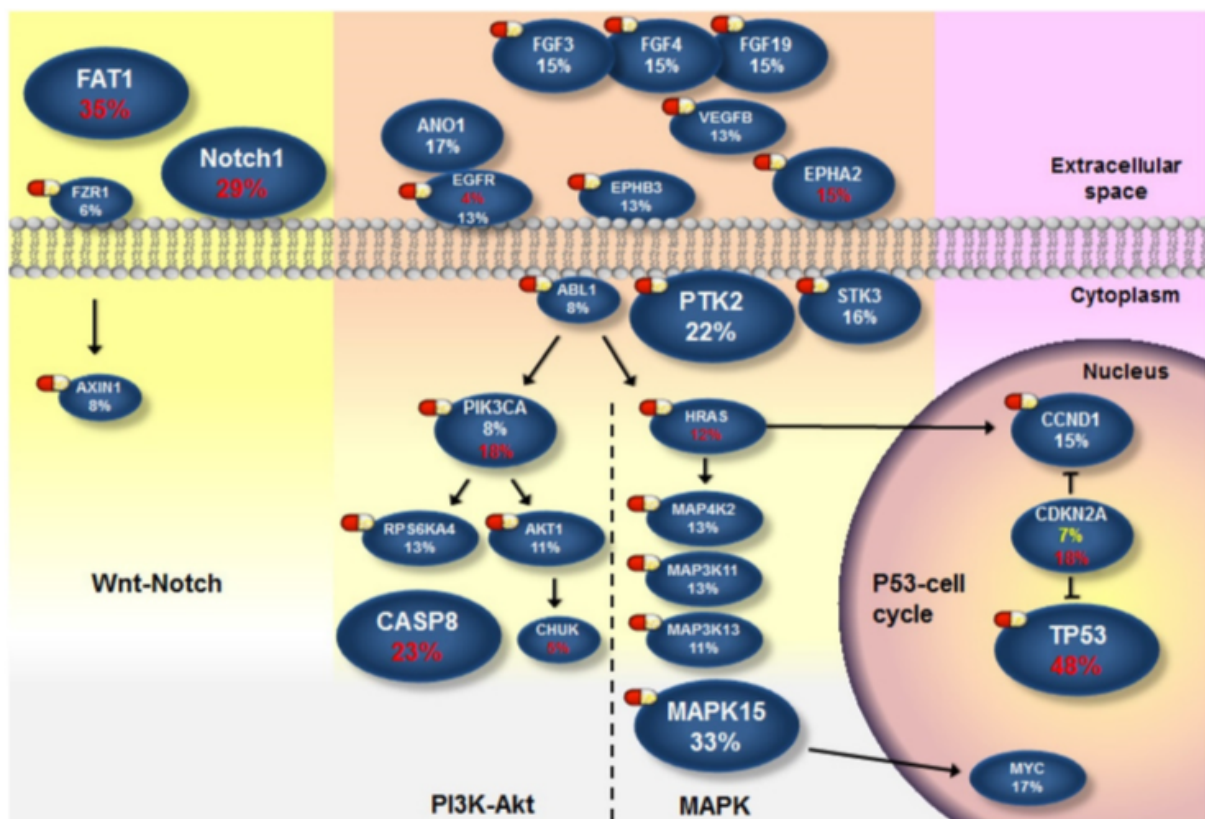


Figure 33 : Gènes altérés et voies à visée thérapeutique dans les cancers de la tête et du cou mis en évidence par les travaux de (Su et al., 2017)

Les dessins représentant des pilules correspondent aux cibles de médicaments déjà approuvés par la FDA ou en cours d'essais cliniques. La fréquence d'altération des gènes altérant la protéine sont notifiées en rouge : FAT1 = 35%, NOTCH1 = 29%, EGFR = 4%, EPHA2 = 15%, PIK3CA = 18%, CASP8 = 23% ; CHUK = 5%, CDKN2A = 18% et TP53 = 48%. Les pourcentages en blanc correspondent à l'amplification du gène et enfin ceux en jaune indiquent la perte de copie (Su et al., 2017).

▲ En 2017, **Puram et al.** étudient le profil des transcriptomes d'environ 6 000 cellules uniques provenant de 18 patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou. Parmi ces patients, cinq présentent des métastases de ganglions lymphatiques qui sont également étudiés. L'ensemble de leur analyse est possible grâce aux progrès récents de la génomique unicellulaire qui offre la possibilité d'explorer l'hétérogénéité génétique et fonctionnelle à une résolution cellulaire. Ainsi, pour leur étude ils utilisent des techniques de séquençage des ARNm sur cellule unique ou scRNAseq ainsi que des données de séquençage de l'exome entier (WES) et de génotypage ciblé (SNaPshot) (*Figure 34*) (Puram et al., 2017).

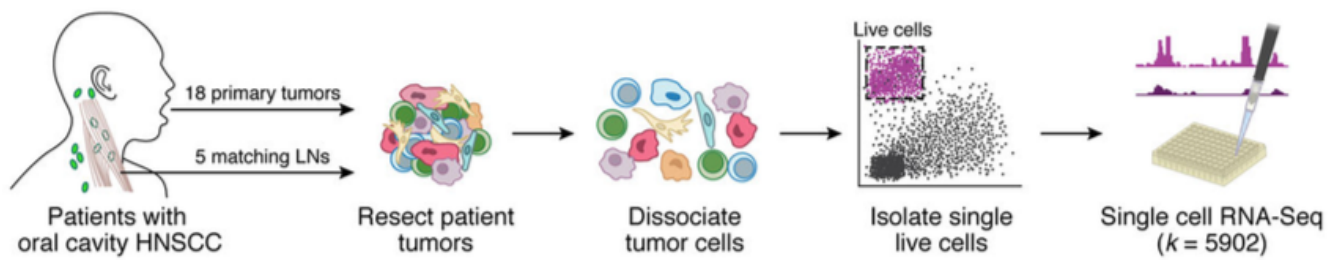


Figure 34 : Chronologie des manipulations de la collecte des échantillons au séquençage de l'ARN messager en cellule unique (Puram et al., 2017)

Ils commencent tout d'abord leur étude par la séparation des cellules malignes des cellules non malignes en évaluant les variations du nombre de copies chromosomiques (variations impactant les cellules malignes). Ensuite, les cellules dites malignes sont définies selon leur origine épithéliale, effectivement ils mettent en évidence que les cellules présentant des variations du nombre de copies ont également une expression de marqueurs épithéliaux.

Les cellules dites non malignes sont aussi classifiées ce qui a d'ailleurs permis de révéler la composition du microenvironnement tumoral de ces échantillons (Figure 35). Ainsi, deux groupes se dessinent avec d'une part celui des cellules T qui lui-même se divise en quatre sous-groupes, à savoir : les cellules T régulatrices, les cellules T auxiliaires CD4+ conventionnelles et deux populations de cellules T CD8+ cytotoxiques. Pour les sous-ensembles cytotoxiques, ceux-ci se distinguent par l'expression des récepteurs co-inhibiteurs dont PD-1 (*programmed death-1*, membre de la famille CD28 des récepteurs des cellules T) et CTLA4. Un second groupe est mis à jour, il s'agit du groupe des fibroblastes qui se ramifient en deux sous-groupes principaux. Le premier sous-groupe des fibroblastes présente des marqueurs classiques des myofibroblastes, c'est-à-dire l'alpha actine de muscle lisse : ACTA2 (alpha actine 2) et les protéines de la chaîne légère de la myosine : MYLK, MYL9. Le second groupe présente des récepteurs, des ligands et des gènes de la MEC, à savoir : la protéine d'activation des fibroblastes (FAP ou *Fibroblast Activation Protein*), la podoplanine (PDPN) et le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*). Enfin, un troisième groupe, mineur, est mis en évidence, celui-ci est dépourvu des marqueurs des myofibroblastes et des CAF et pourrait donc représenter des fibroblastes inertes. Ils accentuent encore leur analyse en distinguant les CAF en deux sous-unités : CAF1 et CAF2 qui présentent une expression différente des gènes de réponse précoce, à savoir : JUN ou encore FOS, mais également des marqueurs mésenchymateux avec VIM et THY1, ainsi que des ligands et des récepteurs tels que FGF7 et TGFBR2/3 et enfin des différences d'expression des protéines de la matrice extracellulaire comme MMP11 ou encore la cavéoline-1 (Cav1) (Figure 35) (Puram et al., 2017).

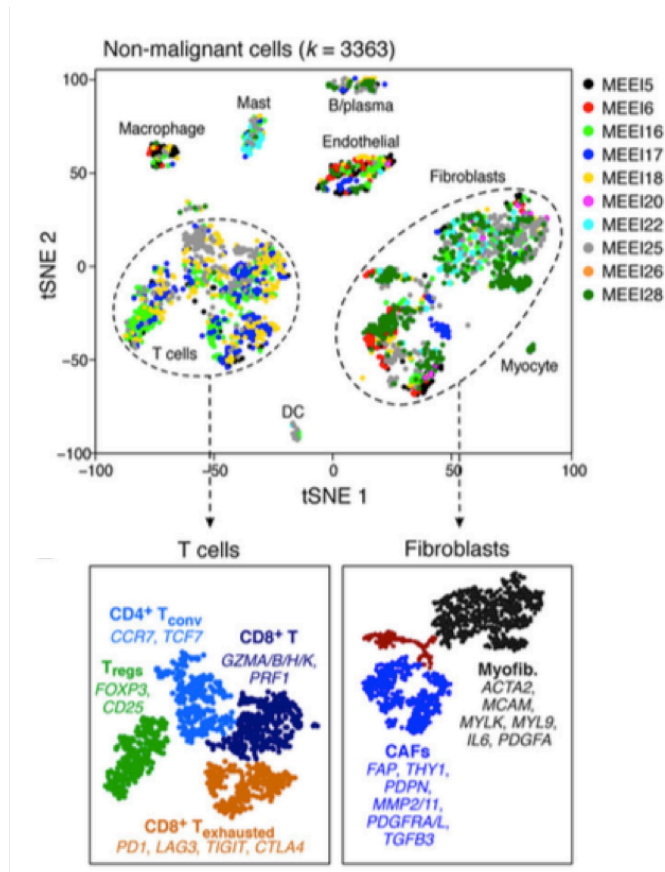


Figure 35 : Hétérogénéité des cellules non malignes dans les cancers de la tête et du cou (Puram et al., 2017)

(En haut) Le tracé par l’algorithme t-SNE des cellules non malignes de 10 patients met en évidence les groupes de cellules stromales et immunitaires dans les tumeurs. Les groupes sont attribués aux types de cellules indiqués par les gènes différemment exprimés. (En bas à gauche) Le tracé par l’algorithme t-SNE des cellules T avec des populations distinctes. (En bas à droite) Le tracé par l’algorithme t-SNE des fibroblastes avec les myofibroblastes, les fibroblastes au repos et les CAF, d’après la légende de (Puram et al., 2017).

Concernant plus spécifiquement les cellules dites malignes, ils mettent en évidence une hétérogénéité d’expression des cellules malignes inter-tumorales *via* des analyses des transcriptomes. En effet, leur étude permet de souligner que les gènes dont l’expression est modifiée sont retrouvés uniquement dans certaines tumeurs étudiées. Ainsi, les gènes liés à la détoxification et au métabolisme des médicaments, à savoir : GPX2, GSTMs, CYP, ABCC1 sont particulièrement surexprimés par les deux tumeurs de sous-type classique de la cohorte : MEEI6 et MEEI20. De même, les gènes liés au stress comme JUNB ou FOSL1 ou encore ceux associés à l’activation immunitaire comme IDO1, STAT1 et TNF sont également surexprimés. De plus, sur les 10 tumeurs étudiées, ils mettent en lumière 60 signatures génétiques qui varient entre les cellules individuelles d’au moins une tumeur. Néanmoins, il existe une corrélation entre les signatures issues de différentes tumeurs d’où la notion de modèles communs d’hétérogénéité d’expression intra-tumorale.

Leur étude met en avant la présence d'un programme partiel de transition épithélio-mésenchymateuse avec seulement l'expression de SNAIL2 mise en avant dans 70% des cellules de l'étude. Cette technique a permis de localiser les cellules malignes au niveau du bord de la tumeur en contact avec le stroma avoisinant. Il semble exister des signaux qualifiés de « *sortants* » des cellules malignes à destination de la diversité des cellules avoisinant la tumeur mais également des signaux dits « *entrants* » vers les cellules malignes notamment de la part des CAF. Les interactions entre les cellules malignes et leur environnement sont sous l'intervention de plusieurs gènes, à savoir : TGFB3-TGFBR2, FGF7-FGFR2 et CXCL12-CXCR7.

Pour poursuivre, leur attention s'est également portée sur les métastases locorégionales et ils ont comparé l'hétérogénéité trouvée dans la tumeur primitive avec les caractéristiques de celles-ci. Ainsi, seules les tumeurs primaires présentent des myocytes. Alors que les métastases locorégionales renferment des cellules B mais également des fibroblastes préférentiellement de la sous-classe des myofibroblastes et de sous-type CAF1. L'environnement des métastases locorégionales est donc différent de celui de la tumeur primaire mais néanmoins la transition épithélio-mésenchymateuse se poursuit même dans les métastases.

Fort de l'ensemble de ces résultats l'équipe de Puram *et al.* décide de superposer leurs données issues du séquençage de cellules uniques avec celles regroupées par le TCGA qui recense des données sur les tumeurs en vrac. Toute la cohorte étudiée est finalement regroupée dans trois des quatre sous-types proposés par le TCGA, à savoir les sous-types basal, classique et atypique. Aucune cellule maligne n'appartient au sous-type mésenchymateux. Or, ce sous-type semble correspondre aux cellules non malignes décrites c'est-à-dire ; les CAF, les myofibroblastes et les myocytes. Ainsi, ils proposent que seuls trois sous-types existent pour les cellules malignes, c'est-à-dire les sous-types basal, classique et atypique et les cellules non malignes sont classées dans l'ancien sous-type mésenchymateux (*Figure 36*) (Puram et al., 2017).

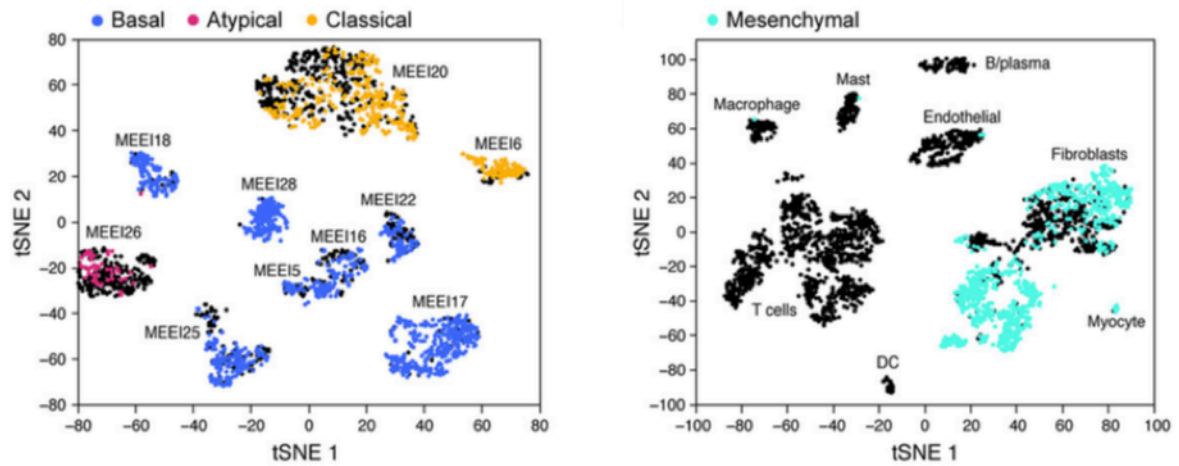


Figure 36 : Nouvelle classification des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou proposée par les travaux de (Puram et al., 2017)

(A gauche) Le tracé t-SNE des cellules malignes de 10 tumeurs. Les cellules sont colorées en fonction du sous-type d'expression TCGA et le noir indique l'absence de correspondance. (A droite) Le tracé par l'algorithme t-SNE des cellules non malignes. Les cellules sont colorées en fonction du sous-type d'expression TCGA auquel elles correspondent et le noir indique l'absence de correspondance, d'après la légende de (Puram et al., 2017).

Dans cette étude, ils valorisent les données obtenues afin de corréliser le programme de l'EMT partielle avec l'apparition de métastases et le devenir défavorable. Ainsi, comme pour les données du TCGA, c'est le sous-type basal qui présente les niveaux les plus importants de gènes liés à l'EMT partielle. De plus, ces scores élevés ont pu être mis en relation avec la présence de métastases locorégionales et l'invasion ganglionnaire tout en favorisant des caractéristiques physiopathologiques négatives, telles que l'extension extracapsulaire ou encore l'invasion lymphovasculaire, toutes deux dépourvues de biomarqueurs. Ils proposent donc l'utilisation en clinique de ce score de l'EMT partielle afin d'améliorer la prise en charge des patients (Puram et al., 2017).

Malgré l'ensemble de ces classifications basées sur des aspects moléculaires et malgré le lien qui est fait avec un éventuel caractère pronostique voire prédictif, aucune de celles-ci n'est employée en clinique en raison d'un manque de corrélation des résultats chez les patients. Aussi, la pratique clinique est toujours, en 2022, basée uniquement sur le stade et le grade du cancer définis selon la classification TNM et les caractéristiques anatomopathologiques pourtant insatisfaisantes. L'identification de biomarqueurs fiables pronostiques mais également prédictifs doit donc se poursuivre.

III) Diagnostic et prise en charge thérapeutique des cancers des voies aérodigestives supérieures

La suite de ce manuscrit vise à présenter la description clinique et le diagnostic histologique des cancers des VADS. Cette partie décrira également la prise en charge thérapeutique dédiée aux cancers de la tête et du cou à l'heure actuelle en France.

1) Diagnostic des cancers des voies aérodigestives supérieures

Depuis maintenant 9 ans, la Société Européenne de la Tête et du Cou (*European Head and Neck Society ou EHNS*) mène la campagne *Make Sense* afin de sensibiliser le grand public aux cancers ORL.

Chaque année, une semaine au mois de septembre est consacrée à dynamiser la diffusion des connaissances sur ces cancers et à mettre en lumière les signes d'alerte pour inviter au dépistage. Cette année, la campagne a lieu du 20 au 24 septembre 2022 à travers le monde et notamment en France avec par exemple une journée de sensibilisation organisée au Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Nancy « *en proposant des dépistages gratuits et indolores dans le cadre de la semaine européenne de sensibilisation au dépistage des cancers ORL* » sous forme de « *bus de dépistage, stands, animations, conférence et table ronde* » (CHRU de Nancy, 2022). Cette campagne permet également d'actualiser et de rendre visible chaque année la règle du « *1 pour 3* ». Il s'agit d'un *mémo-technique* qui invite à être vigilant face à des symptômes qui durent au-delà de trois semaines.

Parmi les symptômes qui peuvent correspondre à des signaux d'alerte, il y a :

- ☐ « *des douleurs à la langue, des ulcères de la bouche qui ne guérissent pas et/ou des tâches rouges ou blanches dans la bouche ;*
- ☐ *des douleurs dans la gorge ;*
- ☐ *un enrrouement persistant ;*
- ☐ *une déglutition douloureuse et/ou difficile ;*
- ☐ *une grosseur dans le cou ;*
- ☐ *ou le nez bouché d'un côté et/ou écoulements de sang par le nez »* (European Head and Neck Society, 2022).

La présence et la persistance de l'un de ses symptômes doivent alerter et conduire le patient à consulter son médecin généraliste ou son dentiste, qui orientera le patient si besoin vers un spécialiste ORL (European Head and Neck Society, 2022).

Afin d'accompagner la campagne, l'EHNS propose des affiches actualisées dans plusieurs langues, ci-dessous voici celle en français pour la campagne de 2022 (Figure 37).

Si vous présentez UN de ces symptômes pendant TROIS semaines...

La définition « un pour trois », développée par les plus grands experts des cancers de la tête et du cou en Europe, signifie que les médecins traitants doivent adresser le patient à un spécialiste de la tête et du cou dès lors que celui-ci présente l'un des symptômes ci-dessous depuis plus de trois semaines.

Douleurs à la langue, ulcères de la bouche qui ne guérissent pas et/ou taches rouges ou blanches dans la bouche	Douleurs dans la gorge	Enrouement persistant
Déglutition douloureuse et/ou difficile	Grosseur dans le cou	Nez bouché d'un côté et/ou écoulements de sang par le nez

SEMAINE 1 **SEMAINE 2** **SEMAINE 3**

CONSULTEZ UN MÉDECIN

L'orientation rapide et le diagnostic précoce sauvent des vies. N'attendez pas.

Pour en savoir plus, rendez-vous / suivez-nous sur :
www.makesensecampaign.eu | Twitter: @MakeSenseCmpn

La campagne *Make Sense* reçoit le soutien européen de :

EHNS www.ehns.org
European Head and Neck Society

MERCK **NORGINE** **Bristol-Myers Squibb**

Figure 37 : Affiche de la campagne Make sense proposée par l'European Head and Neck Society (European Head and Neck Society, 2022)

Ainsi, les symptômes orientant vers un cancer des VADS sont multiples et dépendent de la localisation anatomique mais également de l'étendue de celui-ci. Nous proposons donc de présenter ces symptômes selon la localisation anatomique comme proposé dans la revue de Johnson *et al.*, 2020.

Tout d'abord, les tumeurs de la cavité buccale (plancher, partie mobile de la langue, muqueuse, crêtes alvéolaires, trigone rétromolaire et palais dur) sont fréquemment découvertes par les patients eux-mêmes sans savoir qu'il s'agit d'un cancer étant donné qu'elles se présentent sous la forme d'un aphte ou d'un ulcère dont la présence persiste et la guérison n'a pas lieu.

Il est également possible que les patients décrivent des symptômes incommodes altérant leurs actions du quotidien telles que l'alimentation, la parole, la mastication ou encore une difficulté à parler (dysarthrie).

Ensuite, les tumeurs de l'oropharynx (base de la langue, amygdales, palais mou) et de l'hypopharynx représentent des sites anatomiques peu accessibles par les patients eux-mêmes, les éventuelles lésions ne sont donc pas détectées. En effet, la détection se fera de manière indirecte en raison d'une difficulté à s'alimenter (dysphagie), de douleurs lors de la déglutition (odynophagie) ou de douleurs au niveau des conduits auditifs (otalgie).

Nous pouvons poursuivre par les tumeurs du larynx, selon le moment du diagnostic, différents symptômes peuvent engager les patients à consulter. Ainsi, en cas de stade précoce, seules des modifications de la voix peuvent être constatées. Or, en cas de stade avancé, la symptomatologie peut basculer vers une difficulté à respirer (dyspnée) voire une obstruction des voies respiratoires.

Enfin les cancers des sinus, des fosses nasales et du *cavum* se caractérisent principalement par une obstruction nasale, une rhinorrhée voire des épistaxis. Selon l'avancée du cancer il est possible d'observer une déformation, une diplopie ou encore une anosmie. Dans tous les cas, une adénopathie cervicale peut être observée (*Tableau III*).

Tableau III : Signes cliniques selon la localisation anatomique du cancer des voies aérodigestives supérieures (Haute Autorité de Santé (HAS), 2009)

Topographie de la tumeur	Signes cliniques
Sinus, fosses nasales, cavum	Obstruction nasale, rhinorrhée, épistaxis, déformation faciale, diplopie, hypo-acousie, anosmie
Cavité buccale Oropharynx	Ulcération infiltrée souvent indolore et persistante, tuméfaction, trouble de la mobilité linguale, otalgie réflexe, mobilité dentaire ou instabilité prothétique, gingivorragie, gêne à la déglutition, odynophagie, anesthésie du V ₃
Hypopharynx	Dysphagie, otalgie réflexe, dysphonie, douleur
Larynx	Dysphonie, dysphagie, dyspnée
Toute topographie	Adénopathie cervicale isolée

Par cette description, il est aisé d'apprécier le caractère polysymptomatique de ces cancers mais également de percevoir que certains de ces symptômes peuvent paraître anodins n'engageant donc pas forcément les patients vers une consultation immédiate auprès d'un professionnel de santé. Il est d'ailleurs fréquent que la découverte du cancer se fasse de manière fortuite par exemple lors de la consultation chez le dentiste. Si le patient consulte en raison de la présence de symptômes qui perturbent son quotidien ou deviennent douloureux, pour la majorité des cas cela signe le caractère avancé du cancer, ce qui explique pourquoi le diagnostic est posé alors que le cancer est déjà à un stade avancé et donc la prise en charge est plus lourde et plus complexe.

Une fois la piste du cancer évoquée, il s'agit dans un premier temps de réaliser un bilan initial pour plusieurs motifs. D'une part, afin de confirmer le diagnostic de cancer et de stratifier la tumeur en termes de sous-type histologique et de déterminer son stade, le tout pour orienter la prise en charge thérapeutique.

D'autre part, les échanges avec le patient permettent d'identifier le ou les facteurs de risque, mais également de mettre en évidence d'éventuelles comorbidités et contre-indications vis-à-vis des thérapies envisagées. Evidemment ces entretiens sont également le moment de l'annonce du diagnostic.

Un ensemble varié de professionnels de santé est alors impliqué, du médecin généraliste, en passant par l'oncologue, le radiothérapeute, le psychologue ou encore le diététicien.

Ainsi, la confirmation du diagnostic et le bilan d'extension comprennent différents examens en commençant par la recherche des facteurs de risque en interrogeant le patient, ce dialogue est suivi par un premier examen clinique réalisé par le médecin généraliste afin de visualiser la cavité buccale ainsi que l'oropharynx et d'objectiver d'éventuelles adénopathies cervicales. Le médecin traitant oriente alors, si besoin, le patient vers un spécialiste pour réaliser un examen complet des VADS.

Le diagnostic se poursuit par trois groupes d'examens : l'endoscopie sous anesthésie générale afin de procéder à une biopsie, une évaluation de l'extension locorégionale et le dépistage d'une éventuelle tumeur des VADS. L'œsophage ainsi que les bronches sont également visualisés lors de l'endoscopie. Ensuite, la biopsie réalisée est analysée lors d'un examen anatomopathologique afin de confirmer le diagnostic.

Lors de cette étude le stade de la tumeur est apprécié *via* notamment l'étude de la différenciation tumorale mais également par une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. D'un point de vue différenciation, malgré une proximité d'apparence avec les cellules de l'épithélium stratifié ; les cellules tumorales composant une tumeur bien différenciée présentent une kératinisation irrégulière trouvée sous la dénomination de « *perle de kératine* ». Alors qu'une tumeur peu différenciée est définie par des cellules non matures avec un pléomorphisme nucléaire et des mitoses atypiques, ainsi qu'une stratification ou une kératinisation minimale. Enfin, le patient est engagé dans une procédure d'imagerie afin de mettre en évidence l'extension tumorale locale mais également les aires ganglionnaires cervicales (*Tableau IV*).

Tableau IV : Examens d'imagerie à réaliser lors du bilan initial selon la localisation anatomique du cancer ORL (Haute Autorité de Santé (HAS), 2009)

Topographie de la tumeur	Imagerie de référence
Sinus	<ul style="list-style-type: none"> IRM des sinus (avec injection) et TDM des sinus (sans injection) en constantes osseuses <p>L'IRM permet d'apprécier l'extension tumorale (en particulier orbitaire, intracrânienne, périnerveuse et espaces profonds) ; la TDM en fenêtres osseuses permet l'analyse fine d'une lyse osseuse.</p> <ul style="list-style-type: none"> Il n'y a pas lieu de réaliser de radiographie standard des sinus.
Cavum	<ul style="list-style-type: none"> IRM de la base du crâne et du cou +/- TDM de la base du crâne (en fenêtre osseuse ; +/- injecté si l'étude ganglionnaire cervicale n'a pas été faite en IRM) <p>L'IRM permet d'apprécier les extensions périnerveuses aux forams de la base du crâne et recherche une extension intracrânienne ou aux espaces profonds de la face.</p> <p>+/- TEP . Elle est associée à une TDM thoraco-abdomino-pelvienne avec injection en cas d'adénopathies cervicales basses ou de tumeur très évoluée (stade IV).</p>
Oropharynx Cavité buccale	<p>La TDM cervico-thoracique est le plus souvent réalisée en première intention permettant d'explorer la tumeur primitive, les adénopathies cervicales et l'étage thoracique pour bilan d'extension.</p> <p>L'IRM de l'oropharynx sera le plus souvent nécessaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> dans les stades T2-T3, pour préciser l'extension osseuse, lorsque les artefacts dentaires gênent l'interprétation en TDM.
Larynx Hypopharynx Adénopathie sans porte d'entrée	<ul style="list-style-type: none"> TDM cervicale avec injection (de la base du crâne à l'orifice cervicomédiastinal) associée à des manœuvres dynamiques^B. <p>En pratique courante, une TDM cervico-thoracique est réalisée associant le scanner cervical avec injection et une acquisition sur le thorax de dépistage.</p> <ul style="list-style-type: none"> Une TEP peut être nécessaire en cas de métastase ganglionnaire sans tumeur primitive retrouvée.

Cet examen comprend une tomodensitométrie (TDM) et/ou une imagerie à résonance magnétique (IRM) afin de visualiser précisément la localisation tumorale. En plus de l'imagerie cervico-faciale, un scanner thoracique est associé afin d'objectiver ou d'écarter d'éventuelles localisations pulmonaires. De plus, une tomographie par émission de positons couplée à un scanner (TEP-scan) permet d'objectiver d'éventuelles métastases à distance ou encore la tumeur primitive en cas d'atteinte ganglionnaire cervicale sans lésions ORL (*Tableau IV ci-dessus*). *In fine*, selon le bilan sanguin, il est possible d'ajouter une échographie hépatique. (Haute Autorité de Santé (HAS), 2009) - (Johnson et al., 2020).

2) Classification TNM et arbres décisionnels de prise en charge thérapeutique

Afin d'estimer l'étendue du cancer et de proposer un schéma thérapeutique adapté, les cliniciens utilisent la classification TNM des cancers des VADS, 8^{ème} édition qui se base sur les recommandations de l'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

Dans l'ordre d'apparition, la lettre T de l'acronyme TNM correspond à la tumeur en termes de dimensions, c'est-à-dire l'épaisseur et la profondeur d'invasion (DOI : *depth of invasion*) mais également la présence ou l'absence d'envahissements adjacents. Le N permet de notifier le nombre et la taille des ganglions atteints ainsi que l'invasion ganglionnaire et la rupture de la capsule des ganglions avec extension extra-ganglionnaire (ENE : *extranodal extension*), ces indicateurs sont utilisés à visée pronostique pour les ganglions régionaux métastatiques. Enfin, le M correspond à la présence ou non de métastases à distance.

Cette classification permet aux cliniciens d'établir le stade en fonction de la localisation du cancer. De manière générale, voici un tableau (*Tableau V*) qui résume la classification TNM 8^{ème} édition des cancers des VADS, plus le stade est élevé, moins le pronostic est favorable (Anticancer Fund and European Society for Medical Oncology, 2015) - (Onco Occitanie Réseau Régional de Cancérologie, 2020).

Tableau V : Définition du stade du cancer des voies aérodigestives supérieures selon la classification TNM 8^{ème} édition (Anticancer Fund and European Society for Medical Oncology, 2015)

Stade	Définition
Stade I	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Taille de la tumeur et infiltration</i> : 2 cm de diamètre ou moins, sans infiltration des tissus voisins. • <i>Ganglions lymphatiques*</i> touchés : non. • <i>Organes distants touchés</i> : non.
Stade II	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Taille de la tumeur et infiltration</i> : diamètre compris entre 2 et 4 cm, ou touchant déjà des sites voisins. • <i>Ganglions lymphatiques*</i> touchés : non. • <i>Organes distants touchés</i> : non.
Stade III	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Taille de la tumeur et infiltration</i> : diamètre dépassant 4 cm. OU • <i>Ganglions lymphatiques*</i> touchés : oui, et 3 cm maximum • <i>Organes distants touchés</i> : non.
Stade IVA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Taille de la tumeur et infiltration</i> : toutes tailles et tout type d'infiltration. • <i>Ganglions lymphatiques*</i> touchés : oui, et taille comprise entre 3 et 6 cm. • <i>Organes distants touchés</i> : non.
Stade IVB	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Taille de la tumeur et infiltration</i> : la tumeur envahit l'espace situé devant la colonne vertébrale dans le cou, l'artère carotide* ou des structures dans la zone située entre les deux poumons et appelée médiastin*, comme la trachée* ou l'œsophage. OU • <i>Ganglions lymphatiques*</i> touchés : oui, et taille supérieure à 6 cm. • <i>Organes distants touchés</i> : non.
Stade IVC	Indépendamment de la taille de la tumeur et des ganglions* lymphatiques* touchés, un organe situé à distance est touché (métastase* à distance).

Pour compléter la classification TNM, l'anatomopathologiste attribue quant à lui un grade basé sur les caractéristiques histologiques en étudiant la biopsie. Ainsi, le grade 1 correspond à des cellules bien différenciées. En effet, les cellules tumorales sont, d'un point de vue histologique, très similaires aux cellules saines du site d'origine. Le grade 2 regroupe des cellules moins bien différenciables mais dont il est encore possible de déterminer l'origine, ces cellules sont dites modérément différenciées. Ensuite, le grade 3 décrit des cellules très peu différenciées dont l'origine est quasiment impossible à déterminer. Enfin, le grade 4 correspond à des cellules indifférenciées dont l'origine est non déterminable.

Le travail de l'anatomopathologiste ne s'arrête pas là, il se poursuit en décrivant les marges tumorales qui correspondent aux bordures de l'exérèse au moment de la chirurgie. Deux qualifications sont alors possibles, soit aucune cellule cancéreuse n'est observée, il est alors notifié « *marge négative* », soit au contraire, l'anatomopathologiste trouve des cellules cancéreuses avec un envahissement microscopique inférieur ou égal à 1 mm, alors la marge est qualifiée de « *positive* » indiquant que la tumeur n'a pas été retirée dans son intégralité (Anticancer Fund and European Society for Medical Oncology, 2015).

L'ensemble de ces informations est utilisé par les praticiens afin d'envisager une prise en charge thérapeutique selon le stade et le grade de la tumeur mais également en tenant compte de l'état général du patient, de ses éventuelles comorbidités et des contre-indications possibles. La suite de ce travail va exposer la prise en charge thérapeutique proposée aux patients, en France.

3) Prise en charge thérapeutique des cancers des voies aérodigestives supérieures en France

Afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique du patient, le dossier est suivi et préparé par une équipe pluridisciplinaire de professionnels de santé durant des réunions de concertation pluridisciplinaire. Le programme de la prise en charge est alors discuté selon les informations recueillies sur le patient, à savoir : ses antécédents médicaux personnels, ses antécédents familiaux en termes de cancer, la consommation de tabac et d'alcool, l'état général du patient, son poids et son état nutritionnel.

De plus, la localisation de la tumeur, le stade du cancer et les résultats de la biopsie (localisation, stade, type histologique, profondeur de l'envahissement, grade, marges tumorales, infiltration vasculaire et infection par l'HPV) sont pris en compte. Ainsi, en cas de stade I ou II, c'est-à-dire en cas de cancer local, la prise en charge fera intervenir soit la chirurgie soit la radiothérapie. En cas de stade III ou IV, c'est-à-dire sans métastases, la prise en charge offre deux possibilités, soit une chirurgie associée à de la radiothérapie complétées ou non par une chimiothérapie, soit une radiothérapie associée à une chimiothérapie ou à une thérapie ciblée.

Dans un contexte de stade IV avec des métastases ou une rechute, le score positif combiné ou CPS pour *combined positive score*¹⁷ est déterminé. Si celui-ci est strictement inférieur à 1, alors la prise en charge thérapeutique s'oriente vers le protocole TP-EXTREME, sinon vers un traitement par du pembrolizumab associé ou non à des sels de platine ou à du 5-fluorouracile.

Ponctuellement, un autre protocole peut être employé, il s'agit du protocole EXTREME. Les deux protocoles cités seront détaillés ci-après.

Avant d'initier le traitement, le patient est invité à arrêter toute exposition aux facteurs de risques identifiés, tels que le tabac et l'alcool. De plus, il lui est conseillé de consulter un nutritionniste qui adaptera son régime alimentaire. En effet, certains traitements, ou le cancer lui-même, peuvent engendrer des difficultés à déglutir. En parallèle, le patient se voit proposer une prise en charge dentaire afin de limiter le risque de développer des caries, particulièrement décrit lors de la prise en charge par radiothérapie. Enfin, une bonne hygiène dentaire permet également de limiter le risque d'ulcération et d'infections générales de la bouche.

La prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer des VADS fait donc potentiellement appel à des traitements combinés. L'arsenal thérapeutique peut se distinguer en deux groupes. D'une part, les traitements locaux du cancer, à savoir la chirurgie et la radiothérapie et d'autre part, les traitements systémiques avec la chimiothérapie (cisplatine, carboplatine, 5-fluorouracile, paclitaxel et docétaxel), la thérapie ciblée anti-EGFR (cétuximab), et plus récemment l'immunothérapie (nivolumab, pembrolizumab) (Machiels et al., 2020).

a- Chirurgie

Lorsque cela est possible, la prise en charge d'un cancer des VADS se fait par une chirurgie afin de procéder à l'ablation de la tumeur et si besoin à celle des ganglions lymphatiques. Cette exérèse est réalisée en monobloc avec des marges de sécurité. Durant cette opération, l'objectif est évidemment de retirer la tumeur, mais le chirurgien doit également prendre en considération l'aspect esthétique et fonctionnel, c'est pourquoi il veillera à conserver autant que possible les structures saines.

¹⁷ Score positif combiné ou *combined positive score* (CPS) est déterminé selon le nombre de cellules PD-L1 positives (cellules tumorales, lymphocytes et macrophages) divisé par le nombre total de cellules tumorales vivantes, multiplié par 100 (de Ruitter et al., 2021).

Néanmoins, il n'est pas toujours possible de suivre cette règle, ainsi une chirurgie reconstructive est parfois nécessaire et peut se pratiquer durant la même opération par l'utilisation de lambeaux de tissus provenant d'autres parties du corps du patient ou en réalisant une greffe cutanée afin de recouvrir la ou les lésions (Machiels et al., 2020) - (Onco Occitanie Réseau Régional de Cancérologie, 2020).

b- Radiothérapie

La radiothérapie correspond à l'utilisation de rayonnements à haute énergie soit des électrons, plutôt pour des irradiations superficielles de quelques centimètres, ou des photons, pour délivrer une dose homogène d'énergie encore plus en profondeur. Ils ont la capacité de traverser le corps humain et de déposer leur énergie en profondeur, au niveau de la tumeur afin de la détruire en totalité lorsqu'il n'y a pas eu de chirurgie ou de manière complémentaire à la chirurgie, le tout dans le but d'éliminer de manière locale les cellules cancéreuses. Cependant, tout au long de leur trajet ils déposent de l'énergie avec un phénomène de dispersion avant et après le maximum au niveau de la zone du dépôt.

D'un point de vue mécanistique, la destruction des cellules est possible grâce à deux effets des rayonnements. Premièrement, les rayons X entraînent des radiations électromagnétiques par émission de photons et accélération des électrons ce qui permet la production d'électrons secondaires dans le corps humain. Il se produit alors un effet dit « *direct* » qui correspond à l'interaction d'un électron secondaire avec l'ADN et qui provoque la formation d'un radical cation causant des ruptures de liaison et donc potentiellement des lésions à l'ADN, il y aura également des altérations des lipides, glucides et protéines. Secondement, l'effet indirect, qui correspond à la radiolyse de l'eau par excitation ou ionisation entraîne la formation de radicaux hydrogènes et hydroxyles. Ces deux types de radicaux vont permettre des réactions aboutissant à la formation de radicaux libres pouvant causer des dommages à l'ADN. L'objectif visé est évidemment la mort des cellules cancéreuses (*Figure 38*).

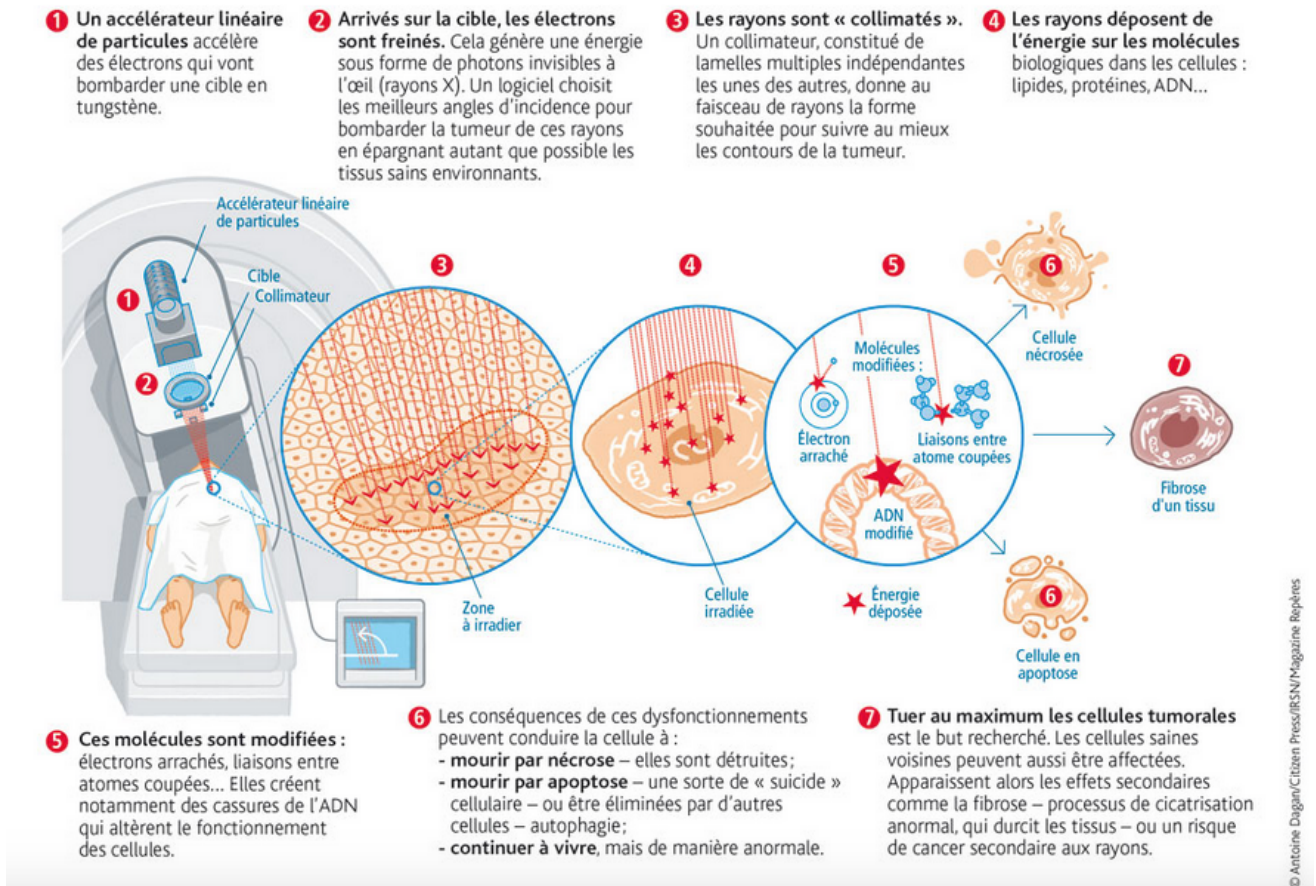


Figure 38 : Effets des rayonnements ionisants en radiothérapie – infographie proposée par (Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), 2019)

La mort évoquée ci-dessus correspond en fait à un ensemble de morts cellulaires qui s'enclenche lors de la radiothérapie, à savoir d'une part, la mort mitotique qui est la mort cellulaire classique post-radiothérapie qui survient en raison de la perte de la capacité cellulaire à se diviser en raison des altérations causées sur l'ADN et des anomalies chromosomiques générées. D'autre part, il y a la nécrose qui est une mort par réaction à l'inflammation secondaire à la perte d'ATP qui représente normalement une source d'énergie pour la cellule. Il y a également l'apoptose qui est particulièrement précoce dans les tissus à multiplication rapide comme les cellules hématologiques. Mais aussi, l'autophagie qui apparaît là comme un système de maintien de l'homéostasie cellulaire, elle est déclenchée par l'irradiation qui apparaît comme un stress pour la cellule. De plus, la sénescence intervient lors de la radiothérapie en raison de la réduction de certaines localisations de l'ADN comme par exemple les télomères (Antoni et al., 2014).

Enfin, la mort cellulaire immunogène participe également à la mort engendrée par la radiothérapie mais en réponse aux autres morts comme l'apoptose. Celle-ci résulte d'une induction de l'immunité face aux antigènes tumoraux libérés par les cellules mortes. Ces antigènes sont alors reconnus par le système immunitaire comme des signaux de danger, des DAMPs (*damage associated molecular pattern*) qui sont pris en charge au niveau des récepteurs de reconnaissance des signaux de danger (PRR : *pattern recognition receptor*) déclenchant ainsi une réaction immunitaire et inflammatoire par activation des voies RIPK1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) / NF- κ B et l'ADN-TMEM, mais aussi des interleukines : l'IL-17A et l'IL-17R (Tang et al., 2019)

Un autre phénomène se produit lors de l'irradiation, il s'agit de l'effet abscopal ou effet *bystander*. En effet, il semblerait que les cellules adjacentes à celles directement visées par la radiothérapie subissent des effets comparables malgré une dose moindre de rayons avec une sensibilité plus accrue des cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Trois processus sous-tendent cet effet, avec d'une part une réponse adaptative des cellules. En effet, lorsque la cellule est soumise à une irradiation de bas niveau, il se produit alors un phénomène de protection qui fait que si la cellule est ensuite soumise à une dose plus importante elle aura des effets moindres. Ensuite, il y a l'apparition d'anomalies cytogénétiques, de mutations, d'une amplification génique, d'une transformation maligne et d'une mort cellulaire de cellules progénitrices. Enfin, la dernière étape correspond à l'effet abscopal à proprement parler. Cet effet réside dans une réponse antitumorale à distance et correspondrait à l'induction d'une réponse immunitaire ou inflammatoire (Antoni et al., 2014).

La radiothérapie peut être exclusive ou en complément à la chirurgie, dans les deux cas elle peut être associée à une chimiothérapie dite à visée radio-sensibilisante. La radiothérapie de la sphère cervico-faciale présente de nombreux organes à risque, tels que les parotides, les glandes sous-mandibulaires, la moelle épinière, le tronc cérébral, la mandibule, les articulations temporo-mandibulaires, l'oreille interne, la cavité buccale, le larynx, le plexus brachiaux, les voies optiques, entre autre. Il est donc primordial d'épargner autant que possible ces zones de toute irradiation, ce qui dans le cas contraire provoqueraient de nombreux et divers effets indésirables au patient et altèreraient sa qualité de vie. Pour ce faire, avant de commencer la radiothérapie, il y a une étape très importante de repérage des zones à traiter. Ainsi, le patient est équipé d'un masque de contention personnalisé thermoformé afin d'immobiliser celui-ci lors des séances de radiothérapie.

De plus, un scanner injecté pour la dosimétrie, couplé avec une IRM et/ou une TEP, et dans tous les cas avec l'imagerie pré-opératoire, est réalisé afin de délimiter de manière précise les contours de la tumeur à traiter.

Le traitement par radiothérapie est organisé sur une base de 5 jours par semaine durant 5 à 7 semaines, le fractionnement standard est de 2 Grays (Gy) par séance. A noter qu'une séance dure entre 10 et 15 minutes, séance durant laquelle le patient doit rester parfaitement immobile. Nous proposons ci-après, les différentes indications de la radiothérapie qui existent selon la prise en charge indiquée :

▲ **La radiothérapie exclusive.** Celle-ci est employée lorsque la chirurgie n'est pas nécessaire dans les cas de certaines tumeurs de stades I et II : T1-T2 N0-N1 au niveau de l'oropharynx, du larynx ou encore de l'hypopharynx. La dose délivrée doit être équivalente à 70 Gy, à raison de 2 Gy par séance.

▲ **La radio-chimiothérapie concomitante.** Cette option est choisie en cas de tumeurs localement avancées ou inaccessibles à la chirurgie. La dose délivrée doit être équivalente à 70 Gy, à raison de 2 Gy par séance. La chimio-sensibilisation peut faire appel à différentes molécules. Premièrement, au cisplatine à raison de 100 mg/m² délivrés à J1, J22 et J43. Une autre possibilité est d'utiliser le cisplatine mais à une concentration plus faible : de 40 mg/m² de manière hebdomadaire et concomitante à la durée de la radiothérapie.

Enfin, la dernière option consiste en l'administration d'une thérapie ciblée : le cétuximab en traitement hebdomadaire concomitant à la radiothérapie lorsque le cisplatine ne peut pas être utilisé chez le patient.

▲ **La radiothérapie post-opératoire.** Cette prise en charge est destinée à des indications bien précises, à savoir des lésions T2, T3 ou T4 avec invasion ganglionnaire. La radiothérapie est donc, dans ce cas, employée en complément à la chirurgie.

▲ **La radiothérapie de ré-irradiation en cas de récurrence ou de 2^{ème} localisation en zone irradiée.** Dans ce dernier cas, le traitement de première intention est la chirurgie. Si cette prise en charge n'est pas possible, dans ce cas, la radiothérapie est l'option choisie avec une dose délivrée comprise entre 60 et 66 Gy (Onco Occitanie Réseau Régional de Cancérologie, 2020).

▲ **Autres techniques de radiothérapie.** Premièrement, la curiethérapie consiste à placer des éléments radioactifs directement à l'intérieur du patient soit au contact de la tumeur, soit au sein de celle-ci. La source radioactive libère spontanément des rayons à raison de moins de 0,7 Gy par heure. Depuis 2014, la technique employée est la curiethérapie à débit pulsé qui consiste à placer, sous anesthésie générale, de petits tubes en plastique au niveau de la tumeur. Dans ce cas, le port d'une protection plombée de la mandibule est requis (Réseau régional de cancérologie Hauts-de-France and Agence régionale de santé (ARS) Hauts-de-France, 2019). Secondement, la protonthérapie qui est une technique utilisant des protons ce qui permet de réduire la dose délivrée dans les tissus et d'éviter l'irradiation des zones post-tumeurs. En effet, les protons ont la capacité de traverser la matière et de déposer leur énergie à une profondeur donnée selon l'énergie initiale puis s'arrêtent, ils ne se dispersent que peu le long de leur trajectoire. La protonthérapie est notamment utilisée pour la prise en charge des cancers de l'œil et de la base du crane. Néanmoins au-delà des caractéristiques physiques, il reste encore à mettre en évidence les avantages biologiques des protons *versus* les photons, certains d'entre eux commencent à être mis en lumière avec notamment les travaux de Lupu Plesu *et al.*, qui indiquent un bénéfice de la protonthérapie en termes de réduction de la prolifération cellulaire et de l'angiogénèse post-radiothérapie sur des cellules de cancers ORL (Lupu-Plesu et al., 2017).

La radiothérapie peut entraîner de nombreux effets indésirables tels qu'une perte, une diminution ou une modification du goût, une perturbation de la production de la salive, une mucite (inflammation des muqueuses), des douleurs lors de la déglutition, une épidermite, de la fatigue, un enrouement et des réactions inflammatoires au niveau des glandes salivaires. Ces effets indésirables sont moins importants en cas de curiethérapie ou de protonthérapie (Anticancer Fund and European Society for Medical Oncology, 2015) - (Réseau régional de cancérologie Hauts-de-France and Agence régionale de santé (ARS) Hauts-de-France, 2019) - (Onco Occitanie Réseau Régional de Cancérologie, 2020).

c- Chimiothérapie

Plusieurs chimiothérapies ont une indication d'utilisation dans les carcinomes des VADS, à savoir : les sels de platine comprenant le cisplatine et, en cas de contre-indication, le carboplatine, le docétaxel et le 5-fluorouracile. Le choix de l'option thérapeutique est déterminé au cours des réunions de concertation pluridisciplinaire.

Tout d'abord, nous proposons de présenter plus en détails les molécules précitées. En premier lieu, le **cisplatine** correspond à un agent cytotoxique dont le mécanisme d'action est similaire à celui des agents alkylants, il fait parti du sous-groupe des sels de platine.

Ainsi, l'interaction avec l'ADN se fait par point d'ancrage au niveau d'une ou de deux guanine(s), ce qui provoque la formation d'adduits mono- ou bi-fonctionnels, respectivement, qui peuvent être intra- ou inter-brin. Il en résulte un mauvais appariement de bases, des cassures de l'ADN, une formation de ponts intra- et inter-chaines ainsi que des lésions irréversibles de l'ADN aboutissant *in fine* à la mort des cellules. Cette molécule présente de nombreux effets indésirables, notamment des vomissements (molécule très émétisante), une néphrotoxicité et une ototoxicité. En cas de contre-indication à cette molécule, l'équipe médicale peut alors opter pour le **carboplatine** qui présente un mécanisme d'action similaire au cisplatine avec des effets indésirables plus limités, à noter tout de même une toxicité médullaire.

Ensuite, le **docétaxel**, il appartient à la famille des cytotoxiques et au groupe des agents tubulo-affines (poisons du fuseau), plus précisément au sous-groupe des taxanes. Il s'agit d'un dérivé du *Taxus brevifolia*, de son nom commun l'If du Pacifique. A l'inverse des deux molécules présentées ci-dessus, celle-ci agit sur la tubuline et non sur l'ADN en inhibant la dépolymérisation (diminution de la tubuline libre) et en stimulant la polymérisation des microtubules (tubuline s'assemble en microtubules stables). La perturbation de la polymérisation et de la dépolymérisation des microtubules entraîne des altérations du cycle cellulaire, en particulier les phases de la mitose et de l'interphase. A nouveau, ce médicament présente de nombreux effets indésirables, tels que la myélosuppression avec une neutropénie, une stomatite, des diarrhées, des nausées et des vomissements, une alopecie (perte de cheveux), une neuropathie sensitive périphérique et une asthénie (faiblesse générale).

Enfin le **5-fluorouracile** ou 5-FU est un cytotoxique du groupe des antimétabolites et du sous-groupe des analogues des pyrimidines. Le mécanisme d'action de cette molécule commence par une transformation du 5-FU en un métabolite : le 5-fluorodéoxyuridine 5'-monophosphate qui est alors capable de bloquer la méthylation de l'uracile en thymine par liaison à la thymidilate-synthétase. De plus, la molécule de 5-FU, après phosphorylation, prend la place de l'uracile dans les ARNs ce qui provoque des anomalies, qui lorsqu'elles s'accumulent empêchent la cellule de poursuivre son développement (*Figure 39*) (Ma et al., 2017).

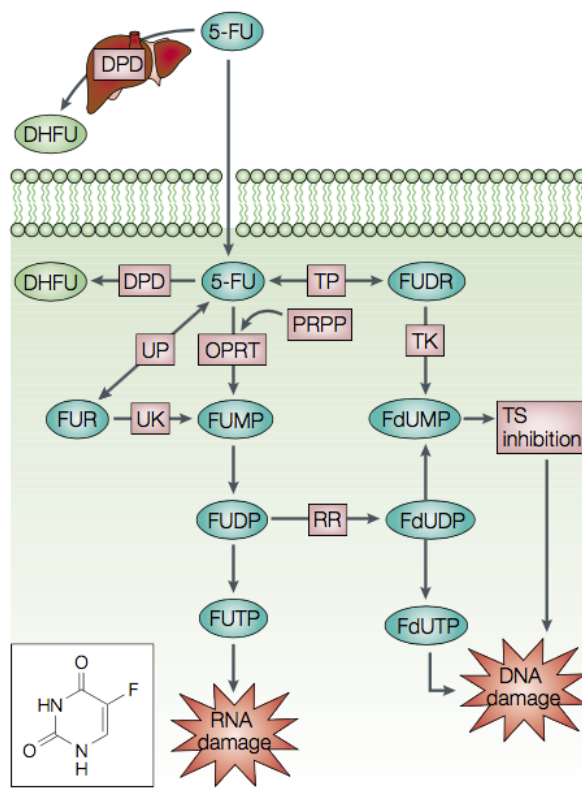


Figure 39 : Mécanisme d'action du 5-fluorouracile (Longley et al., 2003)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

Parmi les effets indésirables les plus fréquemment décrits, nous pouvons citer des toxicités digestives avec des stomatites, des diarrhées, des nausées et des vomissements. Mais également des toxicités hématologique et cutanée, pour ce dernier point la symptomatologie se regroupe sous la terminologie : syndrome main-pied ou érythrodysesthésie qui est particulièrement douloureux et invalidant pour le patient. Ce syndrome se caractérise par une rougeur au niveau des mains et des pieds, dont l'évolution se poursuit par une desquamation de la peau avec un épaissement de la couche cornée de la peau.

Une partie des effets indésirables graves peut résulter d'un déficit en une enzyme : la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) qui permet l'élimination de cette molécule. C'est pourquoi, avant l'introduction de cette chimiothérapie, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande de rechercher de manière systématique un déficit de l'enzyme DPD (Haute Autorité de Santé, 2019).

A présent, nous proposons de présenter les schémas de prise en charge incluant la chimiothérapie suivant le contexte :

▲ **Carcinome épidermoïde non résecable de stades III – IV.** Dans ce contexte, deux options sont possibles. En effet, l'équipe médicale peut opter pour une prise en charge par radiochimiothérapie dans le cas d'une forme de tumeur non résecable. Ainsi, la radiothérapie a lieu de manière concomitante avec soit du cisplatine à forte dose, soit du carboplatine associé à du 5-fluorouracile ou encore du cisplatine associé à du 5-fluorouracile. Dans le cas d'une tumeur très évolutive ou d'un patient particulièrement symptomatique, la prise en charge priorise l'utilisation d'une chimiothérapie d'induction basée sur la combinaison dite TPF composée du docétaxel, du cisplatine et du 5-fluorouracile. Cette chimiothérapie est ensuite suivie d'une radiothérapie ou d'une radio-chimiothérapie concomitante avec du cisplatine, du carboplatine ou du cétuximab.

▲ **Carcinome épidermoïde du larynx et de l'hypopharynx évolué, résecable.** Dans cette situation, il existe deux possibilités à considérer, soit une chimiothérapie d'induction associant du docétaxel, du cisplatine et du 5-fluorouracile soit une radio-chimiothérapie concomitante à base de cisplatine à « *haute dose* ». Afin d'évaluer le bénéfice de l'un par rapport à l'autre, un essai clinique est en cours (SALTOL promotion GORTEC NCT03340896) depuis 2015 avec des conclusions attendues pour 2028 (Machiels et al., 2020).

▲ **Post-opératoire : chimiothérapie et radiothérapie concomitante adjuvante.** Il s'agit d'une prise en charge en contexte de carcinome épidermoïde à haut risque en raison soit d'une exérèse tumorale incomplète soit d'un envahissement ganglionnaire avec rupture capsulaire. Dans ce cas, la prise en charge est basée sur du cisplatine à 100 mg/m² selon le schéma, semaine 1, 4 et 7 (Machiels et al., 2020).

▲ **Carcinome épidermoïde récidivant / métastatique – chimiothérapie palliative.**

Jusqu'à récemment, la prise en charge de première intention des patients en situation de récidives locorégionales et métastatiques consistait en un traitement systémique basé sur de la chimiothérapie et sur une thérapie ciblée par combinaison de trois molécules, à savoir des sels de platine, du 5-fluorouracile et le cétuximab.

L'intérêt de la combinaison de la chimiothérapie à une thérapie ciblée a été objectivé par l'étude PRINCEPS qui démontre une amélioration de la survie globale médiane à 10,1 mois lors de l'association de la chimiothérapie avec du cétuximab *versus* 7,4 mois sous chimiothérapie seule (HR 0,80 ; IC 95% 0,64 – 0,99, p = 0.04) (Vermorken et al., 2008). De plus, l'arsenal thérapeutique proposé jusque là a été enrichi par l'arrivée des inhibiteurs du *checkpoint* immunitaire PD-1 en 2^{ème} ligne avec le nivolumab. Grâce à cette nouvelle prise en charge, une amélioration de la survie globale médiane a été démontrée à hauteur de 7,5 contre 5,1 mois sous traitement par docétaxel, cétuximab ou méthotrexate (antagoniste de l'acide folique) (HR 0,70 ; IC 97,73% 0,51 – 0,96, p = 0,01), ces résultats sont issus de l'étude CHECKMATE 141 (Ferris et al., 2016).

Depuis l'avis de la commission de la transparence de la HAS du 3 juin 2020, le pembrolizumab seul ou en association avec un sel de platine et le 5-fluorouracile est validé en première ligne pour les patients exprimant le PD-L1 (CPS \geq 1) sur la base des résultats de l'étude KEYNOTE-048 (Burtness et al., 2019b). Son autorisation de mise sur le marché (AMM) a été délivrée en octobre 2019 par l'Agence européenne des médicaments (EMA ou *European Medicines Agency*) (Machiels et al., 2020). L'étude KEYNOTE-048 (dont l'un des critères d'inclusion est un score de proportion tumorale ou TPS¹⁸ pour *tumor proportion score* \geq 1%) visait à comparer le pembrolizumab en première ligne, seul ou en association à la chimiothérapie (cisplatine ou carboplatine / 5-fluorouracile), au protocole EXTREME. Elle a permis d'objectiver une amélioration de la survie globale avec le pembrolizumab en monothérapie chez des patients présentant un CPS \geq 1, avec une survie globale médiane de 12,3 *versus* 10,3 mois (HR 0,78 ; 95% CI 0,64 – 0,96, p = 0,0086). Pour les patients avec un CPS \geq 20, la survie globale médiane est davantage améliorée de 14,8 *versus* 10,7 mois (HR 0,61, 95% CI 0,45 – 0,83, p = 0.0007). Enfin, en cas d'association du pembrolizumab à la chimiothérapie pour des patients présentant un CPS \geq 1, la survie globale médiane est également augmentée : de 13,6 *versus* 10,4 mois. Néanmoins, lorsque le patient présente une tumeur n'exprimant pas le PD-L1, le schéma thérapeutique est basé sur le protocole TP-EXTREME associant le taxotère, le cisplatine et le cétuximab.

¹⁸ Score de proportion tumoral ou *tumor proportion score* (TPS) est déterminé selon le nombre de cellules tumorales PD-L1 positives divisé par le nombre total de cellules tumorales vivantes multiplié par 100 (de Ruiter et al., 2021).

Cette option thérapeutique est basée sur les résultats de l'étude GORTEC 2014-01 avec une comparaison de la prise en charge selon le protocole TP-EXTREME *versus* le protocole EXTREME avec certes des résultats en termes de survie globale équivalents mais avec un profil de toxicité plus favorable pour le protocole TP-EXTREME (Guigay et al., 2021).

d- Thérapie ciblée

A l'heure actuelle, la seule thérapie ciblée ayant une indication dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou correspond au cétuximab. En effet, son AMM couvre l'association avec la radiothérapie et si le patient est inéligible au cisplatine en cas de maladie localement avancée. Mais également, l'association avec la chimiothérapie notamment celle basée sur l'utilisation des sels de platine dans le contexte d'une maladie récidivante et/ou métastatique (résumé des caractéristiques du produit, ERBITUX®).

Prenons le temps de définir à quoi correspond une thérapie ciblée.

Une thérapie ciblée, en l'occurrence ici, ciblant les cellules cancéreuses, se concentre sur une ou des anomalies moléculaires ou génétiques conduisant à des phénotypes anormaux engageant les cellules vers un processus de cancérogénèse. Pour le cas du cétuximab, c'est l'EGFR qui est ciblé, car une proportion non négligeable (90%) des tumeurs de la tête et du cou le surexprime comme nous avons pu le voir dans la partie portant sur la cancérogénèse (Kalyankrishna and Grandis, 2006). Ainsi, le cétuximab correspond à un anticorps monoclonal (reconnaissant le même épitope d'un antigène) chimérique d'isotype IgG1 (parties variables murines) dirigé contre l'EGFR. Cette thérapie ciblée doit être administrée une fois par semaine, avec une première dose de 400 mg/m² de surface corporelle, puis les doses hebdomadaires sont de 400 mg/m² de surface corporelle avec une vitesse de perfusion ne dépassant pas 10 mg/minute (Machiels et al., 2020). D'un point de vue de la pharmacodynamie, le cétuximab présente une affinité 5 à 10 fois plus importante pour l'EGFR comparée à celle des ligands endogènes (TGF- α , AREG ou amphiréguline et EREG ou épiréguline) de ce récepteur.

L'anticorps se fixe sur la partie extracellulaire soluble de l'EGFR (le même site occupé par les ligands endogènes de l'EGFR) qui est alors en conformation auto-inhibée au niveau du domaine III. La liaison aboutit ainsi à un encombrement stérique du domaine empêchant le récepteur de passer à la conformation étendue pour permettre une dimérisation et son activation (*Figure 40*) (S. Li et al., 2005).

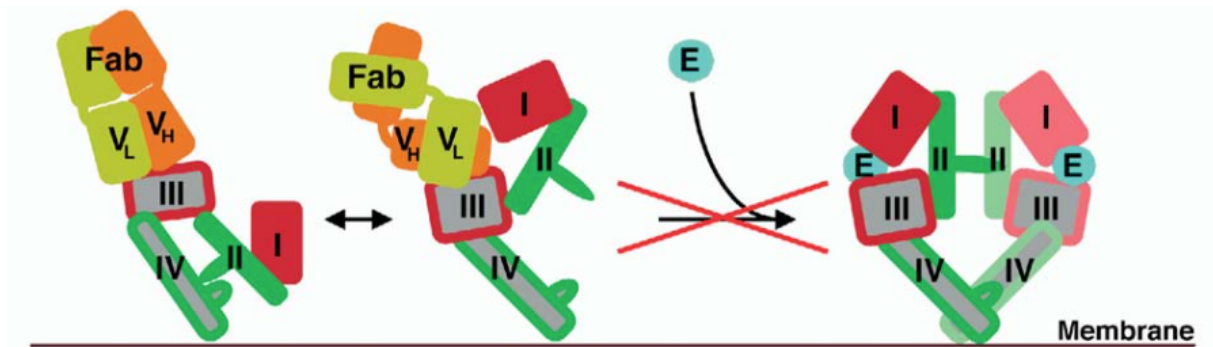


Figure 40 : Encombrement stérique du récepteur du facteur de croissance épidermique par le cétuximab proposé dans les travaux de (S. Li et al., 2005)

Fab : *antigen binding fragment from cetuximab* = fragment de liaison à l'antigène du cétuximab.

Par cette action d'anticorps antagoniste, le cétuximab bloque l'induction de certains signaux, à savoir les voies PI3K / AKT / mTOR et RAS / RAF / MEK / ERK, ou encore STAT et PTEN (*Figure 41*). Ces voies sont impliquées dans l'angiogénèse, la croissance, la migration, l'invasion ou encore la survie cellulaires, la néovascularisation tumorale, dans les processus métastastatiques et dans les mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, concernant les mécanismes de réparation, le cétuximab est utilisé à visée radiosensibilisatrice avant une prise en charge du patient par radiothérapie.

De plus, lors du blocage de l'EGFR il se produit une internalisation qui influence la progression du cycle cellulaire et peut conduire à une activité transcriptionnelle avec une régulation positive de l'expression de la cycline D1 et de Myc, tous deux impliqués dans les processus de prolifération et de survie cellulaires (*Figure 41*) (Bazzani et al., 2018). La description de ces voies sera présentée dans la suite de ce manuscrit.

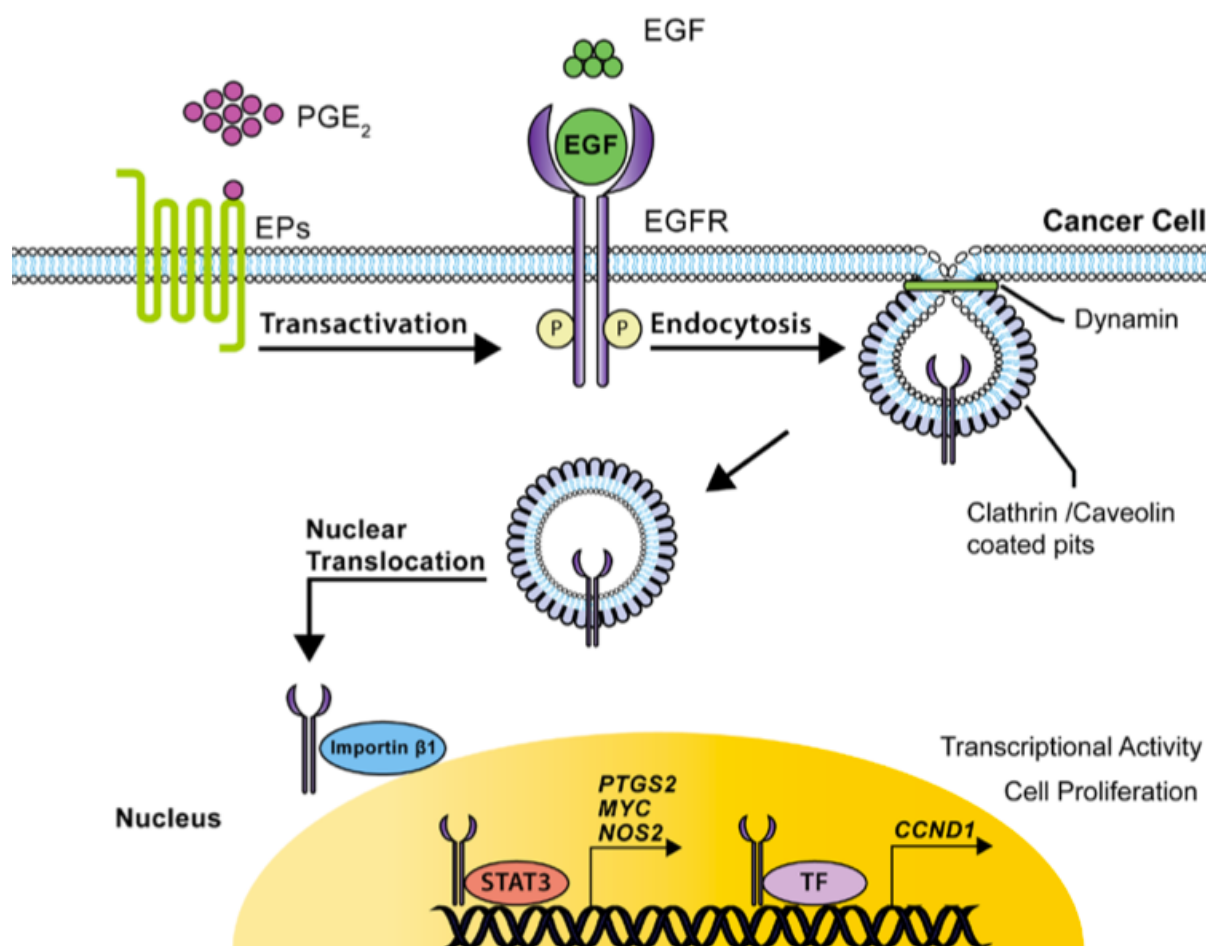


Figure 41 : Signalisation nucléaire du récepteur du facteur de croissance épidermique (Bazzani et al., 2018)

En complément de ces actions, il présente également des propriétés de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC : *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) qu'il exerce au sein de l'espace intratumoral. Cette propriété permet de stimuler les immunités cellulaires adaptative et innée par recrutement des cellules effectrices cytotoxiques de l'immunité dirigées contre les cellules tumorales exprimant l'EGFR. En effet, le Fc (région constante du cétuximab) se lie à un récepteur présent sur les cellules *natural killer* : le CD16 ce qui entraîne l'activation de ces cellules conduisant à la lyse tumorale. Cette lyse peut se poursuivre à la chaîne allant d'une cellule tumorale à une autre, il s'agit donc là du phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.

De plus, d'autres cellules immunitaires peuvent être activées par le même biais, notamment les cellules dendritiques. Une fois activées, ces dernières produisent et excrètent de l'IFN- γ et d'autres cytokines qui vont alors permettre une communication croisée avec les cellules *natural killer* pour accentuer encore la lyse tumorale.

Cette communication croisée permet également l'activation et le recrutement des macrophages vers l'espace intratumoral par le biais de la production de cytokines. La lyse des cellules entraîne une libération d'antigènes tumoraux qui sont ensuite présentés aux cellules T cytotoxiques par le biais des cellules présentatrices d'antigènes. Donc le cétuximab provoque la mort cellulaire immunogène des cellules tumorales via plusieurs types cellulaires immunitaires (*Figure 42*) (Ferris et al., 2018).

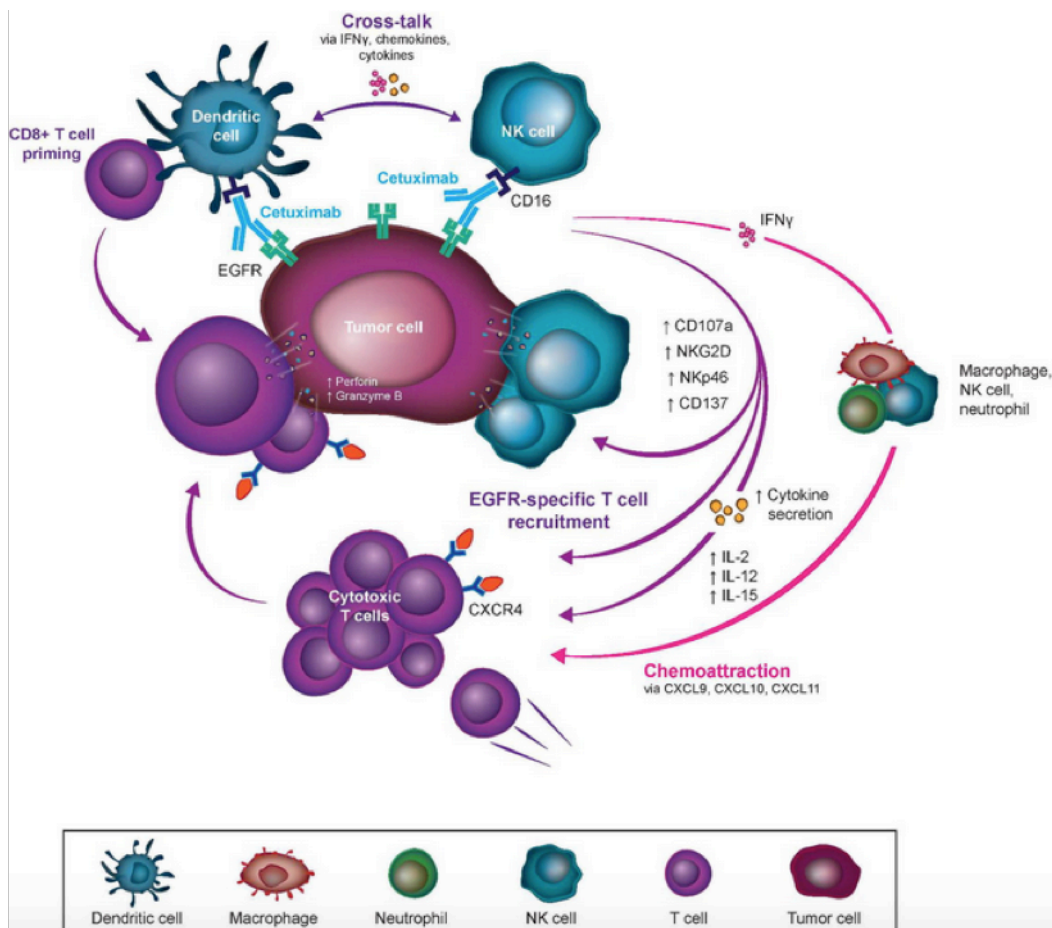


Figure 42 : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC médiée par le cétuximab (Ferris et al., 2018)

Le cétuximab, en raison notamment de son mécanisme de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, entraîne de nombreux effets indésirables, tels que des troubles du métabolisme et de la nutrition avec une hypomagnésémie, une déshydratation en raison d'une diarrhée ou d'une mucite, une hypocalcémie et une anorexie. De plus, il provoque des affections du système nerveux comme des maux de tête, mais également des affections oculaires telles que des conjonctivites.

Des affections gastro-intestinales sont rapportées avec des diarrhées, nausées, vomissements ainsi que des affections hépatobiliaires telles que l'élévation des enzymes hépatiques : l'aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT) et phosphatases alcalines (PAL). Des affections de la peau et du tissu sous-cutané sont également décrites avec des troubles généraux et des anomalies au site d'administration telles que des réactions légères ou modérées liées à la perfusion (VIDAL, 2020).

e- Immunothérapie

En cas de cancers des VADS, seuls deux anticorps ont une indication. Il s'agit d'une part du nivolumab (anticorps monoclonal humain), qui est indiqué en monothérapie en cas de rechute ou de métastases pendant ou après une chimiothérapie à base de sels de platine datant de moins de 6 mois (résumé des caractéristiques du produit, OPDIVO®). D'autre part, le pembrolizumab (anticorps monoclonal humanisé avec parties hypervariables murines) qui est indiqué en monothérapie ou en association à une chimiothérapie composée de sels de platine et de 5-fluorouracile en première ligne dans un contexte de cancer métastatique ou récidivant non résecable avec des tumeurs qui expriment PD-L1 (résumé des caractéristiques du produit, KEYTRUDA®).

Le principe de l'immunothérapie consiste à réactiver l'activité anti-tumorale. En effet, l'une des capacités des cellules tumorales est d'empêcher l'action inhibitrice des cellules de l'immunité et notamment celle des lymphocytes T cytotoxiques. Ainsi, les cellules tumorales surexpriment le ligand PD-L1 afin d'augmenter la probabilité de rencontre avec le récepteur PD-1 qui se situe au niveau des cellules immunitaires et particulièrement au niveau des lymphocytes T cytotoxiques. Au moment de l'interaction, cela entraîne une diminution de la survie des lymphocytes T cytotoxiques et favorise la production de l'IL-10 décrite comme étant majeure dans l'immunosuppression tumorale. L'activité antitumorale des lymphocytes T est donc contrecarrée par la cellule tumorale qui peut continuer sa croissance. L'intérêt de l'immunothérapie est donc de perturber l'interaction entre PD-1 et PD-L1. Pour ce faire, l'anticorps administré se lie au récepteur PD-1 qui se situe sur les cellules T, sur les cellules B ou encore sur les cellules myéloïdes activées et bloque l'interaction du récepteur à ses ligands : PD-L1 et PD-L2.

Ces ligands sont localisés sur les cellules tumorales et sur les cellules dendritiques et sont particulièrement activés par des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ . Le signal d'immunosuppression véhiculé par la cellule tumorale sur les cellules de l'immunité est donc levé et la cellule T cytotoxique peut reprendre son activité anti-tumorale.

(Figure 43).

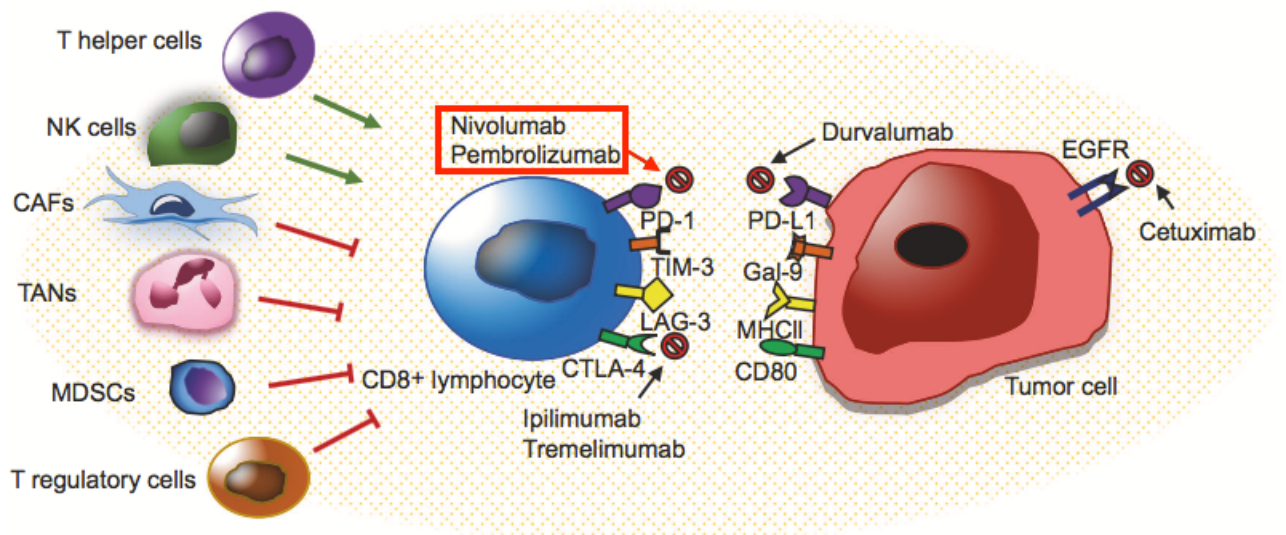


Figure 43 : Mécanismes d'action du pembrolizumab et du nivolumab (Elmusrati et al., 2021)

Malgré le schéma diagnostique et l'ensemble des stratégies thérapeutiques présentés ci-dessus, le taux de survie des patients atteints d'un cancer des VADS reste faible ce qui témoigne de l'intérêt de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques ou d'affiner l'utilisation des thérapies déjà existantes grâce à des biomarqueurs pronostiques et prédictifs. Il est donc évident que les recherches doivent se poursuivre notamment au moyen d'essais cliniques présentés dans la partie qui suit.

4) Essais cliniques sur les cancers des voies aérodigestives supérieures

Les essais cliniques dans cette partie sont présentés selon la classe thérapeutique du traitement étudié. Pour rédiger ce chapitre, nous nous sommes basés sur la revue de Goel *et al.* publiée en avril 2022 qui réalise un bilan des essais cliniques sur les cancers des VADS (Goel et al., 2022).

a- Chimiothérapies

Parmi les résultats des essais cliniques obtenus pour les chimiothérapies, nous pouvons tout d'abord évoquer l'association du docétaxel, du cisplatine ou du 5-fluorouracile avec une radiothérapie. Par cette prise en charge, les résultats cliniques sont améliorés dans les situations postopératoires ou inopérables. Un autre essai a permis de conclure au bénéfice d'un traitement à base de cisplatine chez les patients à haut risque en postopératoire. Ainsi, un essai en phase III sur 334 patients a permis de mettre en évidence une survie sans progression à 5 ans passant de 36 à 47% avec une survie globale s'améliorant de 40 à 53%. Néanmoins, les patients pris en charge par du cisplatine présentent plus d'effets indésirables tels que des toxicités hématologiques, une mucite, des nausées et des vomissements comparés aux patients traités uniquement par de la radiothérapie (Bernier et al., 2004) - (Goel et al., 2022).

Afin de contrecarrer les effets toxiques du cisplatine, un traitement basé sur trois cycles de carboplatine a été développé selon le schéma : 70 mg/m²/jour sur 4 jours associés à du 5-fluorouracile à hauteur de 600 mg/m²/jour également sur 4 jours dans un contexte de stades tumoraux III/IV. Les résultats obtenus démontrent une meilleure survie sans progression et une survie globale améliorée à 3 ans. Néanmoins la mucosité est à nouveau présente et classée comme événement indésirable grave¹⁹ (Calais et al., 1999) - (Goel et al., 2022).

¹⁹ D'après l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) : « un événement indésirable grave (EIG) est un effet indésirable létal, ou susceptible de mettre la vie en danger, ou entraînant une invalidité ou une incapacité importante ou durable, ou provoquant ou prolongeant une hospitalisation, ou se manifestant par une anomalie ou une malformation congénitale. Peut également être considéré comme grave tout effet indésirable jugé comme tel par un professionnel de santé » (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, 2020).

Un autre schéma a été proposé lors d'un essai de phase III sur 237 patients inopérables de stades III/IV. Ce schéma consiste en l'administration de 4 séries de cisplatine à hauteur de 100 mg/m² toutes les 3 heures associées à du 5-fluorouracile à raison de 1 000 mg/m²/jours sur 5 jours et toutes les 3 heures. Ce protocole est ensuite suivi d'une radiothérapie. L'essai a pu conclure à une augmentation de la survie globale à 5 ans de 13 % par rapport à la radiothérapie seule (Zorat et al., 2004) - (Goel et al., 2022).

Plusieurs essais cliniques se sont intéressés aux thérapies en association. Tout d'abord, l'association du docétaxel avec du cisplatine et du 5-fluorouracile suivie d'une chimio-radiothérapie et de l'administration de carboplatine hebdomadaire a permis d'augmenter la survie globale des patients à 3 ans. Néanmoins, plusieurs effets indésirables ont été rapportés et notamment une neutropénie sévère (Posner et al., 2007) - (Goel et al., 2022).

Un autre essai clinique a proposé aux patients une prise en charge associant du docétaxel, du cisplatine et du 5-fluorouracile (protocole DCF) suivie d'une chimio-radiothérapie ou d'un pré-traitement par du cétuximab puis une radiothérapie. Les survies sans progression et globale ont été améliorées en comparaison aux essais précédents néanmoins la toxicité du protocole DCF est importante avec 25,8 % de neutropénies sévères et 7 % de décès liés au traitement (Geoffrois et al., 2016) - (Goel et al., 2022). La réponse et la tolérance à l'association de traitements dite DCF ont été améliorées lors d'un essai proposant un traitement adjuvant à base de leucovorine (acide folinique : métabolite actif de l'acide folique pour la chimioprotection des cellules saines) (Fayette et al., 2016).

Grâce à cette première partie, il est possible d'apprécier que la toxicité médiée par les chimiothérapies constitue le principal frein dans la proposition d'un nouveau schéma de prise en charge thérapeutique. A l'heure actuelle, il n'existe pas de schéma d'irradiation standard pour une chimiothérapie post-induction (Goel et al., 2022).

b- Thérapies ciblées

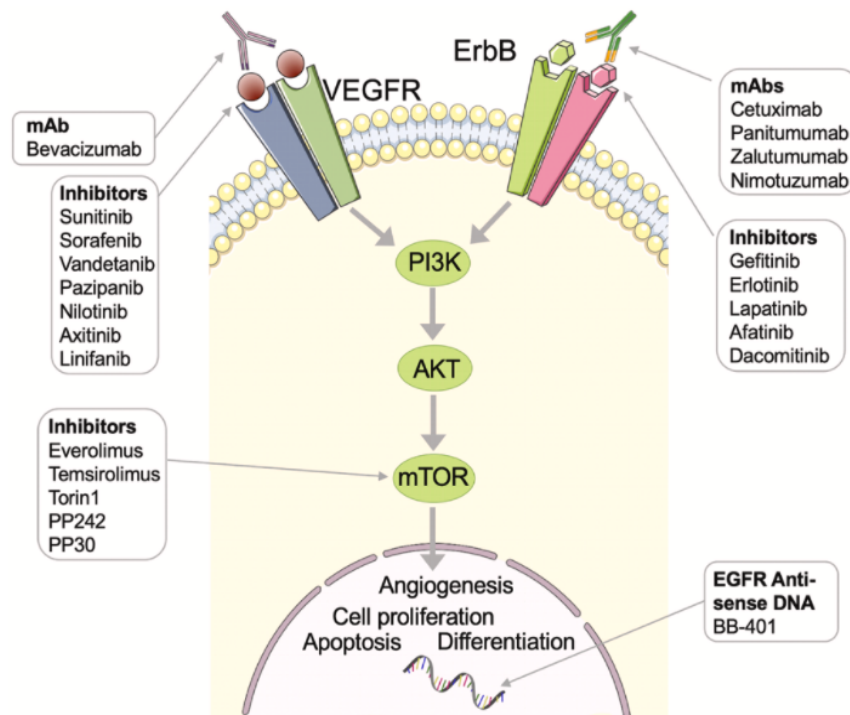


Figure 44 : Inhibiteurs et anticorps monoclonaux ciblant les voies des ErbB et du VEGFR présentés dans les travaux de (Goel et al., 2022)

▲ Anticorps monoclonaux (Figure 44)

Plusieurs anticorps monoclonaux ont été étudiés dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, notamment quatre anticorps monoclonaux humains anti-EGFR. Trois d'entre eux, le panitumumab (VECTIBIX[®], anticorps monoclonal IgG2 entièrement humain, essai clinique de phase III SPECTRUM, NCT00460265) (Vermorken et al., 2013), le zalutumumab (anticorps monoclonal IgG1 entièrement humain, essai clinique de phase III DAHANCA, NCT00496652) (Eriksen et al., 2014) et le nimotuzumab (anticorps monoclonal humanisé IgG1) (Subramaniam et al., 2015) présentent des résultats encourageants en démontrant une bonne tolérance sans pour autant apporter un bénéfice en termes de survie dans la prise en charge des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Goel et al., 2022).

Ainsi, à l'heure actuelle, seul un anticorps monoclonal : le cétuximab, a obtenu une autorisation d'utilisation par la FDA (*Food and Drug Administration* = Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments) et l'EMA pour la prise en charge des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou en association avec la radiothérapie.

De plus, un essai clinique a évalué la dose recommandée pour l'association du ficlatuzumab (AV-299, anticorps monoclonal humanisé IgG1 du facteur de croissance des hépatocytes HGF) avec du cétuximab chez des patients atteints d'un cancer ORL récurrent/métastatique (NCT02277197). Les premiers résultats de cette association sont prometteurs en termes de survie (Bauman et al., 2020).

Enfin, une étude de phase II a évalué l'efficacité et l'innocuité de l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-EGFR recombinant, le SCT200 en association avec la chimiothérapie standard (NCT03491709) sans permettre d'aboutir à des conclusions (Goel et al., 2022).

▲ Inhibiteurs de la tyrosine kinase (*Figure 44*)

Les inhibiteurs de la tyrosine kinase ciblant l'EGFR ont fait l'objet de nombreuses études au sein de plusieurs essais cliniques. Premièrement, l'erlotinib associé ou non au cisplatine et à la radiothérapie en étude de phase II (NCT00410826) a démontré une amélioration du taux de réponse complète par rapport au groupe témoin (cisplatine et radiothérapie uniquement), sans pour autant mettre en exergue une significativité de cette réponse (Martins et al., 2013).

Ensuite, le lapatinib inhibe à la fois les récepteurs EGFR (ErbB1) et HER2 (ErbB2). Lorsque cette thérapie est associée à de la capécitabine (famille des fluoropyrimidines) une efficacité supérieure a été démontrée ainsi qu'une bonne tolérance de l'association (Fumagalli et al., 2015) - (Goel et al., 2022).

D'autre part, au cours d'une étude de phase II, l'efficacité de l'afatinib a été comparée au cétuximab dans la prise en charge d'un cancer ORL récurrent déjà traité par une chimiothérapie avec des sels de platine. Cette étude n'a pas permis de démontrer une efficacité supérieure de l'afatinib comparée au cétuximab (Seiwert et al., 2014). Ensuite, au cours d'une étude de phase III (LUX-Head & Neck 2, NCT01345669), les résultats ont permis de conclure sur l'inefficacité de l'afatinib comme traitement à la suite d'une radiochimiothérapie et sur l'augmentation des effets indésirables. Ainsi, l'afatinib comme traitement adjuvant après une chimiothérapie n'est pas recommandé (Burtneess et al., 2019a).

Enfin, le dacomitinib a d'ores et déjà démontré un intérêt en termes de survie et de tolérance dans la prise en charge en première ligne des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou récurrents/métastatiques (Abdul Razak et al., 2013) - (Goel et al., 2022).

▲ ADN antisens de l'EGFR (*Figure 44*)

Deux études cliniques (NCT00903461 – phase I et NCT01592721 – phase I/II) ont permis de démontrer une bonne tolérance de l'utilisation de l'ADN antisens²⁰ de l'EGFR en association avec du cétuximab combiné à une radiothérapie chez des patients atteints d'un cancer des VADS à un stade avancé (Bauman et al., 2018).

Un autre essai clinique, de phase II (NCT03433027) visait à évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité de l'ADN antisens intratumoral de l'EGFR : BB-401 chez des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou récurrent/métastatique non répondeur aux autres thérapies standards, les résultats ne sont pas encore publiés (Goel et al., 2022).

▲ Facteur de croissance endothélial vasculaire (*Figure 44*)

Parmi les anticorps monoclonaux ciblant le VEGF, le bevacizumab (AVASTIN[®]) a été étudié dans plusieurs essais cliniques. Premièrement, un essai de phase I/II où le bevacizumab a été administré en association avec l'erlotinib (NCT00055913) chez des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou récurrent/métastatique a permis de mettre en évidence une bonne tolérance ainsi qu'une survie globale de 7,1 mois (Cohen et al., 2009).

D'autre part, un essai clinique de phase II (NCT00222729) a montré des résultats positifs en termes d'efficacité pour l'utilisation combinée du bevacizumab et du pemetrexed (ALIMTA[®], agent antinéoplasique antifolate multicible qui agit en interrompant des processus métaboliques folate-dépendants) chez des patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou récurrent/métastatique. Néanmoins certains patients ont présenté des complications hémorragiques qui nécessitent donc une étude plus approfondie de cette combinaison de traitements (Feinstein et al., 2008).

²⁰ L'ADN antisens de l'EGFR correspond à une séquence d'ADN synthétique conçue de manière antisens de la séquence d'ADN du gène de l'EGFR.

De plus, le bevacizumab a également été étudié, au cours d'un essai clinique de phase II, en association avec du cétuximab. Cette étude a permis de mettre en évidence un taux de réponse de 16% et un taux de contrôle de la maladie de 73% avec une survie globale de 7,5 mois. Les patients ayant été traités par cette bithérapie présentent une bonne tolérance avec moins de 10% des patients présentant des effets indésirables graves (Argiris et al., 2013).

Enfin, au cours d'un essai de phase II, le bevacizumab en association avec de fortes doses de cisplatine et d'une radiothérapie à modulation d'intensité (pour focaliser les radiations sur la zone par la tumeur) a démontré des résultats cliniques favorables dans les cas de cancers de la tête et du cou à un stade avancé avec une survie globale à 2 ans de 88% et une tolérance satisfaisante (Fury et al., 2012) - (Goel et al., 2022).

▲ Inhibition des récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Figure 44*)

Tout d'abord, le sorafenib (inhibiteur du VEGFR) permet de sensibiliser les tumeurs ORL à la radiothérapie par inhibition de la réparation des cassures de l'ADN double brin (Laban et al., 2013). Le sorafenib a fait l'objet d'une étude clinique de phase II afin d'évaluer l'intérêt d'une bithérapie associant le cétuximab au sorafenib *versus* le cétuximab en monothérapie, cette association ne présente néanmoins aucun bénéfice en comparaison avec une prise en charge par le cétuximab seul (Gilbert et al., 2015). De même, le sunitinib (cible le VEGFR et le facteur de croissance dérivé des plaquettes : PDGFR) a été étudié en monothérapie où il n'a pas permis de démontrer une efficacité dans les cancers de la tête et du cou (Choong et al., 2010) - (Goel et al., 2022).

▲ Voie PI3K / AKT / mTOR (*Figure 44*)

Au sein d'une première étude de phase II (TEMHEAD, NCT01172769), le temsirolimus (inhibiteur de la protéine mTOR) a été évalué chez des patients atteints de cancers ORL récurrents/métastatiques réfractaires aux sels de platine ainsi qu'au cétuximab. L'utilisation du temsirolimus a ainsi permis de démontrer des propriétés de réduction tumorale mais l'étude indique un déficit en paramètres prédictifs de l'efficacité du traitement nécessitant donc davantage d'analyses (Grünwald et al., 2015).

Ensuite, au sein d'un autre essai clinique de phase II (NCT01016769), le temsirolimus a été administré en association avec du carboplatine et du paclitaxel, le tout à des doses hebdomadaires faibles. Cette étude permet de mettre en avant une efficacité significative de cette association néanmoins il est nécessaire d'étudier plus en détails les altérations génétiques de la voie PI3K / mTOR dans de prochaines études (Dunn et al., 2017).

L'évérolimus (inhibiteur de la protéine mTOR) a été étudié au sein d'un essai clinique de phase II (NCT01051791) qui n'a pas révélé d'efficacité en monothérapie de cette molécule pour des patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou récurrents/métastatiques (Geiger et al., 2016).

Enfin, la metformine (inhibiteur de l'activité de mTORC1) a été étudiée durant un essai clinique de phase I (NCT02325401) en association avec un traitement par radiochimiothérapie (cisplatine) chez des patients non diabétiques atteints d'un cancer de la tête et du cou localement avancé. Les résultats de cette étude mettent en avant une survie globale favorable et encourageante à 2 ans de 90% sans hypoglycémies ou acidoses lactiques détectées (Gulati et al., 2020) - (Goel et al., 2022).

▲ Kinases dépendantes de la cycline (*Figure 44*)

Tout d'abord, une étude de phase II (NCT02101034) visait à évaluer l'association du palbociclib (IBRANCE, inhibiteur des CDK 4 et 6), et du cétuximab chez des patients atteints d'un cancer ORL non HPV-induit et résistant aux sels de platine ou au cétuximab. Le taux de réponse obtenu est encourageant avec, pour les patients résistants aux sels de platine, une réponse à hauteur de 39% et pour les patients résistants au cétuximab, de 19% (Adkins et al., 2019).

En raison de ces résultats encourageants, une étude de phase II est venue complétée la première : PALATINUS, NCT02499120. Cette étude visait à évaluer la même association de traitements mais pour des patients résistants aux sels de platine, n'ayant jamais reçus de cétuximab. La survie dans le groupe traité par l'association de traitements était de 9,7 mois contre 7,8 mois pour les patients du groupe contrôle. Cette différence n'est néanmoins pas significative (Adkins et al., 2021) - (Goel et al., 2022).

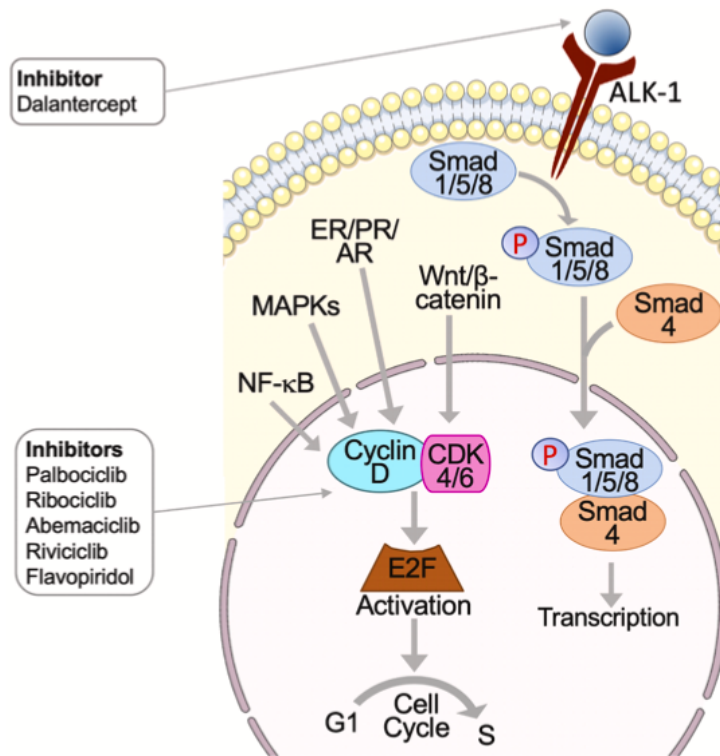


Figure 45 : Inhibiteurs et anticorps monoclonaux ciblant les voies ALK1 et Cycline D utilisés dans les essais cliniques sur les cancers des voies aérodigestives supérieures présentés au sein de la revue de (Goel et al., 2022)

▲ Activin receptor-like kinase-1 (Figure 45)

Le dalantercept (inhibiteur d'ALK1, classe des TGF-β, module l'angiogenèse et la néovascularisation) a fait l'objet d'un essai clinique de phase II (NCT01458392) chez des patients atteints d'un cancer des VADS récurrent/métastatique. Ainsi, les résultats de cette étude témoignent d'une bonne tolérance de cette molécule en monothérapie mais ne permettent pas de conclure à une efficacité de celle-ci (Jimeno et al., 2016)- (Goel et al., 2022).

▲ Transducteur de signal et activateur de transcription 3

Une étude clinique de phase I/II (SCORES, NCT02499328) a évalué l'efficacité d'un traitement associant le durvalumab (MEDI4736, inhibiteur de PD-L1) à du danvatirsen (AZD9150, inhibiteur de STAT3) et à du AZD5069 (inhibiteur de CXCR2). Elle a permis de démontrer une meilleure efficacité du traitement combiné par rapport à l'administration de la seule thérapie anti-PD-L1. De plus, les sponsors de l'étude notent une meilleure efficacité de l'association d'un inhibiteur de PD-L1 et d'un inhibiteur de STAT3 en comparaison à l'association d'un inhibiteur de CXCR2 et d'un inhibiteur de PD-L1 ou à une monothérapie anti-PD-L1 (Cohen et al., 2017) - (Goel et al., 2022).

▲ Indoleamine 2, 3-dioxygénase 1

L'administration combinée de l'épacadostat (inhibiteur d'IDO-1) et du pembrolizumab a été étudiée au sein d'une étude de phase I/II (ECHO-202/KEYNOTE-037, NCT02178722). Cette étude a permis de mettre en avant un profil de sécurité tolérable et une efficacité encourageante de cette combinaison thérapeutique (Mitchell et al., 2018). De plus, l'association du navoximod (GDC-0919) avec de l'atezolizumab (inhibiteur de PD-L1) a été évaluée par un essai de phase I (NCT02471846) chez des patients atteints de tumeurs solides avancées, dont des cancers de la tête et du cou mais n'a pas permis de démontrer le moindre bénéfice (Jung et al., 2019) - (Goel et al., 2022).

c- Immunothérapie

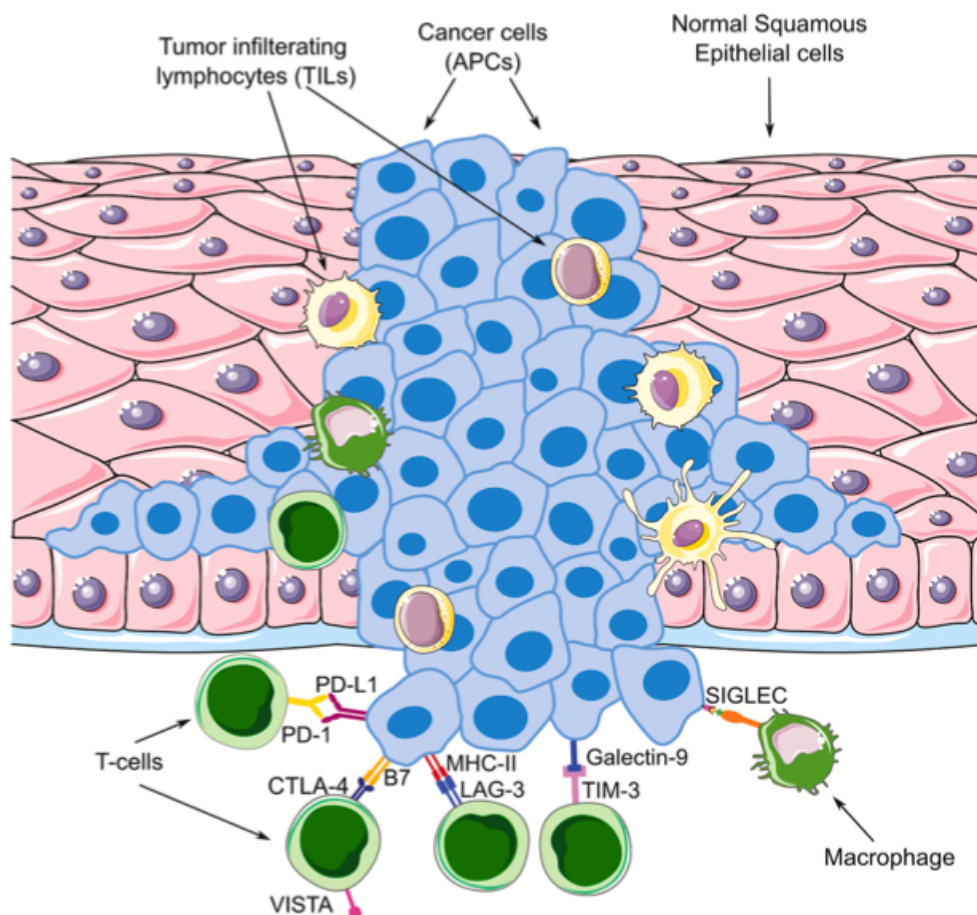


Figure 46 : Molécules inhibitrices exprimées sur les cellules cancéreuses et immunitaires infiltrées dans le microenvironnement de la tumeur (Goel et al., 2022)

« APC : antigen-presenting cells, CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen 4, LAG-3 : lymphocyte activation gene 3, MHC : major histocompatibility complex, PD-1 : Programmed death 1, PD-L1 : Programmed death-ligand 1; TIM-3, T-cell immunoglobulin mucin protein 3; VISTA, V-domain Ig suppressor of T cell activation», d'après la légende de la figure issue de la revue de (Goel et al., 2022).

▲ Protéine de mort cellulaire programmée 1 et ligand de mort programmée 1 (Figure 46)

Premièrement, un essai clinique de phase III (CheckMate 141, NCT02105636) a comparé un groupe de patients recevant du nivolumab (anticorps anti-PD-1) *versus* un groupe de patients traité en monothérapie soit par du méthotrexate, soit par du docétaxel ou du cétuximab. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence que les patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou récurrent/métastatique traités par du nivolumab présentent moins d'effets indésirables et ont une meilleure survie que ceux des autres groupes cités (Ferris et al., 2016).

De plus, une autre étude (KEYNOTE-012, NCT01848834) a évalué l'intérêt du pembrolizumab. Cette étude a permis de conclure sur une toxicité et une efficacité similaire à celles du nivolumab (Seiwert et al., 2016) - (Goel et al., 2022).

▲ Antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (Figure 46)

D'une part, l'évaluation de la combinaison de l'ipilimumab (anticorps inhibiteur du point de contrôle CTLA-4 des lymphocytes T) et du nivolumab (anticorps inhibiteur de PD-1) est comparée à la prise en charge par le protocole EXTREME au sein d'une étude de phase III (CHECKMATE 651, NCT02741570) pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou récurrents/métastatiques. Cette étude a permis de mettre en exergue une durée de réponse importante du nivolumab et de l'ipilimumab sans amélioration de la survie en comparaison au protocole EXTREME (Theodoraki et al., 2022).

D'autre part, une autre étude de phase III (IMSTAR-HN, NCT03700905) évalue cette fois l'intérêt du nivolumab, en monothérapie ou en association avec l'ipilimumab *versus* le traitement standard dans les cancers ORL résécables chirurgicalement après une radiochimiothérapie adjuvante. L'étude est en cours et les résultats ne sont pas encore publiés (Zech et al., 2020) - (Goel et al., 2022).

▲ Gène 3 activé par les lymphocytes (Figure 46)

Premièrement, le relatlimab (BMS-986016, anticorps anti-LAG-3 ou gène 3 activé par les lymphocytes) fait l'objet d'une évaluation de la sécurité et de l'efficacité de son utilisation en mono- ou en bithérapie avec le nivolumab pour le traitement des tumeurs solides, dont les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou au sein d'un essai clinique de phase I/II (NCT01968109). Néanmoins, les résultats ne sont pas encore publiés.

De plus, une étude de phase I (NCT03538028) porte sur l'INCAGN02385 (anticorps IgG1- κ modifié par Fc ayant une forte affinité avec LAG-3) pour la prise en charge de cancers avancés, dont les cancers ORL. Les résultats ne sont pas encore publiés.

Enfin, l'administration de l'XmAb®22841 (anticorps ciblant CTLA-4 et LAG-3) est évaluée en monothérapie et en association avec du pembrolizumab pour des patients atteints de tumeurs solides avancées, dont les cancers de la tête et du cou au sein de l'étude DUET-4, NCT03849469 (Goel et al., 2022). Les résultats ne sont pas encore publiés.

▲ **Immunoglobuline mucine-3 des cellules T** (*Figure 46*)

Dans une étude de phase I (AMBER, NCT02817633), le TSR-022 (anticorps anti-Immunoglobuline mucine-3 des cellules T ou anti-TIM-3) est en cours d'évaluation chez des patients atteints de tumeurs solides avancées, dont les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. De plus, un autre essai clinique de phase I est en cours : NCT03652077 qui vise à évaluer la sécurité, la tolérabilité et l'efficacité de l'INCAGN02390 (Anticorps IgG1 κ humain anti-TIM-3) chez des patients atteints de cancers ORL avancés (Goel et al., 2022).

▲ **Siglec-15** (*Figure 46*)

A l'heure actuelle, seul le NC318 ciblant le siglec-15 (anticorps monoclonal anti-siglec-15) est étudié au sein d'une étude clinique de phase I/II (NCT03665285) chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou avancés (Goel et al., 2022).

▲ **Immunoglobuline à domaine V suppresseur de l'activation des cellules T** (*Figure 46*)

Seuls deux essais cliniques traitent des anticorps anti-immunoglobuline à domaine V suppresseur de l'activation des cellules T ou anti-VISTA pour des cancers ORL avancés. A savoir, d'une part l'étude de phase I sur le JNJ-61610588 (NCT02671955) qui a été interrompue. Et d'autre part, l'étude de phase I (NCT04475523) du CI-8993 qui est actuellement en cours de recrutement (Goel et al., 2022).

▲ **Protéine de fusion ciblant TGF / PD-L1**

Le bintrafusp alfa (M7824) correspond à une protéine de fusion composée du domaine extracellulaire du TGF- β lié à un anticorps monoclonal qui cible PD-L1.

Un essai de phase II (NCT04428047) était jusque là en cours afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de ce traitement dans un contexte de cancers ORL. Néanmoins, l'étude s'est arrêtée en avril 2022 en raison de résultats défavorables et de toxicités révélées par le biais d'autres essais dans d'autres types de cancers (UNICANCER, 2022).

A la lumière des informations présentées au sein de cette troisième partie du manuscrit, vous avez pu apprécier le diagnostic et la prise en charge thérapeutique actuels des patients atteints de cancers de la tête et du cou ainsi qu'une revue des essais cliniques portant sur ces cancers. Malgré tout, ni le diagnostic, ni la prise en charge thérapeutique proposés aujourd'hui ne permettent d'obtenir des résultats efficaces et satisfaisants notamment en termes de survie mais également de rechutes avec un taux encore trop important autant d'un point de vue des rechutes locales que des rechutes métastatiques.

De plus, les essais cliniques menés ou en cours se confrontent pour beaucoup soit à des effets indésirables trop importants soit à un manque d'efficacité en comparaison avec les traitements déjà employés. L'un des freins, plusieurs fois relevé par les sponsors, concerne le manque de marqueurs qui permettraient une meilleure prédiction des traitements et une limitation des effets indésirables observés.

Ainsi, l'identification d'un ou de plusieurs biomarqueurs pronostiques et prédictifs pouvant s'intégrer à la pratique clinique dans l'établissement du profil de la tumeur d'une part, mais également dans l'arbre décisionnel de prise en charge thérapeutique d'autre part, constituerait un atout majeur pour un suivi et une prise en charge adéquate et au plus près de la réponse des tumeurs des patients. *In fine*, les objectifs seraient d'augmenter les taux de survie et d'optimiser les traitements pour limiter les effets indésirables et favoriser la compliance des patients ainsi que d'améliorer leur qualité de vie.

IV) La cavéoline-1 dans les cancers des voies aérodigestives supérieures

1) Les cavéoles et la cavéoline-1

Ce n'est pas la Cav1 qui a été mise en évidence en premier lieu mais la structure dont elle permet la formation nommée cavéole ou *caveolae* (Figure 47). Cette découverte est le fruit de travaux de deux chercheurs au milieu du XX^{ème} siècle, Palade en 1953 et Yamada en 1955. Ils décrivent alors les *caveolae* comme de petites poches ou vésicules qui communiquent avec l'extérieur de la cellule. Tout d'abord, Palade dans les cellules endothéliales et les muscles lisses, puis Yamada dans les cellules épithéliales et la vésicule biliaire. La découverte de ces deux chercheurs a été confirmée par de nombreuses études qui ont suivi et qui ont attesté que ces structures étaient capables de réaliser de l'endocytose afin de favoriser le trafic transcellulaire (Anderson, 1998).

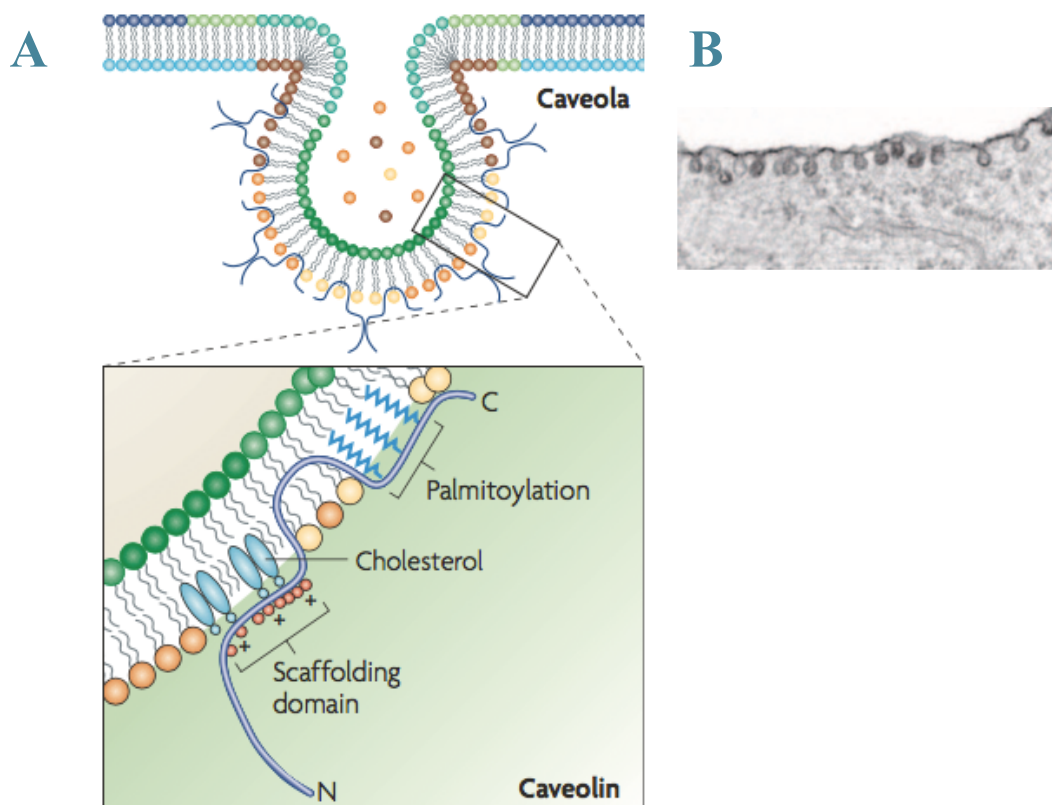


Figure 47 : Représentation schématique d'une caveolae et imagerie par microscopie électronique issues des travaux de (Parton and Simons, 2007)

- (A) Schéma d'une structure de *caveolae* et zoom sur l'intrication de la cavéoline avec les composants lipidiques. (B) Imagerie par microscopie électronique de cavéoles au niveau de la membrane plasmique. Article accessible *via* l'Université de Strasbourg.

Concernant plus en détails les caractéristiques des cavéoles, elles sont considérées comme des sous-ensembles spécialisés de microdomaines nommés radeaux lipidiques qui se trouvent au niveau de la membrane plasmique. Ces radeaux sont insolubles lors de l'exposition à des détergents, ce qui s'explique par la présence de concentrations importantes de cholestérol, de sphingolipides ainsi que de sphingomyéline (Anderson and Jacobson, 2002) - (Parton and Simons, 2007). Les cavéoles sont décrites comme des invaginations de la membrane plasmique constituées par des cavéolines et des composants lipidiques précités. L'ensemble de la formation présente un diamètre compris entre 60 et 80 nm (*Figure 47*). Les cavéolines sont essentielles à la biogenèse des cavéoles mais néanmoins aidées par d'autres protéines, à savoir les cavines (Parton and Simons, 2007) - (Parton and del Pozo, 2013).

Depuis la découverte des invaginations nommées *caveolae*, les études ont pu mettre en évidence l'existence de trois protéines cavéolines mammaliennes : la Cav1, la cavéoline-2 (Cav2) et la cavéoline-3 (Cav3). Concernant leur répartition d'expression, seule la Cav3 présente un tropisme unique pour les cellules musculaires squelettiques. La Cav1 et la Cav2 sont quant à elles exprimées de manière ubiquitaire. En collaboration de ces cavéolines, nous avons donc les cavines (citées ci-dessus) qui correspondent à une autre famille de protéines impliquée comme régulateur de la formation des cavéoles. Il s'agit de protéines cytoplasmiques avec des domaines à enroulement amino-terminal formant de grands complexes recrutés par les cavéoles (Parton and Simons, 2007) - (Parton and del Pozo, 2013).

Portons désormais notre attention plus spécifiquement sur la Cav1.

Il s'agit d'une protéine membranaire exprimée de manière ubiquitaire de 22 à 24 kDa (kilodaltons) et composée de 178 résidus d'acides aminés. Son gène est localisé sur le locus D7D522 du chromosome 7q31.1, une zone fragile, souvent délétée dans les cancers (Engelman et al., 1998). Sa synthèse est réalisée au sein du RE rugueux, puis elle transite à travers l'appareil de Golgi où sa sortie est modulée selon la quantité de cholestérol. En effet, en cas d'ajout de cholestérol, la Cav1 poursuit son trajet vers la membrane plasmique, alors qu'en cas de déplétion de cholestérol, celle-ci sera retenue au niveau de l'appareil de Golgi, comme une réserve pour la cellule qui peut ensuite en disposer si besoin. D'un point de vue structural, elle est organisée avec ses deux extrémités, N et C, orientées vers le cytoplasme. Deux isoformes sont connus et décrits pour cette protéine, il s'agit des isoformes α -Cav1 (résidus 1 à 178) et β -Cav1 (résidus 32 à 178).

Elle est phosphorylable au niveau de la tyrosine 14 (Tyr14) et de la sérine 80 (Ser80) (*Figure 48*) (Phoebe E. Fielding et al., 2004) - (Goetz et al., 2008).

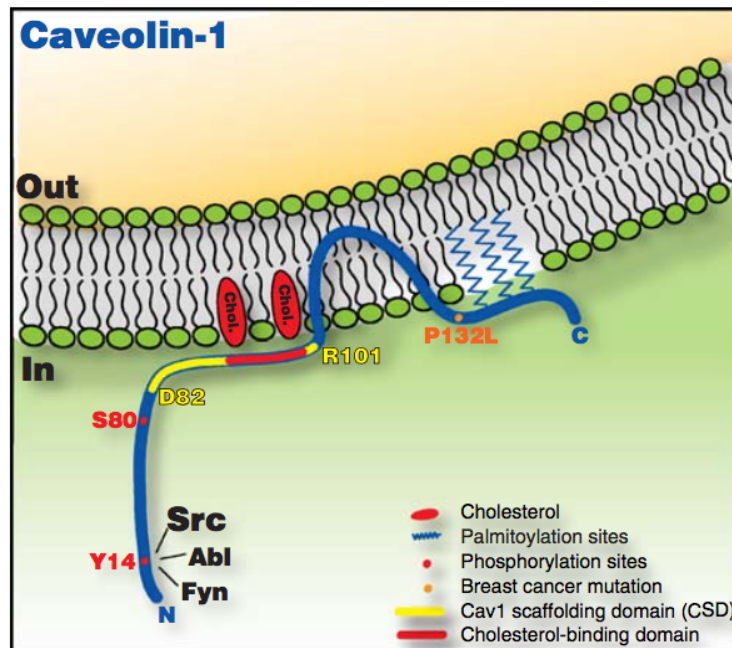


Figure 48 : Représentation schématique de la cavéoline-1 insérée au niveau de la membrane plasmique proposée par (Goetz et al., 2008)

Son intégration dans la membrane plasmique sous forme d'épingle est possible *via* son domaine d'insertion qui se situe au niveau des résidus 102 à 134. Elle présente deux domaines de forte affinité à la membrane plasmique et un domaine à l'extrémité NH₂-terminale : N-MAD (*N-terminal membrane attachment domain* = domaine d'attachement membranaire N-terminal) composé des résidus 82 à 101. Ce dernier domaine est également trouvé sous la terminologie de *Cav1 scaffolding domain* ou CSD, il contient une séquence d'acides aminés interagissant avec le cholestérol au moyen des résidus hydrophobes (*Figure 48*). De plus, elle présente un domaine à l'extrémité COOH-terminale au niveau des résidus 135 à 150 et un domaine d'oligomérisation situé au niveau des résidus 61 à 101 pour l'homo-oligomérisation. Une structure composée de 14 à 16 isoformes de Cav1 peut alors former un oligomère de près de 400 kDa (Li et al., 1996) - (Couet et al., 1997) - (Goetz et al., 2008).

En parallèle, au sein de plusieurs molécules de signalisation un motif de liaison à la Cav1 est trouvé, ce motif aussi appelé *Cav1 binding motif* ou CBM ($\phi\chi\phi\chi\chi\phi$ et $\phi\chi\chi\chi\phi\chi$ où ϕ représente les acides aminés aromatiques et χ les acides aminés non aromatiques) permet l'interaction physique de la Cav1 avec des effecteurs.

Parmi ces effecteurs, nous pouvons citer les membres de la famille RAS, RHO GTases, adénylate cyclase, PKC, PKA, MEK, ERK, EGFR et d'autres récepteurs à facteurs de croissance, l'isoforme endothéliale de la synthase du monoxyde d'azote (e-NOS), Src, des protéines G et des récepteurs couplés aux protéines G (Byrne et al., 2012) - (Fridolfsson et al., 2014) - (Yang et al., 2016). Les interactions directes entre la Cav1 et les protéines précitées modulent leurs activités préférentiellement en les inhibant. De plus, ces interactions peuvent également modifier leur localisation notamment en les conduisant au plus proche de leurs effecteurs afin de faciliter la transmission d'un signal. La Cav1 intégrée dans la grande structure des cavéoles apparaît donc dans la gestion de certaines voies de signalisation. Elle présente également une affinité importante pour des molécules lipidiques, telles que le cholestérol et les sphingolipides (*Figure 49*) (Murata et al., 1995).

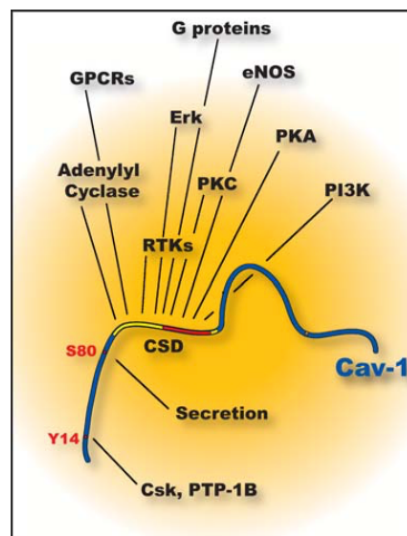


Figure 49 : Protéines interagissant avec la cavéoline-1 (Goetz et al., 2008)

La Cav1 a d'ores et déjà fait l'objet de nombreuses recherches qui ont permis d'identifier plusieurs fonctions dans lesquelles elle intervient. Parmi ces fonctions, nous pouvons évoquer l'endocytose indépendante des clathrines, le trafic intracellulaire, le transport et l'homéostasie du cholestérol, la gestion de la transduction des signaux et l'expression de certains gènes, l'incorporation au sein des cavéoles mais également la mécanocception. Pour cette dernière fonction, la Cav1 est capable de détecter les stimuli mécaniques (étirement, écoulement) subis par les cellules (Parton and Simons, 2007) - (Parton and del Pozo, 2013).

Ainsi, en réponse aux forces exercées sur la membrane dans divers types cellulaires, comme par exemple les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, les fibroblastes ou encore les muscles lisses ; les cavéoles protègent la cellule grâce à leur souplesse de déploiement ou au contraire de retrait afin de réguler la tension opérée par un stress mécanique sur les membranes (Parton and del Pozo, 2013). Cette réponse est possible grâce au jeu entre les cavéolines et les cavines. Effectivement, au moment de l’aplatissement des cavéoles, la cavéoline est libérée dans la membrane alors que le complexe de cavines se retrouve au niveau du cytosol (Parton and Simons, 2007) (*Figure 50*).

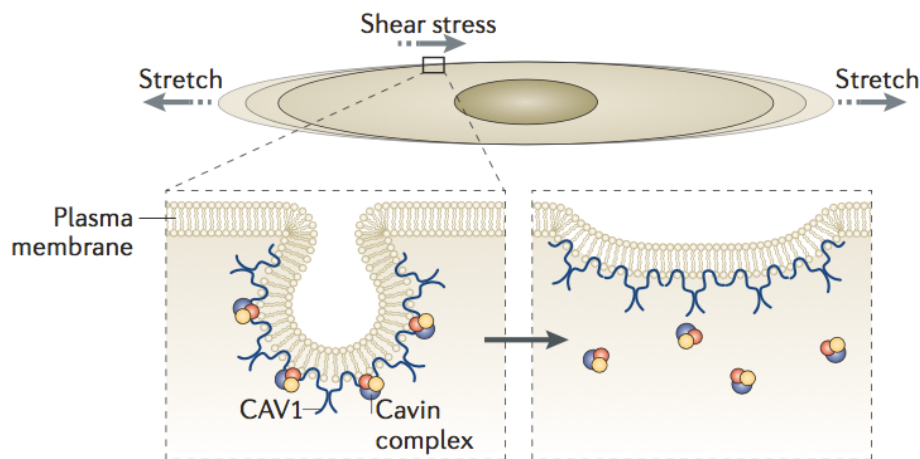


Figure 50 : Mécanosensation et remodelage de la matrice extracellulaire (Parton and del Pozo, 2013)

Article accessible via l’Université de Strasbourg.

De plus, les interactions entre les cavéoles et les intégrines permettent également de rentrer en relation avec la MEC mais aussi avec le cytosquelette (*Figure 51*) (Parton and Simons, 2007) - (Goetz et al., 2008) - (Quest et al., 2013) - (Parton and del Pozo, 2013).

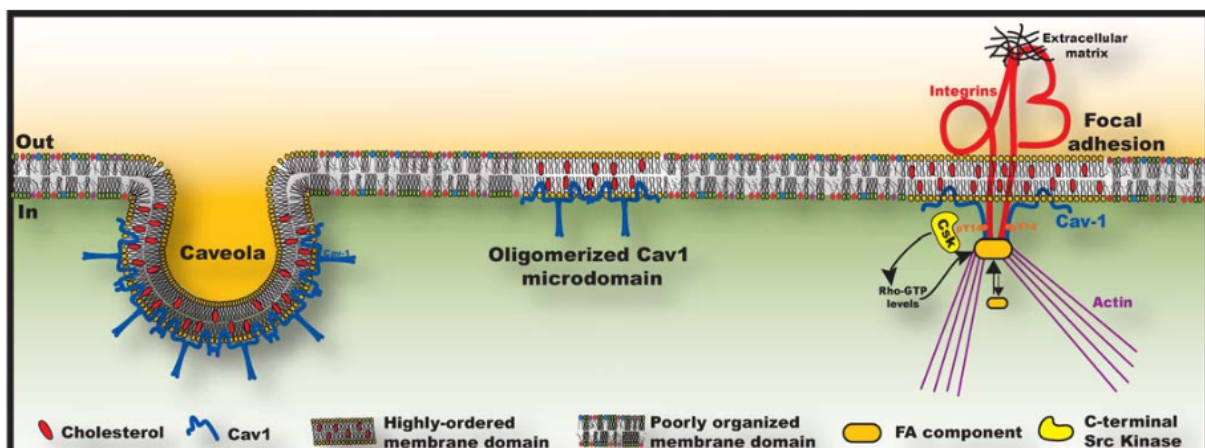


Figure 51 : Organisation des domaines membranaires et cavéoline-1 (Goetz et al., 2008)

Enfin, un dernier point est à soulever, celui de l'intrication existante entre la Cav1 et YAP. En effet, la Cav1 nuance l'activité de la voie HIPPO par la modulation de YAP en contrôlant la dynamique de l'actine et la phosphorylation de YAP. Cette modulation est une réaction face aux changements de rigidité de la MEC (Moreno-Vicente et al., 2018).

Néanmoins, l'activité de cette protéine est complexe puisqu'elle est également dépendante de son niveau de phosphorylation et de sa localisation. En effet, elle peut être localisée en dehors des cavéoles, sous forme circulante, nucléaire, cytoplasmique ou dans les adhérences focales. La Cav1 extra-cavéolaire pourrait exercer des fonctions différentes de ses homologues présents dans les cavéoles (*Figure 52*) (Gu et al., 2017).

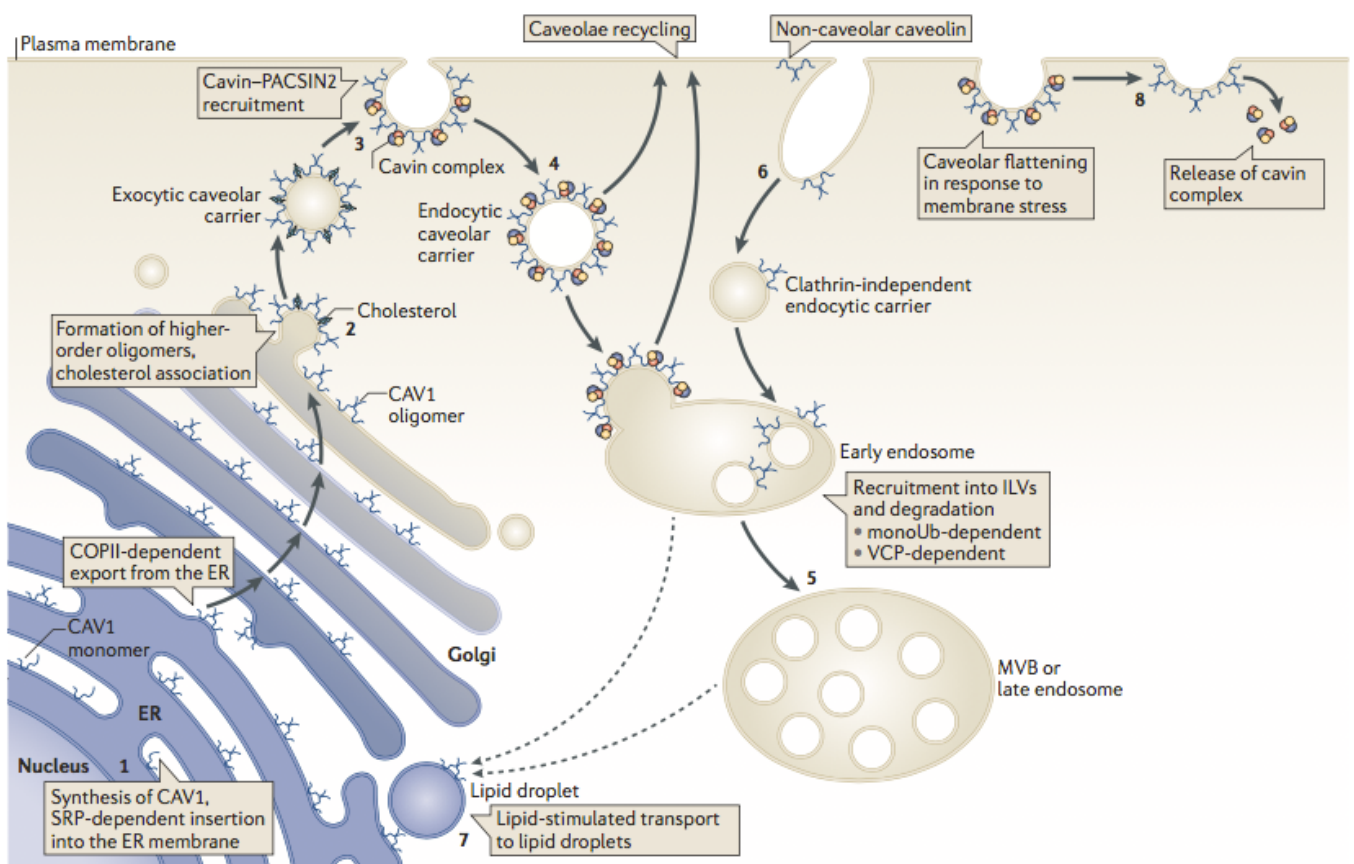


Figure 52 : Trafic membranaire des cavéolines proposé par (Parton and del Pozo, 2013)

Trafic cellulaire de la Cav1 du (1) réticulum endoplasmique (ER), son site de synthèse en passant par (2) l'appareil de Golgi jusqu'à la surface cellulaire. (3) Le complexe cavine-PACSIN2 (substrat de la PKC et de la caséine kinase dans les neurones 2) est impliqué dans la stabilisation des *caveolae* au niveau de la membrane plasmique. (4) Transit des cavéoles vers les endosomes précoces ou recyclage vers la membrane plasmique ou (5) vers les corps multivésiculaires (CMV) pour être dégradées. (6) Autre voie possible d'endocytose. (7) La cavéoline peut circuler vers les gouttelettes lipidiques, mais voie non clairement définie (pointillées). (8) Les cavines sont libérées des cavéoles dans le cytoplasme lors de l'application d'une force sur la membrane. COPII : protéine d'enveloppe II ; ILV : vésicule intraluminaire ; SRP : particule de reconnaissance du signal. Article accessible *via* l'Université de Strasbourg. Légende construite depuis celle présente dans la revue de (Parton and del Pozo, 2013).

2) La cavéoline-1 comme biomarqueur diagnostique et pronostique dans les cancers

Plusieurs études concluent sur l'implication de la Cav1 dans le développement du cancer notamment liée à des mutations de la protéine. En effet, nous pouvons évoquer l'exemple des cancers du sein qui peuvent présenter d'une part, la mutation P132L qui entraîne la dégradation de la Cav1 (Bonuccelli et al., 2009) - (Rieth et al., 2012). D'autre part, dans ces mêmes cancers, il est possible d'observer une méthylation des îlots CpG dans la région promotrice de la Cav1 limitant ainsi son expression (Engelman et al., 1999).

Malgré plusieurs études durant les dix dernières années, le rôle exact de la Cav1 dans les cancers est sujet à controverse. En effet, l'implication de la Cav1 dans le stroma est déjà décrite. Ainsi, une perte ou un défaut d'expression de la Cav1 engage la transition des fibroblastes en myofibroblastes : les CAF (Martinez-Outschoorn et al., 2015). Ces derniers favorisent le remodelage du microenvironnement et facilitent l'invasion tumorale et la métastase avec une activation des voies du TGF- β et d'AKT et de la production de facteurs pro-angiogéniques, le tout est associé à un cancer agressif et de mauvais pronostic (Goetz et al., 2011). Néanmoins, il n'y a aucun consensus quant aux taux d'expression de la Cav1 dans les cellules tumorales ou encore sur son rôle pro- ou anti-tumoral.

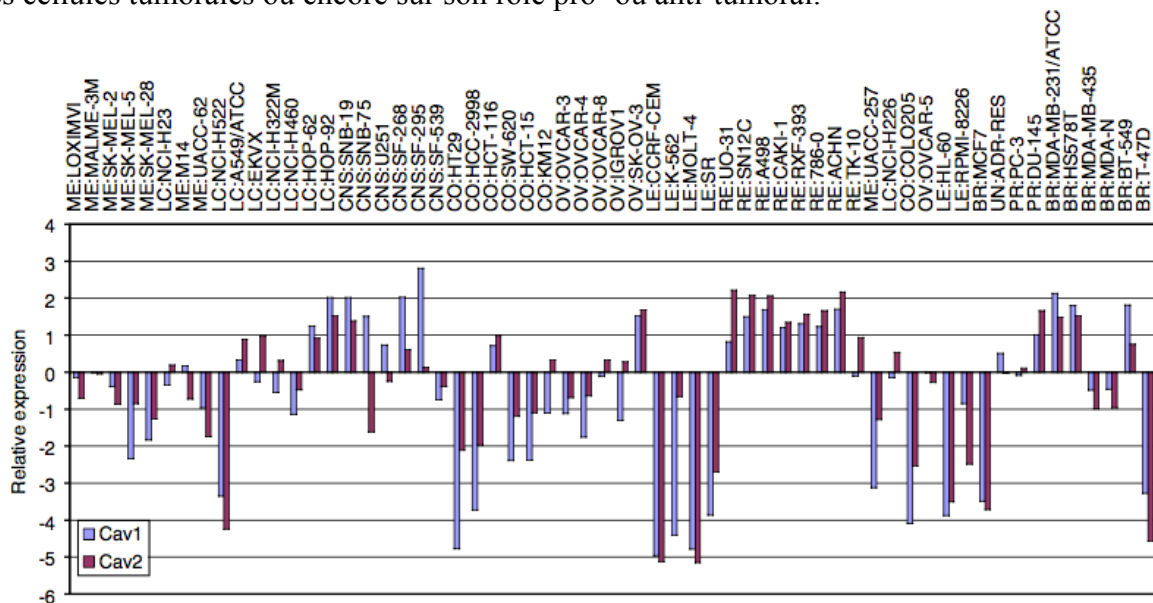


Figure 53 : Expression des cavéolines-1 et 2 au sein de 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines (Ravid et al., 2006)

« ME : melanoma, LC : lung carcinoma, CNS : central nervous system, CO : colon, OV : ovarian, LE : leukemia, RE : rénal, PR : prostate, BR : breast, UN : unidentified », d'après la légende de la figure issue de la revue de (Ravid et al., 2006).

Ainsi, d'après la littérature, la Cav1 est présentée soit comme un suppresseur de tumeur, soit au contraire comme un oncogène. Cette dualité résulte de la fluctuation de son niveau d'expression mais également du type de cancer ainsi que du stade de celui-ci (*Figure 53*) (Ravid et al., 2006).

Afin d'apprécier cette ambivalence, voici l'exemple de l'impact de son expression dans certains cancers. D'une part, dans les cancers de la prostate (Thompson et al., 1999), du poumon (Sunaga et al., 2004), du sein (Savage et al., 2007), ou encore dans les mélanomes (Felicetti et al., 2009), une surexpression de la Cav1 a été mise en parallèle d'un cancer agressif et de mauvais pronostic. D'autre part, dans les cancers du côlon (Bender et al., 2000), des ovaires (Wiechen et al., 2001) ou encore des VADS (Zhang et al., 2008), la surexpression de la Cav1 a été décrite comme de bon pronostic. L'expression de la Cav1 est dynamique et variable durant la tumorigénèse. Grâce aux travaux de Ravid et Liscovitch, il est désormais établi que la régulation des niveaux d'expression de la Cav1 fluctuent durant le processus de cancérogénèse selon un modèle biphasique lié à la fonction de la protéine. (Ravid et al., 2006). Ainsi, son expression est faible voire abolie au moment de la transformation cellulaire pour dynamiser la prolifération, puis elle augmente pour permettre la survie cellulaire mais également les processus de résistance (*Figure 54*).

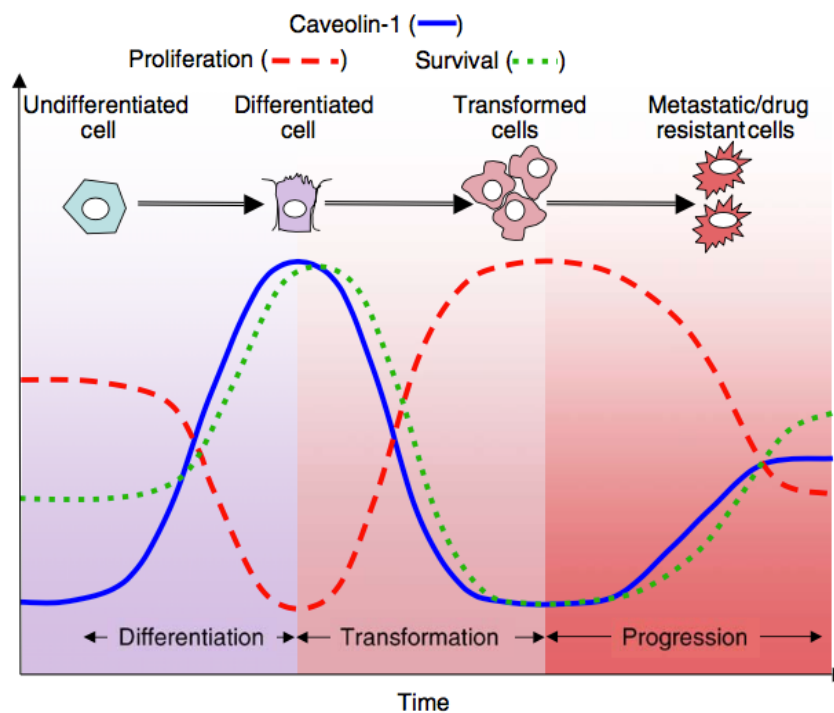


Figure 54 : Modifications de l'expression de la cavéoline-1 lors de la cancérogénèse (Ravid et al., 2006)

3) Implication de la cavéoline-1 dans les cancers

Les fonctions précitées confèrent à la Cav1 un rôle clé dans la signalisation cellulaire, il est donc aisé de percevoir que celle-ci peut entraîner diverses pathologies, dont le cancer. En effet, elle est décrite comme régulant notamment la survie cellulaire, l'angiogénèse ou encore le métabolisme. Ces trois points vont donc être développés dans cette partie.

a- Cavéoline-1 et survie cellulaire

Tout d'abord, des études *in vivo* sur des souris où l'expression de la Cav1 a été inhibée, ont permis aux chercheurs de noter une augmentation de la prolifération cellulaire et une activation de la voie β -caténine-TCF/LEF. Ces résultats sont obtenus dans des cellules de cryptes intestinales (J. Li et al., 2005) mais également dans des cellules souches mammaires (Sotgia et al., 2009). De plus, la Cav1 est également impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, elle est capable de bloquer les cellules en phase G0/G1 du cycle par l'activation de la voie p53/p21^{WAF1/CIP1} (Galbiati et al., 2001).

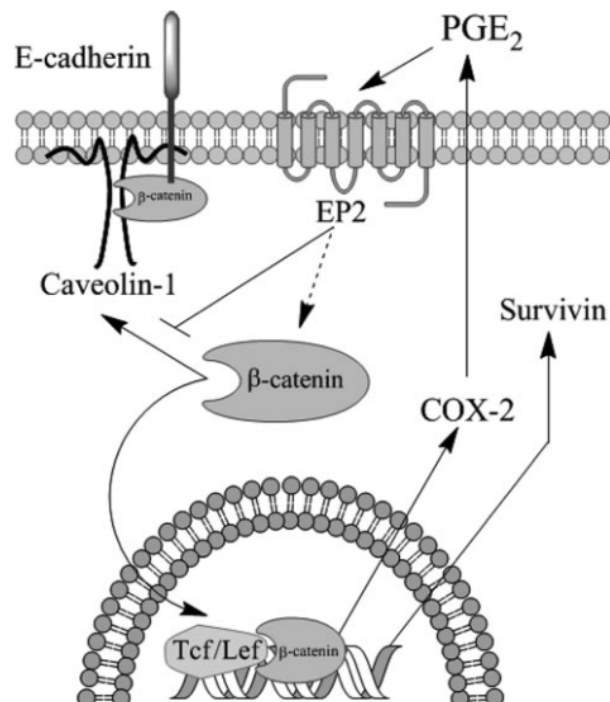


Figure 55 : Modulation de la transcription de la COX-2 et de la survivine par la cavéoline-1 (Rodriguez et al., 2009)

Un autre mécanisme de blocage du cycle consiste en l'inhibition de la transcription de la cycline D1 en bloquant la β -caténine-TCF/LEF ou en se liant à l'hétérochromatine du noyau (Hulit et al., 2000). La Cav1 peut aussi moduler la transcription de la COX-2 et de la survivine afin d'inhiber leurs expressions ce qui conduit à une réduction des cellules en phase G2/M avec une augmentation de la sensibilité à l'apoptose (*Figure 55*) (Torres et al., 2006) - (Rodriguez et al., 2009).

La mort cellulaire par apoptose est également induite dans les carcinomes du larynx par l'interaction directe de la Cav1 et de l'EGFR induisant ainsi la réduction de la phosphorylation de ERK (Gu et al., 2007). Ensuite, il a été démontré que la stabilisation du suppresseur de tumeur PTEN par la Cav1 permet d'inhiber l'activité de PI3K par le biais de l'Akt dans les fibroblastes de la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF = *idiopathic pulmonary fibrosis*) limitant ainsi la prolifération de ces cellules (*Figure 56*) (Xia et al., 2010).

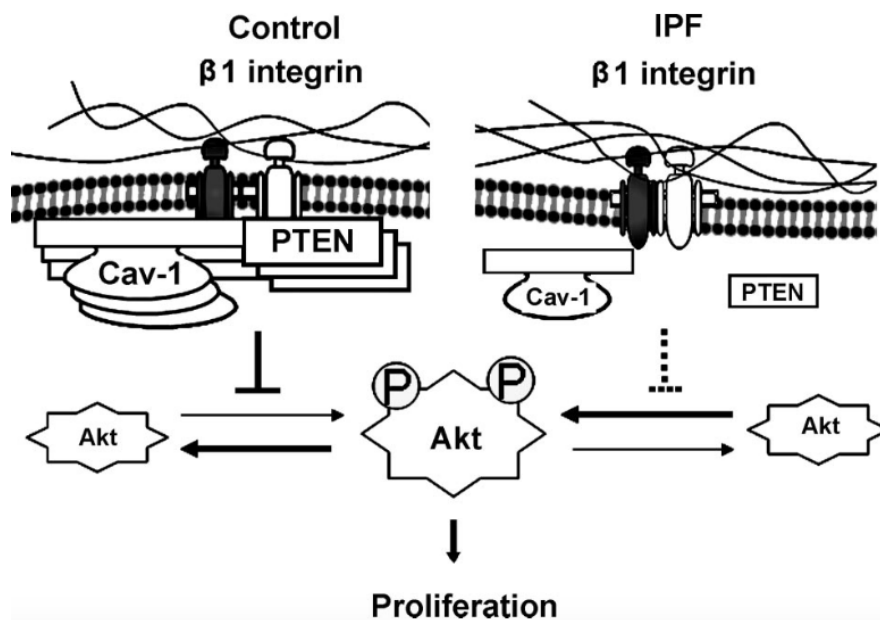


Figure 56 : Intrication de la cavéoline-1 et de l'Akt dans les fibroblastes de la fibrose pulmonaire idiopathique (Xia et al., 2010)

Le contexte d'oxygénation est également important. En effet, en réponse à l'hypoxie, la Cav1 interagit avec les récepteurs de mort cellulaire, à savoir FAS qui se multiplient afin de favoriser l'apoptose après formation du complexe de signalisation induisant la mort constitué de FAS et de la caspase 8 (Zhang et al., 2011). De plus, notre équipe a étudié les carcinomes du côlon, en 2005, et a pu mettre en avant l'implication des cavéoles dans l'activation précoce des récepteurs de mort cellulaire à TRAIL induite par les inhibiteurs de COX-2 et dans l'apoptose (Martin et al., 2005).

Le rôle de la Cav1 dans l'apoptose est encore accentué par la colocalisation de celle-ci et de la phosphatidylsérine à la surface des macrophages apoptotiques engageant vers l'hypothèse que la Cav1 est impliquée dans l'externalisation de cette phosphatidylsérine (Gargalovic and Dory, 2003). En parallèle, en limitant l'apoptose induite par c-MYC dans les cancers de la prostate (Timme et al., 2000), la surexpression de la Cav1 favorise la survie cellulaire. De plus, cette limitation de l'apoptose est également observée lors de la surexpression de la Cav1 dans les carcinomes hépatocellulaires ce qui entraîne un dynamisme de leur migration et de leur invasion par régulation positive de l'expression de MMP2, MMP9 et du VEGF (Tang et al., 2012). Par ailleurs, la Cav1 joue un rôle dans les mécanismes de résistances aux traitements, à savoir des résistances à la radiothérapie, aux chimiothérapies mais également à la thérapie ciblée : le cétuximab (l'implication de la Cav1 dans les résistances aux traitements sera détaillée dans la suite de ce manuscrit). Enfin, la Cav1 est capable de bloquer ERK et par ce biais la voie des MAPK dans les cancers de la tête et du cou ce qui a pour conséquence une diminution de la croissance et du processus métastatique (Zhang et al., 2008).

b- Cavéoline-1 et angiogénèse

Grâce à une étude *in vivo* sur des souris où l'expression de la Cav1 a été abolie, les chercheurs ont pu mettre en évidence une dérégulation de la voie du monoxyde d'azote (Drab et al., 2001). Cette perturbation entraîne une hyper-prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'une augmentation de la perméabilité microvasculaire (Razani and Lisanti, 2001). Par ailleurs, lorsque la Cav1 est surexprimée, une augmentation de l'expression du VEGF est observée dans les hépatocarcinomes engageant ainsi vers le processus de métastase (Zhang et al., 2009). Enfin, la phosphorylation de la Cav1, par la protéine Src, est favorisée dans les myélomes *via* la sécrétion du VEGF par les cellules tumorales (Podar et al., 2004). Ainsi, l'expression de la Cav1 est impliquée dans les processus de progression tumorale et notamment dans celui de l'angiogénèse.

c- Cavéoline-1 et effet Warburg inversé

L'effet Warburg inversé consiste à établir que la glycolyse aérobie est réalisée au sein des CAF. Or, l'expression de la Cav1 dans ce processus joue un rôle central. En effet, la diminution ou la perte de l'expression de la Cav1 entraîne une activation de la eNOS ce qui favorise la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ou *reactive oxygen species*) (Ju et al., 1997).

Cette production de molécules provoque un stress oxydant engageant les cellules dans l'autophagie conduisant ainsi à la transcription et à la stabilisation d'HIF-1 α et de NF- κ B (Chiavarina et al., 2010) et à la diminution de l'expression de la Cav1. L'ensemble de ces fluctuations d'expression abouti à la transformation des fibroblastes en CAF présentant un métabolisme mitochondrial plus faible (OXPHOS ou phosphorylation oxydative diminuée) mais une glycolyse augmentée (*Figure 57*) (Martinez-Outschoorn et al., 2015).

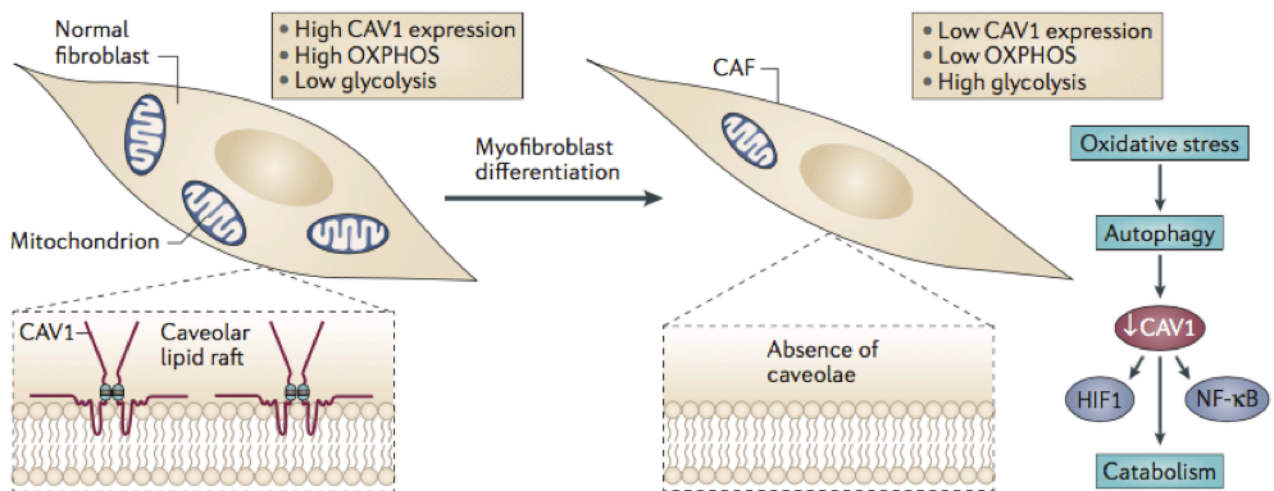


Figure 57 : Influence de l'expression de la cavéoline-1 sur le phénotype métabolique des fibroblastes associés à la tumeur (Martinez-Outschoorn et al., 2015)

De plus, au sein de ces CAF, où l'expression de la Cav1 est réduite voire abolie, l'expression du MCT4 est augmentée par induction du stress oxydatif et de HIF-1 α ce qui permet à ces cellules d'évacuer les catabolites du glucose, à savoir : la glutamine, le lactate et le pyruvate. Ces catabolites peuvent alors être captés par les cellules tumorales afin de compléter leur besoin en nutriments. Ces nutriments viennent compléter ceux produits par les cellules durant la phosphorylation oxydative par l'induction de celle-ci *via* les CAF. Enfin, ceux-ci approvisionnent également la tumeur en acides aminés, en acides gras et en nucléotides, ils sont donc là comme un réel support pour la tumeur en répondant à tous ses besoins nutritionnels (*Figure 58 – A et B*) (Martinez-Outschoorn et al., 2015).

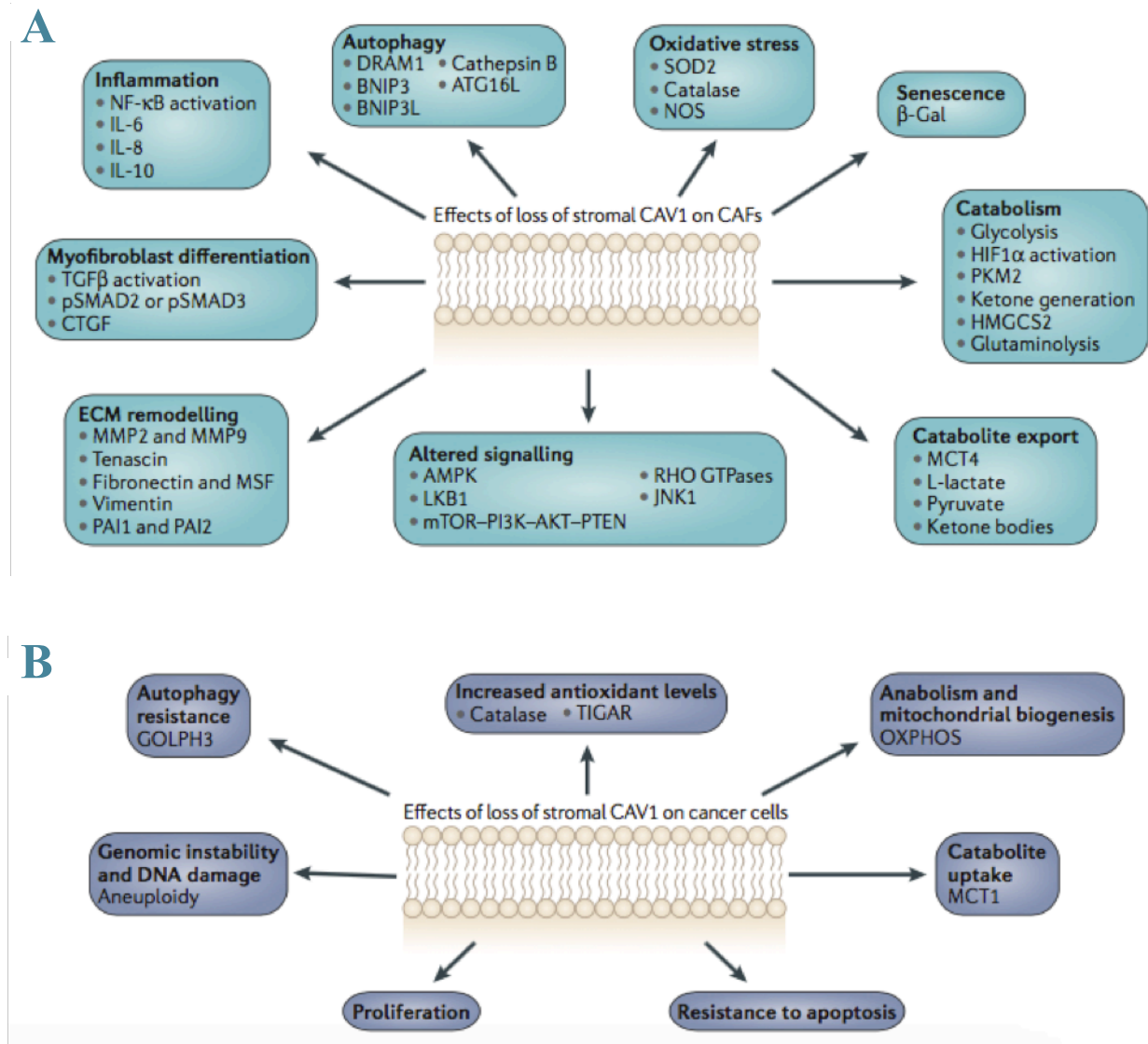


Figure 58 : Effets de la diminution de l'expression de la cavéoline-1 (Martinez-Outschoorn et al., 2015)

(A) Impact d'une diminution de l'expression de la cavéoline-1 dans les fibroblastes associés à la tumeur et (B) dans les cellules tumorales.

« AMPK : AMP-activated protein kinase, ATG16L : autophagy-related protein 16-1, β -Gal : β -galactosidase : BNIP3 : BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3, BNIP3L : BNIP3-like, CTGF : connective tissue growth factor, DRAM1 : DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1, GOLPH3 : golgi phosphoprotein 3, HIF1 α : hypoxia-inducible factor 1 α , HMGCS2 : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, IL : interleukin, JNK1 : JUN N-terminal kinase 1, LKB1 : liver kinase B1, MCT : monocarboxylate transporter, MMP : matrix metalloproteinase, MSF : migration-stimulating factor, NF- κ B : nuclear factor- κ B, NOS : nitric oxide synthase, PAI : plasminogen activator inhibitor, PKM2 : pyruvate kinase M2, p : phosphorylated, SOD2 : superoxide dismutase », d'après la légende de la figure issue de la revue de (Martinez-Outschoorn et al., 2015).

Plusieurs études ont déjà traitées de l'implication de l'expression de la Cav1 dans les processus de métastases à distance. En effet, Masuelli *et al.* ont mis en évidence qu'une surexpression de la Cav1 est observable en cas de cancers ORL présentant des métastases dans les ganglions lymphatiques (Masuelli et al., 2012). Ensuite, des cellules surexprimant la Cav1 ont également été mise en évidence dans des lignées présentant un phénotype métastatique agressif dans l'étude de Masood *et al.* (Masood et al., 2013). De plus, lorsque l'expression de la Cav1 est diminuée au moyen d'un siARN, il a pu être observé une diminution de la croissance tumorale ainsi que de la migration et de l'invasion (Zhao et al., 2011) - (Nohata et al., 2011). Enfin, dans l'étude Jung *et al.* en 2015, notre équipe s'est intéressée au rôle de l'expression de la Cav1 dans la régulation des métastases. Ainsi, notre équipe a pu mettre en évidence, sur des cellules primaires de tumeurs de patients, qu'un faible taux d'expression de cette protéine est en lien avec un pronostic défavorable, une réduction de la survie sans métastase à distance et une diminution de la survie globale (Figure 59 – A et B) (Jung et al., 2015).

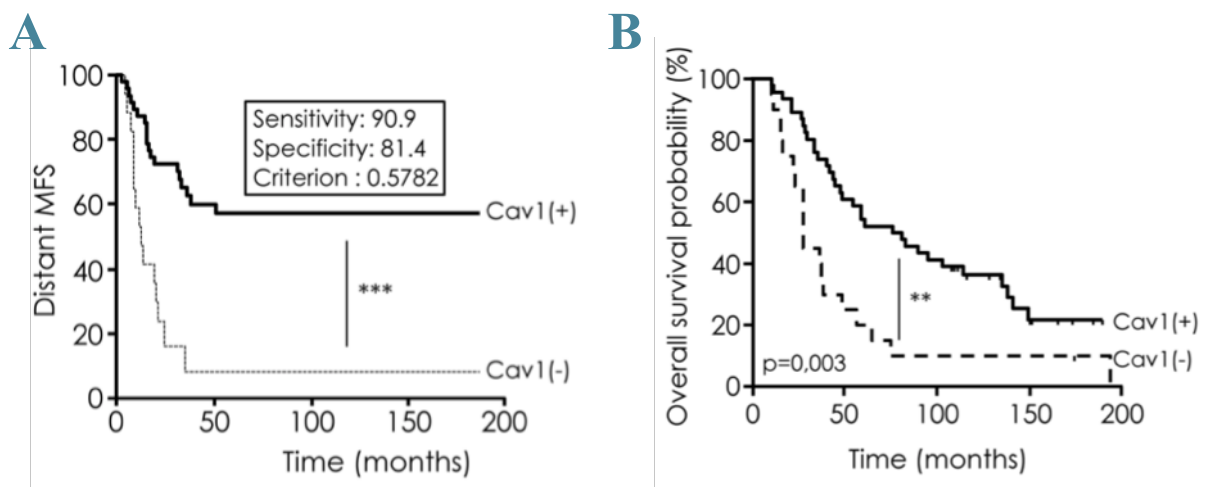


Figure 59 : Expression de la cavéoline-1 dans des échantillons de tissus humains issus de patients atteints d'un cancer des voies aérodigestives supérieures (Jung et al., 2015)

(A) Analyse Kaplan-Meier de la survie sans métastase à distance chez les patients stratifiés selon l'expression de la Cav1 : Cav1(+) et Cav1(-). (B) Analyse Kaplan-Meier de la survie globale (Jung et al., 2015).

En parallèle des données issues des patients, notre équipe a pu mettre en avant un profil métastatique des cellules commerciales de cancers des VADS présentant une faible expression de la Cav1 avec une migration accrue, une évation importante et une invasion augmentée (Jung et al., 2015).

En complément, il a été décrit en 2003, qu'une diminution de l'expression de la Cav1 entraîne une EMT avec une augmentation de la migration et de l'invasion (Lu et al., 2003). Ainsi, le profil des cellules engagées vers la métastase se caractérise par une perte de la morphologie épithéliale avec une transition de l'expression de marqueurs épithéliaux tels que l'E-cadhérine vers l'expression de marqueurs mésenchymateux notamment la vimentine. De plus, de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'EMT sont exacerbés lorsque la Cav1 est sous-réglée, à savoir : Twist, Snail, Slug ou encore ZEB1 et ZEB2. Les cellules ayant réalisé l'EMT présentent donc une capacité accrue de motilité, d'évasion et d'invasion avec une production augmentée des MMP et de la fibronectine ainsi qu'une augmentation d'expression de son récepteur qu'est l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Jung et al., 2015).

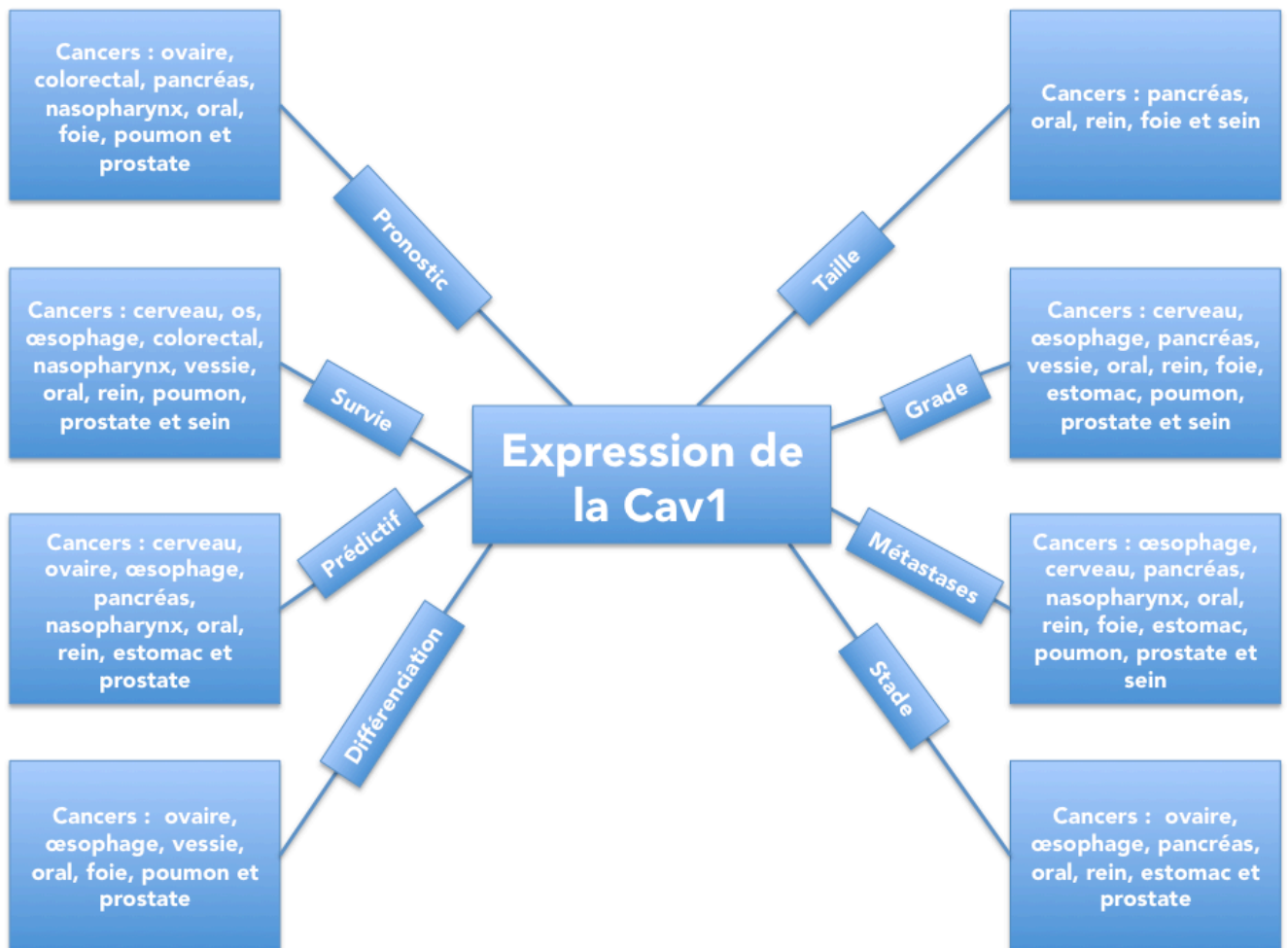


Figure 60 : Implication de l'expression de la cavéoline-1 dans divers cancers (Chen and Che, 2014)

La classification des caractéristiques cliniques, en termes de taille de la tumeur, de différenciation, de grade et de stade de la tumeur, ainsi que de la présence de métastases. Enfin, la classification illustre également le pronostic et le taux de survie global influencés par l'expression de la Cav-1.
Schéma reproduit pour une meilleure qualité, d'après la revue de (Chen and Che, 2014).

Le positionnement de la Cav1 en tant que cible thérapeutique semble peu envisageable en raison de son expression ubiquitaire. Mais plusieurs études engagent le raisonnement d'une utilisation de cette protéine comme un marqueur clinique à diverses fins, telles que le diagnostic (taille de la tumeur, le stade, le grade et la différenciation, les métastases), le pronostic ou encore la prédiction et la survie globale dans diverses tumeurs (*Figure 60*) (Chen and Che, 2014).

4) La cavéoline-1 impliquée dans la résistance aux traitements utilisés dans les cancers des voies aérodigestives supérieures

Certaines cellules cancéreuses acquièrent des résistances aux traitements conduisant ainsi à des rechutes. L'une des pistes de mécanismes moléculaires concerne l'expression de la Cav1 dans les cellules cancéreuses. Une revue proposée par Kettler et Klein en 2018 fait un bilan sur la résistance aux thérapies liée à l'expression de cette protéine, cette revue a été utilisée comme support pour la construction de cette partie du manuscrit (Ketteler and Klein, 2018).

a- Implication de l'expression de la cavéoline-1 dans la résistance aux traitements anti-tumoraux

D'une part, concernant la chimiothérapie, il a été démontré que les cellules cancéreuses pancréatiques surexprimant la Cav1 sont résistantes à la gemcitabine et au 5-fluorouracile (Chatterjee et al., 2015). A l'inverse, une expression faible de la Cav1 entraîne une réduction de l'entrée du nab-paclitaxel (correspondant à une nanoparticule de paclitaxel conjuguée à l'albumine humaine) au sein de ces mêmes cellules et provoque une résistance à la mort cellulaire par apoptose alors qu'une surexpression de cette protéine les sensibilise (Chatterjee et al., 2017). Concernant les cellules du cancer colorectal, une surexpression de la Cav1 provoque une résistance au 5-fluorouracile (Z. Li et al., 2017). De plus, la phosphorylation de la Cav1 (Tyr14) dans les cancers du sein favorise l'apoptose et par ce biais la résistance aux taxanes, notamment au paclitaxel (Shajahan et al., 2007). En parallèle, une expression importante de la Cav1 dans les cancers du sein est associée à une activité antitumorale renforcée du docétaxel (Kang et al., 2016). En ce qui concerne, les cancers des ovaires, il a été rapporté que la surexpression de la Cav1 est corrélée à une résistance lors d'un traitement par du cisplatine (Zou et al., 2015).

De plus, pour les cancers du poumon non à petites cellules, la méthylation de la Cav1 est associée à une meilleure réponse au traitement associant un taxane et un sel de platine (Brodie et al., 2014) - (Ketteler and Klein, 2018).

D'autre part, concernant la radiothérapie, l'expression de la Cav1 a été décrite comme un marqueur de la résistance de celle-ci dans les cellules du cancer du pancréas par activation des processus de réparation des cassures double brin de l'ADN (Hehlgans et al., 2009). En effet, lors d'une radiothérapie, il a été démontré une phosphorylation de la Cav1 ainsi que celle de l'EGFR *via* le proto-oncogène tyrosine kinase : SRC. Ainsi, en cas d'inhibition de la protéine Src, cela provoque la réduction de la phosphorylation de la Cav1 et du transport vers le noyau de l'EGFR et donc une radiosensibilisation des cellules bronchiques humaines et des cellules de carcinomes cellulaires squameux (Dittmann et al., 2009). De même, dans les cancers du sein triple négatif la translocation nucléaire de l'EGFR est favorisée par la Cav1, cette translocation dynamise la réparation de l'ADN après une irradiation et conduit donc à une résistance au traitement (Zou et al., 2017) - (Ketteler and Klein, 2018).

b- Implication de la cavéoline-1 dans la résistance aux thérapies anti-EGFR

Nous allons à présent développer davantage le point concernant l'implication de l'expression de la Cav1 et l'expression de l'EGFR. En effet, il a été décrit dans les travaux de Couet *et al.*, que la Cav1 joue un rôle de régulateur négatif de l'expression de l'EGFR (Couet et al., 1997). Ainsi, par son action sur l'EGFR, la Cav1 impacte et bloque les voies liées à la prolifération, à la migration mais également à l'invasion. Parmi ces voies nous pouvons citer : MEK / ERK et PI3K / AKT / mTOR dans les cancers du larynx (Gu et al., 2007), du pancréas (Han et al., 2009), du poumon (Han et al., 2014) et du côlon (Yang et al., 2018).

En parallèle de ces résultats, d'autres études ont néanmoins mis en avant, qu'au contraire, la Cav1 peut promouvoir l'expression et l'activation de l'EGFR et favoriser la transduction du signal en permettant l'interaction de ce récepteur avec ses ligands par déplacement de celui-ci. Ainsi, cette activation favorise les processus de réparation de l'ADN après une prise en charge par radiothérapie (Dittmann et al., 2009). Elle entraîne la résistance au trastuzumab observée dans les cancers du sein qui pourrait être reliée à une endocytose importante de l'EGFR médiée par la Cav1 (Sekhar et al., 2013).

De plus, cette activation médiée par la Cav1 et par la protéine Src promeut la croissance et la migration des cellules de carcinomes épithéliaux (Overmiller et al., 2016). Elle favorise également la progression tumorale des cellules du cancer gastrique par accentuation de la croissance et par la limitation de l'*anoïkis* (Wang et al., 2018), mais encore la progression tumorale dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules (Bazzani et al., 2018). Enfin, cette activation favorise la motilité cellulaire dans un contexte de cancers de la tête et du cou (Masuelli et al., 2012).

Il est donc possible d'envisager que la Cav1 soit proposée comme biomarqueur pronostique de l'évolution de la tumeur primitive mais également comme biomarqueur prédictif de la réponse aux traitements qui ciblent l'EGFR. Or, à l'heure actuelle la surexpression de la Cav1 et son impact sur l'évolution de la tumeur primitive (aspect pronostique) ou encore sur la réponse aux traitements (aspect prédictif) ne sont encore que trop peu étudiés dans les cancers des VADS d'où la proposition de ce travail de recherche qui porte notamment sur l'évaluation et le positionnement de la Cav1 dans les rechutes locorégionales des cancers ORL.

▲ Présentation du récepteur du facteur de croissance épidermique

Nous avons déjà plusieurs fois cité dans ce manuscrit l'EGFR, sans pour autant le décrire en détail. Ainsi, l'EGFR correspond à une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa (Dassonville et al., 1993). Il appartient à une famille de tyrosines kinases : les ErbB composée de l'EGFR trouvé également sous la terminologie ErbB1 ou HER1. De plus, il existe l'ErbB2 / Neu / HER2, l'ErbB3 / HER3 et l'ErbB4 / HER4. Cette famille de protéines est en lien étroit avec des mécanismes de croissance, de prolifération et de survie cellulaires. En effet, les récepteurs précités sont situés au niveau de la membrane plasmique et sont composés d'un domaine extracellulaire qui permet la liaison au ligand, d'une région hydrophobe transmembranaire et d'un domaine tyrosine kinase intracytoplasmique. De plus, ils sont capables de déclencher diverses voies de signalisation nécessitant une dimérisation des récepteurs puis l'activation de tyrosine kinase intrinsèque, ces voies sont développées dans la suite de ce manuscrit (Contessa et al., 2006) - (Baro et al., 2019) - (Scaltriti and Baselga, 2006).

▲ Ligands du récepteur du facteur de croissance épidermique

Ainsi, l'activation des récepteurs de la famille ErbB est dépendante de l'expression de ses ligands. Parmi eux, l'EGF, le TGF- α et l'AREG qui présentent un tropisme pour l'EGFR. Puis, la bétacelluline, l'HB-EGF (l'EGF se liant à l'héparine) et l'EREG qui présentent une double spécificité à la fois pour l'EGFR et pour l'ErbB4. Ensuite, les neuregulines (NRGs) dont NRG1 et NRG2 se lient à l'ErbB3 et à l'ErbB4 et les NRG3 et NRG4 qui se lient uniquement à l'ErbB4. Enfin, aucun ligand ne se lie directement à l'ErbB2, il est cependant à noter que l'un des membres de la famille des mucines, MUC4 module l'activité de ce récepteur (*Figure 61*).

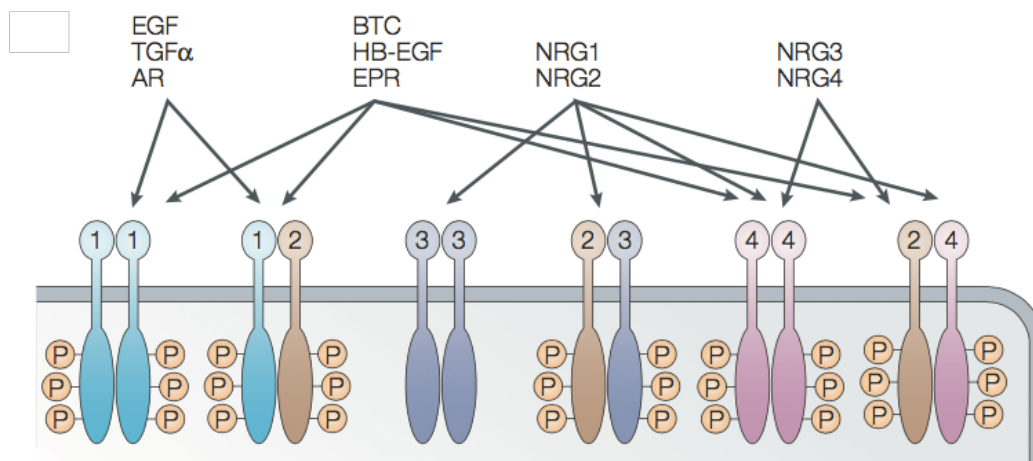


Figure 61 : Récepteurs, ligands et dimères de la famille des ErbB (Hynes and Lane, 2005)

« AR : amphiregulin, BTC : betacellulin, EPR : epiregulin, HB-EGF : heparinbinding EGF, NRGs : neuregulines, TGF α : transforming growth factor- α », d'après la légende de la figure issue de la revue de (Hynes and Lane, 2005).

Pour que la liaison ait lieu, il est nécessaire que le récepteur subisse un changement de conformation spatiale pour passer de l'état inactif à l'état actif. Ainsi, dans la conformation inactive, l'hélice α C est positionnée loin du site de liaison, ouvrant une grande poche hydrophobe arrière. Alors que la conformation est possible lorsque l'hélice α C est à proximité du site de liaison à l'ATP dans le domaine tyrosine-kinase. Une fois les ligands liés aux récepteurs au niveau de la poche de liaison ATP-kinase, il se produit un changement de conformation de l'ectodomaine²¹ entraînant la formation d'homo- ou d'hétérodimères de ce récepteur (*Figure 62*).

²¹ Domaine d'une protéine orienté vers la zone extracellulaire.

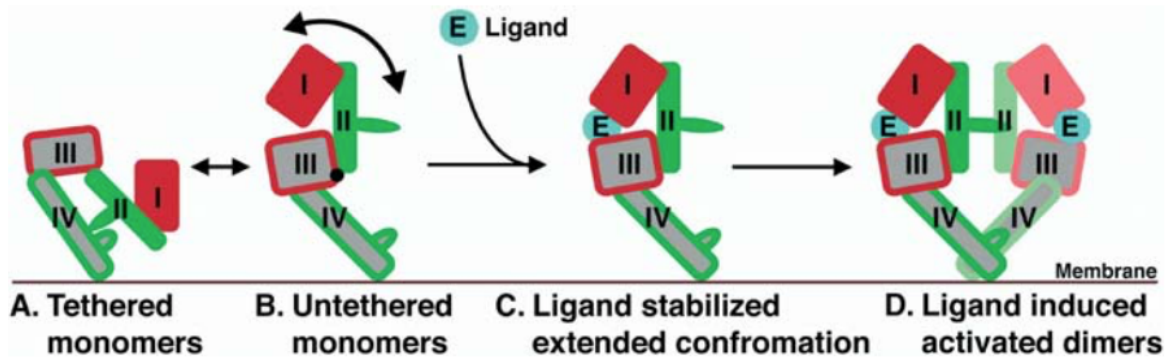


Figure 62 : Mécanisme de dimérisation de l'EGFR induit par un ligand (S. Li et al., 2005)

(A) 95% de l'EGFR non lié à un ligand se présentent sous conformation compacte auto-inhibée, dans ce cas les domaines II et IV interagissent de manière intramoléculaire. (B) Pour les 5% restants, la liaison est rompue pour présenter plusieurs conformations notamment étendues. (C) La liaison du ligand se fait au niveau des domaines I et III, le domaine II est exposé pour la dimérisation. (D) La dimérisation est possible par les domaines II. D'après la légende de la figure issue de l'article de (S. Li et al., 2005).

Après cette dimérisation, l'activation du domaine kinase est possible provoquant alors la phosphorylation de résidus tyrosine au niveau de l'extrémité COOH-terminale qui serviront de sites d'ancrage pour diverses protéines (Figure 63) (Hynes and Lane, 2005).

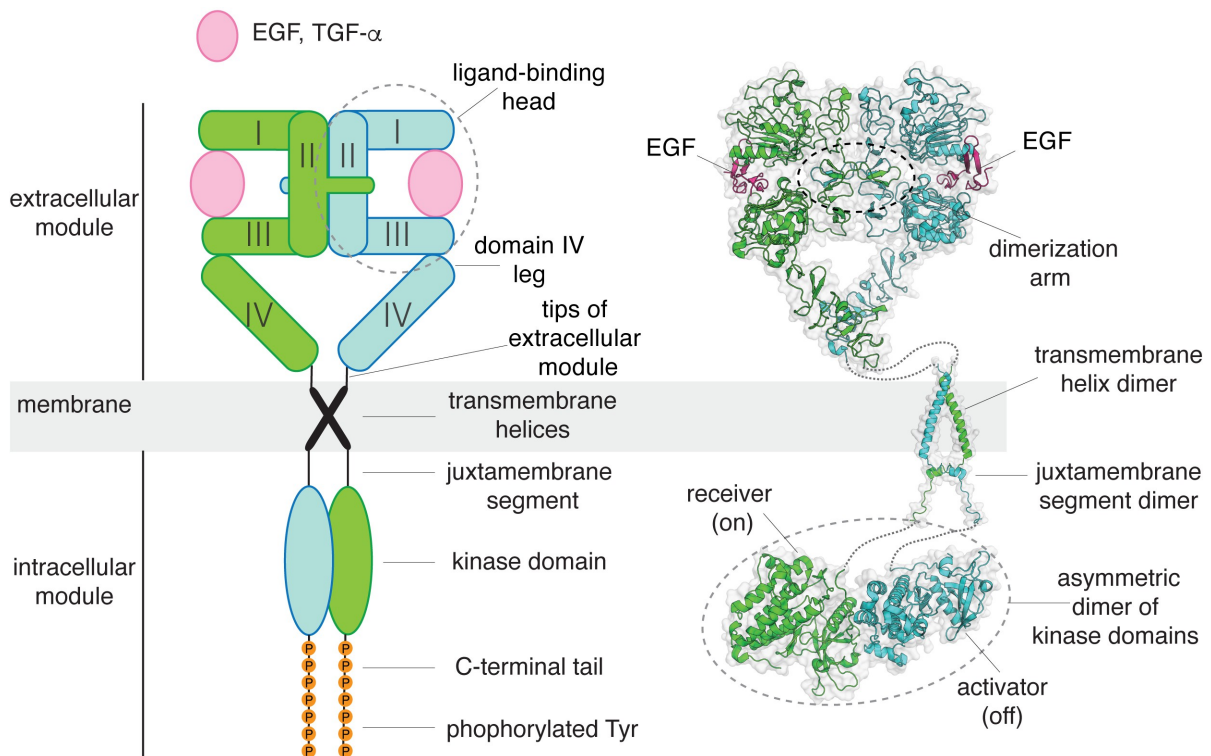


Figure 63 : Dimérisation de l'EGFR après liaison à un ligand (Huang et al., 2021)

Plusieurs sites de phosphorylation sont possibles comme présentés sur la figure ci-après (*Figure 64*). Ces résidus tyrosine phosphorylée représentent alors des sites pour la liaison de protéines cytoplasmiques contenant des domaines d'homologie 2 de Src (SH2).

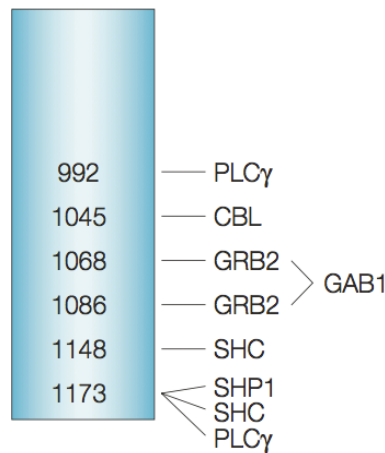


Figure 64 : Représentation schématique des principaux sites d'autophosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (Hynes and Lane, 2005)

▲ Voies de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique

Comme indiqué ci-dessus, l'EGFR peut engager la cellule vers plusieurs voies de signalisation.

Premièrement, la voie RAS / RAF / ERK qui est impliquée dans les processus de prolifération et de survie cellulaires. Après fixation d'un ligand, la phosphorylation de l'EGFR se produit. Un complexe se forme alors avec les protéines adaptatrices Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2* = protéine 2 liée aux récepteurs des facteurs de croissance) sur les résidus Tyr1068 et Tyr1173 phosphorylés. Celles-ci interagissent avec SOS (*son of sevenless*, un facteur d'échange de nucléotides de guanine de RAS) soit par interaction directe soit médiée par une molécule adaptatrice qu'est la Shc (*Src homology and collagen*).

La protéine SOS peut donc recruter une autre protéine qui est la RAS-GDP (RAS-guanosine diphosphate) entraînant l'activation de RAS-GTP (RAS-guanosine triphosphate). Cette dernière, active Raf-1 dont le rôle est de phosphoryler les MAPK (protéines kinases activées par des agents mitogènes). Celles-ci sont alors internalisées dans le noyau afin de phosphoryler les facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire (*Figure 65*) (Scaltriti and Baselga, 2006).

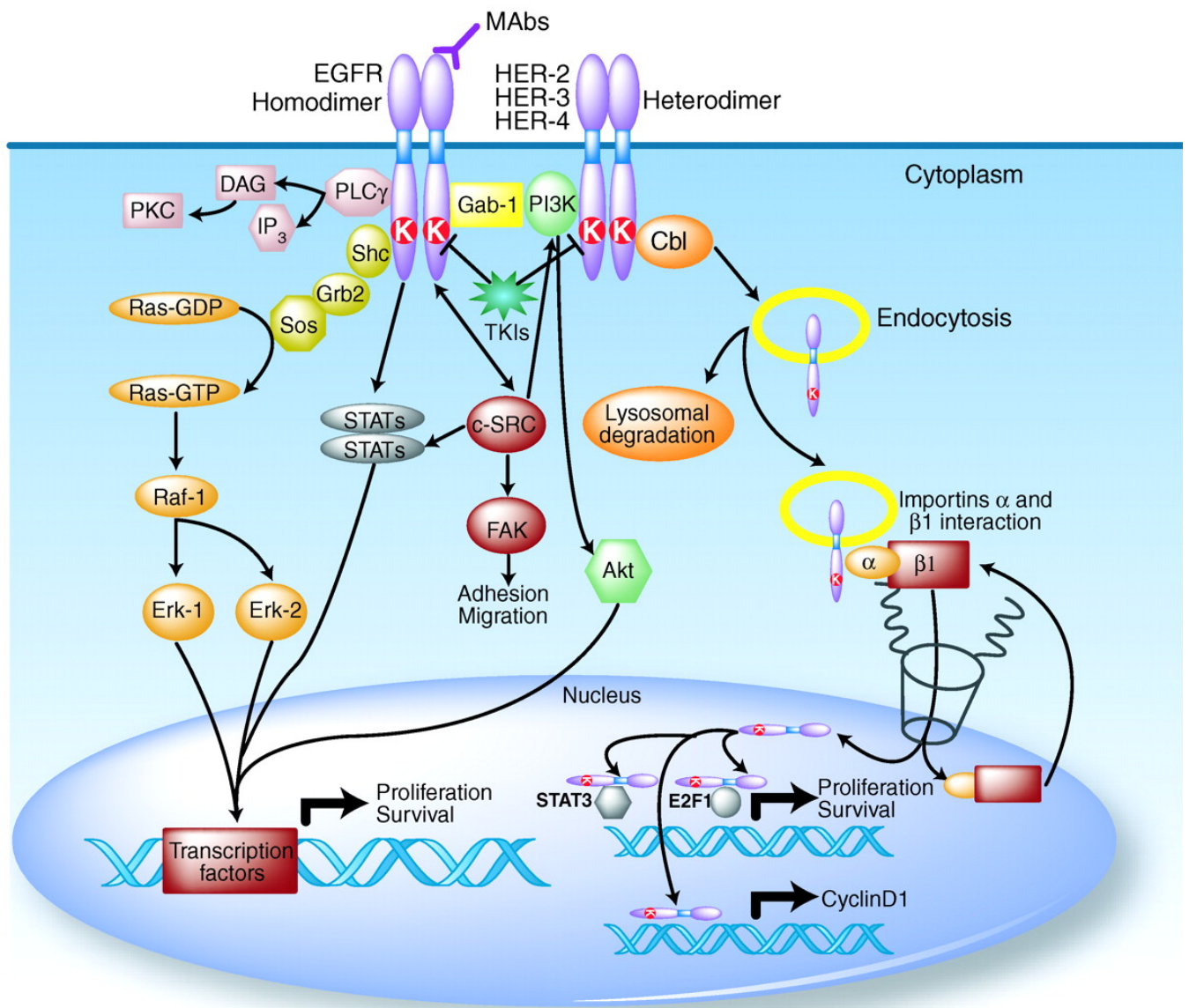


Figure 65 : Voies de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique (Scaltriti and Baselga, 2006)

« DAG : 1,2-diacylglycerol, IP3 : inositol 1,3,5-triphosphate, PLCγ : phospholipase Cγ, Erk-1 : extracellular signal-regulated kinase-1, Erk-2 : extracellular sig.al-regulated kinase-2, FAK : focal adhesion kinase, PKC : protein kinase C », d'après la légende de la figure issue de la revue de (Scaltriti and Baselga, 2006).

Deuxièmement, la voie PI3K / AKT est caractérisée par le PI3K qui correspond à une enzyme composée d'une sous-unité régulatrice qui permet l'ancrage au récepteur et d'une sous-unité catalytique qui génère le second messager : le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. Ce dernier entraîne la phosphorylation et l'activation de la protéine sérine thréonine kinase : Akt. L'activation de cette voie peut se faire, soit par une dimérisation entre l'EGFR et HER3 soit directement sur l'EGFR grâce à la sous-unité p85 qui correspond au site d'ancrage et qui peut interagir avec la protéine GAB-1 directement sur l'EGFR.

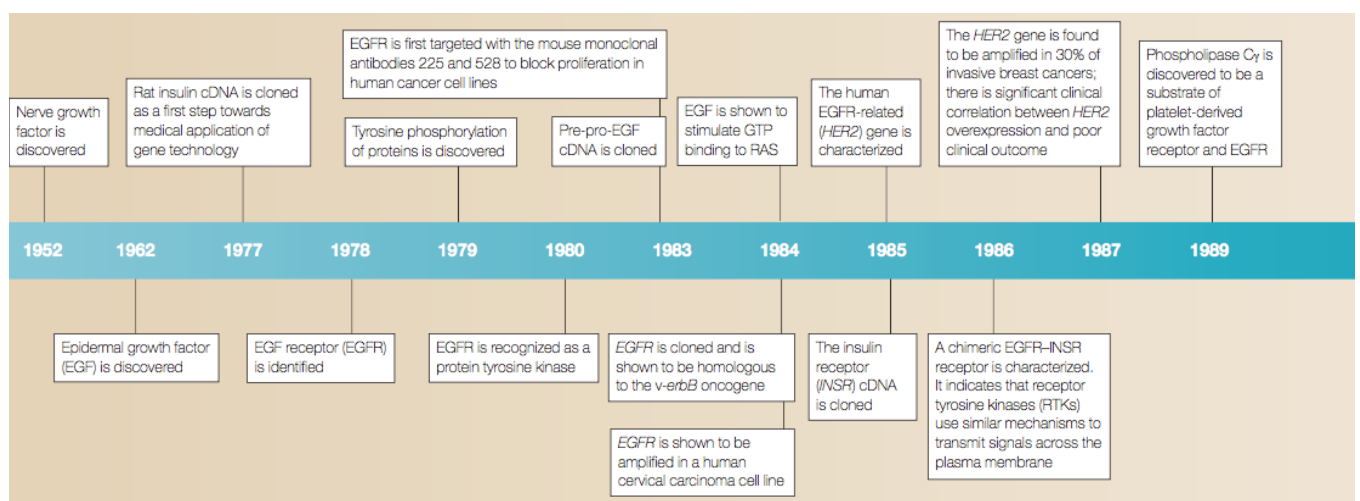
Cette voie est impliquée dans la croissance cellulaire, l'invasion et la migration mais également dans la résistance à la mort cellulaire par apoptose (*Figure 65*) (Scaltriti and Baselga, 2006).

Troisièmement, la voie des transducteurs et activateurs de signaux de transcription : les protéines STAT (notamment STAT3 impliquée dans de nombreux cancers). Ces protéines interagissent *via* leurs domaines d'homologie 2 Src et après dimérisation avec les résidus phospho-tyrosines, il se produit alors un déplacement vers le noyau pour générer l'expression de certains gènes (*Figure 65*) (Scaltriti and Baselga, 2006).

Enfin, quatrièmement, la voie de la kinase Src, qui s'intègre dans une famille de 9 gènes de tyrosine kinases non réceptrices impliquée dans la prolifération, la migration, l'adhésion, l'angiogénèse ou encore la fonction immunitaire. La protéine Src est située dans le cytosol et permet notamment d'activer PI3K ou encore les protéines STAT. Src présente un rôle de transducteur et d'amplificateur de signal pour l'EGFR mais elle est également impliquée dans la résistance aux thérapies visant l'EGFR par activation ou association à d'autres récepteurs (*Figure 65*) (Scaltriti and Baselga, 2006).

▲ Résistances aux thérapies anti-EGFR

Grâce à cette description détaillée de la famille des ErbB et plus spécifiquement de l'EGFR, il est aisé de comprendre que ces derniers sont impliqués dans les processus de cancérisation mais également de résistance aux traitements. Ces affirmations sont le fruit de plusieurs dizaines d'années de recherche qui sont résumées avec la figure qui suit (*Figure 66*) (Gschwind et al., 2004).



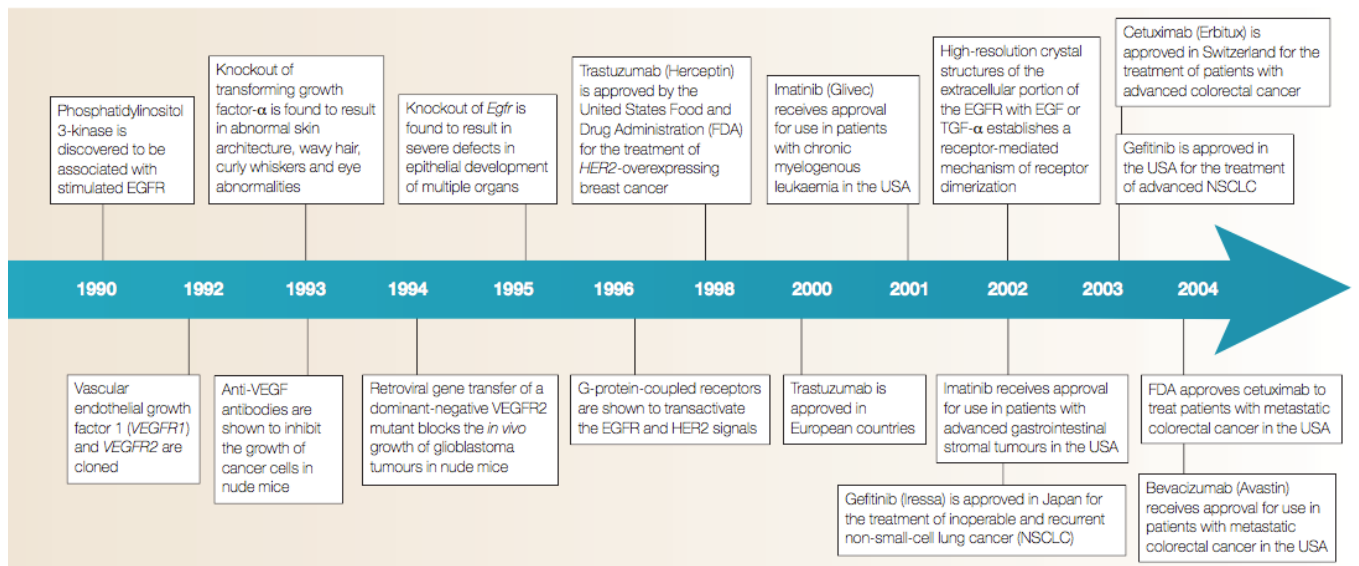


Figure 66 : Découvertes sur la transduction du signal des récepteurs tyrosine kinases et la thérapie des cancers (Gschwind et al., 2004)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

Les récepteurs ErbB ont fait l'objet de nombreuses études quant à leur implication dans la cancérogénèse. Ainsi, l'EGFR est décrit comme ayant un lien direct avec le développement de cancers notamment dans les gliomes, les cancers du sein, du poumon ou encore des ovaires. En effet, une surexpression de l'EGFR est observée dans de nombreux cancers et notamment dans les carcinomes épidermiques où l'EGFR est surexprimé 25 fois. De plus, il a été démontré le possible réarrangement structurel avec la présence de variants caractérisés par des délétions et des mutations ponctuelles entraînant une augmentation de l'activité tyrosine-kinase du récepteur, l'une des plus décrites correspond au variant EGFR III caractérisé par la perte des exons 2 à 7 provoquant ainsi un réarrangement génétique ou un épissage alternatif de l'ARN messenger (Gschwind et al., 2004) - (Hynes and Lane, 2005).

Parmi les résistances aux traitements anti-EGFR décrites, il y a celles des thérapies ciblant les tyrosine-kinases. En effet, il peut se produire une régulation de la signalisation de l'EGFR, de MET, du récepteur de facteur de croissance I analogue à l'insuline (IGF-IR : insulin-like growth factor 1 receptor) ou encore de l'ErbB3, étant donné que la Cav1 *via* la cavine et le récepteur orphelin 1 de type tyrosine kinase (ROR1 : *receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1*) permet l'internalisation de ces récepteurs et le transit intracellulaire par le cytosquelette.

ROR1 permet donc l'interaction entre la cavine et la Cav1 et l'ensemble favorise la formation des *caveolae* et donc la transmission des signaux intracellulaires (*Figure 67*) (Yamaguchi et al., 2016) - (Yamaguchi et al., 2019).

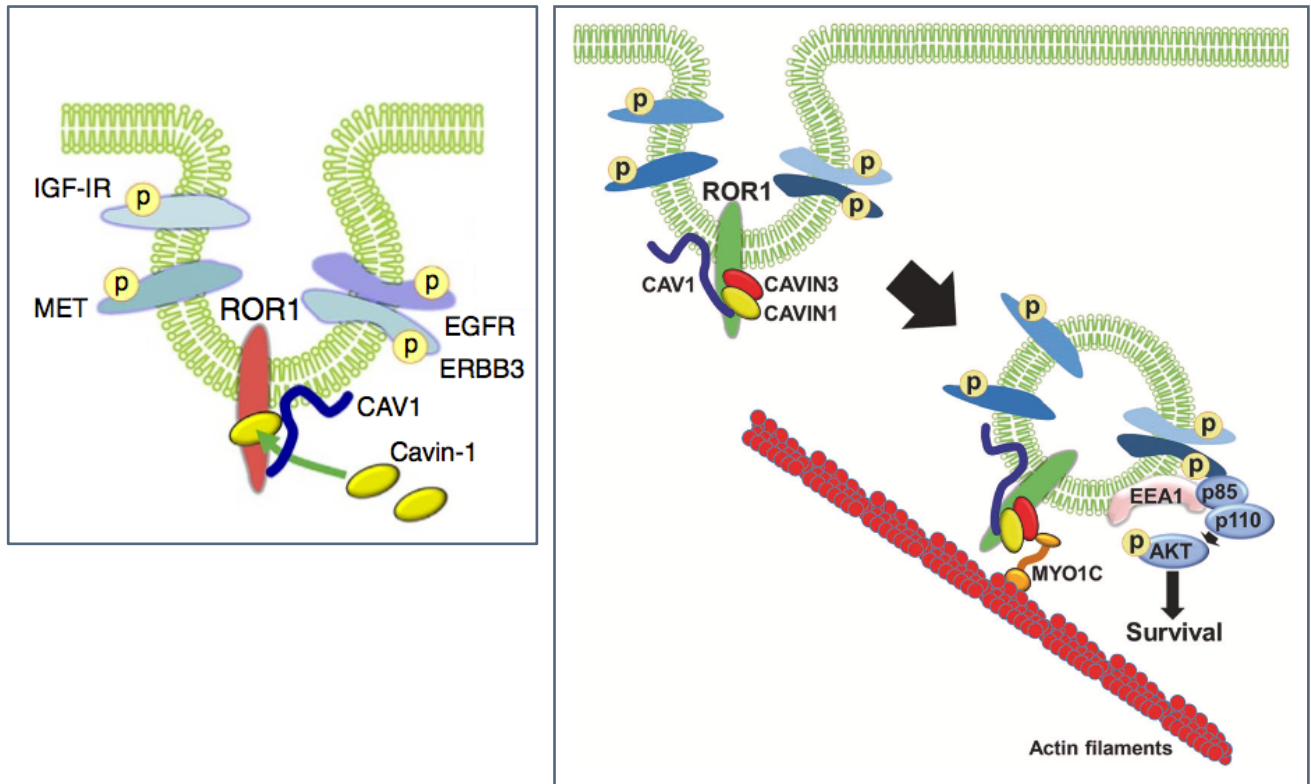


Figure 67 : Implication du récepteur orphelin 1 de type tyrosine kinase dans la formation des cavéoles et la transmission des signaux intracellulaires (Yamaguchi et al., 2016) (Yamaguchi et al., 2019)

Articles accessibles *via* l'Université de Strasbourg.

De plus, la Cav1 peut également séquestrer l'EGFR au niveau de la membrane au sein des radeaux lipidiques et donc empêcher son internalisation et son activité transcriptionnelle (Overmiller et al., 2016).

L'implication de la Cav1 dans les points de résistances aux traitements anti-tumoraux a des conséquences sur le pronostic des tumeurs des patients qui peuvent alors rechuter soit de manière locorégionale soit par des métastases à distance. Dans la suite de ce manuscrit, il est donc question de mettre en avant les pistes évoquées dans la littérature pour favoriser la sensibilisation des cellules résistantes et ce par le biais de l'activation de certaines morts cellulaires programmées en lien avec l'expression de la Cav1.

5) Rôle de la cavéoline-1 dans la régulation des morts cellulaires programmées impliquées dans la résistance aux traitements anti-tumoraux

Dans la suite de ce manuscrit, nous proposons de traiter deux morts cellulaires programmées, à savoir l'autophagie d'une part et la ferroptose d'autre part.

a- Autophagie

C'est à partir des années 60 que les termes *lysosome* et *autophagie* voient le jour grâce aux recherches de Christian de Duve (de Duve et al., 1955). L'étymologie du mot autophagie vient du grec : « *se nourrir soi-même* ». Il s'agit d'un processus adaptatif en réponse à des stimuli de stress, tels que la privation de nutriments (par exemple détectée par le ratio ATP:AMP), l'épuisement des facteurs de croissance, les infections, le stress du RE ou encore un contexte hypoxique. De plus, l'autophagie apparaît également comme sélective et cytoprotectrice puisqu'elle permet l'élimination d'un matériel cytosolique indésirable voire dangereux comme des cellules endommagées, des agrégats de protéines, des virus ou encore des bactéries (Dikic and Elazar, 2018). Dans la version 2018 de la *Nomenclature Committee on Cell Death*²² (NCCD), l'autophagie est définie comme une mort cellulaire programmée généralement activée suite à un stress afin d'aboutir à des effets cytoprotecteurs (Galluzzi et al., 2018).

D'un point de vue mécanistique (*Figure 68 – page 133*), l'autophagie est induite par le recrutement de protéines liées à l'autophagie ou ATG au niveau d'un emplacement subcellulaire correspondant au site d'assemblage du phagophore pour former la structure pré-autophagosomale (PAS = *pre-autophagosomal structure*) (Dikic and Elazar, 2018). En effet, en condition de stress, le complexe d'initiation ATG1 / ULK1 (Unc-51-like kinase 1) est formé. Il entraîne alors la nucléation du phagophore par phosphorylation des composants du complexe I : PI3K de classe III (PI3KC3).

Ce complexe est alors composé de PI3KC3, de VPS34, de Beclin-1, de l'ATG14, de la molécule d'activation de la protéine 1 d'autophagie régulée par la Beclin-1 (AMBRA1) et du facteur général de transport vésiculaire ou p115.

²² NCCD vise à unifier les critères de définition des morts cellulaires.

Le complexe peut dynamiser la production locale de PI3P au niveau de l'omégasome qui se situe sur le RE. Le PI3P peut ensuite recruter les protéines effectrices du PI3P que sont les protéines d'interaction avec le phosphoinositide du domaine répété WD ou WIPIs (ici, WIPI2) et la protéine 1 contenant le domaine FYVE à doigts de zinc ou DFCP1. Ce recrutement se fait à destination du l'omégasome par interaction avec leurs domaines de liaison à la PI3P.

L'induction de l'autophagie entraîne la nucléation d'une membrane d'isolement qui forme alors une structure en forme de coupe appelée phagophore. Pour ce faire, WIPI2 se lie directement à l'ATG16L1 pour le recrutement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1. Cette liaison renforce la conjugaison médiée par l'ATG3 des protéines de la famille ATG8, y compris les protéines de la chaîne légère 3 ou LC3 associées aux microtubules. La réaction de conjugaison permet la conversion de LC3-I en LC3-II, cette dernière étant la signature des membranes autophagiques. De plus, les membres de la famille des ATG8 sont nécessaires à l'allongement et à la fermeture de la membrane du phagophore. En effet, la membrane s'allonge de plus en plus ce qui provoque une expansion du phagophore qui forme ensuite une sphère autour d'une partie du cytosol.

Enfin, la membrane constitue une vésicule nommée autophagosome qui présente en son sein du matériel cytosolique correspondant à la cargaison autophagique. C'est la protéine LC3 qui est impliquée dans la séquestration d'une cargaison au sein de l'autophagosome grâce à des récepteurs de cargaison contenant des régions d'interaction avec LC3. Cette protéine apparaît donc comme un marqueur spécifique de l'autophagie. De plus, la protéine p62 présente au niveau du site de formation de l'autophagosome est capable d'interagir directement avec LC3 pour son incorporation au sein de l'autophagosome dans un but de dégradation. Ainsi, p62 peut être considérée comme un marqueur de l'autophagie, car son accumulation signe une diminution du processus de mort cellulaire par autophagie (Rikiishi, 2012). L'autophagosome chemine ensuite vers le lysosome grâce aux microtubules, une fois atteint, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le lysosome pour ainsi former l'autolysosome. Le corps autophagique à membrane unique est ainsi dégradé (*Figure 68*) (Abada and Elazar, 2014) - (Mizushima and Komatsu, 2011) - (Dikic and Elazar, 2018).

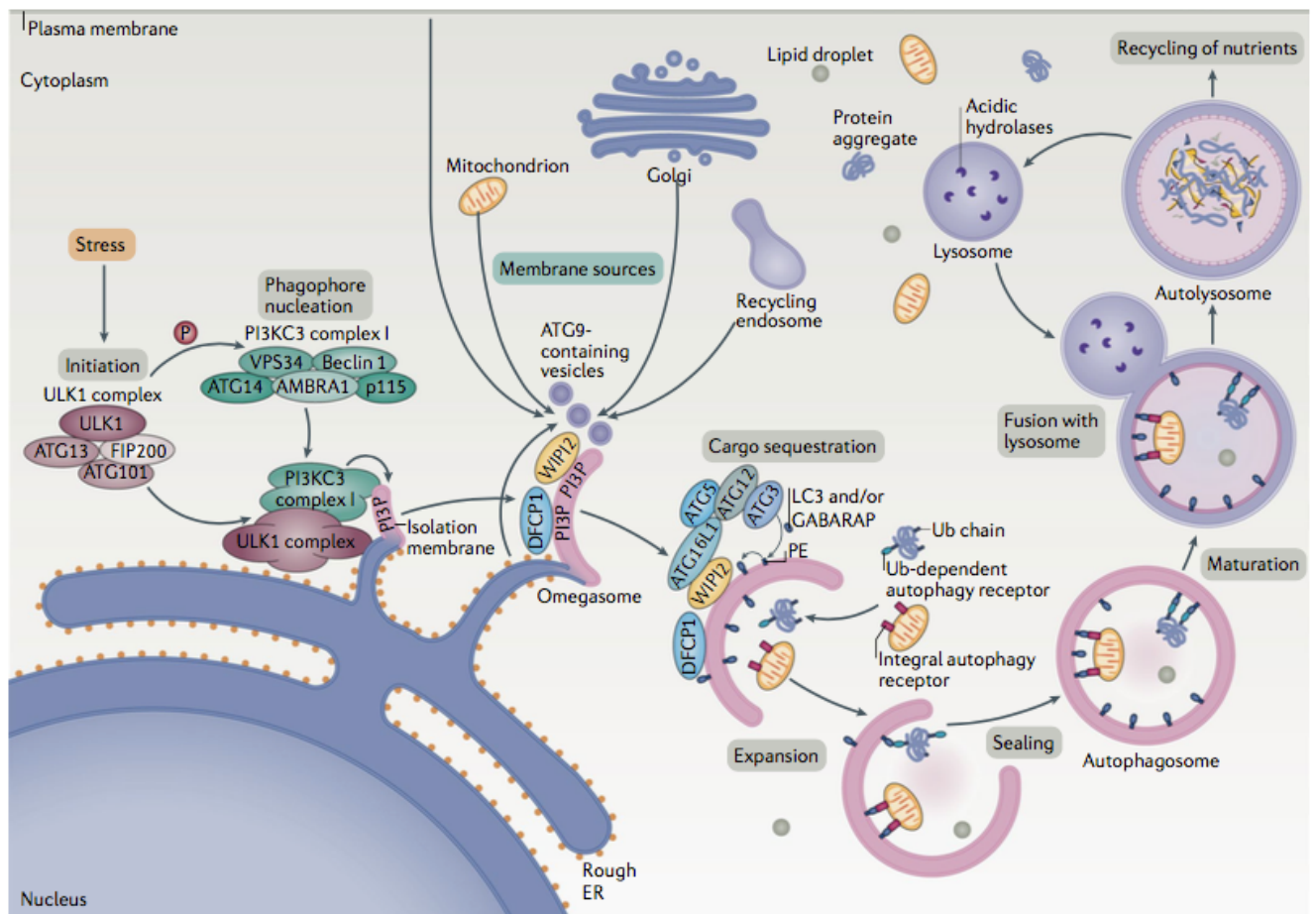


Figure 68 : Mécanistique de la mort cellulaire programmée par autophagie (Dikic and Elazar, 2018)

Article accessible via l'Université de Strasbourg.

▲ Régulation de l'autophagie

Comme tout processus cellulaire, l'autophagie peut être modulée.

D'une part, elle peut être régulée négativement par l'intermédiaire de différents effecteurs notamment dans des conditions riches en nutriments, cette régulation peut se faire au moyen de mTOR. En effet, ce modulateur peut interagir avec l'ATG13, qu'il phosphoryle sur plusieurs résidus sérine, cette phosphorylation permet la réduction d'ULK1 mais également son activation et donc l'autophagie (Kamada et al., 2000). De plus, les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) sont là encore des régulateurs négatifs de l'autophagie. En effet, elles ont la capacité de se lier au domaine BH3 présent au niveau de la Beclin-1 inhibant ainsi son activité et donc l'autophagie (Patingre et al., 2005) - (Maiuri et al., 2007). D'autre part, cette mort cellulaire peut être régulée positivement par exemple lors d'une augmentation du niveau de calcium au sein du cytosol.

En effet, l'activation de l'autophagie résulte alors de la kinase- β calcium / calmoduline-dépendante et de l'AMPK qui permettent l'inhibition de mTOR (Høyer-Hansen et al., 2007) associée à une activation de l'ATG1 par l'AMPK (Egan et al., 2011) - (Kim et al., 2011) - (Lin and Baehrecke, 2015).

▲ Autophagie et cancers

L'autophagie est impliquée dans l'initiation et la progression des tumeurs mais son rôle reste contradictoire. En effet, elle peut favoriser la formation de tumeurs par le recyclage intracellulaire afin de fournir des substrats pour la survie des cellules tumorales en raison notamment d'un stress métabolique. Néanmoins, il existe également un rôle de l'autophagie dans la suppression des tumeurs. Par exemple, l'expression de l'ATG5 est fréquemment régulée à la baisse dans les mélanomes primaires ce qui va de pair avec une survie sans progression réduite (Liu et al., 2013) - (Lin and Baehrecke, 2015).

De plus, il existe également un lien récemment décrit entre l'expression de la Cav1 et l'activation de l'autophagie. Ainsi, il a été démontré qu'une diminution de l'expression de cette protéine est corrélée à une activation importante de l'autophagie dans les cancers du sein (Shi et al., 2015). En parallèle, cette mort cellulaire est inhibée dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires par implication de la Cav1 (Liu et al., 2016).

En raison des intrications entre l'autophagie et le cancer, il n'est pas surprenant que cette mort cellulaire soit ciblée par des agents anticancéreux. L'induction thérapeutique de cette mort peut être réalisée par la modulation de ses régulateurs, à commencer par mTOR. En effet, un traitement par de la rapamycine (inhibiteur de mTOR) entraîne l'activation d'ATG1 / ULK1 et conduit donc au processus d'autophagie.

Ainsi, des effets antitumoraux *in vivo* ont été démontrés dans des tumeurs pulmonaires murines (Granville et al., 2007) mais également dans des lignées cellulaires de cancers du sein (Seront et al., 2013). De plus, certaines études ont pu mettre en évidence des effets thérapeutiques accrus lors de la combinaison d'un traitement inhibiteur de mTOR et de la radiothérapie (Nam et al., 2013). Enfin, d'autres études ont mis en avant l'intérêt de la combinaison d'un inhibiteur de mTOR et de la chloroquine. Cette dernière provoque la diminution de la fusion autophagosome-lysosome ce qui entraîne l'accumulation de la cargaison autophagique toxique sans pour autant pouvoir la dégrader par le lysosome ce qui conduit à la mort de la cellule (Yang et al., 2011).

D'autre part, un autre régulateur peut encore être ciblé, il s'agit de l'AMPK. Ainsi, la metformine (inhibiteur du complexe I de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons) entraîne la diminution de la production d'ATP et donc l'augmentation des niveaux d'AMP, la fluctuation de ce ratio provoque l'activation de l'AMPK et donc l'induction de l'autophagie. Il a été démontré dans une étude *in vivo* sur le cancer du poumon induit par le tabac chez les rongeurs que la metformine réduit la tumorigénèse (Memmott et al., 2010).

Enfin, une autre étude a mis en avant l'intérêt de la combinaison de la chimiothérapie et de la metformine afin d'obtenir une réponse thérapeutique antitumorale accrue dans les cellules de cancers du sein en comparaison à un traitement par chimiothérapie ou metformine seule (Liu et al., 2012) - (Lin and Baehrecke, 2015).

A l'inverse, certaines études démontrent que l'autophagie peut intervenir comme un mécanisme de survie cellulaire protecteur contre les stress environnemental et cellulaire, et donc favoriser la résistance aux thérapies anticancéreuses. Tout d'abord, la résistance face aux rayonnements ionisants peut être médiée par l'activation de l'autophagie protectrice. Il a ainsi été démontré qu'un pré-traitement des lignées cellulaires de cancers du sein au moyen de la 3-méthyladenine (3-MA) ou de la chloroquine (inhibiteurs de l'autophagie) conduit à la réduction de la survie clonogénique (Chaachouay et al., 2011).

Ensuite, la résistance au cisplatine observée par exemple dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain est corrélée à une autophagie importante. En effet, lorsque de la 3-MA est administrée, l'autophagie est inhibée et la résistance au cisplatine est levée (Ren et al., 2010). L'inhibition de l'autophagie peut donc apparaître comme une stratégie pertinente de sensibilisation des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par la radio- et la chimiothérapie (Rikiishi, 2012).

Enfin, une résistance aux traitements anti-EGFR (inhibiteurs de l'EGFR-tyrosine kinase et anticorps anti-EGFR) dans les cancers du poumon non à petites cellules a été décrite en lien avec l'autophagie. En effet, les traitements anti-EGFR peuvent induire cette mort cellulaire par inhibition de l'activation de mTOR. Ainsi, lors d'un traitement au moyen de l'erlotinib dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, l'autophagie protectrice est activée ce qui confère aux cellules une résistance à cette thérapie (Sobhakumari et al., 2013). De plus, lors d'un traitement des cellules cancéreuses de l'ovaire par l'AG1478 (inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR), il se produit une résistance à la thérapie (Yang et al., 2015).

Aussi, un traitement par de l'osimertinib (inhibiteur de la tyrosine kinase de l'EGFR de troisième génération) dans les cancers du poumon non à petites cellules peut conduire à une activation de l'autophagie entraînant une résistance (Tang et al., 2017) - (Kwon et al., 2019). In fine, l'anticorps monoclonal ciblant l'EGFR : le cétuximab est perçu par les cellules des cancers de la tête et du cou comme un signal de stress activant donc l'autophagie. Celle-ci peut alors expliquer la résistance observée à cette thérapie chez certains patients d'où l'intérêt prometteur de l'association de cet anticorps avec des agents inhibant l'autophagie (Rikiishi, 2012).

Il existe une réelle intrication entre les processus de morts cellulaires programmées, ainsi l'autophagie peut être liée à l'apoptose, à la ferroptose, à la nécroptose, à la pyroptose ou encore à la mitophagie²³ (Raudenská et al., 2021). Dans ce manuscrit, seules les intrications entre l'autophagie et l'apoptose ainsi celles entre l'autophagie et la ferroptose sont abordées.

▲ Autophagie et apoptose

Dans ce cas, cette intrication est médiée par les caspases qui sont capables d'interagir avec différents effecteurs de l'autophagie tels que l'ATG3, l'ATG5, l'ATG16L1 afin de les réguler négativement et donc de bloquer le processus d'autophagie (Tsapras and Nezis, 2017). A l'inverse, dans le cas de la protéine Beclin-1, celle-ci est clivée par les caspases ce qui inactive l'autophagie mais dynamise l'apoptose par la libération de facteurs pro-apoptotiques par les mitochondries (Wirawan et al., 2010) et par l'activation de la caspase-9 (Furuya et al., 2005). De plus, cette intrication peut, par inhibition des protéines apoptotiques, faire basculer une réponse au stress cellulaire de la voie apoptotique par défaut vers l'autophagie (Raudenská et al., 2021).

²³ La **nécroptose** correspond à une mort cellulaire programmée « déclenchée par des perturbations de l'homéostasie extracellulaire ou intracellulaire qui dépend de façon critique de MLKL, RIPK3 et (au moins dans certains cas) de l'activité kinase de RIPK1 ». La **pyroptose** correspond à une mort cellulaire programmée « qui dépend essentiellement de la formation de pores dans la membrane plasmique par des membres de la famille des protéines gasdermines, souvent (mais pas toujours) à la suite d'une activation inflammatoire des caspases ». La **mitophagie** ou mort mitotique correspond à une « variante spécifique de la mort cellulaire programmée (le plus souvent, apoptose intrinsèque) entraînée par la catastrophe mitotique ». Ces définitions sont extraites de la version de 2018 de la *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD) (Galluzzi et al., 2018).

Il existe également une ambivalence de certaines caspases, comme la caspase-8 qui peut à la fois être activée par le complexe de signalisation induisant la mort cellulaire mais également par les autophagosomes *via* une liaison au récepteur de cargaison autophagique : p62 (Young et al., 2012). Dans les cancers de la tête et du cou, la pro-caspase 8 est fréquemment activée par ce dernier processus en raison d'une surexpression de c-FLIP (protéine inhibitrice endogène de l'apoptose induite par FAS) (X. Li et al., 2008), ce qui conduit à la formation d'un autophagosome sans pour autant aboutir à la dégradation de la cargaison dans les autolysosomes. Une autre ATG peut également interagir avec des protéines liées à l'apoptose, il s'agit de l'ATG12 qui par interaction avec BCL-2 et MCL-1 peut favoriser l'apoptose par action en amont sur les mitochondries (Rubinstein et al., 2011). Enfin, des cellules en cours d'apoptose peuvent exprimer des effecteurs de l'autophagie, tels que ULK-1 (Lindqvist et al., 2018) - (Raudenská et al., 2021).

▲ Autophagie et ferroptose

L'intrication de l'autophagie et de la ferroptose (mort cellulaire décrite dans la suite du manuscrit) réside dans la liaison de l'éristine (molécule activatrice de la ferroptose) et de la VDAC2 (protéine 2 de canal sélectif anionique dépendante de la tension) présente au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Cette liaison modifie alors la perméabilité de la membrane mitochondriale ainsi que la sélectivité ionique des canaux induisant un dysfonctionnement mitochondrial et *in fine* la libération de ROS favorisant la ferroptose (Yagoda et al., 2007). Enfin, l'éristine permet l'augmentation de l'expression de la protéine 2 de la membrane associée aux lysosomes (LAMP2 : *lysosomal-associated membrane protein 2*) ce qui favorise l'autophagie mais également la ferroptose. Cette dernière est étroitement liée à la ferritinophagie (dégradation autophagique de la ferritine). En effet, lors de l'inhibition de la ferritinophagie par blocage de l'autophagie cela inhibe l'accumulation de ROS et de fer labile intracellulaires (Gao et al., 2016) - (Galluzzi et al., 2018).

b- Ferroptose

Ce n'est qu'en 2003 qu'un nouveau type de mort cellulaire est observé par exposition des cellules à l'éristine employée alors pour provoquer la mort ciblée de cellules présentant une mutation oncogénique de RAS (Dolma et al., 2003).

Il faudra encore patienter près de 10 ans, pour qu'en 2012 le terme *ferroptosis* soit communiqué à la communauté scientifique par Scott J. Dixon et Brent Stockwell qui la décrivent comme une mort cellulaire non apoptotique induite par l'éraستine et dépendante du fer (*Figure 69*) (Dixon et al., 2012) - (Stockwell et al., 2017).

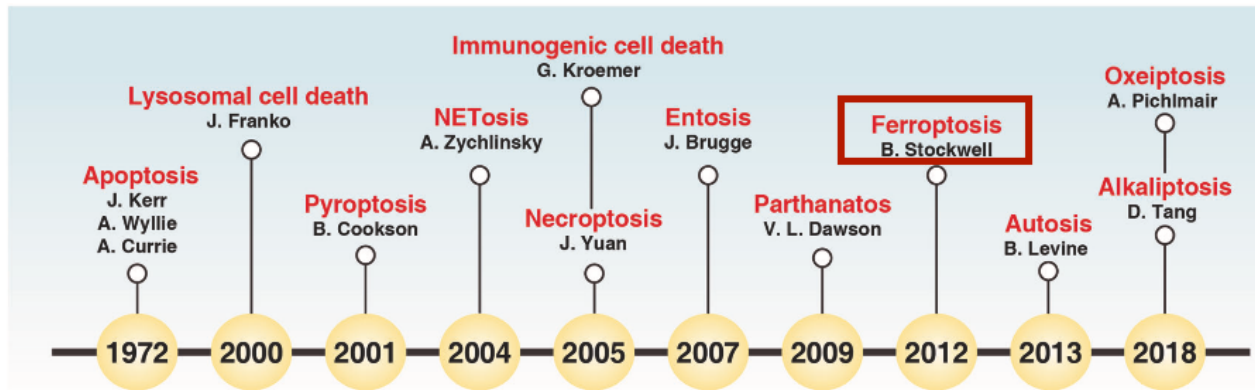


Figure 69 : Historique des découvertes des morts cellulaires de 1978 à 2018 (Tang et al., 2019)

Et c'est seulement en 2018 que la ferroptose est officialisée et définie d'un point de vue morphologique, biochimique et fonctionnel dans la NCCD comme étant une « *forme de mort cellulaire régulée initiée par des perturbations oxydatives du microenvironnement intracellulaire qui est sous le contrôle constitutif de GPX4 et peut être inhibée par des chélateurs du fer et des antioxydants lipophiles²⁴* ». (Galluzzi et al., 2018)

▲ Mécanistique de la ferroptose

La ferroptose est initiée par des perturbations du microenvironnement cellulaire caractérisées par une peroxydation des lipides en raison de la présence de ROS et par une présence importante de fer.

D'une part, l'accumulation des ROS lipidiques (*Figure 70*) est dépendante du fer et peut résulter d'une peroxydation lipidique non enzymatique trouvée également sous le terme d'auto-oxydation lipidique. Il s'agit alors d'une réaction en chaîne sous l'impulsion de radicaux libres, où les ROS initient l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI). Cette réaction en chaîne peut toucher l'ensemble de la membrane plasmique et entraîner la mort de la cellule.

²⁴ Définition traduite directement à partir du document *Molecular mechanisms of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018* (Galluzzi et al., 2018).

Une autre possibilité existe, il s'agit de la peroxydation lipidique enzymatique *via* les lipoxygénases (LOX) ou par des COX, qui permettent l'insertion d'oxygène dans les AGPI aboutissant alors à la formation d'hydroperoxydes lipidiques (LOOH) qui sont capables d'initier le processus d'auto-oxydation décrit ci-dessus. Par exemple, l'oxydation de l'AA *via* la voie catalytique fait intervenir diverses protéines dont le membre 4 de la famille des acyl-CoA synthétases à longue chaîne (ACSL4), la lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3), les arachidonates lipoxygénases (ALOX, notamment ALOX15).

D'autre part, l'implication du fer (*Figure 70*) dans la ferroptose trouve son explication dans la capacité de ce métal lourd à favoriser l'oxydation non enzymatique des lipides grâce à la réaction chimique lysosomale de *Fenton* dépendante du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'accumulation du fer est possible grâce à deux phénomènes en parallèle, à savoir d'une part, la captation du fer par le récepteur de la transferrine également trouvé sous les termes TFR ou TFR1 (*transferrin receptor 1*) et d'autre part, la réduction de l'exportation du fer par la ferroportine.

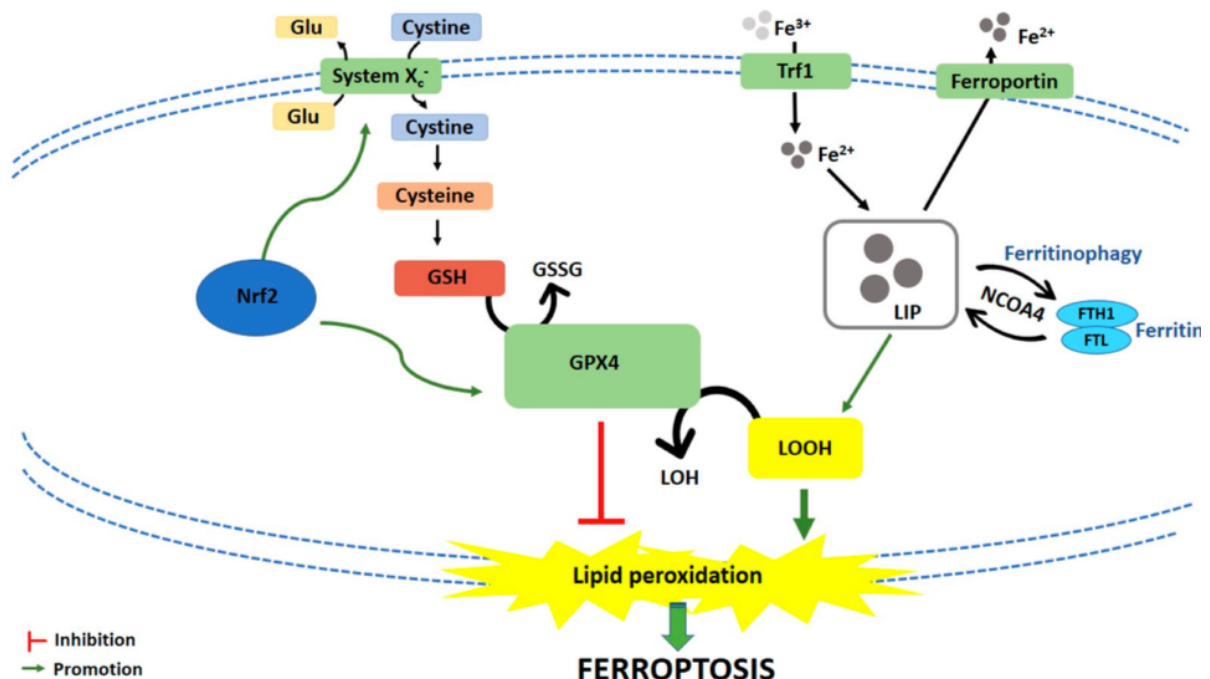


Figure 70 : Mécanismes impliqués dans le processus de mort cellulaire par ferroptose (Greco et al., 2021)

« Glu : Glutamate, GSH : Glutathione, GSSG : Oxidized glutathionne, GPX4 : Glutathione peroxidase 4, LOH : Lipid alcohols, LOOH : Lipid hydroperoxides, Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Trf1 : Transferrin receptor 1, LIP : Labile iron pool, FTH1 : Ferritin heavy chain 1, FTL : Ferritin light chain, NCOA4 : Nuclear receptor coactivator », d'après la légende de la figure issue de la revue de (Greco et al., 2021).

Ainsi, le déclenchement de la ferroptose réside dans la balance entre la production de ROS induite par l'accumulation de fer et le système antioxydant qui empêche la formation de lipides peroxydés. Il est à noter que d'autres systèmes antioxydants sont susceptibles d'intervenir mais dans une moindre mesure, notamment le facteur nucléaire (dérivé érythroïde 2)-like 2 (NFE2L2 ou NRF2), ou encore des protéines du choc thermique (HSP : *Heat shock proteins*) (Dixon et al., 2012) - (Galluzzi et al., 2018) - (Tang et al., 2019) - (Greco et al., 2021)

Néanmoins, ce qui reste à confirmer concerne les processus qui conduisent de la peroxydation des lipides vers la mort cellulaire par ferroptose. Dans la littérature, deux mécanismes sont avancés. Premièrement, il est possible que les LOOH favorisent la formation de réactifs aldéhydes toxiques, tels que le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) ou encore le malondialdéhyde (MDA) qui peuvent inactiver les protéines par réticulation. Secondement, un autre mécanisme est proposé, celui de la génération intense de peroxydes lipidiques entraînant des modifications structurelles et fonctionnelles de la membrane plasmique, à savoir : un amincissement de celle-ci et l'augmentation de sa courbure favorisant alors l'accès aux oxydants qui aboutit *in fine* à la déstabilisation de la membrane et à la formation de pores et de micelles. Des études complémentaires sont nécessaires afin de trancher la question (Dixon et al., 2012) - (Galluzzi et al., 2018) - (Tang et al., 2019) - (Greco et al., 2021).

Différents agents permettent de moduler la ferroptose soit en l'induisant soit en l'inhibant. En effet, elle peut être activée par divers moyens, soit en ciblant directement la GPX4 (glutathion peroxydase 4) soit en impactant le cycle catalytique de la GPX4 par l'inhibition du système antiport nommé système x_c^- qui est composé d'une sous-unité régulatrice SLC3A2 et d'une sous-unité catalytique SLC7A11. Ce système est responsable du transport intracellulaire de la cystine extracellulaire par un échange avec le glutamate intracellulaire. La cystine ainsi intracellulaire est alors réduite en cystéine afin de générer du glutathion (GSH). A l'inverse, elle peut être inhibée par certaines molécules, telles que les ferrostatines, ou encore la GPX4. Une autre molécule est également connue pour activer la ferroptose, il s'agit de la metformine dont le mécanisme d'action est traité dans la suite du manuscrit. De plus, certaines molécules utilisées dans la prise en charge des cancers sont désormais connues comme ayant un lien avec la ferroptose. Notamment le sorafenib décrit comme déclenchant la ferroptose par inhibition du système x_c^- ou encore l'altretamine (agent alkylant) connu pour son activité inhibitrice de la GPX4.

▲ La ferroptose et le cancer

Par cet exposé, il est aisé de percevoir l'implication potentielle de la ferroptose dans un contexte de pathologies. En effet, ce processus de mort cellulaire est déjà mis en évidence dans les troubles neurodégénératifs (exemple des maladies d'Alzheimer et de Parkinson), dans les troubles de surcharge en fer, dans des lésions cérébrales traumatiques mais également dans la cancérogénèse (Stockwell et al., 2017).

La ferroptose a d'ores et déjà été mise en évidence dans certains cancers. Prenons un premier exemple, celui du cancer du sein triple négatif qui est caractérisé par une dépendance à la glutamine. Ce phénomène s'explique notamment par la capacité des cellules à accentuer l'absorption de la cystine au moyen de l'antiport x_c^- qui peut alors se présenter comme une piste de cible thérapeutique. Nous pouvons ajouter un second exemple, celui du cancer colorectal, où la protéine suppressive de tumeur (p53) ainsi que la protéine BRCA1 peuvent réguler de manière négative, par des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques, la SLC7A11 afin d'entraîner un phénomène de mort cellulaire par ferroptose. La protéine p53 peut à elle seule, au contraire, empêcher la ferroptose par inhibition de l'activité enzymatique de la glycoprotéine membranaire dipeptidyl peptidase 4 (DPP4 ou CD26) ou par augmentation de l'inhibiteur 1A de la kinase cycline-dépendante (CDKN1A, p21) qui agit comme un régulateur du cycle cellulaire (Tang et al., 2019).

Enfin, en ce qui concerne les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, un lien avec la ferroptose a également été démontré (*Figure 71*) (Raudenská et al., 2021). En effet, certaines cellules de cancers des VADS présentent une surexpression du récepteur de transferrine 1 responsable de l'absorption cellulaire du fer (TFRC1) (Shan et al., 2008) - (Järvinen et al., 2006) dont le gène se situe dans la région génomique 3q29 souvent amplifiée dans ces cancers. Cette surexpression est à mettre en parallèle avec une expression moindre de la ferroportine (Lenarduzzi et al., 2013) qui permet l'efflux de ce métal, ainsi les cellules présentent une concentration intracellulaire de fer importante. De plus, la protéine p53 est capable d'empêcher l'expression de la sous-unité SLC7A11 du système x_c^- sensibilisant donc les cellules à la ferroptose, certaines formes mêmes mutées de p53 peuvent entraîner une résistance à l'apoptose ou encore à la sénescence sans pour autant empêcher l'induction de la ferroptose (Jiang et al., 2015). D'autres articles établissent également que les cancers ORL présentent souvent une glutaminolyse exacerbée permettant donc de dégrader intensément la glutamine en glutamate.

Pour ce mécanisme, deux enzymes sont nécessaires : la glutaminase-1 (GLS1) et la glutaminase-2 (GLS2) dont la GLS2 est décrite comme suppresseur de tumeur car elle intervient dans la ferroptose alors que la GLS1 est plutôt considérée comme un oncogène (Gao and Jiang, 2018).

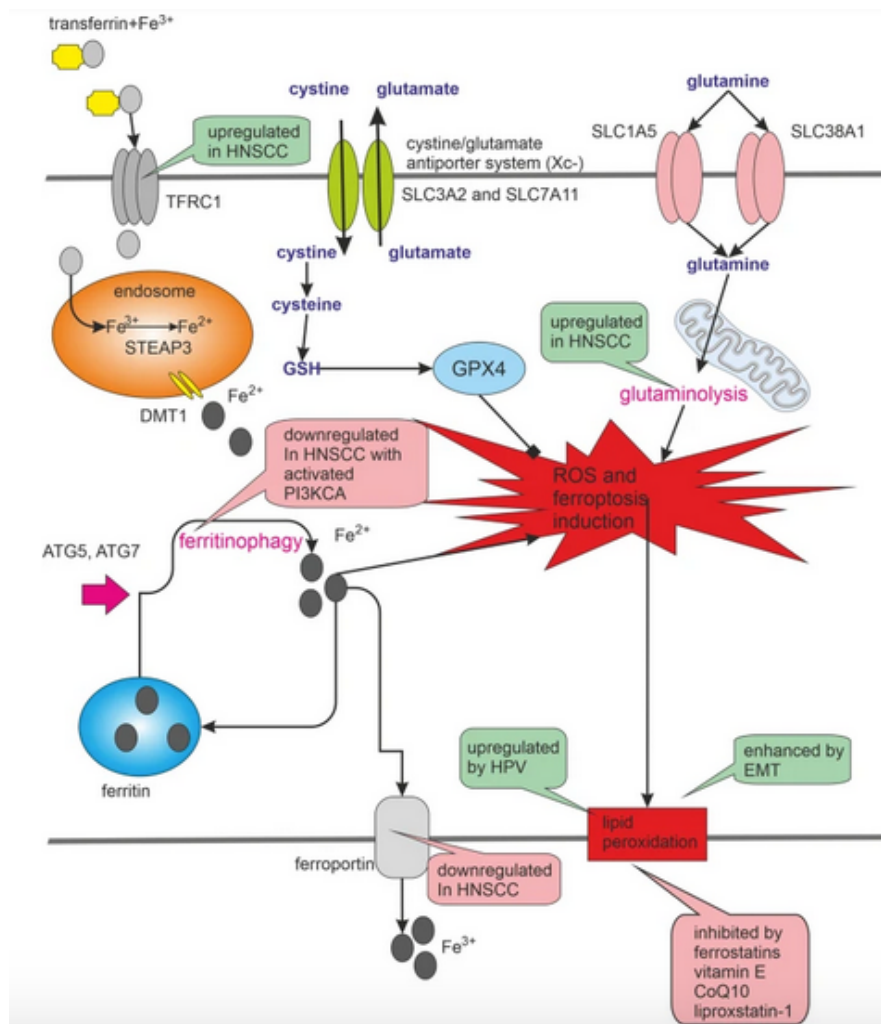


Figure 71 : Mécanismes intervenant dans la mort cellulaire par ferroptose dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Raudenská et al., 2021)

Enfin des travaux récents de l'équipe de Lu *et al.* en 2021 ont permis de mettre en évidence un lien entre l'expression de la Cav1 et la ferroptose dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

En effet, après avoir interrogé la base de données FerrDb²⁵ qui indique que la Cav1 est une protéine suppresseur de la ferroptose, ils se sont intéressés de plus près à son implication dans les cancers des VADS. Ainsi, ils ont pu mettre en exergue que la surexpression de la Cav1 inhibe la ferroptose favorisant ainsi un phénotype agressif avec notamment une accentuation de la prolifération cellulaire. Dans cette étude, ils proposent que le niveau d'expression de la Cav1 soit établi chez les patients atteints d'un cancer de la tête et du cou afin de préférer un traitement anticancéreux adapté. Ainsi, lorsque la tumeur présente un niveau d'expression faible de Cav1 cela aura potentiellement un effet d'activation de la mort cellulaire par ferroptose (Lu et al., 2022).

En définitive, la ferroptose apparaît comme un processus pouvant être ciblé dans la prise en charge thérapeutique des cancers en la favorisant. Plusieurs articles scientifiques traitent de la question et nous proposons d'en évoquer certains dans la suite de ce manuscrit.

Commençons par le cancer colorectal KRAS muté, où l'une des prises en charge thérapeutique consiste en l'utilisation du cétuximab. Néanmoins, l'efficacité de ce traitement est limitée et entraîne donc des rechutes. Dans l'étude de Yang *et al.*, ils ont décidé de réaliser une bithérapie associant le cétuximab et la molécule de RSL3 permettant ainsi de conclure que le cétuximab renforce les effets cytotoxiques de la molécule de RSL3 en dynamisant la ferroptose par inhibition de Nrf2 / HO-1 (Figure 72) (Jiawen Yang et al., 2021).

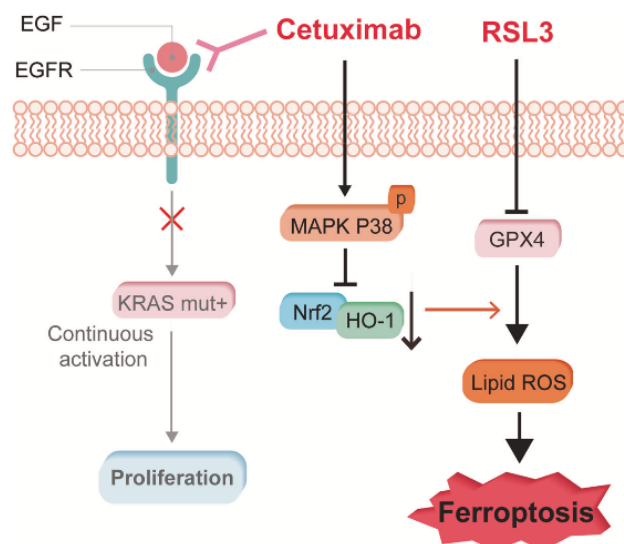


Figure 72 : Mécanisme de la ferroptose induite par le RSL3 et renforcée par le cétuximab (Jiawen Yang et al., 2021)

²⁵ FerrDb correspond à une base de données mondiales qui regroupent les gènes et substances répertoriés comme régulant la ferroptose (activation ou inhibition) mais également les liens établis avec certaines maladies.

Ensuite, la metformine a été décrite comme activatrice de la ferroptose dans le cancer du sein par les travaux de Yang *et al.* en 2021 où cette molécule limite la croissance des cellules cancéreuses (Jingjing Yang et al., 2021). L'implication de la metformine dans la prise en charge du cancer est connue depuis plusieurs années, les résultats de ces recherches sont regroupés au sein d'une revue proposée par l'équipe de Pernicova *et al.* Ainsi, dès 2005, un lien est établi entre l'administration de metformine et la réduction de l'incidence du cancer. De plus, en 2010, un essai clinique permet de mettre en avant une réduction de 40% du risque de développer un cancer lorsque les patients, présentant un diabète de type 2, sont pris en charge par un traitement à base de metformine (Pernicova and Korbonits, 2014).

D'autres articles étayaient encore ce discours. Premièrement, les travaux d'Hosono *et al.* arrivent à la conclusion que les patients atteints d'un cancer colorectal et traités par la metformine ne présentent plus de formation de cryptes aberrantes (Hosono et al., 2010).

Deuxièmement, chez des femmes atteintes d'un cancer du sein et traitées par metformine, celles-ci présentent une diminution du marqueur de prolifération cellulaire, KI67 (Hadad et al., 2011).

Troisièmement, en 2019, l'équipe de Wu *et al.* indique qu'un traitement par la metformine peut agir directement sur les cellules initiatrices du cancer et empêcher la progression de celui-ci dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (X. Wu et al., 2019). Néanmoins, c'est l'article de Yang *et al.*, en 2021, qui constitue la première démonstration de l'implication de la metformine dans un processus de ferroptose à visée anticancéreuse. En effet, grâce à leur étude sur les cancers du sein, ils mettent en évidence une augmentation des niveaux intracellulaires de fer et de ROS lipidiques et esquissent des explications mécanistiques. Ainsi, il semblerait que la metformine perturbe la stabilité de la sous-unité SLC7A11, un des composants du système antiport x_c^- en inhibant le processus d'UFMylation²⁶ conduisant à la ferroptose (*Figure 73*) (Jingjing Yang et al., 2021).

²⁶ UFMylation est un processus de modifications post-traductionnelles des protéines au même titre que l'ubiquitination. Ce processus, dépendant du modificateur de pliage de l'ubiquitine ou UFM1 qui se conjugue à la protéine cible, fait intervenir 3 enzymes. Tout d'abord, l'enzyme 5 de modification et d'activation de l'ubiquitine (UBA5) active l'UFM1 suivit de l'enzyme 1 de conjugaison de l'UFM1 (UFC1) qui permet de transférer l'UFM1 au site actif et enfin la ligase 1 spécifique de l'UFM1 (UFL1) permet de reconnaître le substrat et de le lier à l'UFM1 (Wei and Xu, 2016).

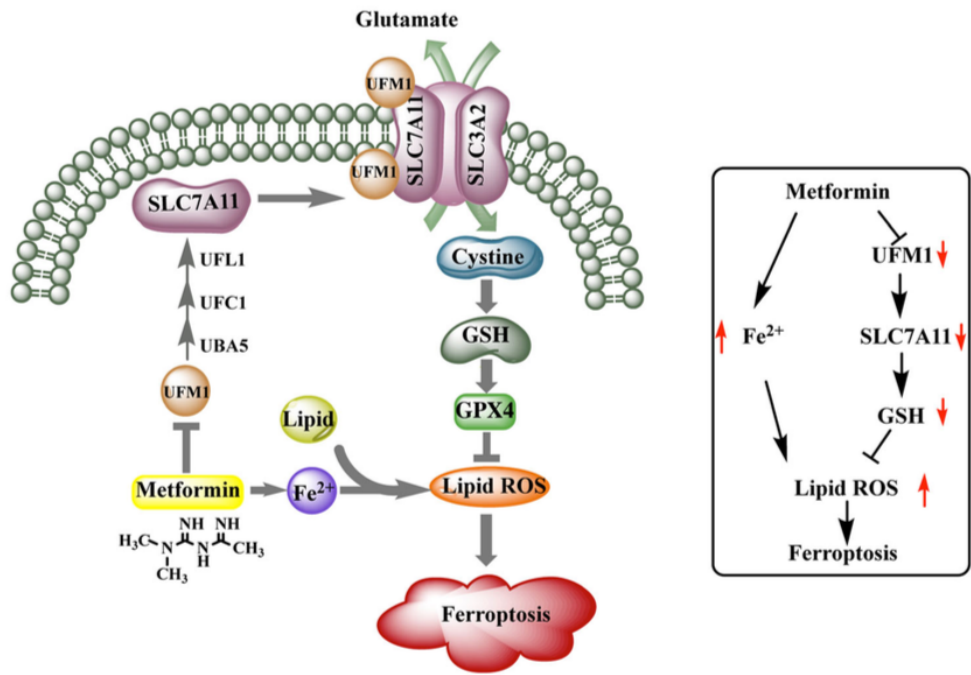


Figure 73 : Implication de la metformine dans l'induction de la ferroptose (Jingjing Yang et al., 2021)

En définitive, la description innovante de la mort cellulaire par ferroptose offre de nouvelles perspectives notamment en termes de prise en charge thérapeutique dans les cancers et plus particulièrement dans les cancers de la tête et du cou. L'étude plus poussée de la ferroptose dans les cancers des VADS est d'autant plus pertinente que des liens ont d'ores et déjà été établis entre ce phénomène de mort cellulaire et l'expression de la Cav1.

Malgré le développement et les avancées scientifiques et médicales en termes de diagnostic, de prise en charge thérapeutique et de suivi des patients cancéreux, les taux de rechutes, soit locales soit métastatiques à distance, restent importants dans les cancers des VADS. Ces taux s'accompagnent d'un mauvais pronostic sans évolution de la diversité des options thérapeutiques disponibles en clinique. Ces mauvais résultats sont à mettre en parallèle avec un défaut, toujours actuel, de biomarqueurs afin d'aider au diagnostic, de prédire la réponse aux traitements ou encore de permettre un suivi optimal des patients.

A travers l'introduction de ce manuscrit vous avez pu apprécier un manque de biomarqueurs pertinents pour une utilisation en clinique malgré des recherches acharnées mais qui restent pour le moment infructueuses. C'est pourquoi, les décisions thérapeutiques sont basées uniquement sur la classification TNM et sur des caractéristiques histologiques générales. La prise en charge thérapeutique actuelle est confrontée à des résistances notamment médiée par des morts cellulaires, et la prise en charge innovante est limitée par d'importants effets indésirables liés à un manque de spécificité. Il est donc particulièrement important de mettre en évidence un ou des biomarqueurs utilisables dans ces cancers, à la fois pronostique mais également prédictif. De plus, il est urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou de proposer des repositionnements de molécules déjà utilisées en clinique afin d'améliorer la survie des patients et leur qualité de vie.

Grâce aux travaux antérieurs menés au sein de notre laboratoire, la Cav1 a d'ores et déjà pu être identifiée comme modulant la chimiosensibilité des cancers du côlon (Martin et al., 2005) mais également comme un marqueur pronostique et prédictif de l'agressivité des glioblastomes (Martin et al., 2009) – (Cosset et al., 2012). Ainsi, dès 2015 notre équipe s'est intéressée à l'expression de la Cav1 dans les cancers de la tête et du cou et a évalué son caractère pronostique *via* une première étude rétrospective sur une cohorte de patients. Cette étude a tenu compte des profils des tumeurs en termes de présence ou non de métastases et un groupe distinct de tumeurs à profil métastatique et de mauvais pronostic a pu être mis en avant. Ces tumeurs présentaient un niveau d'expression faible de la Cav1. Pour expliquer ce phénotype métastatique, des études *in vitro* ont permis de mettre en avant que l'expression faible de la Cav1 favorise la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, ce processus a été objectivé par la mise en évidence d'une augmentation de la motilité, de l'évasion et de l'invasion cellulaires ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de la fibronectine et une surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et des métalloprotéases matricielles. Par ces travaux, l'intérêt de l'utilisation de thérapies ciblant les intégrines a également été mis en lumière (Jung et al., 2015). Néanmoins les questions mécanistiques autour de l'implication de la Cav1 dans ces processus de rechutes restent à élucider afin de conforter l'intérêt de la Cav1 comme biomarqueur pronostique des cancers ORL.

De plus, il s'agit également de compléter les informations quant à l'implication de la Cav1 dans les processus de rechutes locorégionales. Enfin, le caractère prédictif de la Cav1 pourrait également être un atout dans ces cancers afin soit d'optimiser les traitements actuellement utilisés soit en définissant de nouvelles cibles thérapeutiques ou en proposant un repositionnement de molécules employées dans d'autres pathologies. Ces derniers points ont permis d'échafauder le projet de thèse qui est présenté dans la suite de ce manuscrit.

**OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE DU
TRAVAIL DE THESE**

A l'heure actuelle, la survie des patients atteints d'un cancer ORL est faible en raison d'une part d'un diagnostic tardif et d'autre part de la survenue de rechutes témoin d'une résistance aux traitements existants dans l'arsenal thérapeutique. De plus, il n'existe actuellement aucun biomarqueur pouvant être employé dans l'arbre décisionnel de prise en charge thérapeutique d'une tumeur primitive des cancers des VADS.

Aussi, la prise en charge innovante est limitée en raison d'effets indésirables importants notamment liés à un manque de spécificité par défaut de biomarqueurs prédictifs. Il est donc urgent d'identifier un ou des biomarqueurs à caractère pronostique mais également prédictif et de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques ou de proposer des repositionnements thérapeutiques. Grâce aux résultats obtenus par notre équipe dans une étude translationnelle, la Cav1 a pu être caractérisée de potentiel biomarqueur pronostique de l'évolution de la tumeur primitive vers la métastase à distance (Jung et al., 2015). Les mécanismes cellulaires et moléculaires expliquant ce phénotype restent néanmoins à confirmer et l'intérêt de cette protéine dans les rechutes locorégionales des cancers ORL sont encore à définir.

Le travail scientifique de cette thèse s'est basé sur la recherche clinique. Il s'est positionné à l'interface entre la recherche fondamentale, pour déterminer les mécanismes moléculaires des processus cellulaires des rechutes ainsi que leur régulation, et la recherche translationnelle afin de valider l'identification de biomarqueurs et l'élaboration de nouveaux protocoles de prise en charge thérapeutique.

Ainsi ce travail de thèse a visé à :

- ☐ Déterminer les conséquences de l'expression de la Cav1 sur l'évolution de la tumeur primitive en termes de rechutes, locorégionale et métastatique à distance, et donc conclure sur sa caractéristique potentielle de biomarqueur pronostique par l'étude *in vitro* des processus impliqués dans ces phénomènes (croissance, évation, survie clonogénique, profil métabolique et morts cellulaires) ;

- ☐ Déterminer l'impact de l'expression de la Cav1 sur différentes thérapies utilisées dans la prise en charge des patients atteints d'un cancer ORL : radiothérapie et thérapie ciblée, le cétuximab. Et établir le profil d'expression de la Cav1 dans les cellules identifiées comme résistantes aux thérapies précitées afin de conclure sur la caractéristique potentielle de biomarqueur prédictif de la Cav1 ;

- ▣ Identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou repositionner des molécules déjà existantes en clinique grâce à la mise en évidence de biomarqueurs prédictifs additionnels à la Cav1 ;

- ▣ Développer un modèle 3D de type tumoroïde (organoïde tumoral) à partir de pièces de résection chirurgicale de tumeurs des VADS pour réaliser une preuve de concept des données déterminées par le biais des cellules commerciales sur un modèle plus complexe représentant l'hétérogénéité intra- mais également inter-tumorale.

↪ Ce travail de thèse, à l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche translationnelle, a pour problématique d'une part la mise en évidence et l'identification de biomarqueurs. Avec premièrement, l'identification de biomarqueur(s) pronostique(s) pour anticiper l'évolution de la tumeur primitive et son caractère agressif ainsi que sa probabilité à récidiver de manière locorégionale ou métastatique à distance. Secondement, l'identification de biomarqueurs prédictifs employables en clinique dans le but de déterminer en amont la réponse à un traitement et de proposer de nouvelles pistes de prise en charge thérapeutique pour les cancers des VADS

D'autre part, la problématique de cette thèse vise également la mise en avant de nouvelles cibles thérapeutiques qui complèteraient l'arsenal thérapeutique des cancers ORL déjà existant ou le repositionnement thérapeutique de molécules déjà connues dans d'autres pathologies.

Matériels et méthodes

I) La culture cellulaire

1) Les lignées cellulaires commerciales des cancers des voies aérodigestives supérieures

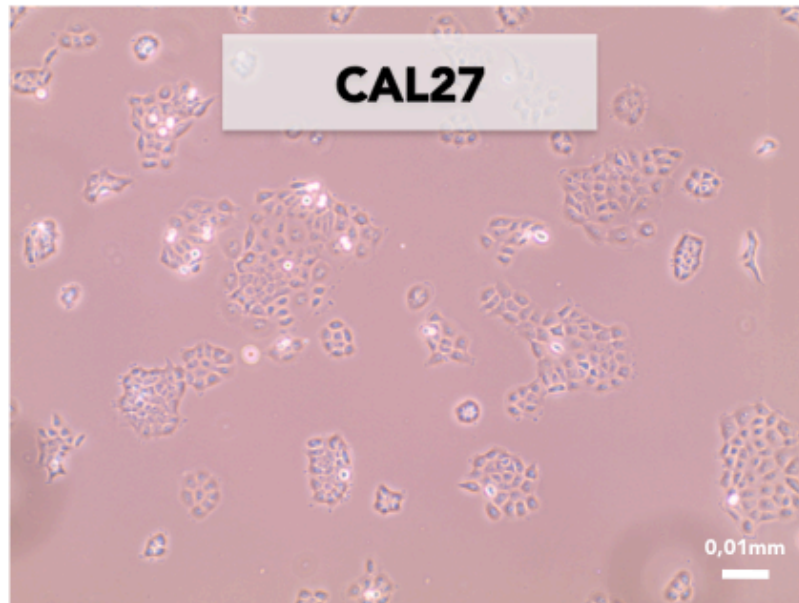
Les manipulations ont été principalement réalisées sur trois lignées cellulaires de cancers des VADS qui font toutes parties du sous-type basal des cancers de la tête et du cou, ce sous-type est notamment caractérisé par une surexpression de l'EGFR (Khariwala et al., 2017).

Nous avons tout d'abord utilisé les CAL27 et CAL33 (*Figure 74 – A et B*) dont l'acronyme signifie : Centre Antoine Lacassagne – 27 et 33, respectivement. Ces deux lignées cellulaires de cancer de la langue ont été acquises par achat auprès de DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* – référence ACC446 pour les CAL27 et ACC447 pour les CAL33). Les CAL27 correspondent à une lignée cellulaire établie en 1982 à partir d'un carcinome épidermoïde de la langue retiré chirurgicalement chez un homme de 56 ans et la lignée CAL33 correspond, quant à elle, à une lignée établie à partir du fragment d'une lésion de la langue retirée chirurgicalement chez un homme de 69 ans atteint d'un carcinome épidermoïde modérément différencié de la langue en 1983 (informations extraites des données des fiches techniques de DSMZ). Ces deux lignées cellulaires ont des caractéristiques de cellules épithéliales adhérentes et se développent en monocouche. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Pan Biotech, référence P04-03550) contenant 4,5 g/L de glucose, 3,7 g/L de bicarbonate de sodium, 4 mM de L-glutamine auquel est ajouté 1 mM de solution de pyruvate de sodium (Lonza™ BioWhittaker™, référence BE13-115E) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (SVF maintenu à 56°C pendant 30 minutes dans un bain-marie).

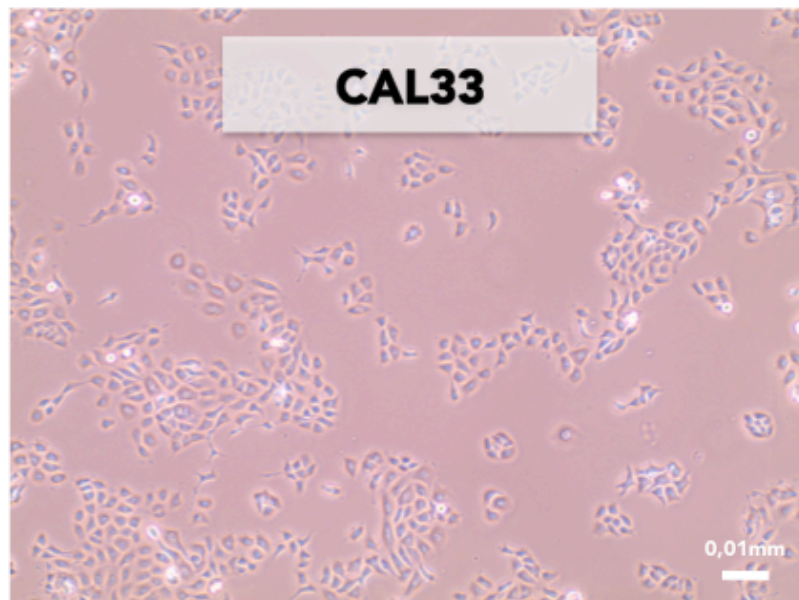
Ensuite, concernant les cellules SCC9 (*Figure 74 – C*) pour *Squamous Cell Carcinoma-9*, celles-ci ont été acquises auprès de la société ATCC® (*American Type Culture Collection* – référence CRL-1629™). Cette lignée cellulaire est établie à partir d'un carcinome épidermoïde de la langue prélevé chez un homme de 25 ans : JG Rheinwald (informations extraites des données des fiches techniques de l'ATCC®). A nouveau, cette lignée cellulaire présente des caractéristiques de cellules épithéliales adhérentes se développant en monocouche.

Les SCC9 sont cultivées dans du milieu DMEM / F12 (Pan Biotech, référence P04-41450) contenant 1,2 g/L de bicarbonate de sodium, 0,5 mM de solution de pyruvate de sodium (Lonza™ BioWhittaker™, référence BE13-115E), auquel est ajouté 2,5 mM de ultra-glutamine 1 (Lonza™ BioWhittaker™, référence BE17-60E5AJ1), 15 mM de HEPES (PAN Biotech, référence P05-01100) et 400 ng/mL d'hydrocortisone ainsi que 10% de SVF.

A



B



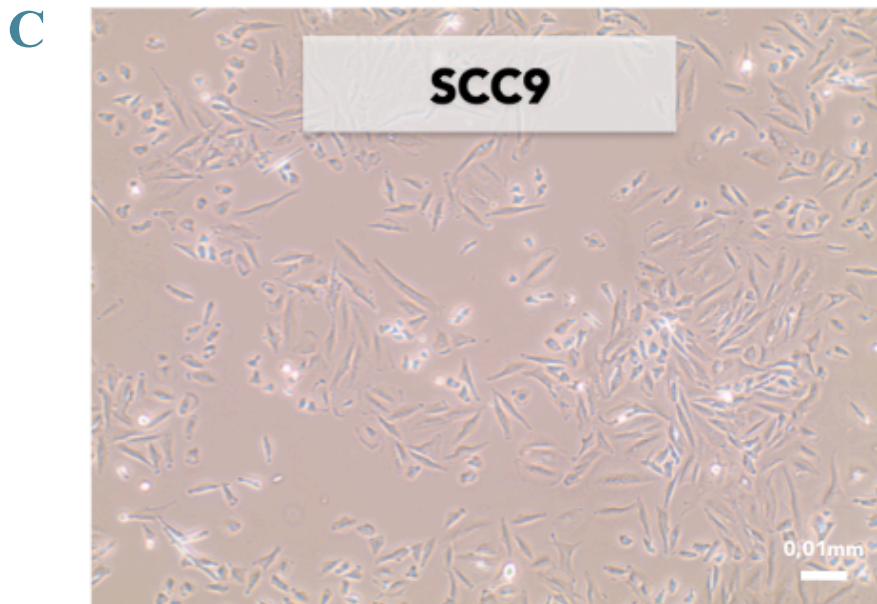


Figure 74 : Imagerie par microscopie optique des lignées cellulaires CAL27, CAL33 et SCC9

Photographies des lignées CAL27 (A), CAL33 (B) et SCC9 (C) au microscope optique Evos XI Core (AMG) au grossissement x10 réalisées par Aude JEHL et Omblin CONRAD.

2) Matériel tissulaire humain : le modèle tumoroïde

Tout d'abord, le terme *tumoroïde* correspond à un système biologique *in vitro* auto-organisé en trois dimensions récapitulant la structure et les types cellulaires des organes *in vivo* concernés ainsi que certaines de leurs fonctions afin de modéliser le vivant pour les médecines de précision et régénérative en complémentarité avec l'expérimentation animale (Galzi, 2021). Dans le contexte des cancers, le groupement de recherche organoïde (GDR 2012 Organoïde, CNRS) a décidé de nommer plus spécifiquement ce modèle *via* la terminologie *tumoroïde*.

Afin d'obtenir des tumoroïdes, nous avons, en collaboration avec les cliniciens et anatomopathologistes de l'Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS) et du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Hautepierre à Strasbourg (Pr. P. SCHULTZ, Pr. M.-P. CHENARD, Dr. M. BURGY, M. A. DANIC, M. T. DOURHLES) utilisé des pièces de résection chirurgicales obtenues auprès de patients pris en charge chirurgicalement dans le cadre d'un cancer des VADS. Les critères retenus pour ces prélèvements sont les suivants : carcinome épidermoïde localement avancé de la tête et du cou (pharynx, larynx et cavité buccale) avec prise en charge thérapeutique par exérèse tumorale, HPV négatif de classification TMN \geq T3 et/ou \geq N2a et M0.

D'un point de vue réglementaire, le consentement libre et éclairé du patient a été obtenu avant toute manipulation, par les médecins, et approuvé par le comité national d'éthique. La bio-collecte est réalisée par le Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Hautepierre, celle-ci a été validée dans le cadre de l'accord national CODECOH (COnservation D'Eléments du COrps Humain) pour le prélèvement : DC-2019-3759. Un contrôle pré-opératoire est effectué par des tests sérologiques pour les infections actives au *Papilloma* virus humain, au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ainsi que pour les virus de l'hépatite B et C. Le transit de la biopsie entre l'hôpital et le laboratoire n'est possible que si ces tests sérologiques sont négatifs, et le personnel réalisant les manipulations au sein du laboratoire a une obligation de présenter une vaccination à jour, notamment pour l'hépatite B. De plus, le personnel impliqué est équipé de moyens de protection individuelle à savoir : des gants jetables, des lunettes, des sur-chaussures, une charlotte ainsi qu'une blouse et une blouse jetable. Concernant les équipements de protection collective, les manipulations sont réalisées au sein d'une salle de culture de confinement de laboratoire niveau L2 dédiée à la culture de cellules issues de patients.

Le protocole décrit ci-après s'est basé sur celui proposé par l'équipe d'Hans Clevers et d'Else Driehuis (Driehuis et al., 2020) mais adapté au sein du laboratoire afin d'optimiser la mise en culture et le maintien de celle-ci dans le temps. Afin de faciliter la lecture du descriptif du protocole de mise en culture des pièces opératoires, nous proposons d'exposer tout d'abord les milieux nécessaires cités dans la suite des propos.

▲ **Milieu « de base »** correspond à du milieu *advanced* DMEM / F12 (Life Technologies, réf.12634-028) complété avec 1x de glutaMAX (Life Technologies, référence 35050-03), de la pénicilline – streptomycine (Life Technologies, référence 15140-122) et 10 mM d'HEPES (Dutscher Pan-Biotech, référence P.05-01100), ce milieu se conserve à 4°C pendant maximum 1 mois.

▲ **Milieu « de transport »**, il s'agit du milieu de base auquel nous ajoutons 10 µM d'Y-27632 (Euromedex, référence AB-M1817), 100 µg/mL de primocine (Invivogen, référence Ant-pm1) et 0,55 µg/mL de caspofungine (Sigma, référence SML0425). Il est nécessaire de préciser que ce milieu est à conserver à 4°C durant 1 mois au maximum.

▲ **Milieu « de culture organoïde »** correspond au milieu de base que nous complétons avec 10 μ M d'Y-27632 (Euromedex, référence AB-M1817), 0,55 μ g/mL de caspofungine (Sigma, référence SML0425), 1x de supplément B27 (Thermo Fisher Scientific, référence 17504-044), 1,25 mM de N-acétyl-L-cystéine (Sigma-Aldrich, référence A9165), 10 mM de Nicotinamide (Sigma-Aldrich, référence N0636), 5 mM d'A83-01 (Sigma-Aldrich, référence SML0788), 0,3 μ M de CHIR99021 (Sigma-Aldrich, référence SML1046), 50 ng/mL d'EGF humain (PeproTech, référence AF-100-15), 10 ng/mL de FGF10 humain (PeproTech, référence 100-26), 5 ng/mL de FGF2 humain (PeproTech, référence 100-18B), 4% de spondin (ImmunoPrecise, référence UCR001), 4% de noggin (ImmunoPrecise, référence UCN002), 1 μ M de prostaglandine E2 (Bio-technie, référence 2296) et 1 μ M de forskolin (Bio-technie, référence 1099). Il est important de noter que ce milieu se conserve à 4°C durant maximum 2 semaines.

⌘ Poursuivons désormais par le **protocole de mise en culture** (*Figure 75*), de la salle opératoire jusqu'au laboratoire. Ainsi, durant l'opération, l'exérèse tumorale a lieu et celle-ci est transportée jusqu'au service d'anatomopathologie où des pièces de résection chirurgicale d'environ 200 à 500 mg sont réalisées. Ces pièces de résection sont alors placées dans un tube contenant le milieu de transport, le tout est déposé dans une glacière afin de garantir une température inférieure à 4°C. Le transport au laboratoire se fait le plus rapidement possible afin d'épargner les cellules.

Une fois arrivée au laboratoire, la pièce de résection est déposée dans une boîte de Pétri contenant un petit volume de trypsine diluée à 0,127% (Sigma, référence T1426). Si la pièce est trop sanguinolente, nous proposons de rincer délicatement *via* une solution neutre avant de la placer dans la boîte de Pétri. Ensuite, l'éventuel excès de graisse est retiré et la biopsie est découpée en petits morceaux *via* un scalpel (à cette étape, des fragments sont placés dans de l'azote liquide pour envisager des manipulations sur l'ADN). Les morceaux découpés sont alors introduits dans un tube contenant 1 mL de trypsine diluée à 0,127% (Sigma, référence T1426), le tout est mis à l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ dans un agitateur rotatif. Le temps de contact avec la trypsine ne doit pas dépasser 60 minutes.

Lorsque la digestion est jugée satisfaisante, 10 mL de milieu de culture organoïde froid (milieu placé à 4°C) sont ajoutés dans le tube contenant le digestat. Ce tube est mis à centrifuger à 420 g pendant 5 minutes à 4°C.

Le surnageant est retiré et 10 mL de milieu de culture organoïde sont placés sur le culot, après homogénéisation, l'ensemble est filtré sur un filtre EasyStrainer de 100 μm (Dutscher, référence 542000).

La suspension ainsi filtrée est mise à centrifuger à 420 g pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant est retiré et le tube contenant le culot est alors placé sur de la glace. Une solution glacée de 70% de *Cultrex Ultimatrix growth factor reduced Basement Membrane Extract* (BME) (R&D System, référence BME-001) dans du milieu de culture organoïde est alors placée sur le culot, une homogénéisation délicate est requise afin d'éviter toute formation de bulles qui fragiliseraient la structure de la goutte. Quatre gouttes de 40 μL sont déposées dans un puits d'une plaque 24 puits préalablement chauffée à 37°C. La plaque est ensuite retournée et placée à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ durant 30 minutes afin de permettre la solidification de la matrice. Une fois les gouttes de BME solidifiées, 1 mL de milieu de culture est ajouté dans chacun des puits et la plaque est déposée précautionneusement dans l'incubateur (*Figure 75*).

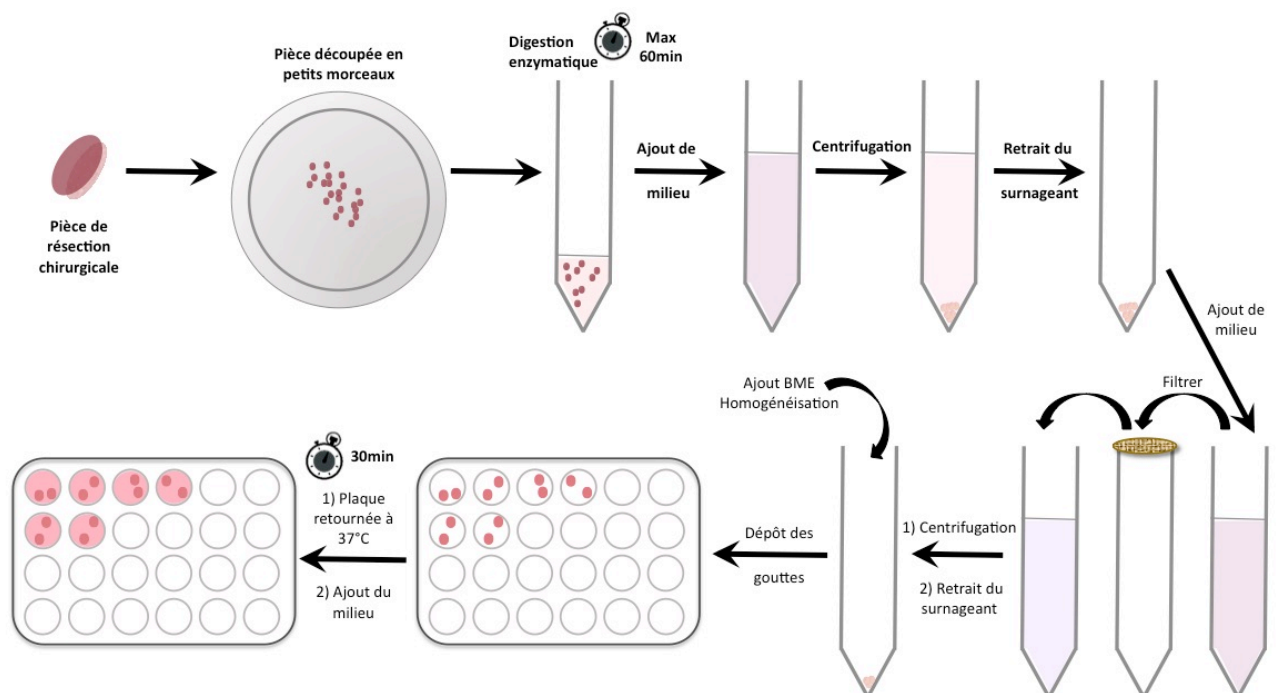


Figure 75 : Schématisation du protocole de mise en culture des pièces de résection chirurgicale de patients

Figure réalisée par Aude JEHL.

Une fois la mise en culture réalisée, il est nécessaire de changer le milieu de culture organoïde tous les 2 à 3 jours. Il est cependant important de préciser que l'inhibiteur de ROCK (Y-27632) ainsi que la caspofungine sont conservés dans le milieu de culture uniquement lors des deux premiers passages.

⌘ Concernant le **repiquage**, celui-ci doit être réalisé toutes les deux à trois semaines, évidemment ce délai est à adapter selon la culture. Pour ce faire, il faut tout d'abord retirer le milieu de culture organoïde sans léser les gouttes de BME, rincer ensuite avec un tampon phosphate salin (*phosphate-buffered saline* = PBS) et ajouter 1 mL de TrypLE Express (Life Technologies, référence 12605-010), puis rompre les gouttes de BME à l'aide d'une micropipette P1000 et laisser la digestion enzymatique opérer 15 minutes dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Toutes les 5 minutes, il est recommandé de réaliser des allers-retours avec une micropipette P1000 afin d'associer à la digestion enzymatique, une digestion mécanique. Durant l'ensemble de l'action enzymatique, la digestion est surveillée au microscope optique, dès que les cellules sont sous forme de petits regroupements ou de cellules isolées, la digestion est stoppée en récupérant la suspension cellulaire et en la plaçant dans un tube contenant du milieu de culture organoïde froid.

La suspension est alors centrifugée à 420 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et une solution de BME 70% est déposée sur le culot (BME placée au préalable dans un bac de glace afin qu'elle soit à l'état liquide), une homogénéisation délicate est indiquée afin d'éviter la formation de bulles qui sont délétères pour l'intégrité de la goutte. Comme pour la mise en culture initiale, des gouttes de 40 µL de 10 000 cellules environ sont formées au fond des puits d'une plaque 24 puits préalablement chauffée dans l'incubateur. La plaque est retournée et placée dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ afin de favoriser la solidification des gouttes en 3D durant 30 minutes. Une fois la goutte solidifiée, 1 mL de milieu de culture est ajouté dans chacun des puits.

Au moment de la soutenance de ce travail de thèse, plusieurs pièces opératoires ont été recueillies depuis 2020 afin de réaliser une culture et un maintien de tumoroïdes, dont trois sont encore en culture, à savoir la 21-T0333, la 22-T0217 et la 22-T0238 (*Tableau VI*). Deux d'entre elles ont pu être valorisées dans les travaux présentés au sein de l'article *Blocking EREG / GPX4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction* (A. Jehl *et al.*, soumis).

Tableau VI : Récapitulatif des caractéristiques des pièces opératoires recueillies pour la réalisation de tumoroïdes en cours de culture au sein du laboratoire de Bioimagerie et Pathologies

Identification	Date de mise en culture	Description et caractéristiques	Mise en culture
21-T0333 (tumeur)	28/06/2021	Sérologie négative pour HPV16, VIH et hépatites B et C homme de 68 ans Carcinome épidermoïde T3N0M0 du plancher buccal antérieur	4 gouttes BME (40 µL)
22-T0217 (tumeur)	02/05/2022	Sérologie négative pour HPV16, VIH et hépatites B et C homme de 64 ans Carcinome épidermoïde différencié kératinisant et infiltrant du sinus piriforme gauche T4aN2b(2/49)R1	4 gouttes BME (40 µL)
22-T0238 (tumeur)	17/05/2022	Sérologie négative pour HPV16, VIH et hépatites B et C homme de 59 ans Carcinome épidermoïde différencié kératinisant du sinus piriforme droit CPS > 1 T4aN3bM0R1	4 gouttes BME (40 µL)

3) Echantillons de tissus humains

Une collecte de 173 échantillons de tumeurs entre 2003 et 2013 a été réalisée lors de la chirurgie initiale après obtention du consentement libre et éclairé de chacun des patients. Ces échantillons ont été conservés jusqu'à leur utilisation dans la banque de tumeurs au Centre de lutte contre le cancer (CLCC) Paul Strauss, à Strasbourg. Les critères d'inclusion comprenaient : la localisation de la tumeur (hypopharynx, oropharynx ou cavité orale, HPV négatif), $\geq T3$ et/ou $\geq N2a$ sans preuve clinique ou radiographique de métastases à distance. Les critères d'évaluation primaires étaient la maladie métastatique et la survie sans récurrence locorégionale à 3 ans post-chirurgie. Enfin, les critères d'évaluation secondaires comprenaient la survie globale qui se définit comme le temps écoulé entre la chirurgie et la date du décès ou du dernier suivi du patient.

Les variables enregistrées comprenaient l'âge, l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) pour informer sur l'état général du patient (exprimé de 0 : actif à 5 : mort) et le *Karnofsky Performance Score* (KPS) pour déterminer le niveau d'autonomie et de dépendance du patient (exprimé en pourcentage).

De plus, ces variables incluaient également les comorbidités (indice de comorbidité de Charlson), le stade tumoral, le régime de chimiothérapie en association avec la radiothérapie, la consommation de tabac et d'alcool, et les données de suivi (données de survie, paramètres biologiques et caractéristiques nutritionnelles). L'ensemble des caractéristiques de ces patients est regroupé au sein du tableau qui suit (*Tableau VII*).

Tableau VII : Récapitulatif des caractéristiques des patients et des échantillons prélevés (Burgy and Jehl et al., 2021)

Supplementary Table 2: Relation between Caveolin-1 expression and clinical characteristics of patients							
Variable	All patients	Caveolin-1				p-value	
		0	+	++	+++		
Sex — no. (%)							
Male	148 (85)	30 (88)	41 (79)	52 (88)	24 (86)	0.55	
Female	26 (15)	4 (12)	11 (21)	7 (11)	4 (14)		
Age							
Median age —yr	58	62	61	56	60	0.25	
<65yr — no. (%)	118 (68)	20 (59)	33 (63)	45 (76)	20 (71)	0.28	
≥65yr — no. (%)	55 (32)	14 (41)	19 (37)	14 (24)	8 (29)		
ECOG — no. (%)							
0-1	145 (84)	29 (85)	45 (87)	48 (82)	23 (82)	0.4	
2	17 (10)	1 (3)	5 (9)	6 (10)	5 (18)		
≥3	7 (4)	3 (9)	2 (4)	2 (3)	0		
missing	4 (2)	1 (3)	0	3 (5)	0		
Karnofsky score							
Median score	90	90	90	90	90	0.58	
Interquartile range	90-100					0.88	
<80yr — no. (%)	22 (13)	4 (12)	6 (12)	7 (12)	5 (18)		
≥80yr — no. (%)	145 (84)	29 (86)	46 (88)	47 (80)	23 (82)		
missing	6 (3)	1 (2)	0	5 (8)	0		
Charlson Comorbidity Index — no. (%)							
Median score	4	4	4	3	4	0.22	
0	0	0	0	0	0	0.62	
1-2	21 (12)	4 (12)	3 (6)	10 (17)	4 (14)		
3-4	86 (50)	18 (53)	27 (52)	28 (47)	13 (47)		
≥5	61 (35)	11 (32)	22 (42)	18 (31)	10 (35)		
missing	5 (3)	1 (3)	0	3 (5)	1 (4)		
Smoking — no. (%)							
smoking cessation	69 (40)	21 (62)	21 (40)	15 (25)	12 (43)	0.06	
active smoking	89 (51)	12 (35)	27 (52)	35 (60)	15 (54)	0.74	
pack-years means	40	46	44	41	49		
no history of smoking	8 (5)	1 (3)	3 (6)	4 (7)	0		
missing	7 (4)	0	1 (2)	5 (8)	1 (3)		
Alcohol consumption — no. (%)							
history of alcohol addiction	112 (65)	23 (68)	36 (69)	32 (54)	21 (75)	0.44	
missing	8 (5)	1 (3)	1 (2)	4 (7)	2 (7)		
Primary tumor site — no. (%)							
Oral cavity	36 (21)	3 (9)	9 (17)	18 (31)	6 (21)	0.12	
Oropharynx	52 (30)	14 (41)	12 (23)	16 (27)	10 (36)		
Hypopharynx	44 (25)	12 (35)	16 (31)	12 (20)	4 (14)		
Overlap between several tumor sites	41 (24)	5 (15)	15 (29)	13 (22)	8 (29)		
TNM classification — no. (%)							
T	T1	9 (5)	1 (3)	2 (4)	4 (7)	2 (7)	0.18
	T2	55 (32)	13 (38)	15 (29)	24 (41)	3 (11)	
	T3	73 (43)	15 (44)	24 (46)	17 (29)	17 (61)	
	T4	36 (20)	5 (15)	11 (21)	14 (23)	6 (21)	
N	N0	24 (14)	2 (6)	8 (15)	9 (15)	5 (18)	0.43
	N1	17 (10)	5 (15)	6 (12)	4 (7)	2 (7)	
	N2a	11 (6)	1 (3)	7 (13)	2 (3)	1 (3)	
	N2b	61(36)	13 (38)	14 (27)	27 (46)	7 (25)	
	N2c	42 (24)	9 (26)	12 (23)	13 (22)	8 (29)	
N3	18 (10)	4 (12)	5 (10)	4 (7)	5 (18)		
Histologic type and characteristics — no. (%)							
Well differentiated	29 (17)	1 (3)	10 (19)	10 (17)	8 (29)	0.06	
Modertely differentiated	93 (54)	17 (50)	28 (54)	34 (58)	14 (50)		
Poorly differentiated	42 (24)	14 (41)	11 (21)	11 (19)	6 (21)	0.63	
Indifferentiated	4 (2)	1 (3)	1 (2)	2 (3)	0		
Squamous-cell carcinoma not specified	5 (3)	1 (3)	2 (4)	2 (3)	0	0.17	
Lymphovascular emboli	38	10 (29)	11 (21)	11 (19)	6 (21)		
Perineural invasion	20	2 (6)	8 (15)	4 (7)	6 (21)	0.39	
Capsular rupture of the lymph nodes	116	27 (79)	34 (65)	37 (63)	18 (64)	0.88	
Positive surgical margins	73	16 (47)	23 (44)	24 (41)	10 (36)		
First-line treatment — no. (%)							
Adjuvant radiotherapy alone	63 (37)	10 (29)	23 (44)	18 (31)	12 (43)	0.32	
Concomitant chemotherapy (cisplatin)	106 (61)	24 (71)	29 (56)	38 (64)	15 (54)		
Without adjuvant therapy	4 (2)			3 (5)	1 (3)		
Extent of disease — no. (%)							
Only locoregionally recurrent	37 (21)	5 (15)	6 (12)	12 (20)	14 (50)	0.004	
Metastatic with or without locoregional recurrence	43 (25)	11 (32)	15 (29)	14 (24)	3 (11)	0.8	
Total — no. (%)	173	34 (20)	52 (30)	59 (34)	28 (16)		

Le CRB du CLCC Paul Strauss a dû, au préalable, réaliser une déclaration à la cellule bioéthique du ministère français de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pour la collecte et l'importation des échantillons humains. La déclaration d'activité du CRB n°DC-2013-1798 a été autorisée par le mandat d'autorisation n°AC-2018-3177. De même pour le CRB du CHU de Hautepierre, dont le numéro de déclaration d'activité est le n°DC-2019-1016 et le mandat d'autorisation est le n°AC-2015-2351. La gestion des données des patients a été déclarée et autorisée par la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) *via* les mandats n°519013-n°601451 et n°1970390V7, respectivement. Des lames d'hématoxyline-éosine, après inclusion des échantillons dans de la paraffine, ont été réalisées et des anatomopathologistes ont confirmé le sous-type histologique de carcinome épidermoïde.

4) Transfections

a- Surexpression de la cavéoline-1

Les cellules ont été transfectées de manière stable en utilisant la technique d'électroporation (système de transfection par électroporation Neon[®], Invitrogen) à l'aide de vecteurs d'expression pEZM68_{Ctrl} et pEZM68_{Cav1} (GeneCopoeiaTM), afin respectivement d'être utilisées comme contrôle ou pour entraîner une surexpression de la Cav1. Une fois la transfection réalisée, les cellules sont exposées à 10 µg/mL de puromycine (Sigma, référence P8833-10mg) incorporés dans le milieu de culture classique des cellules. Ainsi, seules les cellules ayant intégrées le plasmide sont sélectionnées. La surexpression de la Cav1 a été confirmée par western blot.

b- Inhibition d'expression d'EREG et surexpression de YAP

L'expression d'EREG a été régulée par une transfection transitoire avec 25 ou 50 nM de siARN_{EREG} ou de son contrôle siARN_{Ctrl} (Dharmacon, Human EREG L-011268-00-005 et SMARTPool D-001810-10-05) en utilisant de la Lipofectamine 2000TM (Invitrogen, référence 11668-019). La technique de transfection employée consiste en la préparation d'un tube A_{EREG} et d'un tube A_{Ctrl}. Le tube A_{EREG} contient de l'optiMEM (1x) (Gibco, référence 31985-062) et le siARN_{EREG} selon le ratio 250 µL d'optiMEM pour 2,5 µL de siARN. En parallèle, le tube A_{Ctrl} contient de l'optiMEM et le siARN_{Ctrl} selon le rapport 250 µL d'optiMEM pour 2,5 µL de siARN. Ensuite, un tube B est préparé contenant de l'optiMEM et l'agent de transfection : la lipofectamine, pour un ratio de 250 µL d'optiMEM et 5 µL de lipofectamine.

Ce tube est laissé pendant 5 minutes à température ambiante. Enfin, un tube C qui correspond au tube contrôle est préparé avec un ratio de 500 μL d'optiMEM et 5 μL de lipofectamine. Une fois les 5 minutes écoulées, 255 μL du tube B sont placés dans le tube A (l'opération est répétée en fonction du nombre d'échantillons finaux) ainsi que dans le tube C, le mélange est laissé à reposer durant 30 minutes à température ambiante. Lorsque le temps est écoulé, la solution est placée dans chacun des puits contenant au préalable 1,5 mL de milieu de culture. Cette solution est déposée goutte à goutte au moyen d'une micropipette 1 mL dans chacun des puits.

Pour surexprimer YAP, les cellules ont été transfectées avec 2 μg de vecteurs d'expression flag-YAP ou avec 2 μg de son contrôle : Mock (don du Dr. Masson, de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg – ESBS, France) en utilisant de la lipofectamine selon la même méthodologie que celle décrite ci-dessus.

L'efficacité de l'inhibition de l'expression d'EREG et l'efficacité de la surexpression de YAP ont été déterminées par RT-qPCR (*Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*) et par western blot.

II) Traitements

1) Radiothérapie

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 500 000 cellules par flasque T25 puis irradiées à des doses de 2, 5 ou 10 Gray (Gy). Les irradiations ont été réalisées au laboratoire de Radiobiologie du CLCC Paul Strauss de Strasbourg (actuellement le laboratoire fait parti de l'ICANS) dirigé par le Professeur Georges Noël et le Docteur Hélène Burckel. Afin de réaliser les irradiations, l'irradiateur auto-protégé : Biobeam GM 8000[®] (GSM) a été utilisé. Il délivre des doses uniques de rayons γ (césium 137) à raison de 2,5 Gy/min. Les cellules qui se trouvent en phase exponentielle de croissance sont donc sorties de l'incubateur et déposées au sein de l'irradiateur qui est à la température ambiante et à 5% de CO_2 . En parallèle, les cellules identifiées comme contrôle, et donc non irradiées, subissent la même manutention.

L'une des conditions consiste à sensibiliser les cellules à l'irradiation au moyen d'un pré-traitement par du cétuximab. Pour ce faire, les cellules sont traitées 2 heures avant l'irradiation par 10, 30 ou 50 nM de cétuximab (Erbix[®], Merck, concentration stock de 5 mg/mL). Durant l'ensemble de la manipulation, les expérimentateurs sont équipés d'un dosimètre.

2) Cetuximab

Au courant des manipulations effectuées, différents traitements pharmacologiques ont été réalisés. Le cétuximab (ERBITUX 5 mg/ml solution pour perfusion, MERCK, don de la pharmacie du CLCC Paul Strauss, Strasbourg) présente pour son récepteur une affinité 5 à 10 fois supérieure en comparaison aux ligands endogènes de l'EGFR. Les concentrations retenues durant les expérimentations sont de 10, 30 et 50 nM.

3) RSL-3

La molécule de RSL-3 (MedChemExpress, référence HY-100218A, 5 mg) correspond à une molécule décrite comme activant le mécanisme de mort cellulaire par ferroptose en inhibant la GPX4. La concentration utilisée dans les expérimentations est de 5 μ M.

4) Metformine

La dernière molécule utilisée au courant des expérimentations correspond à la Metformine. Cette molécule est classiquement prescrite dans la prise en charge du diabète. Elle est utilisée durant les manipulations à une concentration de 1 mM (MedChemExpress, référence HY-17471A, 100 mg).

III) Tests phénotypiques

1) Test de survie clonogénique à long terme

- a- Test de survie clonogénique à long terme après traitement par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison cétuximab et radiothérapie

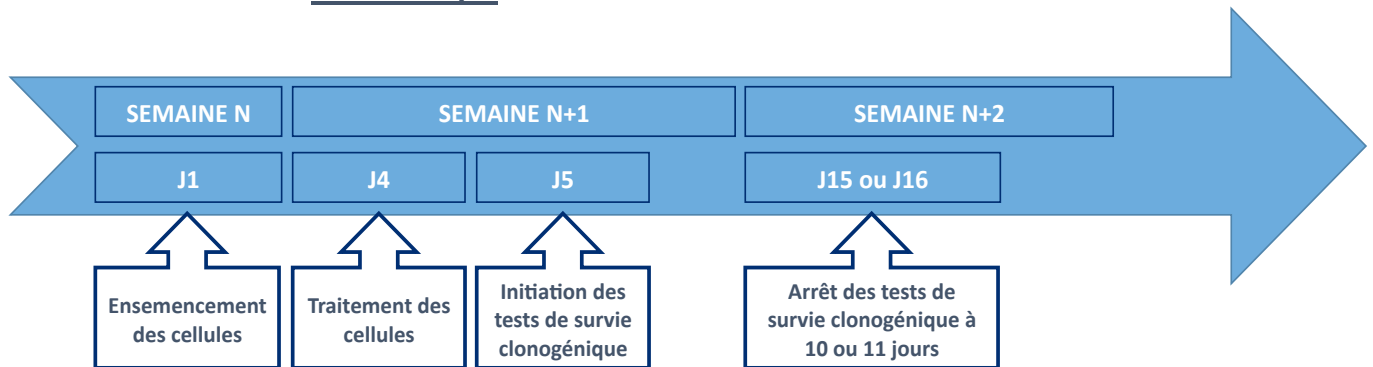


Figure 76 : Programmation des tests de survie clonogénique à long terme pour les cellules traitées par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison des deux

Frise chronologique réalisée par A. JEHL.

Vingt-quatre heures après le traitement par du cétuximab en monothérapie ou en association avec des irradiations, les cellules sontensemencées à 250, 500 et 1 000 cellules dans des plaques 6 puits contenant 2 mL de milieu par puits (J5). Les plaques sont placées pendant 10 ou 11 jours, respectivement pour les SCC9 et les CAL33, dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. Après 10 ou 11 jours, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées avec du PBS, puis colorées et fixées *via* du cristal violet à 0,1% (Sigma-Aldrich). Un rinçage précautionneux à l'eau purifiée par un système de filtres / résines / membranes est requis avant de laisser sécher les plaques (*Figure 76*).

Les colonies sont alors comptées afin de déterminer l'efficacité d'ensemencement (PE) et la fraction de survie (SF), selon les équations suivantes :

Efficacité d'ensemencement = nombre de cellules survivantes / nombre de cellules ensemencées

Fraction de survie = efficacité d'ensemencement du groupe expérimental / efficacité d'ensemencement du groupe témoin.

b- Test de survie clonogénique à long terme après transfection

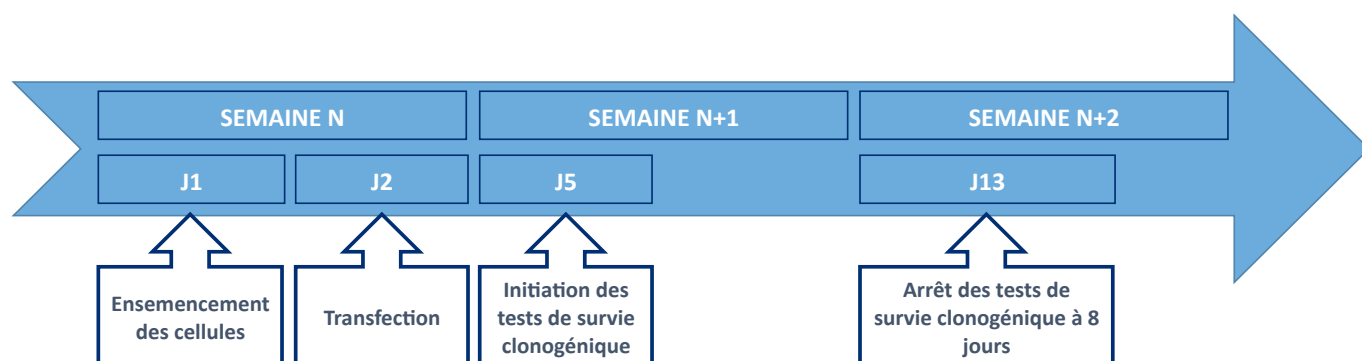


Figure 77 : Programmation des tests de survie clonogénique à long terme pour les cellules transfectées

Frise chronologique réalisée par A. JEHL.

Quarante-huit heures après la transfection (J5), les cellules sont ensemencées à 500 (CAL27 et SCC9) ou à 1 000 (CAL33) cellules par puits. Les plaques sont alors placées à l'incubateur durant 8 jours (*Figure 77*).

c- Test de survie clonogénique à long terme après transfection et traitement au cétuximab en association ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine

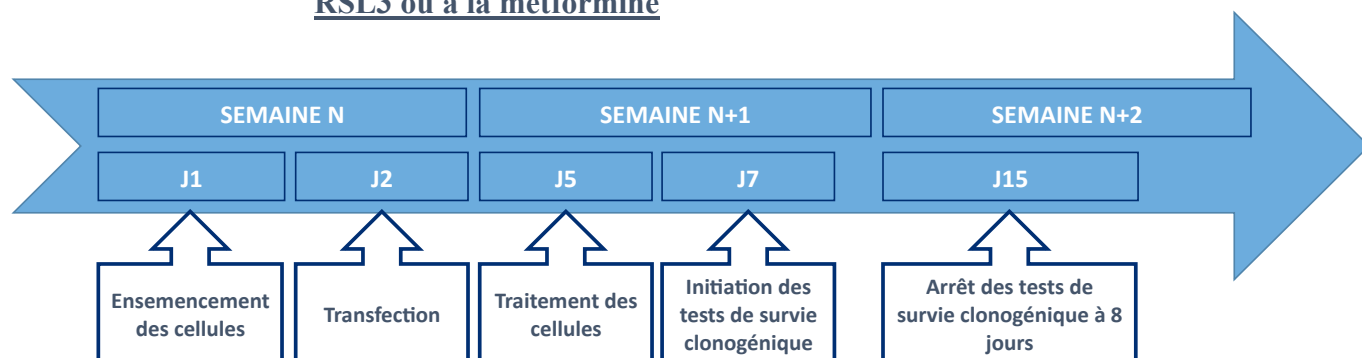


Figure 78 : Programmation des tests de survie clonogénique à long terme pour les cellules traitées par du cétuximab en associant ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine

Frise chronologique réalisée par A. JEHL.

Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont traitées par du cétuximab en association ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine (J5), elles sont ensuite replacées à l'incubateur durant 48 heures.

Les cellules sont ensuite ensemencées à 500 (CAL27 et SCC9) ou à 1 000 (CAL33) cellules par puits (J7). Les plaques sont alors placées à l'incubateur durant 8 jours (*Figures 78 et 79*).

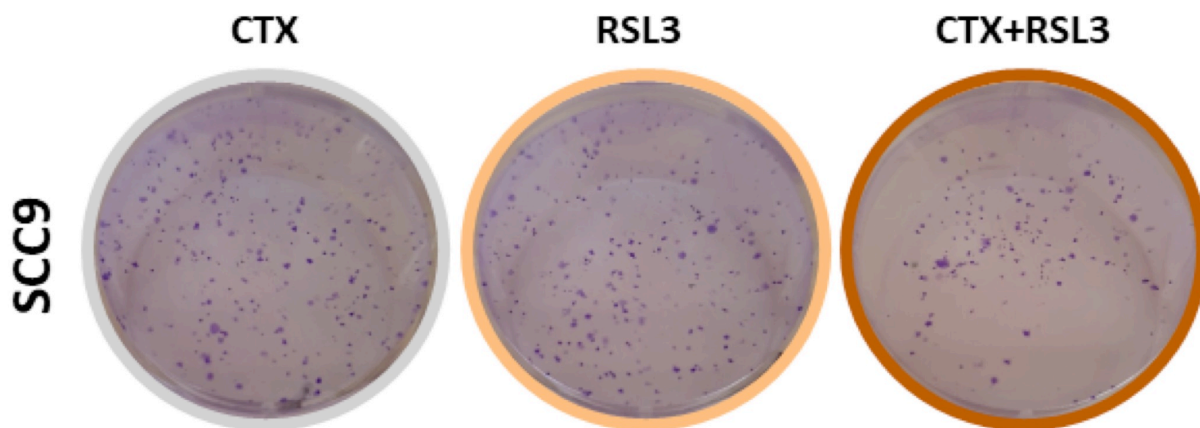


Figure 79 : Exemple de résultats des tests clonogéniques de la lignée cellulaire des SCC9

Cellules SCC9 traitées par 30 nM de cétuximab (à gauche), cellules SCC9 traitées par 5 μ M de la molécule de RSL3 (au milieu) et cellules SCC9 traitées par une combinaison de 30 nM de cétuximab et 5 μ M de la molécule de RSL3.

Photographies réalisées par A. JEHL.

2) Test de croissance cellulaire

Les manipulations de suivi de la croissance cellulaire sont réalisées au moyen de l'Incucyte[®] Zoom (Sartorius). Il s'agit d'un « *bioimageur* » effectuant l'analyse en temps réel de divers processus cellulaires dont la croissance, la viabilité et la morphologie des cellules. L'appareil réalise des photographies des puits toutes les 3 ou 4 heures (ce paramètre de temps peut être modifié si besoin). Celui-ci est placé au sein d'un incubateur qui peut donc être paramétré soit en normoxie (21% de dioxygène), soit en hypoxie (1% de dioxygène).

Ainsi, cet appareil permet à la fois la prise de photographies pour chacun des puits de plusieurs microplaques, mais il permet également l'analyse de celles-ci.

L'analyse est effectuée à l'aide de l'algorithme de confluence intégré du logiciel Incucyte[®].

a- Croissance cellulaire après traitement par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison cétuximab et radiothérapie

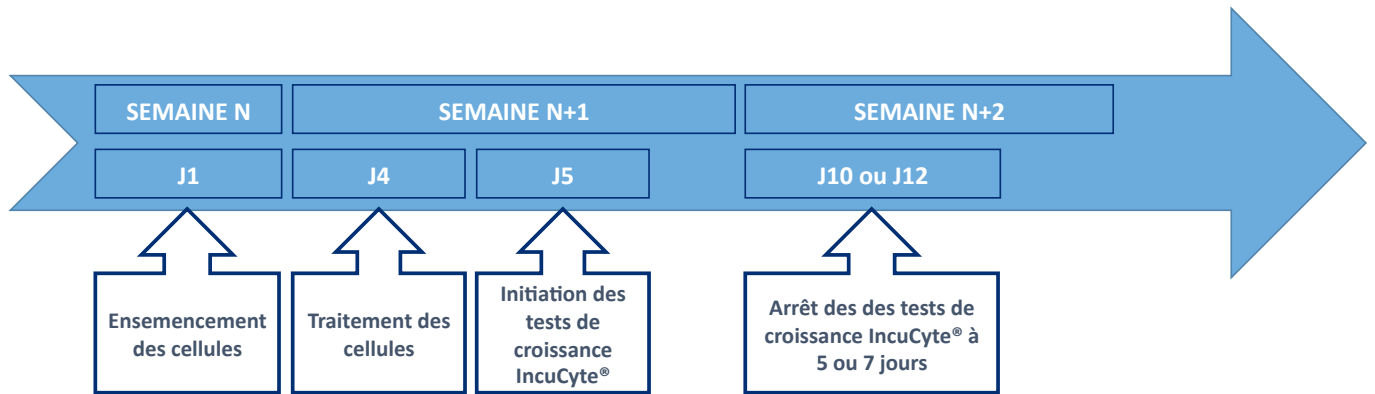


Figure 80 : Programmation des tests de croissance cellulaire pour les cellules traitées par du cétuximab, de la radiothérapie ou la combinaison des deux

Frise chronologique réalisée par A. JEHL.

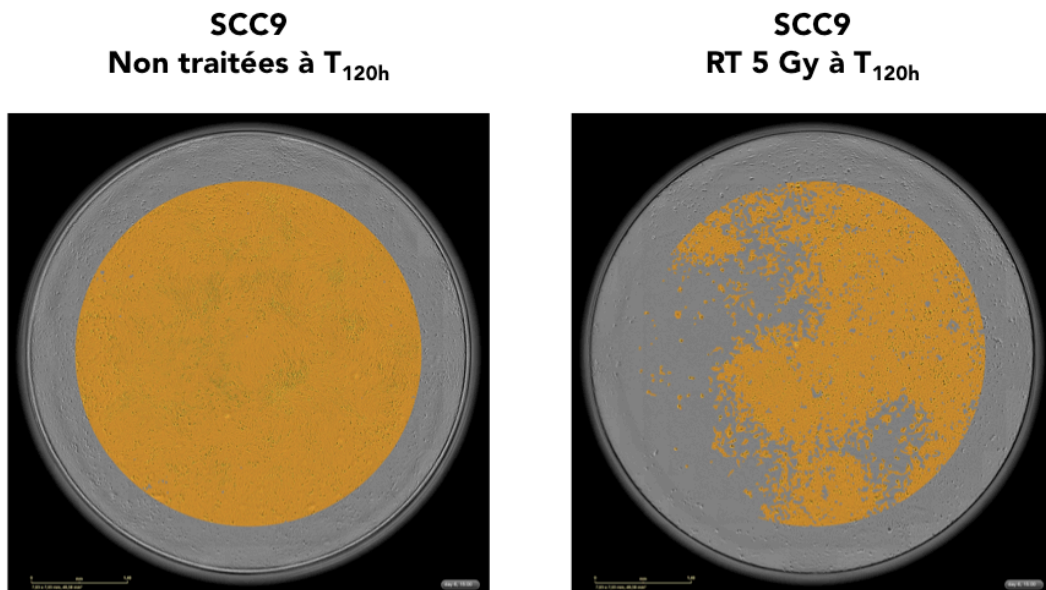


Figure 81 : Exemple du masque de confluence créé avec le logiciel Incucyte Zoom® pour la lignée cellulaire des SCC9

Les cellules SCC9 non traitées sont complètement confluentes au temps 120 heures, il est donc à noter que le masque de confluence, en orange, comble l'ensemble de la zone d'analyse au centre du puits (à gauche). Les cellules SCC9 traitées par radiothérapie à 5 Gy ne sont pas confluentes au temps 120 heures (à droite). La taille et la morphologie des cellules entre les deux puits sont similaires, seule la croissance est diminuée lors d'un traitement par de la radiothérapie.

Images sélectionnées sur le logiciel Incucyte Zoom® par A. JEHL.

Vingt-quatre heures après le traitement, c'est-à-dire soit après un traitement en monothérapie par du cétuximab à 10, 30 ou 50 nM, soit par de la radiothérapie de 2 à 10 Gy soit par un traitement en bithérapie associant le cétuximab et la radiothérapie, les cellules sontensemencées à une densité de 1 000 cellules par puits pour les SCC9 et de 2 000 cellules par puits pour les CAL33 dans un volume de 200 µL au sein d'une plaque 96 puits (J5). La plaque est ensuite placée dans le bioimageur à 37°C en normoxie. Des photographies sont réalisées toutes les 3 heures (objectif x4 du microscope) sur une période de temps de 120 heures (5 jours) pour les SCC9 et de 168 heures (7 jours) pour les CAL33 (*Figures 80 et 81*).

b- Croissance cellulaire après transfection et/ou traitement

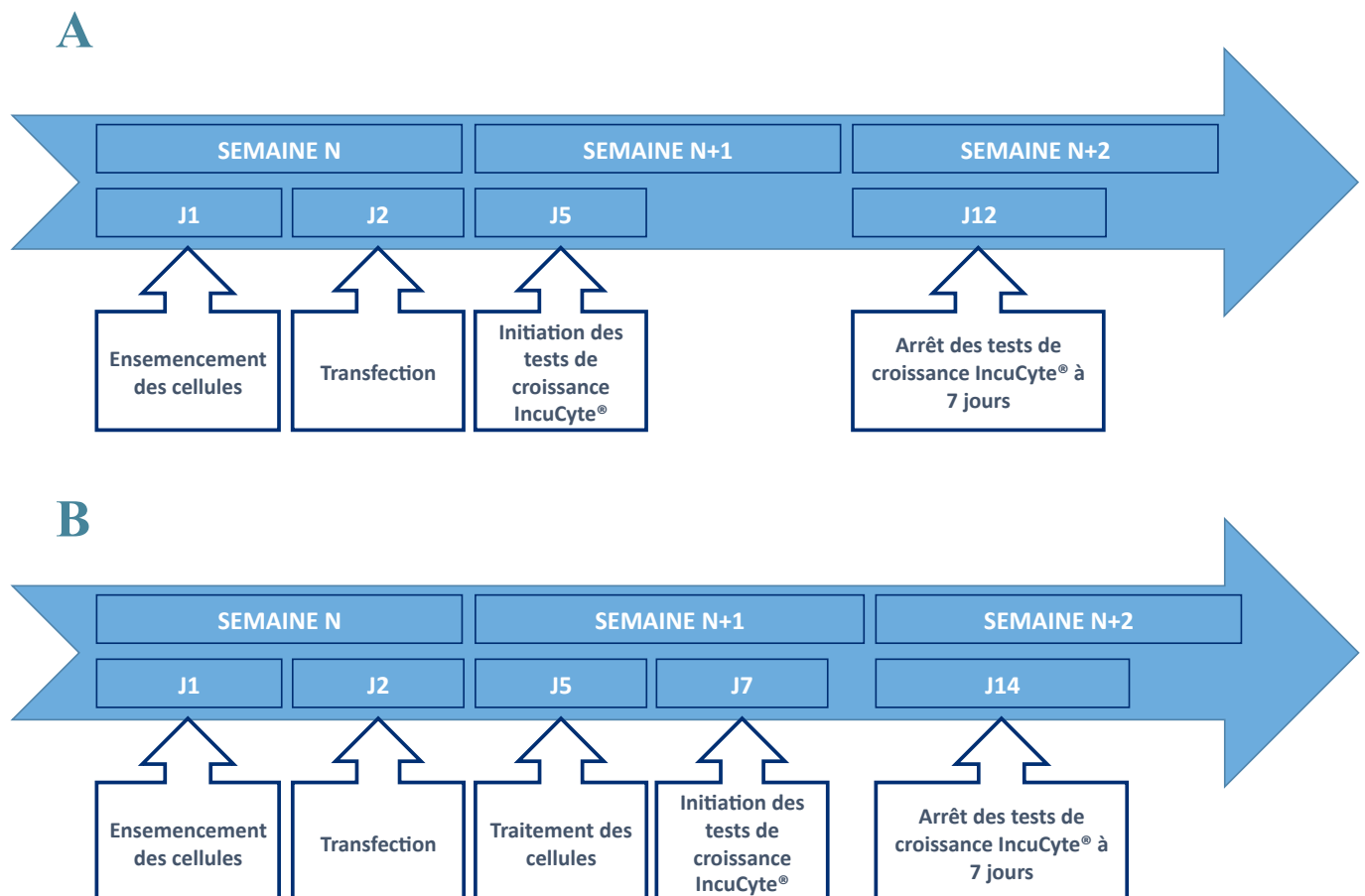


Figure 82 : Programmation des tests de croissance cellulaire pour les cellules transfectées et/ou traitées par du cétuximab en association ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine

(A) Frise chronologique pour les manipulations effectuées sur les cellules uniquement transfectées.
 (B) Frise chronologique pour les manipulations effectuées sur les cellules transfectées et traitées soit par du cétuximab associées ou non à la molécule de RSL3 ou à la metformine.

Frises chronologiques réalisée par A. JEHL.

Soixante-douze heures (*Figure 82 – A*) ou 120 heures (*Figure 82 – B*) après la transfection, les cellules sont ensemencées à une densité de 4 000 cellules par puits pour les CAL33 et de 8 000 cellules par puits pour les CAL27 et les SCC9 dans une plaque 96 puits, chaque puits contient 200 μ L de milieu de culture.

La plaque est ensuite placée dans l'Incucyte[®] Zoom à 37°C en normoxie. La croissance est mesurée toutes les 3 heures (objectif x4 du microscope) sur une période allant jusqu'à 168 heures (7 jours) (*Figure 82 - A et B*).

c- Croissance cellulaire des tumoroides

Après une dissociation enzymatique des tumoroides présents dans une goutte de BME, 10 000 cellules sont déposées par puits d'une plaque 96 puits à fond rond et ayant subi un traitement de faible adhérence (Sbio, référence MS-9096UZ), 200 μ L de milieu sont ajoutés au sein de chacun des puits.

Les cellules sont ainsi placées en culture durant 4 jours puis traitées en mettant directement les molécules dans chacun des puits correspondants (cétuximab, RSL3, metformine).

La plaque est ensuite déposée au sein de l'imageur et la croissance est mesurée toutes les 3 heures (objectif x4 du microscope) durant 7 à 10 jours.

3) Etude du cycle cellulaire et de l'apoptose par cytométrie en flux

Vingt-quatre heures après l'irradiation et/ou le traitement au kétuximab, les cellules sont centrifugées à 1 500 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est retiré et le culot est re-suspendu dans 1 mL d'éthanol 70% glacé. Le tout est placé au congélateur à -20°C pendant au minimum 24 heures. Le lendemain, les cellules sont lavées au PBS, centrifugées à 1 500 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est retiré et le culot est re-suspendu dans 100 μ L d'une solution contenant l'anticorps primaire anti- γ H₂AX (dilution au 1/100^{ème}, anticorps monoclonal de souris, clone JBW301, Merck Millipore), les échantillons sont ensuite placés pendant 24 heures à 4°C. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont lavées au PBS, centrifugées et le culot est re-suspendu dans 100 μ L de solution contenant l'anticorps secondaire Alexa fluor 488 (dilution au 1/100^{ème}, anticorps de chèvre anti-IgG de souris, Merck Millipore) pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Après un lavage au PBS, les cellules sont à nouveau centrifugées et le culot est re-suspendu dans 200 μ L d'une solution d'iodure de propodim (IP) et de RNase A (concentration_{RNase A} = 100 μ g/mL et concentration_{IP} = 5 μ g/mL, dilution au 1/100^{ème}, Merck Millipore) pendant 30 minutes à l'obscurité afin de marquer l'ADN et d'étudier la répartition cellulaire au sein du cycle. Cette répartition, mais également le marquage anti- γ H₂AX, sont mesurés au moyen d'un cytomètre en flux : BD Accuri[®] C6 (Becton Dickison). L'analyse des résultats a été réalisée *via* le logiciel BD Accuri[®].

4) Tests sur le métabolisme cellulaire

L'ensemble des tests portant sur le métabolisme détaillé ci-après est réalisé grâce à l'analyseur de flux extracellulaire XFp (Seahorse Bioscience, Agilent). Pour tous ces tests, le début de la procédure est commune, à savoir 72 heures après la transfection (sans traitement : ATP rate assay, Glycolytic test et Mito stress test) ou 120 heures après la transfection (avec ou sans 30 nM cétuximab : ATP rate assay), 20 000 cellules sontensemencées dans une microplaque de culture cellulaire Seahorse XF avec le milieu de culture classique de chacune de ces lignées. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le milieu de culture est retiré pour y placer le milieu dédié au dispositif (*Figure 83 – A*), c'est-à-dire le milieu XF DMEM (Agilent, référence 1035-100) non tamponné supplémenté avec 10 mM de glucose (Agilent, référence 103577-100), 4 mM de L-glutamine (Agilent, référence 103579-100) et 2 mM de pyruvate de sodium (Agilent, référence 103578-100).

Un autre élément est nécessaire aux tests portant sur le métabolisme, il s'agit de la cartouche d'hydratation (*Figure 83 – B*). Celle-ci est composée de deux parties, une partie inférieure ressemblant à la plaque de culture et une partie supérieure verte présentant pour chaque puits inférieur, quatre micro-puits permettant le dépôt des réactifs pour les manipulations. Cette plaque doit être hydratée au moins 24 heures avant la manipulation. Pour ce faire, il est nécessaire de retirer la partie supérieure (verte) afin d'accéder aux puits de la partie inférieure (transparente). Dans ceux-ci, il s'agit d'ajouter une solution neutre telle que du PBS (dans les puits de la partie basse transparente). La partie supérieure verte est ensuite remplacée et la plaque doit être déposée au sein d'un incubateur à 37°C mais dépourvu de CO₂.

Le jour de la manipulation, la solution neutre est retirée pour y ajouter une solution tamponnée brevetée fournie par Agilent, le XF calibrant (Agilent, référence 103059-000). La partie supérieure de la cartouche d'hydratation de couleur verte est dédiée au dépôt des solutions de réactifs nécessaires pour les différents tests. Les profils métaboliques sont analysés en ligne *via* la plateforme Seahorse Analytics.

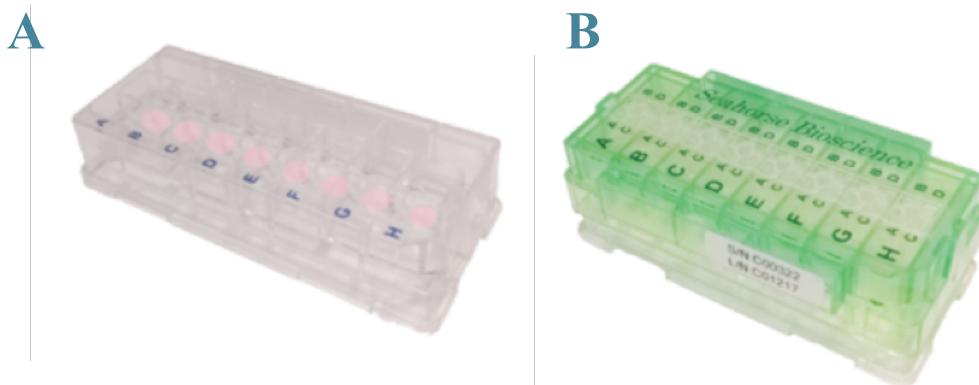


Figure 83 : Photographie des plaques dédiées à l'analyse de flux extracellulaire XFp (SeaHorse Bioscience, Agilent) (Agilent Technologies, 2018)

(A) Plaque de culture et (B) cartouche d'hydratation avec micropores pour le dépôt des réactifs. Ces images sont extraites du guide d'utilisation (kit 103591-100) disponible sur le site internet <https://www.agilent.com>.

a- Test de mesure de la production d'ATP (*ATP rate assay*)

Le test de mesure du taux d'ATP total (*ATP rate assay*) produit par les cellules permet de déterminer la production d'ATP par les cellules vivantes et donc de décrire le métabolisme cellulaire. De plus, ce test permet également de déterminer la proportion de la production d'ATP par l'activité mitochondriale *via* la phosphorylation oxydative et celle résultant de la glycolyse.

Dans un premier temps, les valeurs du taux basal d'acidification extracellulaire (ECAR : *ExtraCellular Acidification Rate*) et du taux de consommation d'oxygène (OCR : *Oxygen Consumption Rate*) sont mesurées en utilisant un milieu tamponné. Puis un premier réactif est injecté : l'oligomycine (1,5 μ M) conduisant à une diminution de l'OCR, ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse de l'ATP par les mitochondries afin d'obtenir la mesure du taux de production d'ATP mitochondrial. L'ECAR, quant à lui permet d'obtenir le taux d'efflux de protons (PER).

Ensuite, un mélange de roténone et d'antimycine A (0,5 µM) est injecté afin d'inhiber complètement l'activité mitochondriale pour permettre à l'appareil de déterminer l'acidification du milieu spécifique aux mitochondries.

Ces données, ainsi que le PER, sont utilisés pour déterminer la production de glycoATP (Glycolytic ATP) (*Figure 84*).

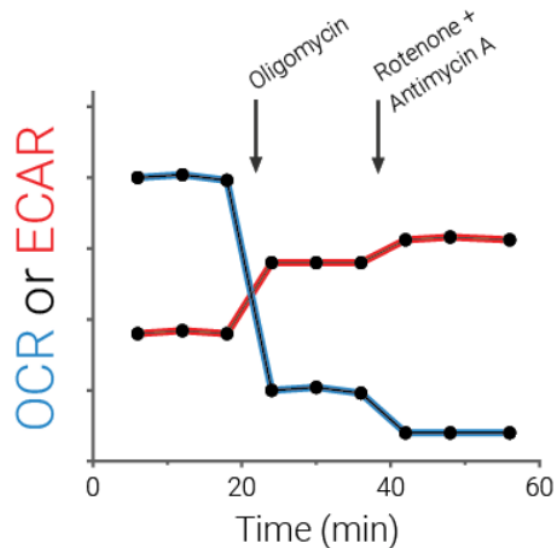


Figure 84 : Profil des mesures des taux de consommation d'oxygène (OCR) et d'acidification du milieu (ECAR) – Infographie de (Agilent Technologies, 2018)

Cette figure est extraite du guide d'utilisation (kit 103591-100) disponible sur le site internet <https://www.agilent.com>.

Afin d'aboutir aux données, plusieurs équations sont réalisées par le logiciel Agilent que nous proposons de décrire ci-dessus (Agilent Technologies, 2018).

Tout d'abord, le taux de production d'ATP glycolytique est calculé : glycoATP. Pour ce faire, deux équations sont nécessaires, premièrement au cours de la conversion d'une molécule de glucose en lactate dans la voie glycolytique, deux molécules d'ATP sont générées ainsi que deux ions hydrogène H^+ et du lactate :

EQUATION 1 (Agilent Technologies, 2018)



Etant donné l'existence d'une stœchiométrie de la voie glycolytique (équation 1), le taux de production d'ATP dans cette voie est similaire au taux d'efflux de protons glycolytiques (glycoPER) et peut être calculé de la manière suivante :

EQUATION 2 (Agilent Technologies, 2018)

$$\text{glycoATP production rate (pmol ATP/min)} = \text{glycoPER (Glycolytic Proton Efflux Rate) (pmolH}^+/\text{min)}$$

Ensuite, il s'agit de calculer le taux de production d'ATP mitochondriale. Ainsi, l'OCR, qui est corrélé à la production d'ATP pendant la phosphorylation oxydative, peut être calculé par l'OCR inhibé *via* l'ajout de l'inhibiteur d'ATP synthase, c'est-à-dire l'oligomycine :

EQUATION 3 (Agilent Technologies, 2018)

$$\text{OCR}_{\text{ATP}} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} = \text{OCR (pmol O}_2\text{/min)} - \text{OCT}_{\text{oligo}} \text{ (pmol O}_2\text{/min)}$$

La valeur de l'OCR_{ATP} est ensuite convertie en taux de production d'ATP mitochondrial selon l'équation qui suit :

EQUATION 4 (Agilent Technologies, 2018)

$$\text{mitoATP (ATP mitochondiral) production rate (pmol ATP/min)} = \text{OCR}_{\text{ATP}} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} \times 2 \text{ (pmol O/pmol O}_2\text{)} \times \text{P/O (pmol ATP/pmol O)}$$

Enfin, le taux de production d'ATP cellulaire total est calculé par l'équation suivante :

EQUATION 5 (Agilent Technologies, 2018)

$$\text{ATP production rate (pmol ATP/min)} = \text{glycoATP production rate (pmol ATP/min)} + \text{mitoATP production rate (pmol ATP/min)}$$

b- Test de stress glycolytique (*Glycolytic Stress Test*)

Le test de stress glycolytique (*Glycolytic Stress Test*) permet de déterminer la glycolyse basale ainsi que la glycolyse compensatoire et la capacité des cellules à gérer la demande énergétique en condition de stress.

Tout d'abord, grâce au milieu tamponné, les valeurs basales ECAR et OCR sont mesurées sur trois points. Puis l'injection d'un premier réactif : la solution de roténone et d'antimycine-A (0,5 μ M) permet d'inhiber les complexes I et III et donc l'activité mitochondriale et la consommation d'oxygène par les mitochondries.

Ensuite, la seconde injection d'un analogue du glucose : le 2-désoxy-D-glucose (2-DG) (50 mM) inhibe la glycolyse en se liant à la glucose hexokinase. Ainsi, la diminution de l'efflux de protons confirme que l'efflux généré avant l'injection de 2-DG résulte bien de la glycolyse (*Figure 85*).

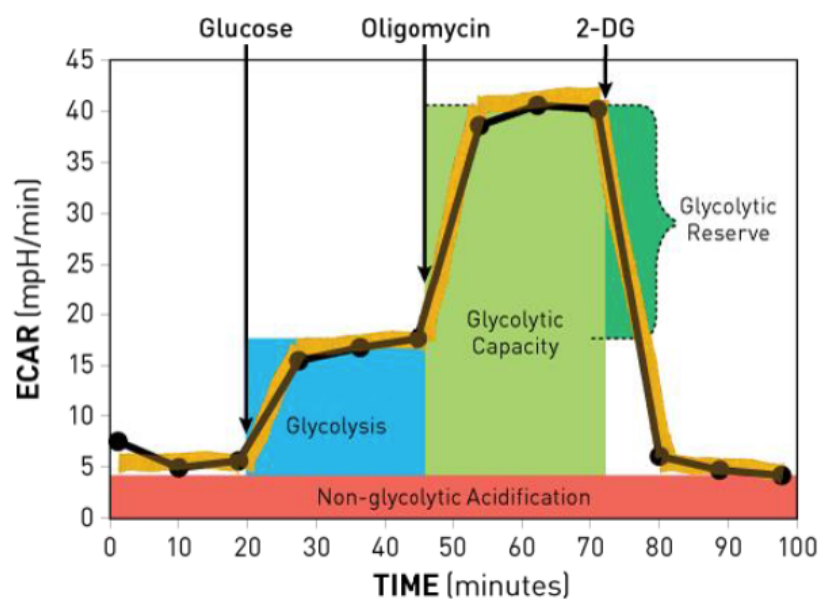


Figure 85 : Schéma représentatif du test Agilent Seahorse XFp Real-Time Glycolytic Stress Test – Infographie de (Agilent Technologies, 2017)

Cette figure est extraite du guide d'utilisation (kit 103591-100) disponible sur le site internet <https://www.agilent.com>.

c- Test du stress mitochondrial (*Mito Stress Test*)

Le test de mesure du stress mitochondrial (*Mito Stress Test*) permet, en mesurant l'OCR, de définir les paramètres clés de la fonction mitochondriale. Tout d'abord, grâce au milieu tamponné, les valeurs basales ECAR et OCR sont mesurées en trois points. Puis l'injection d'un premier réactif : l'oligomycine (1,5 μ M) permet une diminution de l'OCR, ce qui entraîne l'inhibition de la synthèse d'ATP par les mitochondries. Il en résulte alors l'inhibition des complexes I et III et donc de l'activité mitochondriale et de la consommation d'oxygène par les mitochondries.

La deuxième injection permet l'administration du fluoro-carbonyl-cyanide phénylhydrazone (FCCP) (1 μM), un agent de découplage qui perturbe le potentiel membranaire mitochondrial et stimule l'OCR, cette opération permet de définir la capacité respiratoire disponible. Enfin, la troisième injection est un mélange de roténone et d'antimycine A (0,5 μM) injecté pour inhiber complètement l'activité mitochondriale afin de déterminer l'acidification du milieu spécifique aux mitochondries (Figures 86 et 87).

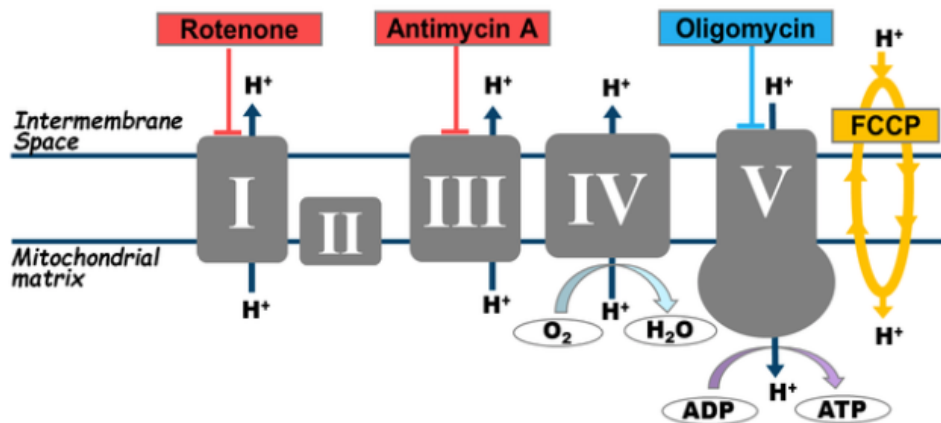


Figure 86 : Mécanisme d'action des réactifs utilisés dans le test du stress mitochondrial, Mito Stress Test – Infographie de (Agilent Technologies, 2019)

Cette figure est extraite du guide d'utilisation (Kit 103015-100) disponible sur le site internet <https://www.agilent.com>.

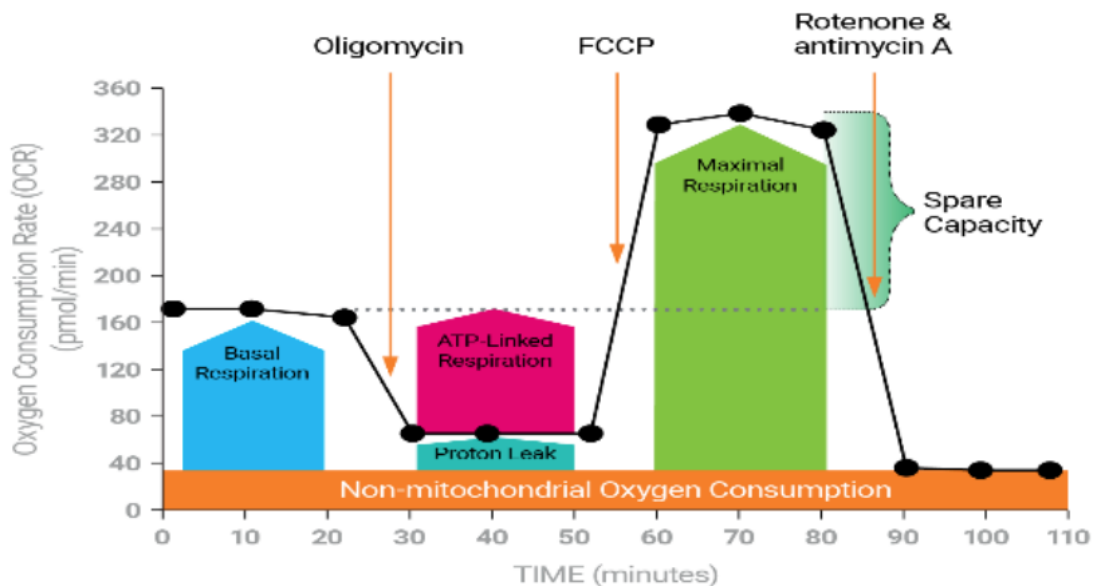


Figure 87 : Profil du test Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test, montrant les paramètres clés de la fonction mitochondriale – Infographie de (Agilent Technologies, 2019)

Cette figure est extraite du guide d'utilisation (Kit 103015-100) disponible sur le site internet <https://www.agilent.com>.

5) Test d'évasion cellulaire

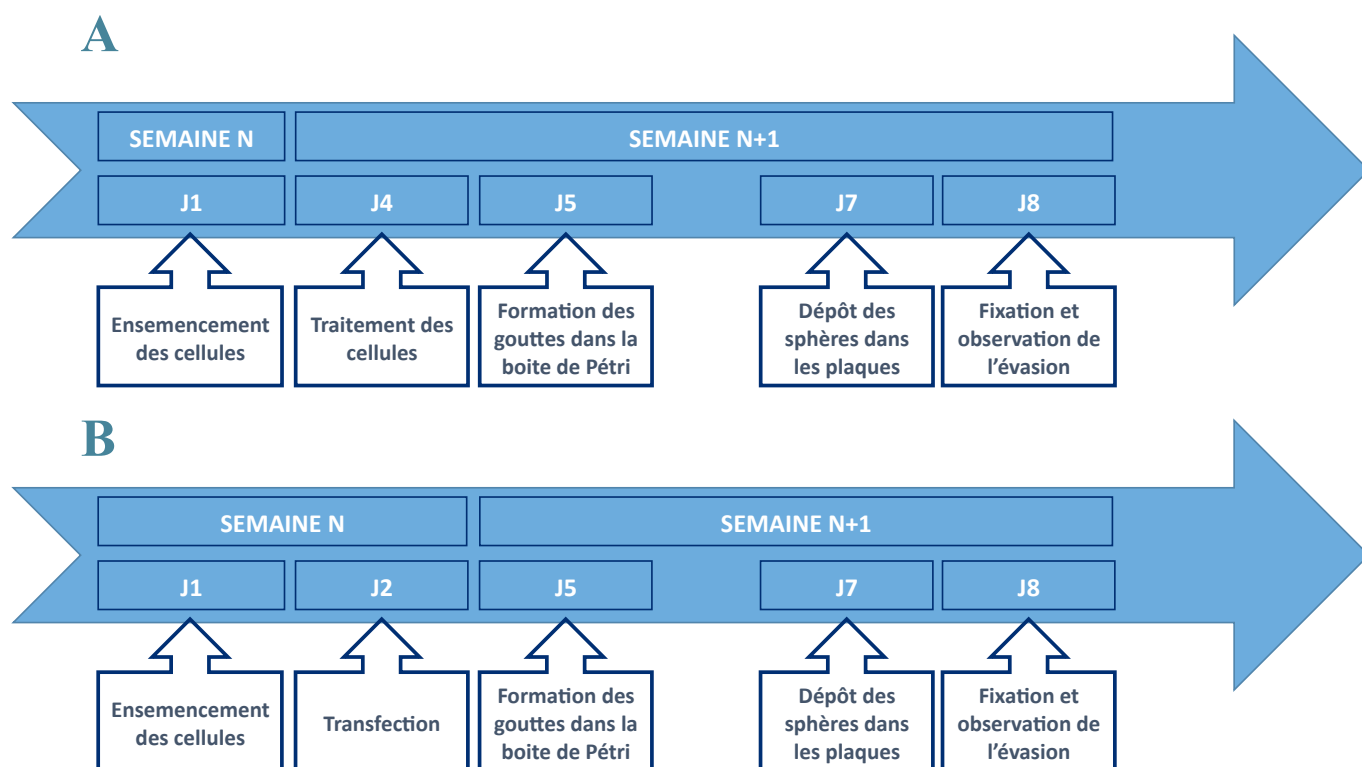


Figure 88 : Programmation des tests d'évasion cellulaire pour les cellules traitées par du cétuximab et/ou de la radiothérapie et pour des cellules transfectées

(A) Frise chronologique pour les manipulations effectuées sur les cellules traitées par du cétuximab et/ou de la radiothérapie. (B) Frise chronologique pour les manipulations effectuées sur les cellules uniquement transfectées.

Frises chronologiques réalisées par A. JEHL.

Ce test se base sur la technique des gouttes suspendues. Ainsi, 24 heures après une irradiation et/ou un traitement par du cétuximab (*Figure 88 – A*) ou 72 heures après une transfection (*Figure 88 – B*), des sphères tumorales sont générées à l'aide du protocole de gouttes suspendues. Celui-ci consiste tout d'abord à réaliser une suspension cellulaire composée de 500 000 cellules dans 1 mL de milieu pour sphéroïdes. Ce milieu comprend 80% du milieu de culture classique des cellules, soit du DMEM pour les CAL27 et CAL33, soit du DMEM/F12 pour les SCC9, additionnés de 20% de méthylcellulose (Sigma). Une fois l'homogénéisation réalisée, en prenant soin de limiter la formation de bulles, 20 μ L de suspension sont déposés sur la face interne du couvercle d'une boîte de Pétri de diamètre moyen, à savoir 35 mm. Une fois la manœuvre terminée, le fond de la boîte est replacé sur le couvercle.

Le tout est retourné et la boîte est placée dans une chambre humide à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ pendant 48 heures pour permettre la formation des sphères par gravité. Une fois le délai écoulé, 4 à 5 sphères sont délicatement récupérées au sein des gouttes pour les déposer dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 500 µL de milieu de culture, soit du DMEM soit du DMEM/F12. La plaque est replacée à l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ durant 24 heures. Enfin, l'évasion peut être objectivée après avoir réalisé la fixation des cellules *via* du glutaraldéhyde 1% (Electron Microscopy Sciences). Ce réactif est placé durant 30 minutes dans chacun des puits, puis retirer et deux lavages sont nécessaires avec une solution neutre avant de pouvoir visualiser les cellules au microscope optique Evos XI Core (AMG) au grossissement x10.

Les aires d'évasion sont déterminées par analyse des photographies *via* le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>) en utilisant la formule suivante :

Aire d'évasion = aire totale – aire de la sphère (*Figure 89*)

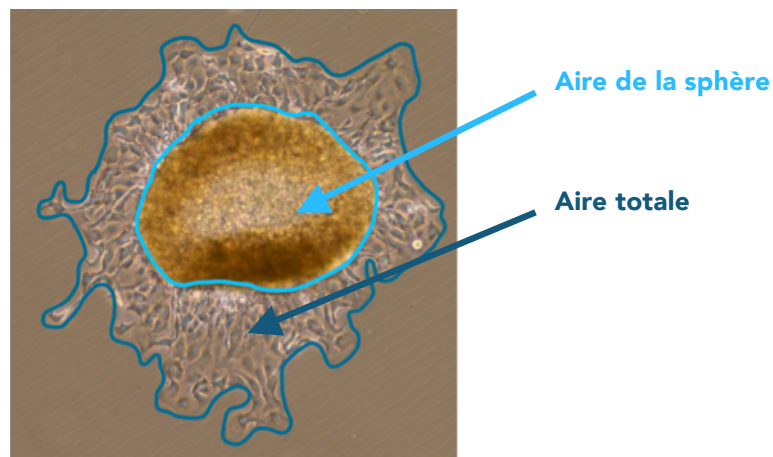


Figure 89 : Exemple d'un résultat d'un test d'évasion avec une sphère formée à partir de la lignée cellulaire des CAL33

Le contournement en bleu ciel correspond à l'aire de la sphère initiale, et celui en bleu canard correspond à l'aire totale. Photographie *via* le microscope Evos XI Core (AMG) au grossissement x10 réalisée par A. JEHL.

6) Tests de mise en évidence du processus de mort cellulaire par ferroptose

a- Test de mise en évidence des ions ferreux intracellulaires : FerroOrange, Dojindo

L'une des caractéristiques de la mort cellulaire programmée par ferroptose correspond à l'accumulation intracellulaire d'ions ferreux : Fe^{2+} . Afin de mettre en évidence la présence de ces ions, nous avons utilisé la sonde intracellulaire FerroOrange (Dojindo, Chine, référence F374). Concernant le mécanisme de cette sonde brevetée, le fabricant indique que celle-ci est inerte à l'extérieur de la cellule et qu'elle est capable de pénétrer les cellules et d'émettre une fluorescence uniquement en cas de contact avec les ions ferreux intracellulaires (*Figure 90*).

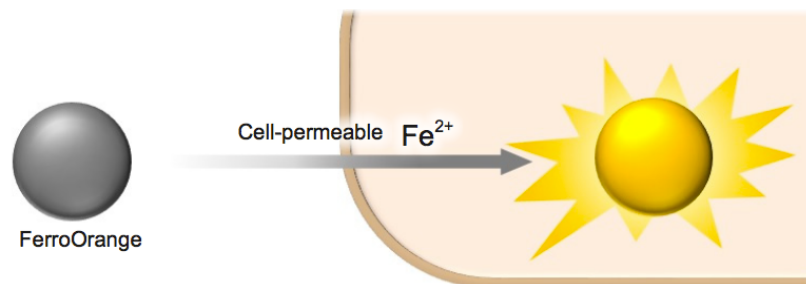


Figure 90 : Sonde FerroOrange, Dojindo pour la détection des ions ferreux intracellulaires (Dojindo Molecular Technologies, 2019)

Cette figure est extraite de la fiche technique (FerroOrange, Dojindo) disponible sur le site internet <https://dojindo.com>.

Pour réaliser cette manipulation, nous avonsensemencé les cellules dans des plaques 96 puits aux parois opaques blanches, afin 24 heures plus tard de mesurer l'intensité de fluorescence émise par la sonde. Une fois le temps écoulé, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées *via* une solution neutre puis, à l'abri de la lumière, la solution de FerroOrange, Dojindo à 1 $\mu\text{mol/L}$ est ajoutée dans chacun des puits. La plaque est ensuite placée durant 30 minutes au sein d'un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 . L'intensité de fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques, le Varioskan LUX (Thermo Scientific) paramétré avec une longueur d'onde d'excitation à 543 nm et une longueur d'onde d'émission à 580 nm ainsi qu'un temps de lecture à 100 ms.

En parallèle, les cellules sont égalementensemencées dans des puits LabTek en verre pour réaliser de l'imagerie *via* un microscope confocal LEICA TCS SPE II (Leica Microsystems SA, Nanterre Cedex, France), avec un objectif de grossissement x20 et les paramètres réglés pour une longueur d'onde d'excitation à 488 nm et une longueur d'onde d'émission à 500-550 nm. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>).

b- Test de mise en évidence de lipides peroxydés : Liperfluo, Dojindo

L'accumulation des lipides peroxydés au sein des cellules correspond à la seconde caractéristique de la mort cellulaire programmée par ferroptose. Pour détecter cette accumulation de lipides peroxydés, nous avons utilisé le kit Liperfluo (*Figure 91*) (Dojindo, Chine, L248). Les cellules sont alorsensemencées dans des puits LabTek en verre afin de réaliser de l'imagerie avec un microscope confocal. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées avec une solution neutre. La solution de Liperfluo, Dojindo est ajoutée dans chacun des puits à une concentration de 1 µmol/L, à l'abri de la lumière. La plaque est ensuite placée durant 30 minutes au sein d'un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. La solution de Liperfluo, Dojindo est retirée et les cellules sont à nouveau rincées *via* une solution neutre. Puis, l'ensemble est visualisé au microscope confocal LEICA TCS SPE II (Leica Microsystems SA, Nanterre Cedex, France) avec un objectif de grossissement x20 et les paramètres réglés pour une longueur d'onde d'excitation à 488 nm et une longueur d'onde d'émission à 500-550 nm. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>).

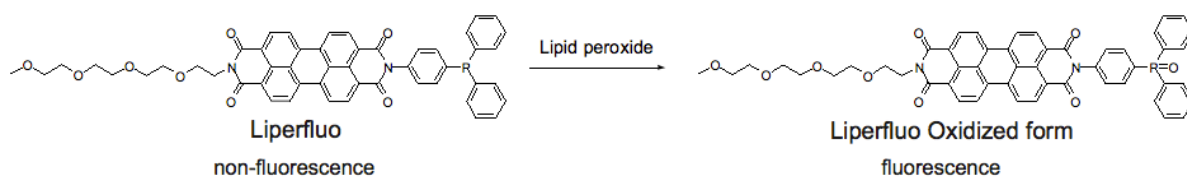


Figure 91 : Molécule Liperfluo proposée par Dojindo dans l'étude de la ferroptose par mise en évidence des lipides peroxydés (Dojindo Molecular Technologies, 2020)

Cette figure est extraite de la fiche technique (Liperfluo, Dojindo) disponible sur le site internet <https://dojindo.com>.

IV) Techniques de biologie moléculaire

1) Western blot

Les cellules sont lysées dans la glace à l'aide du tampon de lyse (1% Triton X-100, NaF 100mM, NaPPi 10mM, Na₃VO₄ 1mM dans du PBS 1X) supplémenté extemporanément d'un cocktail anti-protéases (Roche). La lyse cellulaire est réalisée à 4°C (sur de la glace) durant 30 minutes ou en plaçant les échantillons au congélateur à -20°C pendant au moins 24 heures, puis une sonication de 5 secondes environ est effectuée. Le lysat protéique est alors centrifugé à 14 000 rpm durant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans un microtube puis les échantillons sont dosés. Le dosage protéique est réalisé selon les recommandations du fabricant (DC Protein Assay, Biorad).

L'analyse de la concentration protéique se fait par lecture de la densité optique au spectrophotomètre, à 595 nm. Une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : *Bovine Serum Albumin* de 0 à 2 mg/ml) est effectuée sur la même plaque que les échantillons. Afin d'effectuer les western blots, les échantillons sont préparés de manière à déposer de 5 à 20 µg de protéines sur un gel de polyacrylamide TGX 4-20% (SDS-PAGE Bio-Rad®). La migration est réalisée dans un tampon d'électrophorèse (Tris-Glycine 1X Eudomedex, 5ml SDS 20%, q.s.p 1 litre) à 150 – 180 volts durant 45 minutes à 1 heure. Le transfert, quant à lui, s'effectue sur une membrane de PVDF (Amersham) durant 30 minutes à 100 volts. Un blocage des sites aspécifiques est nécessaire par incubation d'au moins une heure dans un tampon de blocage (lait ou BSA à 20%, selon les recommandations fabricants). Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C, sous agitation, avec l'anticorps primaire (*Tableau VIII*).

Une fois le temps écoulé, les membranes sont lavées au moyen d'un tampon de lavage correspondant (PBS 1x/Tween 0,3%) durant 15 minutes puis 3 fois 5 minutes afin d'éliminer l'anticorps primaire excédentaire. Puis, elles sont incubées 1 heure à température ambiante, sous agitation douce, dans le tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire. Les membranes sont à nouveau lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'anticorps secondaire en excès. La révélation est réalisée au moyen d'un bio-analyseur : LAS4000® (GE Healthcare) *via* de la chimioluminescence. Au préalable, la membrane est exposée durant 5 minutes à une solution composée de peroxydase qui oxyde le luminol (kit Clarity ECL®, Bio-Rad) ce qui entraîne l'émission de la lumière à 425 nm. Le signal généré est analysé *via* le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/>).

Tableau VIII : Anticorps utilisés durant le travail de recherche des trois années de thèse

Anticorps	Espèce	Dilution	Fournisseur
Akt #9272	Lapin	1:1000 (Lait)	Cell Signaling Technology [®]
Phospho-AKT (Ser473) D9E #4060	Lapin	1:1000 (Lait)	
Beclin-1 #3738	Lapin	1:1000 (Lait)	
Caveolin-1 (D4663) #3267S	Lapin	1:1000 (Lait)	
EREG (D4O5I) #12048	Lapin	1:1000 (Lait)	
EGFR (D38B1) #4267S	Lapin	1:1000 (Lait)	
LC3B (D11) #3868	Lapin	1:1000 (Lait)	
p44/42 MAPK (ERK1/2) #9102	Lapin	1:1000 (Lait)	
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) Thr202/Tyr204 #9101	Lapin	1:1000 (Lait)	
PARP clivée (Asp214) #9541	Lapin	1:1000 (Lait)	
TAZ #D3I6D	Lapin	1:1000 (Lait)	
ULK1 (D8H5) #8054	Lapin	1:1000 (Lait)	
YAP #140745	Lapin	1:1000 (Lait)	
pYAP S127 #D9W2I	Lapin	1:1000 (Lait)	
GAPDH (MAB374)	Souris	1:10000 (Lait)	EMD Millipore [®]
GPX4 (EPNCIR144) #ab125066	Lapin	1:1000 (Lait)	Abcam [®]
c-MYC (9E10) sc-40	Souris	1:200 (Lait)	Santa Cruz Biotechnology [®]
Anti-mouse IgG HRP-conjugate	Chèvre	1 :10000 (Lait)	Promega [®]
Anti-rabbit IgG HRP-conjugate	Chèvre	1 :10000 (Lait)	

2) RT-qPCR

Avant de réaliser la RT-qPCR, il est tout d'abord nécessaire de réaliser une extraction des ARNs. Pour ce faire, nous appliquons le protocole décrit par Qiagen (Qiagen, référence 74134). Les extractions sont réalisées dans 350 μ L d'une solution de β -mercaptoéthanol et de *RTL buffer lysis* selon le ratio 10 μ L pour 1 mL, respectivement. Après des allers-retours effectués avec une seringue et une aiguille, le volume est déposé au sein d'un premier tube composé d'un microtube et d'une colonne bleue avec filtre permettant de retenir l'ADN (fourni dans le kit). L'ensemble des tubes est ensuite mis à centrifuger pendant 30 secondes à 10 000 rpm et le filtre est retiré et jeté.

Pour poursuivre, 350 μL d'éthanol à 70% sont additionnés au volume déjà présent dans le tube, les 700 μL sont alors resuspendus et placés dans de nouveaux tubes composés d'un microtube et d'une colonne rose avec filtre afin de faire précipiter l'ARN (fourni dans le kit), ceux-ci sont mis à centrifuger pendant 15 secondes à 10 000 rpm. Le surnageant est retiré au moyen d'une pompe et 700 μL de la solution *RWI* (Qiagen) du kit sont placés dans ces microtubes. A nouveau, les microtubes sont centrifugés et le surnageant est retiré. Le protocole se poursuit par l'addition de 500 μL d'une solution de tampon *RPE* (Qiagen) présente dans le kit (44 mL d'éthanol sont ajoutés au lyophilisat avant l'utilisation de ce tampon), il permet l'élimination des résidus de sels laissés par les réactifs précédents. Une fois cette solution ajoutée, une centrifugation est réalisée, cette opération est répétée une seconde fois. Enfin, 30 μL d'une solution d'eau *RNase free* (Qiagen) du kit sont déposés sur les colonnes et le tout est mis à centrifuger à 14 000 rpm pendant 1 minute.

Une fois l'extraction réalisée, la seconde étape consiste à doser les ARNs présents dans nos échantillons. Pour ce faire, nous déposons 1 μL de la solution sur l'optique de la machine NanoDrop qui réalise des lectures de l'absorbance à 260 et 280 nm.

La troisième étape correspond à la transcription inverse, il s'agit là de rétrotranscrire l'ARN en ADN complémentaire. Pour réaliser cette procédure, il est nécessaire de préparer une solution composée de l'enzyme *reverse transcriptase* et du *iScript* (Bio-rad, référence 1708891). Cette solution permet la synthèse d'ADN complémentaire du premier brin pour la qPCR en temps réel. Un tube pour le contrôle négatif est préparé contenant uniquement de la solution Mix et de l'eau du kit *RNA free*. L'ensemble des échantillons est alors préparé où chaque tube contient de l'eau *RNA free* du kit, la solution composée de l'enzyme *reverse transcriptase* et du *iScript* ainsi que 1 μg d'ARN. Tous les tubes sont placés au sein d'un thermocycleur T100 Thermal Cycles afin de réaliser la transcription inverse.

Enfin, la dernière étape correspond à la PCR ou *Polymerase Chain Reaction* qui permet d'amplifier de manière massive les ADNs complémentaires qui sont détectés au moyen d'un fluorophore : le *SYBERTM Green* (1X *SYBERTM Green Master Mix*, Applied Biosystems, référence 43856122). Ainsi, celui-ci s'incorpore dans les transcrits amplifiés lors de chaque cycle.

La solution préparée pour réaliser la PCR est composée d'eau MQ[®], de SYBER[™] Green contenant un tampon, les désoxyribonucléotides triphosphates, de l'ADN polymérase *hot-start* et le colorant, et enfin des amorces (partie F et partie R). Les amorces, sens et antisens, sont déposées à une concentration finale de 300 µM. Les paires d'amorces suivantes, provenant d'Invitrogen, ont été utilisées et sont présentées ci-dessous sous forme de tableau récapitulatif (*Tableau IX*).

Tableau IX : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR durant le travail de recherche des trois années de thèse

Amorce	Sens	Antisens	Fournisseur
AREG	5'-CCACAGTGCTGATGGATTG-3'	5'-GCCAGGTATTTGTGGTTCGT-3'	Invitrogen
CAV1	5'-ACCGCGACCCTAAACACCTC-3'	5'-CCTTCCAAATGCCGTCAAAA-3'	
CCND1	5'-GCTGTGCATCTACACCGACA-3'	5'-TTGAGCTTGTCACCAGGAG-3'	
CYR61	5'-ATGAATTGATTGCAGTTGAAAA-3'	5'-TAAAGGGTTGTATAGGATGCGA-3'	
EREG	5'-TCCCAGGAGAGTCCAGTGAT-3'	5'-GTGTTACATCGGACACCAG-3'	
MYC	5'-CTTGTTGCGAAACGACGAG-3'	5'-ACTCAGCCAAGTTGTGAGG-3'	
RNA18S	5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3'	5'-TCCAGACCATGGCTAGGAC-3'	

La plaque 96 puits de PCR est alors remplie en déposant 15 µL de solution PCR et 5 µL d'ADNc par puits (50 ng/mL) selon le schéma de plaque défini. La plaque est alors scellée *via* un film plastique transparent autocollant afin de limiter l'évaporation des échantillons lors de l'augmentation de la température à l'étape d'amplification. La plaque est centrifugée pendant 2 minutes à 1 000 rpm et déposée dans la machine : StepOne Plus[™] (Applied Biosystems) pour déterminer l'expression de l'ARN messager par RT-qPCR quantitative relative. Le programme d'amplification se compose de trois étapes, en commençant par la dénaturation durant 10 minutes à 95°C, puis l'hybridation s'articulant en 40 cycles de 15 secondes à 95°C et enfin l'élongation durant 1 minute à 65°C.

L'analyse de l'amplification des transcrits est objectivée par la valeur du nombre de cycles d'amplification (Ct). Ainsi, plus la valeur du Ct est importante, moins le transcrit est exprimé. L'ARN ribosomique 18S est employé comme gène de référence.

Enfin, les résultats sont obtenus *via* le rapport des Ct du transcrit d'intérêt selon le Ct de l'ARN ribosomique 18S grâce à l'équation suivante : $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

V) Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme suivante : moyenne \pm erreur standard de la moyenne ou SEM. Plusieurs tests statistiques ont permis d'analyser les résultats, à savoir : test t de Student, test ANOVA ou *two way ANOVA* *via* le logiciel Prism[®] 5.0 (GraphPad).

Pour chacun de ces tests statistiques précités, la valeur p est la suivante :

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ et **** = $p < 0,0001$.

RESULTATS

Article scientifique n°1 publié le 18 juin 2021 dans *Cancers*

<https://doi.org/10.3390/cancers13123038>

Burgy, M*. and **Jehl, A***, Conrad, O., Foppolo, S., Bruban, V., Etienne-Selloum, N., Jung, A.C., Masson, M., Macabre, C., Ledrappier, S., Burckel, H., Mura, C., Noël, G., Borel, C., Fasquelle, F., Onea, M.-A., Chenard, M.- P., Thiéry, A., Dontenwill, M., Martin, S.

***Co-auteurs**

**Cav1 / EREG / YAP Axis in the Treatment
Resistance of Cav1 –Expressing Head and Neck
Squamous Cell Carcinoma**

Introduction

D'après le dernier rapport du GLOBOCAN publié en 2020, l'incidence des cancers de la tête et du cou va progresser pour atteindre 1 160 000 cas à travers le monde d'ici à 2030, soit une augmentation de 30% en moins de 15 ans (Sung et al., 2021).

En parallèle de ces données, le diagnostic de ces cancers est trop souvent tardif avec des patients présentant, dans deux tiers des cas, une maladie à un stade déjà avancé : stades III et IV. De plus, le taux de survie pour ces cancers est faible et n'évolue pas notamment en raison de la survenue de récurrences post-traitement. En effet, environ 50% des patients atteints d'un cancer ORL présentent une récurrence locorégionale et 20 à 30% une récurrence métastatique à distance post-traitement (Vermorken and Specenier, 2010). Ces récurrences peuvent trouver une explication dans le défaut de biomarqueurs existants dans ces cancers, soit des biomarqueurs pronostiques afin d'anticiper l'évolution de la tumeur primitive soit des biomarqueurs prédictifs pour présager de la réponse aux traitements. Ainsi, pour améliorer le diagnostic, la prise en charge thérapeutique et le suivi des patients afin d'optimiser leur survie, il devient urgent d'identifier un ou des biomarqueurs utilisables par les cliniciens.

Les membres de notre équipe ont eu l'occasion de travailler sur d'autres cancers et ont pu mettre en avant l'intérêt d'une protéine à caractère pronostique et prédictif : la Cav1. En effet, ils ont pu d'une part, aboutir à la conclusion que la Cav1 module la chimiosensibilité dans les cancers du côlon (Martin et al., 2005) et d'autre part que celle-ci peut être considérée comme un biomarqueur pronostique et prédictif de l'agressivité des glioblastomes (Martin et al., 2009) – (Cosset et al., 2012). L'étude de l'implication de la Cav1 a donc paru pertinente dans les cancers des VADS.

Ainsi, à travers une étude rétrospective effectuée sur une cohorte de patients dont la stratification a tenu compte de la présence ou non de métastases, notre équipe a pu discriminer l'implication de l'expression faible de la Cav1 dans les tumeurs à profil métastatique. Ce caractère pronostique de la Cav1 dans les cancers ORL a été confirmé par des analyses phénotypiques *in vitro*, où la faible expression de la Cav1 est corrélée avec un engagement des cellules dans l'EMT caractérisée par une augmentation de la motilité, de l'évasion et de l'invasion cellulaires ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de fibronectine et une surexpression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et des métalloprotéases matricielles.

Ces travaux ont également permis de mettre en évidence l'intérêt thérapeutique du ciblage des intégrines et notamment celui de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Jung et al., 2015).

Pour autant, l'implication de l'expression de la Cav1 dans les processus de rechutes reste à élucider et notamment dans un contexte de rechutes locorégionales. C'est pourquoi, notre équipe a décidé de réaliser une autre étude rétrospective sans prendre en compte cette fois la présence ou non de métastases mais uniquement en tenant compte de l'expression de la Cav1 afin d'évaluer son caractère pronostique. En parallèle des résultats cliniques, il s'agit également dans ce projet de mettre en lumière les processus moléculaires et cellulaires permettant d'expliquer l'apparition des rechutes locorégionales. Etant donné que ceux attribués aux métastases sont reliés à une expression faible de la Cav1 et décrits dans l'article de notre équipe publié en 2015, il reste donc à élucider les processus impliqués dans les rechutes locorégionales. C'est pourquoi, dans ce projet notre attention se porte sur les conséquences phénotypiques (croissance, évasion, survie, métabolisme et morts cellulaires) mais également moléculaires d'une surexpression de la Cav1 dans des lignées cellulaires commerciales de cancers de la tête et du cou afin d'évaluer et de conclure sur le caractère pronostique de son expression. De plus, il s'agit également d'étudier son caractère prédictif afin de l'utiliser comme critère dans l'arbre décisionnel de prise en charge thérapeutique. Pour ce projet, deux traitements proposés dans un contexte de cancers localement avancés sont étudiés, à savoir la radiothérapie combinée ou non au cétuximab. Ces deux thérapies sont sélectionnées en raison des données de la littérature qui indiquent une amélioration du contrôle locorégional et de la survie globale chez les patients traités par une association de cétuximab à de radiothérapie comparés aux patients traités uniquement par la radiothérapie (Bonner et al., 2006) - (Bonner et al., 2010). Ainsi, la seule option thérapeutique basée sur une thérapie ciblée dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou à détenir une autorisation de mise sur le marché de la FDA et de l'EMA correspond au cétuximab en association à la radiothérapie. Donc, par ce projet nous souhaitons déterminer l'implication de la Cav1 sur la réponse aux thérapies précitées mais également les conséquences de ces traitements sur l'expression de cette protéine.

Ce projet vise à conclure sur le caractère pronostique de la Cav1 et sur sa possible utilisation en clinique pour le suivi de l'évolution de la tumeur primitive. De plus, ce travail scientifique a pour but d'argumenter sur le caractère prédictif de la Cav1 pour une radiothérapie combinée ou non à du cétuximab et sur la pertinence clinique de son utilisation dans l'arbre décisionnel de prise en charge thérapeutique.

Les résultats de ce projet sont présentés ci-dessous au sein de l'article *Cav1 / EREG / YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* publié en juin 2021 dans *Cancers* (Burg and Jehl et al., 2021).

Article

Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Mickaël Burgy ^{1,2,†}, Aude Jehl ^{1,†}, Omblin Conrad ¹, Sophie Foppolo ¹, Véronique Bruban ¹, Nelly Etienne-Selloum ^{1,3}, Alain C. Jung ^{4,5}, Murielle Masson ⁶, Christine Macabre ^{4,5}, Sonia Ledrappier ^{4,5}, Hélène Burckel ⁷, Carole Mura ⁷, Georges Noël ^{7,8}, Christian Borel ², François Fasquelle ⁹, Mihaela-Alina Onea ¹⁰, Marie-Pierre Chenard ¹⁰, Alicia Thiéry ¹¹, Monique Dontenwill ¹ and Sophie Martin ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Bioimaging and Pathology, University of Strasbourg, UMR7021 CNRS, 67401 Illkirch, France; m.burgy@icans.eu (M.B.); aude.jehl@etu.unistra.fr (A.J.); omblin.conrad@etu.unistra.fr (O.C.); sophie.foppolo@unistra.fr (S.F.); veronique.bruban@unistra.fr (V.B.); nelly.etienne-selloum@unistra.fr (N.E.-S.); monique.dontenwill@unistra.fr (M.D.)
 - ² Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France; C.borel@icans.eu
 - ³ Department of Pharmacy, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France
 - ⁴ Laboratory STREINTH (Stress Response and Innovative Therapies), Inserm IRFAC U1113, Université de Strasbourg, 67200 Strasbourg, France; a.jung@icans.eu (A.C.J.); CMacabre@strasbourg.unicancer.fr (C.M.); s.ledrappier@icans.eu (S.L.)
 - ⁵ Laboratory of Tumor Biology, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France
 - ⁶ UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, 67412 Illkirch, France; murielle.masson@unistra.fr
 - ⁷ Paul Strauss Comprehensive Cancer Center, Radiobiology Laboratory, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Strasbourg University, UNICANCER, 67000 Strasbourg, France; h.burckel@icans.eu (H.B.); C.mura@icans.eu (C.M.); g.noel@icans.eu (G.N.)
 - ⁸ Paul Strauss Comprehensive Cancer Center, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe (ICANS), Department of Radiation Oncology, Unicancer, 67200 Strasbourg, France
 - ⁹ Institut Pathology, University Hospital of Lausanne, 1011 Lausanne, Switzerland; Francois.Fasquelle@chuv.ch
 - ¹⁰ Department of Pathology, Strasbourg University Hospital, 67200 Strasbourg, France; Mihaela.ONEA@chru-strasbourg.fr (M.-A.O.); Marie-Pierrette.CHENARD@chru-strasbourg.fr (M.-P.C.)
 - ¹¹ Department of Public Health, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France; athiery@strasbourg.unicancer.fr
- * Correspondence: sophie.martin@unistra.fr; Tel.: +3-336-885-4197; Fax: +3-336-885-4313
† These authors contributed equally to the work.



Citation: Burgy, M.; Jehl, A.; Conrad, O.; Foppolo, S.; Bruban, V.; Etienne-Selloum, N.; Jung, A.C.; Masson, M.; Macabre, C.; Ledrappier, S.; et al. Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 3038. <https://doi.org/10.3390/cancers13123038>

Academic Editor: Amanda Psyrrri

Received: 3 May 2021

Accepted: 11 June 2021

Published: 18 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The EGFR-targeting antibody cetuximab (CTX) combined with radiotherapy has been proven effective for the treatment of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (LA-HNSCC). Due to resistance to CTX, some patients do not benefit from the treatment and recurrence is observed. As caveolin-1 (Cav1) has been reported to affect the EGFR pathway, we aimed to elucidate how it might affect the response to CTX-radiotherapy. We showed that Cav1 expression conferred surviving, growing and motile capacities that protect cells against the combination of CTX-radiotherapy. The protecting effects of Cav1 are mediated by the Cav1/EREG/YAP axis. We also showed in a retrospective study that a high expression of Cav1 was predictive of locoregional relapse of LA-HNSCC. Cav1 should be taken into consideration in the future as a prognosis marker to identify the subgroup of advanced HNSCC at higher risk of recurrence, but also to help clinicians to choose the more appropriate therapeutic strategies.

Abstract: The EGFR-targeting antibody cetuximab (CTX) combined with radiotherapy is the only targeted therapy that has been proven effective for the treatment of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (LA-HNSCC). Recurrence arises in 50% of patients with HNSCC in the years following treatment. In clinicopathological practice, it is difficult to assign patients to classes of risk because no reliable biomarkers are available to predict the outcome of HPV-unrelated HNSCC. In the present study, we investigated the role of Caveolin-1 (Cav1) in the sensitivity of HNSCC cell lines to CTX-radiotherapy that might predict HNSCC relapse. Ctrl- and Cav1-overexpressing HNSCC cell lines were exposed to solvent, CTX, or irradiation, or exposed to CTX before irradiation. Growth,

clonogenicity, cell cycle progression, apoptosis, metabolism and signaling pathways were analyzed. Cav1 expression was analyzed in 173 tumor samples and correlated to locoregional recurrence and overall survival. We showed that Cav1-overexpressing cells demonstrate better survival capacities and remain proliferative and motile when exposed to CTX-radiotherapy. Resistance is mediated by the Cav1/EREG/YAP axis. Patients whose tumors overexpressed Cav1 experienced regional recurrence a few years after adjuvant radiotherapy \pm chemotherapy. Together, our observations suggest that a high expression of Cav1 might be predictive of locoregional relapse of LA-HNSCC.

Keywords: head and neck cancer; biomarkers; EGFR therapy

1. Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents the fifth most common cancer worldwide, with an annual incidence and mortality estimated to be approximately 600,000 and 375,000 cases, respectively [1]. Locally advanced HNSCC (LA-HNSCC, stage III/IV) represents about 60% of patients at diagnosis. They require primary surgery followed by adjuvant (chemo)radiotherapy or definitive chemoradiotherapy. Despite such therapeutic strategies, the 3-year survival rate does not exceed 60% due to regional recurrence or distant metastasis that occurs in 50% of patients. In clinicopathological practice, it is difficult to assign patients to classes of risk because no reliable biomarkers are available to predict the outcome of HPV-unrelated HNSCC.

Cetuximab (CTX) is a human/murine chimeric IgG1 monoclonal antibody that binds to the epidermal growth factor receptor (EGFR). CTX promotes EGFR internalization, preventing the downstream signal [2,3]. Bonner's trial [4,5] showed a significant improvement in locoregional control (three-year rates of locoregional control: 47% with radiotherapy plus cetuximab vs. 34% with radiotherapy alone) and median overall survival (49 vs. 29 months) for patients treated with CTX and radiotherapy vs. radiotherapy alone. These results led to the FDA approval of CTX in combination with radiotherapy for the treatment of LA-HNSCC [6,7]. The GORTEC 2007-01 phase III randomized trial showed no survival benefit associated with CTX combined with chemoradiation despite significant gains in locoregional control. This combination is therefore not recommended as treatment for HNSCC [8]. To date, CTX combined with radiotherapy is the only targeted therapy that has been proven effective for the treatment of LA-HNSCC patients ineligible for cisplatin. Vermorken and colleagues [9] showed the benefits of combining CTX with cisplatin/carboplatin and 5-FU (EXTREME regimen) vs. chemotherapy alone for recurrent or metastatic HNSCC (R/M-HNSCC). In 2019, the KEYNOTE-048 study demonstrated the superiority of pembrolizumab alone or in combination with platinum and 5-FU in all patients vs. EXTREME [10]. This result set immunotherapy as the new standard of care (SOC) in the R/M setting. However, the survival benefit of immunotherapy \pm chemotherapy is not clearly demonstrated for all subgroups and overall survival seems to be less important for the PD-L1 combined positive score (CPS) <1 . Thus, indication of pembrolizumab combination is restricted by the European Medicines Agency (EMA) to patients whose disease expresses PD-L1 with CPS ≥ 1 , with an ongoing role for CTX in the first line for the CPS <1 population. Unfortunately, some patients do not benefit from CTX treatment, and others show recurrences soon after the end of the treatment. Both cases suggested an intrinsic or therapeutically acquired resistance to CTX. Extensive studies have sought to understand the mechanisms involved.

Caveolin-1 (Cav1) is one of the main constituents of lipid domains known as caveolae. Cav1 triggers, and plays a key role in, all the features described as the hallmarks of cancer. Whether Cav1 is an oncogene or a tumor suppressor is debated; however, the answer may be related not only to the levels expressed but also to its function, localization (tumor or stromal cells), type and stage of cancer, or physical forces within the environment of the tumor [11,12]. In HNSCC, low or no expression of Cav1 was reported to be predictive of

metastasis-prone HNSCC [13–15]. We showed that the disappearance of Cav1 triggered epithelial to mesenchymal transition associated with the expression of integrins and MMPs responsible for the motile and invasive processes promoting metastasis [13]. Cav1 was initially described as a negative regulator of EGFR [16]. However, Cav1 can also promote EGFR activation and facilitate downstream signal transduction by relocating EGFR close to its signaling partners. Cav1 also modifies the half-life and cell surface availability of EGFR [17–24]. It is therefore not surprising that Cav1 might be predictive of anti-EGFR drug efficacy or failure [22,25–28]. How Cav1 overexpression affects the response to treatment and tumor evolution is only sparsely documented in HNSCC. We have highlighted here that the overexpression of Cav1 confers survival capacities on cells that remain proliferative and motile when exposed to CTX-radiotherapy. Such resistance might explain locoregional recurrence in Cav1-overexpressing tumors.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture, Transfection and Drugs

SCC9 and CAL33 cell lines were purchased from ATCC (LGC Standards S.a.r.l., F-67123 Molsheim Cedex France) and DSMZ (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 38124 Braunschweig, Germany (authenticated by STR profiling). All cell lines tested negative for mycoplasma contamination. SCC9 cells were grown in DMEM-F12 (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 2.5 mM ultraglutamine, 15 mM HEPES, 400 ng/mL hydrocortisone (Sigma, Lyon, France) and 10% FBS (Gibco, DUTSCHER SAS, BRUMATH Cedex, France). CAL33 cells were grown in DMEM (PAN Biotech) supplemented with 2 mM ultraglutamine, 0.5 mM sodium pyruvate and 10% heat-inactivated FBS (Gibco). To overexpress Cav1, SCC9 and CAL33 cell lines were electroporated (Neon[®] electroporation transfection system, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) with pEZ-M68_{Ctrl} or pEZ-M68_{Cav1} expression vectors (GeneCopoeia[™], Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines Cedex, France; CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1}) following the manufacturer's instructions. Stable cell lines were obtained after selection with puromycin. The overexpression of Cav1 was confirmed by Western blot. EREG expression was downregulated by transfecting CAL33 cells with 50 nM siRNA_{EREG} (and the respective control siRNA_{Ctrl}, SMARTPool Dharmacon, Fischer Scientific, Illkirch Cedex, France; CAL33_{siRNA-Ctrl} and CAL33_{siRNA-Cav1}) using Lipofectamine 2000[™] (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France). Efficient EREG silencing was determined by RT-qPCR. To overexpress YAP, CAL33 cells were transfected with 2 µg of Flag-YAP expression vectors (and the respective control mock, a generous gift from Dr Masson, ESBS, France; CAL33_{Mock} and CAL33_{Flag-YAP}) using Lipofectamine 2000[™] (Invitrogen). The overexpression of YAP was confirmed by Western blot. When indicated, cells were treated with 10, 30 and 50 nM of CTX (Erbix[™], 5 mg/mL, Merck, ICANS, France), a monoclonal antibody classified as an antineoplastic agent. The concentrations were consistent with those achieved in patients (Merck information product sheet).

2.2. Irradiation

Experiments were performed in “replating conditions” (cells were treated before being plated for further experiments) that might better reflect the situation of normal fractionation [29]. Irradiation was delivered at room temperature using single doses of γ-rays (Cesium¹³⁷) with a Biobeam GM 8000 irradiator (GSM GmbH, Leipzig, Germany) at the Paul Strauss Cancer Center (ICANS, Strasbourg, France) at a dose-rate of 2.5 Gy/minute. The applied doses ranged from 0 to 10 Gy. Cells were kept at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h before being seeded for further experiments. When indicated, cells were treated with CTX (10, 30 or 50 nM) 2 h prior to irradiation.

2.3. Clonogenic Survival Assay

Twenty-four hours after treatments (10, 30 or 50 nM cetuximab alone, 0–10 Gy irradiation alone or two hours cetuximab pretreatment before irradiation), cells were seeded

(250, 500 and 1000 cells/2 mL) in 6-well plates and allowed to grow for 10 days. Cells were stained with crystal violet at 0.1% (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier Cedex, France). Colonies were counted to determine the plating efficiency (PE) and the surviving fraction (SF). PE = number of surviving cells/number of cells plated. SF = PE of the experimental group/PE of the control group.

2.4. IncuCyte[®] Assay

After CTX and irradiation alone or in combination, cells were seeded (1000–2000 cells/200 μ L/well) in 96-well plates. Plates were kept at 37 °C for 7 days. Growth (monitored by analyzing the area occupied by cells (% confluence)), cell health and morphology were monitored for 7 days. The percentage of confluence was determined using the IncuCyte[®] analysis software after normalization to day 0 (Essen BioScience, Sartorius, Goettingen, Germany).

2.5. Western Blot

After treatments, cells were lysed with lysis buffer (1% Triton, 100 nM NaF, 10 mM Na₄O₇P₂, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail (Roche, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier Cedex, France) in PBS) for 20 min at 4 °C and then sonicated. The supernatant was recovered by centrifugation at 14000 rpm for 10 min at 4 °C. A total of 1 to 20 μ g of protein was separated on a 4–20% TGX-denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier Cedex, France). Blots were probed with various antibodies (see Table S1). Proteins were visualized with enhanced chemiluminescence using the LAS4000 imager and densitometry analysis was performed using ImageQuant Software (GE Healthcare, Tremblay-en-France, France).

2.6. Cell Cycle and Apoptosis Analysis

After treatment, cells were collected and centrifuged at 1500 rpm for 5 min, fixed in cold 70% ethanol and placed at –20 °C for at least 24 h. Cell cycle distribution and apoptosis were determined using propidium iodide/RNaseA staining (dilution 1/100, Merck Millipore, Molsheim, France). Cells were incubated for 30 min at room temperature in the dark before the fluorescence was analyzed using a flow cytometer (BD Accuri[®] C6 Becton Dickinson, Rungis, France).

2.7. Metabolic Assay

After treatment, 20,000 cells were plated in a Seahorse XF Cell Culture microplate in XF growth medium (nonbuffered DMEM containing 10 mM glucose, 4 mM L-glutamine, and 2 mM sodium pyruvate). OCR (oxygen consumption rate) and ECAR (extracellular acidification rate) were measured using the mitochondrial stress test procedure under basal conditions and in response to 3.5 μ M oligomycin, 0.5 and 1 μ M fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone (FCCP) and 14 μ M rotenone + 14 μ M antimycin A with the XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Agilent, Les Ulis, France). The metabolic profiles were analyzed using Seahorse software (Agilent, Les Ulis, France).

2.8. Sphere Evasion Assay

After treatments, 500,000 cells were resuspended in 1 mL of regular culture medium supplemented with 20% methylcellulose. Spheroids were formed using the hanging drop culture method. Drops of 20 μ L cell suspension were placed onto the lids of 60 mm dishes which were inverted over the dishes. Dishes were cultured in humidified chambers (containing PBS) for 24 h to allow the formation of round aggregates. Spheroids were harvested and seeded in plastic 24-well plates (4 spheres/well) for an additional 24 h to allow evasion of cells from attached spheres. Pictures were taken using an Evos XI Core microscope (AMG, Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) at 10 \times magnification. The results were expressed, in pixels, as the evasion area of the cells relative to the area

of the attached sphere (total area—area of the sphere) determined using ImageJ (<https://imagej.nih.gov>, access on 3 May 2021).

2.9. Human Tissue Samples

All tumor specimens ($n = 173$) were collected during the initial surgery and stored until use in the tumor Bank (Paul Strauss Cancer Center, Strasbourg, France). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. The collection of HNSCC samples was declared to the Bioethical unit of the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (Declaration DC-2013-1798), and was authorized by the same authority (AC-2018-3177, 22 November 2018). The management of patient data was declared and authorized by the French National Commission for Data Protection and Liberties (CNIL; 519013 and 601451). Patients from the northeastern region of France underwent initial surgical resection of their localized HNSCC between 2003 and 2013 at Saint Barbe Clinic (Strasbourg, France), followed by postoperative radiotherapy or chemoradiotherapy (cisplatin) at the Paul Strauss Cancer Center (Strasbourg, France) or the Civil Hospitals of Colmar or Mulhouse. Hematoxylin-eosin slides of paraffin-embedded tumor (FFPE) specimens were examined by two pathologists. All tumors were confirmed as squamous cell carcinomas. The inclusion criteria were: tumor localization (hypopharynx, oropharynx or oral cavity, HPV-negative), $\geq T3$ and/or $\geq N2a$ with no clinical or radiographic evidence of distant metastases. The primary endpoints were metastatic disease and locoregional recurrence-free survival 3 years after surgery. Secondary endpoints included overall survival (OS), defined as the time from the surgery to the date of death or last follow-up. The recorded variables included age, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) and Karnofsky Performance Score (KPS), comorbidities (Charlson comorbidity index), tumor stage, chemotherapy regimen in combination with radiotherapy, smoking and alcohol consumption, and follow-up data (survival data, biological parameters, and nutritional characteristics). For detailed patient demographics see Supplementary Data, Table S2.

2.10. Immunohistochemistry on Human Tissue Samples

The expression of Cav1 was evaluated by immunohistochemical (IHC) analysis using a Ventana Autostainer Automat (Ventana Medical Systems, Roche Tissue Diagnostics, Boulogne-Billancourt, France). Slides were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens. Slides were stained for Cav1 (N-20 sc-894; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; dilution 1/50) according to the manufacturers' instructions. Signals were revealed with the ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Roche Tissue Diagnostics, Boulogne-Billancourt, France), according to the manufacturer's instructions. All images were acquired with an Olympus BX60 with 20 \times or 40 \times objectives. Contrasts were uniformly adjusted on all images with Photoshop (Adobe) software (<https://www.adobe.com>; access on 3 May 2021). We used two different semiquantitative analyses of the IHC staining of Cav1. In the first category, tumors were classified into 4 categories according to the percentage of Cav1-positive carcinoma cells: 0 (0%), + (1–25%), ++ (26–75%) and +++ (>75%). In the second one, the histoscore (H-Score) was calculated as a percentage of different positive cells for Cav1 (0, 1, 2 or 3) using the formula ($1 \times (\% \text{ cells } 1) + 2 \times (\% \text{ cells } 2) + 3 \times (\% \text{ cells } 3)$).

2.11. Immunohistochemistry on Cells

After treatment, cells were seeded in the Nunc Lab-Tek II CC² 8-well Chamber Slide System at a density of 2000 per well and cultured for 2 days. Cells were then fixed in ice-cold methanol for 10 min and washed in PBS. After a 60 min blocking step in PBS/3% BSA/0.3% Triton X-100, cells were incubated overnight at 4 °C with EGFR antibody (#4267; Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Cyr-L'Ecole, France; dilution 1/50). After washing in PBS, cells were incubated with appropriate secondary antibodies (Life Technologies; dilution 1/500) and DAPI (#D9542; Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier Cedex, France; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After washing in PBS, the slides were mounted using Fluoromount-G medium

(#00-4958-02; Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Images were acquired using a LEICA TCS SPE II confocal microscope (Leica Microsystems SA, Nanterre Cedex, France), with a 60 × magnification oil-immersion objective, and analyzed with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov>, access on 3 May 2021).

2.12. Real-Time Quantitative PCR on Human Tissues Samples

Total RNA was extracted from frozen tumor tissues using DNA/RNA allprep minikits (Qiagen, Courtaboeuf Cedex, France), according to the manufacturer's instructions. The integrity of the extracted RNA was verified on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). RNA concentrations were measured using an ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France). Then, 0.5 µg of extracted RNA was used for cDNA synthesis using the Goscript reverse transcription system (Promega, Charbonnières-les-bains, France) according to the manufacturer's instructions. One microliter of diluted cDNA, corresponding to either 5 or 1.25 ng of reverse transcribed RNA, was analyzed with SYBR Green (Roche, Meylan, France), in duplicate, using the LightCycler 480 real-time PCR system (Roche, Meylan, France). qRT-PCR data were analyzed using LightCycler® 480 software (Roche, Meylan, France). Ct levels were normalized to the geometric mean of the Ct values of 2 internal controls (housekeeping genes): UBB (ubiquitin B) and RPLP0 (ribosomal protein large P0). The following primer pairs were used: CAV1 (5'-ACCGCGACCCTAAACACCTC-3' and 5'-CCTTCCAAATGCCGTCAAAA-3'), RPLP0 (5'-GAAGGCTGTGGTGTGATGG-3' and 5'-CCGGATATGAGGCAGCAGTT-3') and UBB (5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3' and 5'-CGAAGATCTGCATTTTGACCT-3').

2.13. Real-Time Quantitative PCR on Cells

RNA was extracted as previously described. mRNA expression was evaluated by relative quantitative RT-qPCR analysis using the StepOne Plus (Applied Biosystems, Fischer Scientific, Illkirch Cedex, France) FastSYBRGreen PCR detector. The primer pairs (Invitrogen, Fischer Scientific, Illkirch Cedex, France) were: CAV1 (5'-ACCGCGACCCTAAACACCTC-3' and 5'-CCTTCCAAATGCCGTCAAAA-3'), EREG 5'-TCCCAGGAGAG TCCAGTGAT-3' and 5'-GTGTTACATCGGACACCAG-3', AREG (5'-CCACAGTGCTGATGGATTTG-3' and 5'-GCCAGGTATTTGTGGTTCGT-3'), CYR61 (5'-ATGAATTGATTGCAGTTGGAAA-3' and 5'-TAAAGGGTTGTATAGGATGCCA-3'), RNA18S (5'-TGTGGTGTGAGGAAAGCAG-3' and 5'-TCCAG ACCATTGGCTAGGAC-3'), CCND1 (5'-GCTGTGCATCTACACCGACA-3' and 5'-TTGAGCTTGTTCACC AGGAG-3') and MYC (5'-CTTGTTCGGAAACGACGAG-3' and 5'-ACTCAGCCAAGGTTGTGAGG-3'). Target cDNA expression was quantified using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method with 18S rRNA as an internal control.

3. Statistical Analysis

3.1. Descriptive and Univariate Analyses

Quantitative variables are presented as their mean and standard deviations and compared to univariate analyses with a Student's t-test if following a Gaussian distribution (Shapiro–Wilk tests were used to assess the Gaussian distribution) or a Wilcoxon's rank test if non-Gaussian distribution. Similarly, the qualitative variables are described by their absolute numbers and percentages, and are subsequently compared using Pearson's χ^2 test if effectives were sufficient or by a Fisher's exact test if not. In Table S2, the *p*-value refers to the relationship between Cav1 expression subgroups and the characteristics of the patients.

3.2. Survival Analyses

Overall survival (OS) and locoregional recurrence-free survival were estimated using the Kaplan–Meier method. Inferential analysis for qualitative variables was performed using a log-rank test, and quantitative variables were compared using the Cox model. Multivariate analyses were performed using all statistically significant variables in univariate analyses or according to clinical importance. A stepwise regression was performed with backward selection to identify variables of potential prognostic relevance.

$p < 0.05$ was considered significant. All analyses were performed with R 3.1.0 software (<https://cran.r-project.org>, access on 3 May 2021) and the survival package.

3.3. Measures Interrater Agreement

The degree of agreement between the two pathologists was estimated using the weighted Cohen's kappa coefficient (k).

4. Results

4.1. Overexpression of Cav1 Enables Cells to Survive Long-Term Exposure to Cetuximab Alone and in Combination with Radiation

The basal subtype represents 30% of HNSCC tumors and was previously described as being more sensitive to EGFR-targeting treatments [30,31]. We chose SCC9 and CAL33 cell lines as representative of this subtype [32] to determine the impact of Cav1 on the response to cetuximab. Cells were manipulated to overexpress Cav1 and were exposed to cetuximab (CTX).

CTX significantly reduced the long-term clonogenic survival of the CAL33_{Ctrl} cell line at all concentrations tested ($41 \pm 16\%$, $48 \pm 7\%$ and $35 \pm 11\%$ at 10, 30 and 50 nM, respectively, Figure 1A). The overexpression of Cav1 significantly reduced basal clonogenic survival. Nevertheless, it rendered CAL33_{Cav1} cells totally resistant to CTX (Figure 1A). Similar results were observed in SCC9_{Ctrl} and SCC9_{Cav1} cells. We next determined whether the resistance was linked to the inhibition of EGFR expression or its downstream signaling pathway. Cav1 overexpression increased the steady-state expression of EGFR, and was associated with increased phosphorylation of AKT (Figure 1B,C). CTX significantly inhibited ERK1/2 phosphorylation in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1}. Although it did not affect the phosphorylation of AKT in CAL33_{Ctrl}, CTX significantly inhibited AKT phosphorylation in CAL33_{Cav1} (Figure 1B,C). EGFR and Cav1 expression remain unaffected by cetuximab. The data show that CTX blocked AKT and ERK1/2 activity in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1}, indicating that these pathways remain sensitive to CTX but play a minor role in the resistance of Cav1-overexpressing cells to CTX.

SCC9 and CAL33 cells were exposed to 30 nM CTX before being irradiated with 2 Gy. In CAL33_{Ctrl}, the combination of CTX with irradiation reduced clonogenic survival by more than $61 \pm 2\%$, which is more than that obtained by each treatment alone ($48 \pm 7\%$ and $16 \pm 13\%$ reduction with CTX or irradiation alone, respectively, Figure 1D left). In contrast, clonogenic survival was not affected regardless of CAL33_{Cav1} exposure. We confirmed these results in another representative cell line of the basal subtype exerting less intrinsic sensitivity to CTX but higher radiosensitivity—SCC9. Almost similar data were obtained with SCC9_{Ctrl}. The clonogenic survival was reduced by more than $73 \pm 4\%$ following exposure to CTX + irradiation vs. $30 \pm 6\%$ and $55 \pm 3\%$ reductions with CTX and irradiation alone, respectively (Figure 1D right). The CTX-induced inhibition of clonogenic survival and radiosensitization was abolished in SCC9_{Cav1} cells. Cav1 overexpression did not modify the intrinsic radiosensitivity of any of the cells tested (not shown). In conclusion, Cav1 overexpression reduces the intrinsic clonogenicity of HNSCC cells but also triggers cell resistance to conventional CTX-radiotherapy regimens.

4.2. Overexpression of Cav1 Protects Cells Against the Cytostatic Effect of Cetuximab Alone or Combined with Irradiation

To determine which processes sustain the survival capacities conferred by Cav1, growth (monitored by analyzing the area occupied by cells (% confluence) over time), cell health and morphology were monitored for 7 days (168 h) using a real-time live-cell bioimager. Despite the fact that Cav1 overexpression reduced basal clonogenicity (Figure 1A), CAL33_{Cav1} cells filled the growing area at the same rate as CAL33_{Ctrl} cells (Figure 2A curves and histograms and B a and b). The growth of CAL33_{Ctrl} was significantly reduced by 14% with CTX and by 26% with CTX combined with irradiation (Figure 2A left and histograms and Figure 2B c–g). Growth was not altered in any condition tested in CAL33_{Cav1}

cells (Figure 2A right and histograms, and Figure 2B d–h). No modification of the size or shape of the cells could be observed during the course of the experiment (Figure 2B a'–h').

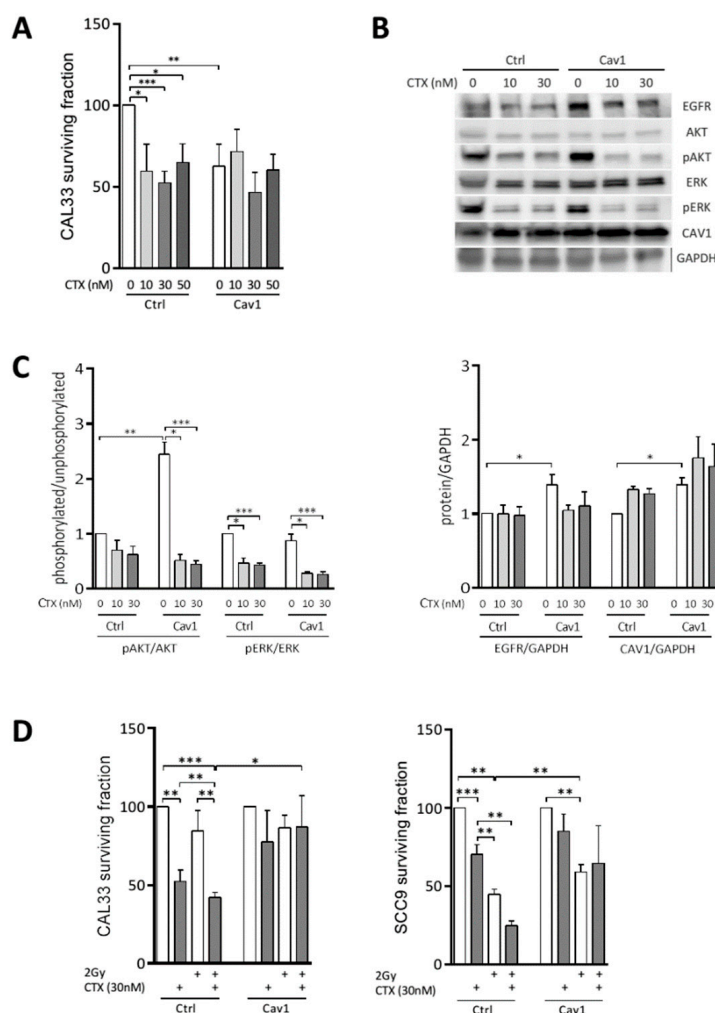


Figure 1. The overexpression of Cav1 enables cells to survive long-term exposure to CTX alone and in combination with radiation. **(A)** Clonogenic survival of CAL33 cells transfected with pEZ-M68_{ctrl} (CAL33_{Ctrl}) or pEZ-M68_{cav1} (CAL33_{Cav1}) was determined 10 days after exposure to 10, 30 and 50 nM CTX. Histograms represent the surviving fraction in each condition. The plating efficiencies were 0.21 ± 0.07 and 0.16 ± 0.04 for CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1}, respectively. Data are represented as the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). **(B)** Expression of EGFR, AKT, phospho-AKT, ERK1/2, phospho-ERK1/2 and GAPDH was determined by Western blot (WB) of lysates from CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells exposed 72 h to 0, 10 and 30 nM CTX. Western blots are representative of 3-5 independent experiments. **(C)** Phospho-AKT, phospho-ERK, EGFR and Cav1 levels were analyzed using AKT, ERK or GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). **(D)** Clonogenic survival of SCC9_{Ctrl}, SCC9_{Cav1}, CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} was determined 10 days after exposure to 2 Gy irradiation, 30 nM CTX and a combination of both. Histograms represent the surviving fraction in each condition. Data are represented as the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$).

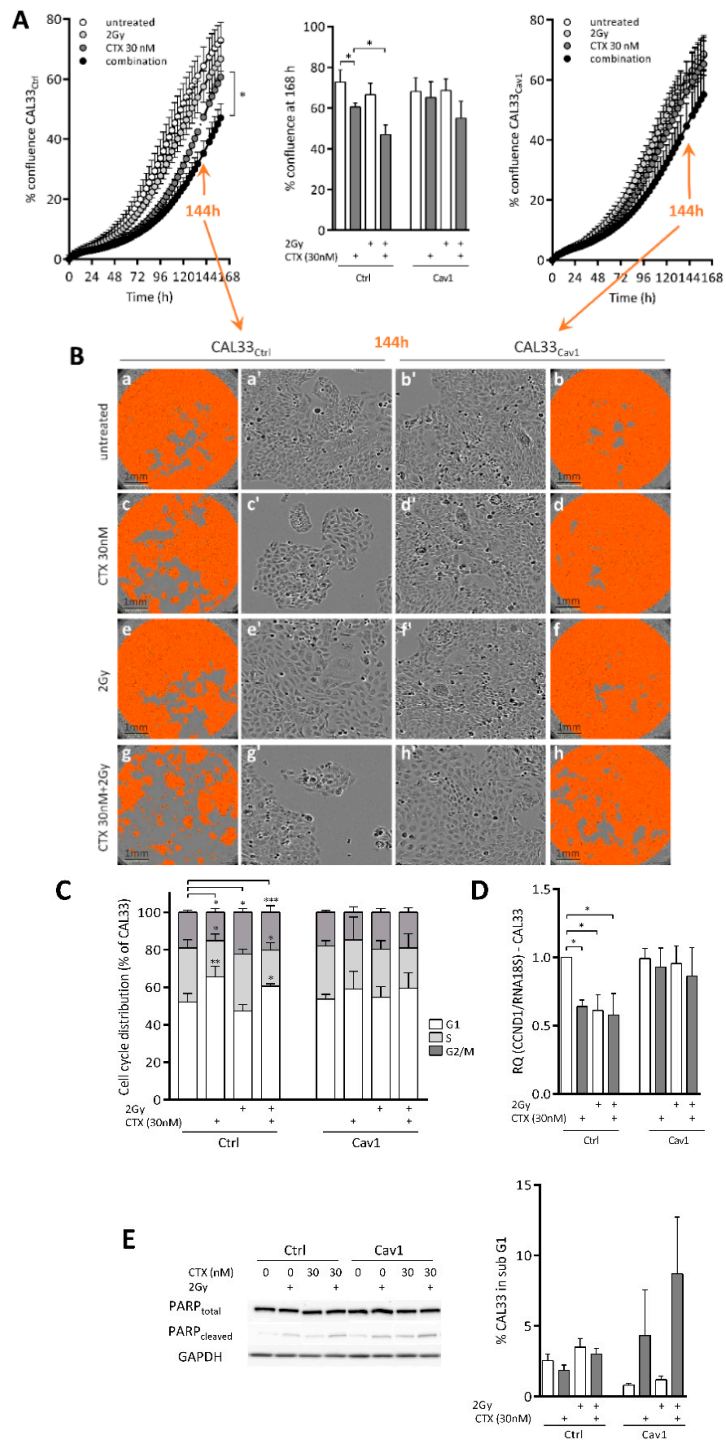


Figure 2. Cont.

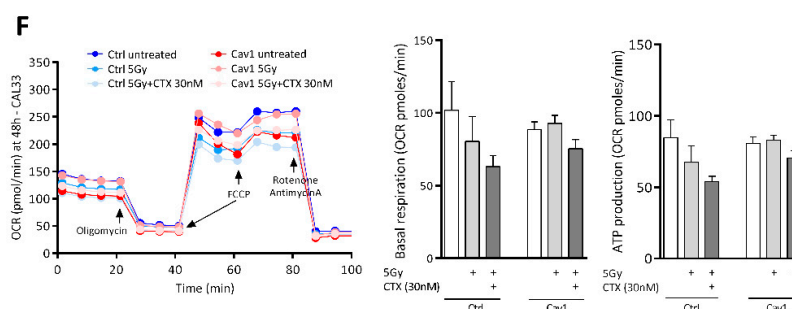


Figure 2. The overexpression of Cav1 protects cells against the cytostatic effect of CTX alone or combined with irradiation. (A) Growth was monitored by analyzing the area occupied by cells (% confluence) over 7 days (168 h) using the Incucyte[®] Zoom (Sartorius, Goettingen, Germany). Curves show the % confluence (after normalization to day 0) of CAL33_{Ctrl} (left) and CAL33_{Cav1} (right) cells over 7 days (168 h) of exposure to 2 Gy irradiation, 30 nM CTX, or a combination of both. Histograms represent the % confluence at day 7 (168 h) for each condition. Data are represented as the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$). (B) IncuCyte imaging showing the confluence of the cells (represented by the orange mask, a–h) and the morphology of cells (a'–h') at day 6 (144 h). (C), the progression of the cell cycle was determined 48 h after exposure to 2 Gy irradiation, 30 nM CTX, and a combination of both by flow cytometry. Histograms represent the percentage of cells in each phase of the cell cycle (G1, S and G2/M). Data are represented as the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). (D) Quantitative determination of CCND1 transcripts in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells exposed for 72 h to 2 Gy irradiation, 30 nM CTX, or a combination of both using RT-qPCR with RNA18S as a control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$). (E) CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells were exposed for 48 h to 2 Gy irradiation, 30 nM CTX and a combination of both. Expression of cleaved and total PARP and GAPDH was determined by Western blot (left). Apoptosis was determined by flow cytometry (right). Histograms represent the percentage of cells in subG1. Data are represented as the mean ($n = 3-5$). (F) OCR and ECAR were measured using the mitochondrial stress test procedure in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells 7 days after treatment with 2 Gy irradiation alone or combined with 30 nM CTX. Basal respiration (last rate measurement before oligomycin injection—nonmitochondrial respiration), maximal respiration (maximum rate after FCCP injection—nonmitochondrial respiration) and ATP production (last rate measurement before oligomycin injection—minimum rate measurement after oligomycin injection) were determined. Histograms represent the mean ($n = 3$) \pm SEM.

As expected from the clonogenic assay and growth data, the distribution of CAL33_{Ctrl} cells in the cell cycle was significantly altered upon treatment (Figure 2C). Indeed, CTX increased the percentage of cells in G1. Irradiation arrested cells in G2/M. The combination of both treatments blocked cells in G1 and G2/M (Figure 2C). Cell cycle arrest in G1/S was associated with a reduction in CCND1 expression (Figure 2D). Regardless of the treatment used, no alteration in cell cycle progression or the expression of CCND1 was observed in CAL33_{Cav1} cells (Figure 2C,D). No apoptosis could be measured (by PARP cleavage or flow cytometry, Figure 2E) in any of the conditions tested. As mitochondria might influence the therapeutic response and play a critical role in the regulation of cell survival triggered by cancer treatment, we checked the integrity of the mitochondria. In contrast to CAL33_{Cav1} cells, in which both parameters remained unaffected, basal respiration and ATP production were reduced in CAL33_{Ctrl} cells exposed to CTX alone or in combination with irradiation for 48 h (Figure 2F). Thus, protection of the mitochondria might contribute to the resistance induced by Cav1. The data suggest that Cav1 enables cells to survive long-term exposure to CTX alone or combined with radiation at least in part by maintaining growth, cell cycle progression and mitochondrial integrity, altogether contributing to protecting cells against death.

4.3. Overexpression of Cav1 Maintains the Evasive Potency of Cells Exposed to Cetuximab Alone or Combined with Irradiation

To evaluate the impact of the deregulation of Cav1 expression on the propensity of tumor cells to evade the primary tumor sphere and thus to colonize tumor surroundings, 3D collective cell migration assays were performed using CAL33 spheroids. Although CTX and irradiation by themselves did not significantly affect the evasion capacity of CAL33_{Ctrl} cells, the combination of both reduced evasion out of the tumor spheroid by 31% (Figure 3 left). The overexpression of Cav1 reduced basal evasive capacity by 33% (Figure 3 left). CTX, irradiation, or the combination of both, did not inhibit evasion any further (Figure 3 left). Similar results were observed in the other basal-like cell line SCC9 (Figure 3, right). Even if CTX and irradiation by themselves did not significantly affect the evasive capacity of SCC9_{Ctrl} cells, the combination of both treatments reduced the evasion out of the tumor spheroid by 25% (Figure 3 right). The overexpression of Cav1 affected neither basal evasion nor the motility of cells exposed to CTX, irradiation, or the combination of both (Figure 3 right).

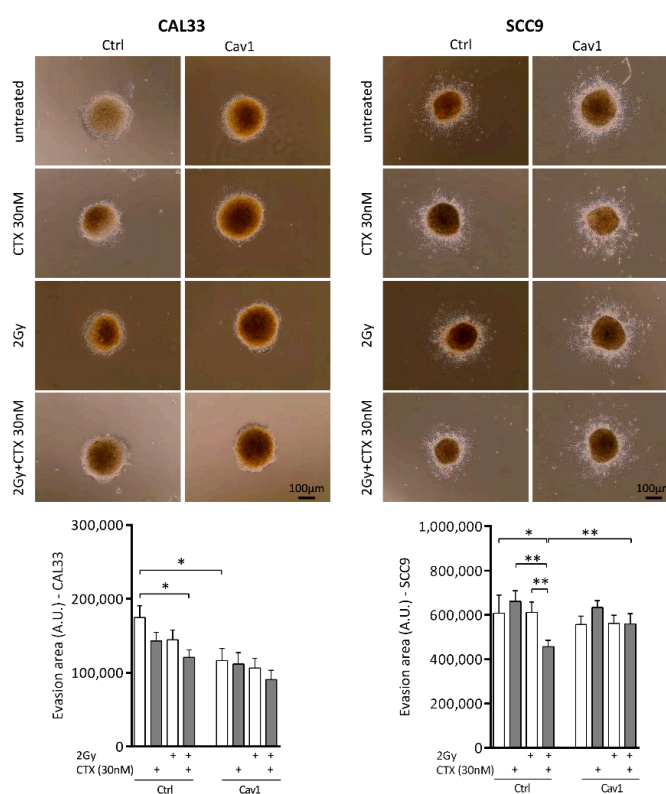


Figure 3. Overexpression of Cav1 maintains the evasive capacity of cells exposed to CTX alone or combined with irradiation. Analysis of collective cell migration: evasion of SCC9_{Ctrl}, SCC9_{Cav1}, CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells 24 h after treatment with 2 Gy irradiation, 30 nM cetuximab and a combination of both out of the spheroids. Pictures show the evasion area and histograms represent the mean \pm SEM area covered by cells escaping from the spheroid ($n = 3-4$, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$).

Thus, in addition to survival and growth preservation, Cav1 overexpression maintains the evasive capacities of cells exposed to CTX-radiotherapy.

4.4. Overexpression of Cav1 Is Associated with a Decrease in EREG-Driven Oncogenic Addiction

The basal subtype of HNSCC tumors aberrantly expresses factors involved in EGFR signaling, such as amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), CAIX and HIF1A [33–36]. In accordance with this, we showed that representative cells of this subtype exert higher expressions of AREG and EREG than nonbasal cell subtypes. The expression of EREG was found to be a predictive functional marker of sensitivity to EGFR blockade in basal-like HNSCC [32]. The exposure of CAL33_{ctrl} and CAL33_{Cav1} cells to CTX, irradiation, or the combination of both did not affect the expression of AREG and EREG (Figure 4A). However, the overexpression of Cav1 almost totally abolished EREG expression ($77 \pm 4\%$, Figure 4A) without AREG being affected. As observed for EREG, the expression of another EGFR target gene, MYC, was also significantly reduced by CTX, irradiation, or the combination of both in CAL33_{ctrl} cells (Figure 4A). As observed for EREG, Cav1 overexpression was associated with an inhibition of its expression ($24 \pm 6\%$, Figure 4A) that was not further affected by any treatment. Altogether, the data suggest that the expression of Cav1 might render cells insensitive to EGFR signaling at least in part by preventing the additive EREG feedback loop.

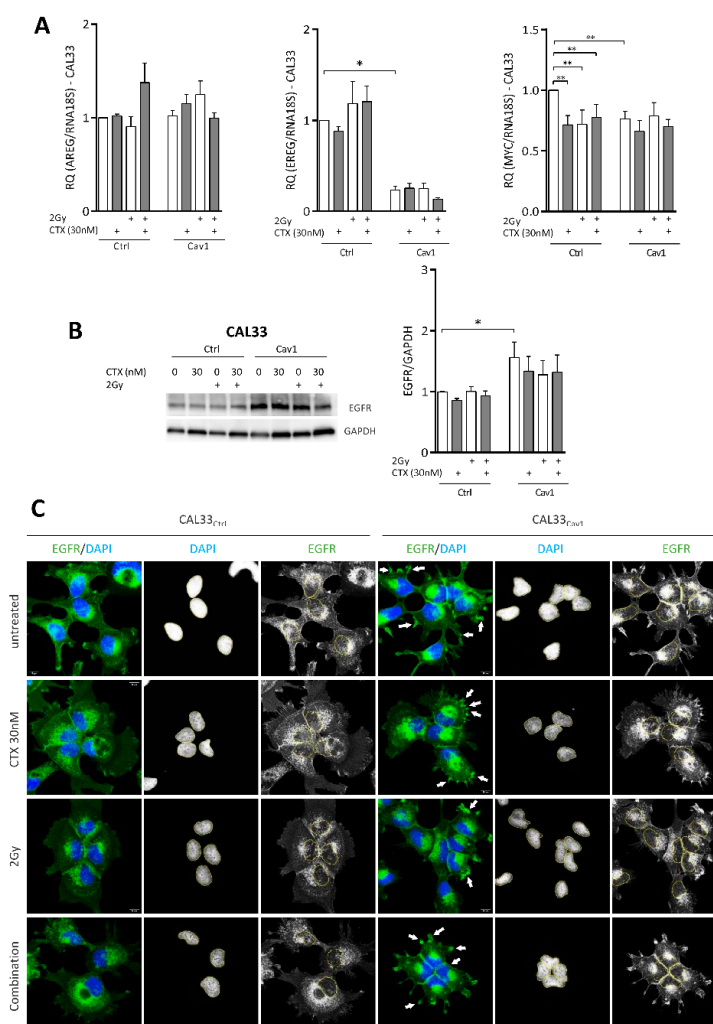


Figure 4. Cont.

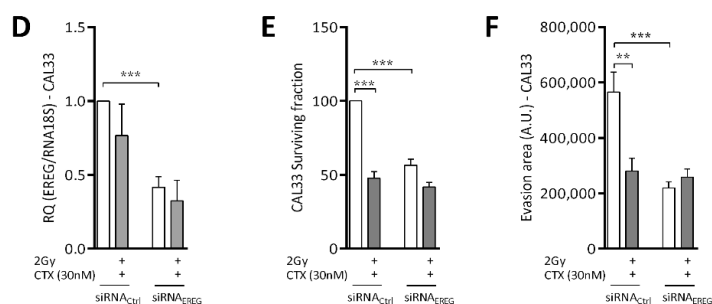


Figure 4. Overexpression of Cav1 is associated with a decrease in EREG-driven oncogenic addiction. (A) Quantitative determination of AREG, EREG and MYC transcripts in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells exposed to 2 Gy irradiation, 30 nM cetuximab or a combination of both using RT-qPCR with RNA18S as a control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$). (B) Expression of EGFR and GAPDH was determined by Western blot (WB) in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells exposed to 2 Gy irradiation, 30 nM cetuximab and a combination of both. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. EGFR levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM ($* p < 0.05$). (C) Immunofluorescence analysis of EGFR by confocal microscopy in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells exposed to 2 Gy irradiation, 30 nM CTX, and a combination of both. Nuclei were stained using DAPI. Arrows show the region of the plasma membrane concentrating EGFR staining ($\times 63$). (D) Quantitative determination of EREG transcripts in CAL33_{siRNA-Ctrl} and CAL33_{siRNA-EREG} cells exposed to a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX using RT-qPCR with RNA18S as a control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM ($*** p < 0.001$). (E) Clonogenic survival of CAL33_{siRNA-Ctrl} and CAL33_{siRNA-EREG} cells was determined 10 days after exposure to a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX. Histograms represent the surviving fraction in each condition. Data are represented as the mean ($n = 3-5$) \pm SEM ($*** p < 0.001$). (F) Analysis of collective cell migration: evasion of CAL33_{siRNA-Ctrl} and CAL33_{siRNA-EREG} 24 h after treatment with a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX out of the spheroids. Pictures show the evasion area and histograms represent the mean ($n = 3-4$) \pm SEM ($** p < 0.01$ and $*** p < 0.001$) area covered by cells evading the spheroid.

EGFR expression was increased in CAL33_{Cav1} cells (Figure 4B). It remained unaffected by CTX, irradiation or the combination of both (Figure 4B). Immunofluorescence staining followed by confocal analysis showed that EGFR was variably distributed in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells. EGFR is mainly located at the plasma membrane and in the cytosol of CAL33_{Ctrl} cells. In contrast, EGFR seemed to concentrate into clusters at specific regions of the plasma membrane and around the nucleus in CAL33_{Cav1} cells (see arrows Figure 4C). Nuclear staining was observed in both cell types in the resting state (Figure 4C). The exposure of CAL33_{Ctrl} cells to CTX, irradiation or a combination of both causes internalization of EGFR, characterized by the accumulation of endocytic vesicles in the cytosol. In addition, increased EGFR staining could be detected in the nucleus, most likely due to its nuclear translocation. No change in EGFR distribution could be observed in CAL33_{Cav1} cells regardless of the treatment used (Figure 4C). The data suggest that the overexpression of Cav1 not only suppresses EREG, but also redistributes and anchors EGFR in specific regions, thus preventing its internalization.

EREG was silenced in CAL33_{Ctrl} cells (using a siRNA, CAL33_{siRNA-EREG}) to determine its role in the resistance phenotype of CAL33_{Cav1} cells. EREG expression was repressed by $59 \pm 7\%$, and was not decreased any further by the combination of CTX and irradiation (Figure 4D). The downregulation of EREG reduced clonogenic survival to a similar extent to that obtained following Cav1 overexpression ($47 \pm 2\%$ reduction Figure 4E vs. $38\% \pm 13\%$ Figure 1A). Exposure to CTX and irradiation reduced the clonogenic survival of CAL33_{siRNA-Ctrl} by more than $57 \pm 4\%$, and only mildly affected that of CAL33_{siRNA-EREG}, i.e., $16 \pm 3\%$ (Figure 4E). Turning to evasion, the downregulation of EREG reduced basal evasive capacity by 61% (Figure 4F). Exposure to CTX and irradiation reduced the evasion

of CAL33_{siRNA-Ctrl} by more than 51%, and had no effect on CAL33_{siRNA-EREG} (Figure 4F). Notably, Cav1 expression was affected neither by the downregulation of EREG nor by the treatment (not shown). Together, the data confirm that the repression of EREG recapitulates the phenotype of Cav1-overexpressing cells, and suggest that EREG is a key factor in the chemo/radioresistant phenotype of Cav1-expressing cells.

4.5. Repression of EREG by Cav1 Is Associated With the Activation of the Hippo-YAP Pathway

YAP expression was recently shown to be associated with the resistance of colorectal cells to CTX [37]. In addition, EGFR and the Hippo-YAP pathway seem to regulate each other. Here, the downregulation of EREG significantly induced YAP expression ($1.7 \pm 0.2\%$, Figure 5A). In accordance with this, the overexpression of Cav1, which represses EREG, was also associated with the induction of YAP and its paralog TAZ (Figure 5B, 2.2 ± 0.4 - and 2.0 ± 0.2 -fold increase in CAL33_{Cav1} versus CAL33_{Ctrl}). Induction of YAP expression was associated with an inhibition of its phosphorylation at Ser127 by $57 \pm 7\%$ in CAL33_{Cav1} cells, suggesting an increase in YAP activity in Cav1-overexpressing cells (Figure 5B). This was confirmed by the induction of the target-gene of YAP, CYR61 (Figure 5C).

Next, YAP was overexpressed in CAL33_{Ctrl} cells (CAL33_{Flag-YAP}) to determine its role in the resistant phenotype of CAL33_{Cav1}. YAP expression was increased 1.9 ± 0.2 -fold (Figure 5D). Exposure to CTX and irradiation reduced the expression of YAP in CAL33_{Mock} cells ($46 \pm 6\%$), but remained unaffected in CAL33_{Flag-YAP} cells (Figure 5D). Of interest, the expression of YAP did not modify the levels of EREG (Figure 5E). In contrast to Cav1 and EREG, the forced expression of YAP did not affect basal clonogenic survival. Exposure to CTX and irradiation reduced the clonogenic survival of CAL33_{Mock} by more than $44 \pm 10\%$ without affecting that of CAL33_{Flag-YAP} (Figure 5F). The overexpression of YAP did not affect basal evasion (Figure 5G). Exposure to CTX and irradiation reduced the motility of CAL33_{Mock} and CAL33_{Flag-YAP} to similar extents (59% and 49% , respectively, Figure 5G). Similar results were obtained using the constitutively active mutant form of YAP, S127A (not shown). Again, Cav1 expression was affected neither by the expression of YAP nor by the treatment (not shown). Altogether, data show that the expression of YAP only partially recapitulates the phenotype of Cav1-overexpressing cells. Although YAP did not modify basal survival and motility, it prevented the damage of the treatment.

4.6. Tumors Overexpressing Cav1 Give Rise to Locoregional Relapse and Have a Poor Prognosis

We showed that Cav1 confers resistance, allowing cells to survive, proliferate or escape tumor spheroids even under extreme conditions, such as the CTX-radiotherapy regimens used in the clinical management of LA-HNSCC. It was tempting to speculate that Cav1 might play a role in the recurrence of these tumors. One hundred seventy-three patients with stage III–IVb primary HNSCC (median age: 58 years, range 36–84 years) were enrolled in this study. Nearly all patients received post-operative radiotherapy (98%) or chemoradiotherapy (cisplatin, see Table S2 for the baseline patient characteristics). Immunoreactivity indicating the expression of Cav1 was detected both in the cytoplasm and at the cell membrane (Figure 6A).

Thirty-four tumors (20%) did not express Cav1 (Cav1 (0)). The remaining 80% expressed Cav1 at different intensities: 30% (52), 34% (59) and 16% (28) of the samples displayed low (Cav1 (+)), intermediate (Cav1 (++)) and high (Cav1 (+++)) Cav1 staining (Table in Figure 6A). The H-Scores for each subgroup were 24.8 ± 5.9 for Cav1 (0), 76.4 ± 7.5 for Cav1 (+), 156.8 ± 9.7 for Cav1 (++) and 223.2 ± 12.1 for Cav1 (+++) (Data S1). The Cav1 H-Scores were significantly different between each group, which validates the robustness of our subgrouping. The expression of CAV1 was also assessed by RT-qPCR. CAV1 gene expression for each subgroup was 75.0 ± 22.7 for Cav1 (0) samples, 89.9 ± 8.2 for Cav1 (+) samples, 194.8 ± 24.4 for Cav1 (++) samples and 325.4 ± 65.5 for Cav1 (+++) samples (Data S2). Again, CAV1 gene expression could statistically discriminate each subgroup. In addition, CAV1 gene expression was correlated with the IHC expression of the protein ($p < 0.0001$, Data S3).

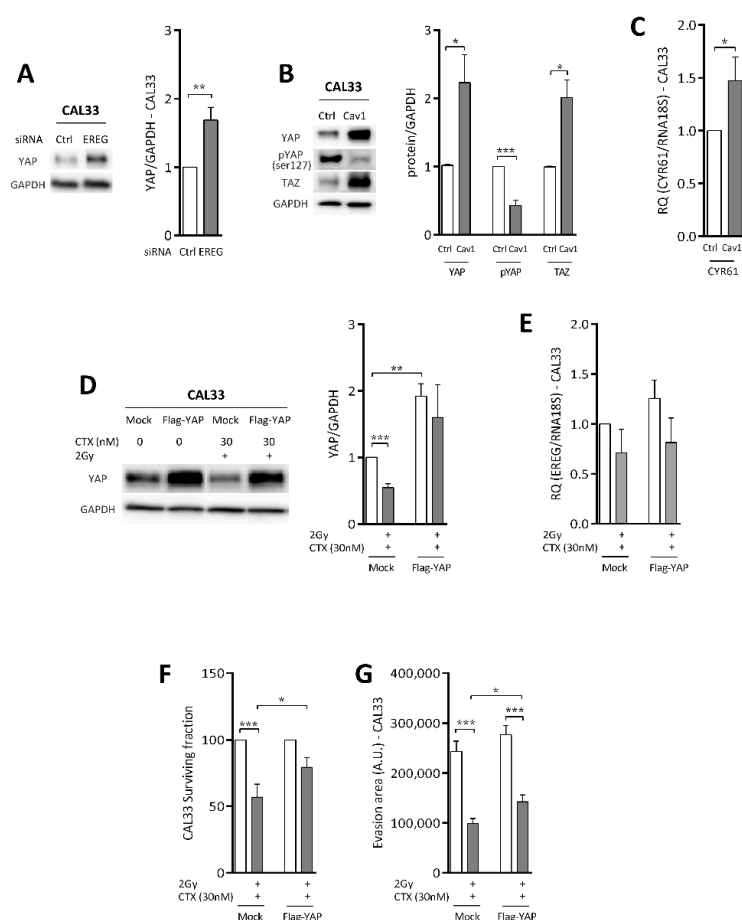


Figure 5. Repression of EREG by Cav1 is associated with the activation of the HIPPO-YAP pathway. (A) Expression of YAP and GAPDH was determined by Western blot (WB) in CAL33_{siRNA-Ctrl} and CAL33_{siRNA-EREG} cells. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. YAP levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (** $p < 0.01$). (B) Expression of YAP, phospho-YAP, TAZ and GAPDH was determined by the Western blotting (WB) of lysates from the CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. YAP levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$). (C) Quantitative determination of transcripts of CYR61 in CAL33_{Ctrl} and CAL33_{Cav1} cells using RT-qPCR with RNA18S as control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$). (D) The expression of YAP and GAPDH was determined by Western blot (WB) in CAL33_{Mock} and CAL33_{Flag-YAP} cells after treatment with a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX. Western blots are representative of 3–5 independent experiments. YAP levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). (E) Quantitative determination of EREG transcripts in CAL33_{Mock} and CAL33_{Flag-YAP} after treatment with a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX using RT-qPCR with RNA18S as a control. Each bar represents the mean ($n = 3-5$) \pm SEM. (F) Clonogenic survival of CAL33_{Mock} and CAL33_{Flag-YAP} cells was determined 10 days after exposure to a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX. Histograms represent the surviving fraction in each condition. Data are represented as the mean ($n = 3-5$) \pm SEM (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$). (G) Analysis of collective cell migration: evasion of CAL33_{Mock} and CAL33_{Flag-YAP} cells 24 h after treatment with a combination of 2 Gy irradiation and 30 nM CTX out of the spheroids. Pictures show the evasion area and histograms represent the mean \pm SEM area covered by cells evading the spheroid ($n = 3-4$, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

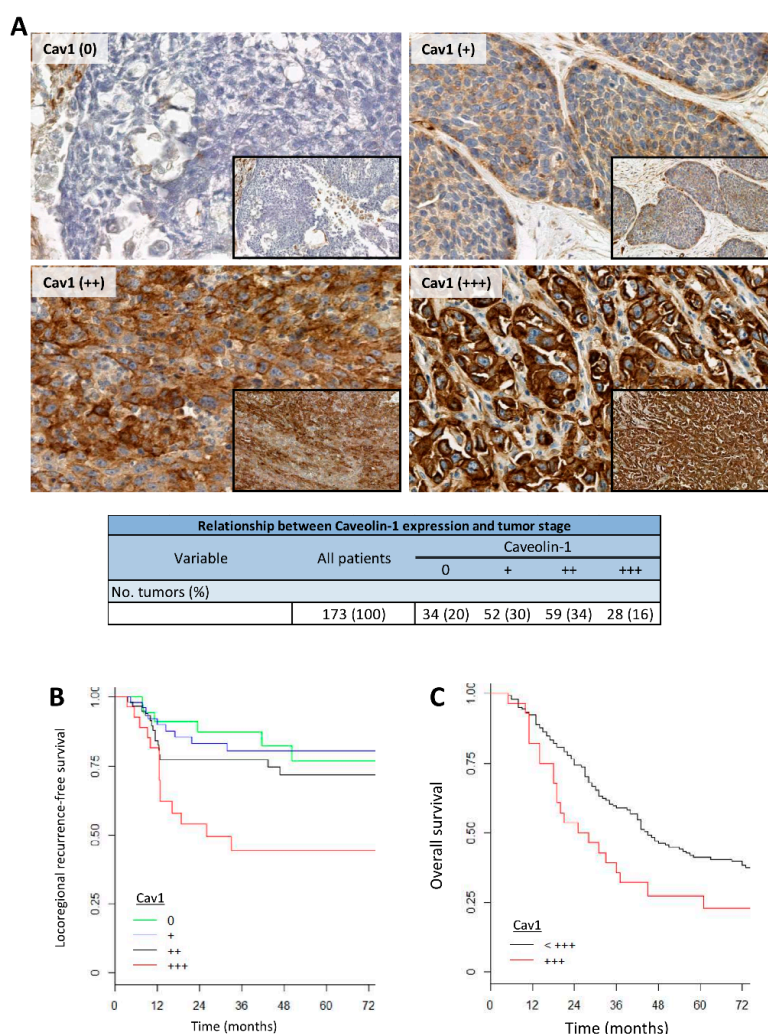


Figure 6. Cav1 expression in human HNSCC primary tumor tissues. (A) Semiquantitative analysis of the immunohistochemical staining of Cav1 based on classification in 4 categories according to the percentage of Cav1-positive carcinoma cells: 0: 0%; +: 1–25%; ++: 26–75%; +++: > 75% (original magnification: $\times 10$ and $\times 40$). (B) Locoregional recurrence-free survival. (C) Overall survival was analyzed according to Cav1 protein expression using the Kaplan–Meier estimate with the log rank test.

Cav1 expression (subgroups, H-score or mRNA) was not correlated with tumor differentiation, age, sex, tumor stage (T1 to T4) or lymph node status ($p > 0.05$). The high IHC expression of Cav1 was significantly associated with an increased risk of local recurrence ($p = 0.00124$, HR = 3.9 (1.5; 10.0) and H-score p -value of 0.01364) (Figure 6B). High CAV1 gene expression was also correlated with a higher risk of local recurrence ($p = 0.013$). Finally, a strong expression of Cav1 (+++) was associated with shorter overall survival ($p = 0.02$) (Figure 6C). Altogether, the data suggest that Cav1 expression is correlated with tumor recurrence and poor prognosis.

5. Discussion

The biphasic expression of Cav1 has already been described in HNSCC [15,38]. Cav1 gradually increases during epithelial transformation into primary SCC and decreases

afterwards in metastatic carcinoma. Cav1 expression was also reported to be induced by various drugs (metformin, cisplatin) [25] as well as by irradiation [39]. Zhang and colleagues reported a loss of Cav1 in highly metastatic cells. The restoration of Cav1 in these cells completely abolished metastasis [15]. In addition, we reported low or no expression of Cav1 in metastatic-prone primary tumors [13]. The deletion of Cav1 in HNSCC cell lines boosted cell motility through the activation of $\alpha_5\beta_1$ integrins and MMPs [13]. By contrast, Masuelli and colleagues [24] suggested that the overexpression of Cav1 and ErbB receptors, including EGFR, promoted metastasis. The present study showed that the overexpression of Cav1 is associated with locoregional relapse and poor prognosis. Tumor recurrence is probably linked to the fact that Cav1 maintains/preserves the growth, survival and motility of cells exposed to CTX-radiotherapy. As Cav1 can alter the therapeutic response of tumors, thereby increasing the likelihood of recurrence, it should be considered not only as a biomarker predicting recurrence, but also as a marker predicting therapeutic failure. Although cisplatin delivered concurrently with radiotherapy is the SOC in LA-HNSCC, CTX represents the main alternative agent to definitive radiotherapy for cisplatin-ineligible LA-HNSCC patients. There are no data available on the proportion of cisplatin-ineligible LA-HNSCC patients, but this proportion is probably significant, with a rough estimate based on the proportion of recurrent or metastatic HNSCC patients treated with carboplatin in the two pivotal trials in first-line treatment (EXTREME study and KEYNOTE-048) in the range of 40 to 50% [4,8,40,41]. Although it would have been interesting and appropriate to include study arms with cisplatin, we wanted in this paper to focus on this targeted therapy to investigate resistance mechanism in HNSCC cancer. As observed in other cancers, HNSCC presents intrinsic or therapeutically acquired resistance to CTX. This can primarily be attributed to a deregulation of EGFR itself (overexpression and strong activity in more than 80% of HNSCC) [42,43], the expression of a mutant type III variant of EGFR [44,45], aberrant downstream signaling pathways [46–48], an oncogenic switch [49–52] or compensatory mechanisms (such as the activity of other tyrosine-kinase receptor ALK [53], MET [54,55] or AXL [56,57]). CTX even seems to promote its own resistance by inducing mutations in KRAS/NRAS/HRAS [58] or missense mutations in the ectodomain of EGFR, mimicking the activation of the receptor [59]. In this study, we reported that Cav1 may also play a role in this process. The overexpression of Cav1 not only abolished the sensitivity to CTX but also prevented radiosensitization. Cav1-expressing cells exert better survival capacities and remain proliferative and motile when exposed to CTX-radiotherapy. Historically, Cav1 was reported to be a negative regulator of various tyrosine-kinase receptors, including EGFR [16]. Cav1 was reported to block EGF-mediated proliferation, migration and invasion by targeting downstream effectors (mainly MEK/ERK and Pi3K/AKT/mTor) in various cancers [60–63]. However, Cav1 can also promote the interaction between EGFR and its effectors, leading to signal transduction in caveolae [20,24,64]. Bound to Cavin via ROR1, Cav1 allows EGFR/Met/IGFR signaling and subsequent resistance to anti-EGFR and TKIs [28,65]. Although EGFR, AKT and ERK1/2 expression and/or activity are increased in Cav1-expressing cells, CTX was still able to reduce their phosphorylation. Thus, unregulated EGFR signaling cannot account for the resistance of Cav1-overexpressing cells.

Cav1 also plays a crucial role in EGFR trafficking. In breast cancer cells, it internalizes HER2 bound to trastuzumab, which improves drug efficacy [21,25,27]. In contrast, knocking out Cav1 in gastric cancer cells increases the availability of HER2 at the cell surface, thus sensitizing gastric cancer cells to anti-HER2 therapy [66]. However, EGFR can also signal far away from the plasma membrane. After irradiation, Cav1 translocates EGFR to the nucleus where it activates DNA-PK and DNA repair [22,23,67]. EGFR also exerts transcriptional activity that is manifested by the upregulation of CCND1 or MYC, supporting EGFR-mediated proliferation/survival [18]. Here, we have shown that EGFR concentrates into clusters at specific regions of the plasma membrane in Cav1-expressing cells. EGFR remained blocked there after exposure of the cells to CTX and/or irradiation, even though it was internalized in control cells. The concentration of EGFR in lipid rafts

by Cav1 was reported to negatively regulate EGFR signaling [19]. It could also prevent EGFR internalization and subsequent nuclear transcriptional activity. In accordance, the expression of the EGFR target-gene MYC and the EGFR ligand EREG were inhibited in Cav1-expressing cells. Epiregulin, encoded by the EREG gene, binds to and activates EGFR and ErbB4/HER4 [68]. Job and colleagues recently suggested that the sensitivity of basal-like HNSCC to EGFR-targeting drugs comes from their addiction to EGFR signaling through an oncogenic autoamplifying loop induced by EREG [32]. The expression of EREG may be considered a predictive biomarker of response to anti-EGFR therapies [68]. Here, we showed that the direct inhibition of EREG is indeed associated with resistance to CTX and/or irradiation, which recapitulates the phenotype of Cav1-expressing cells. Whether the suppression of EREG is dependent on EGFR sequestration at the cell membrane or the result of Cav1 repression requires further investigation. Nevertheless, EREG is a key target of Cav1-mediated cell resistance to CTX-chemotherapy.

Very recently, Cav1 was identified as a regulator of YAP activity [69]. Forty-two percent of HPV-negative HNSCC presents alterations in the HIPPO pathway [70]. Amplification of YAP and TAZ is found in 5% and 9% of HNSCC [70], respectively. EGFR activation leads to the nuclear translocation of YAP [71], resulting in the upregulation of AREG, EREG, TGF and EGFR [72]. This suggests an autocrine loop between both the EGFR and HIPPO pathways. Thus, YAP/TAZ might also be involved in the autoamplifying loop involving EREG. We have demonstrated here that Cav1-induced YAP activation requires the suppression of EREG. To our knowledge, this is the first study showing that EREG might repress YAP expression and activity. YAP activation confers to cells proliferative and motile advantages (through the activation of canonical target genes such as CTGF, CYR61, AXL, COL4A3, ITGB2, CCNE2, CDK2, BIRC5 and SOX9). It was also identified as a biomarker of resistance to CTX [37,70], cisplatin [73] or radiotherapy [74]. In accordance, the overexpression of YAP and its constitutively active mutant S127A renders cells resistant to CTX/irradiation treatment. Although the regulation of YAP by EREG deserves further study, our data clearly show that Cav1 promotes resistance to CTX/irradiation through the Cav1/EREG/YAP axis.

Finally, we have shown that high Cav1 expression in tumors is associated with locoregional relapse and worse prognosis. This study complements our prior paper, which showed that low or no Cav1 expression was observed in metastasis-prone HNSCC, and was also correlated to poor prognosis. The results published by Jung et al. [13] were obtained in a different cohort of patients. It was designed to identify molecular markers able to discriminate patients at high metastatic risk as the first recurrence event within 3 years after treatment, or patients with no progression at all during a 3-year follow-up period. Thus, low or no expression of Cav1 (characterizing metastatic patients) was indeed correlated with adverse prognosis when compared to the non-metastatic patient. In the present study, the correlation between Cav1 levels, relapse and overall survival has been determined in a representative cohort of patients, including both locoregional relapses and metastatic events. Here, Cav1 overexpression is clearly associated only with locoregional relapses. Both studies are complementary and show that this independent prognostic biomarker could help to identify subgroups of advanced HNSCCs at higher risk of recurrence either locally or at distant sites. Both are a bad prognosis operating through different pathways, and should be taken into consideration for better risk stratification. Our tumor biobank includes only resected specimens and not small biopsy samples. As no prospective evidence supports single-agent CTX combined in the post-operative setting, we were not able to establish a group of patients treated with CTX-radiotherapy. Thus, we used human tissue samples derived from patients treated with adjuvant radiotherapy \pm cisplatin. Although this might appear to be a limitation of our study, our purpose was to explore the prognostic value of the Cav1/EREG/YAP axis regardless of treatment. However, Cav1 detection might also be taken into consideration in the future in the clinic, not only to help clinicians choose more appropriate therapeutic strategies, but also to predict the success of the approach by taking into account probable radio-, CTX- or chemoresistance. As immunotherapies are

new SOCs in the R/M setting, further studies will be needed to determine if Cav1 might also play a role in immune escape. Reduced basal growth/survival/motility following Cav1 expression seems to put cells into a state in which they can resist the treatment. Data tend to explain why patients displaying tumors with high levels of Cav1 relapse a few years after treatment. This also clearly indicates the inefficacy of EGFR-targeting drugs in Cav1-expressing tumors. Altogether, our observations suggest that a high expression of Cav1 may be predictive of a locoregional relapse of LA-HNSCC involving the Cav1/EREG/YAP axis.

6. Conclusions

Altogether, our work showed that Cav1 expression conferred surviving, growing and motile capacities that protect cells against the combination of CTX-radiotherapy. The protecting effects of Cav1 are mediated by the Cav1/EREG/YAP axis. High expression of Cav1 was predictive of locoregional relapse of LA-HNSCC. Cav1 should be taken into consideration in the future as a prognosis marker to identify the subgroup of advanced HNSCC at higher risk of recurrence, but also to help clinicians to choose the more appropriate therapeutic strategies.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13123038/s1>, Table S1. Antibodies, Table S2. Baseline patient characteristics, Data S1–S3. Cav1 expression in human HNSCC primary tumor tissues 1.

Author Contributions: Conceptualization, M.D. and S.M.; methodology, V.B., N.E.-S., M.M., C.M. (Christine Macabre), H.B., F.F., M.-A.O. and M.-P.C.; software, A.T.; validation, A.T.; formal analysis, A.J., O.C., S.F., C.M. (Christine Macabre), C.M. (Carole Mura) and F.F.; investigation, G.N. and S.M.; resources, A.C.J. and S.L.; data curation, M.B., A.J., C.M. (Carole Mura), M.-A.O. and M.-P.C.; writing—original draft preparation, S.M.; writing—review and editing, S.M. and M.B.; supervision, C.B.; project administration, A.C.J. and S.M.; funding acquisition, S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (S19R417B), Fondation ARC (SA6R417C), URPS Chirurgiens Dentistes Grand Est.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The HNSCC sample collection was declared to the Bioethical unit of the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (Declaration DC-2013-1798), and was authorized by the same authority (AC-2018-3177, approved on 22 November 2018). The management of patient data was declared and authorized by the French National Commission for Data Protection and Liberties (CNIL; 519013 and 601451).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: Authors would like to thank Rob Simmons (IUT Louis Pasteur, Université de Strasbourg) for the corrections he made to the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386. [[CrossRef](#)]
2. Brand, T.M.; Iida, M.; Wheeler, D.L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11*, 777–792. [[CrossRef](#)]
3. Ciardiello, F.; Tortora, G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1160–1174. [[CrossRef](#)]
4. Bonner, J.A.; Harari, P.M.; Giralt, J.; Azarnia, N.; Shin, D.M.; Cohen, R.B.; Jones, C.U.; Sur, R.; Raben, D.; Jassem, J.; et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 567–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Bonner, J.A.; Harari, P.M.; Giralt, J.; Cohen, R.B.; Jones, C.U.; Sur, R.K.; Raben, D.; Baselga, J.; Spencer, S.A.; Zhu, J.; et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet. Oncol.* **2010**, *11*, 21–28. [[CrossRef](#)]
6. Rabney, A.; Baum, K.; Pitts, D. Cetuximab approved by FDA for treatment of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 340–342.
7. Colevas, A.D.; Yom, S.S.; Pfister, D.G.; Spencer, S.; Adelstein, D.; Adkins, D.; Brizel, D.M.; Burtness, B.; Busse, P.M.; Caudell, J.J.; et al. NCCN guidelines insights: Head and neck cancers, version 1.2018. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2018**, *16*, 479–490. [[CrossRef](#)]
8. Tao, Y.; Auperin, A.; Sire, C.; Martin, L.; Khoury, C.; Maingon, P.; Bardet, E.; Kaminsky, M.C.; Lapeyre, M.; Chatellier, T.; et al. Improved outcome by adding concurrent chemotherapy to cetuximab and radiotherapy for locally advanced head and neck carcinomas: Results of the GORTEC 2007-01 phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 3084–3090. [[CrossRef](#)]
9. Vermorken, J.B.; Mesia, R.; Rivera, F.; Remenar, E.; Kawecki, A.; Rottey, S.; Erfan, J.; Zabolotnyy, D.; Kienzer, H.R.; Cupissol, D.; et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 1116–1127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Burtness, B.; Harrington, K.J.; Greil, R.; Soulieres, D.; Tahara, M.; Castro, G.D., Jr.; Psyrrri, A.; Baste, N.; Neupane, P.; Bratland, A.; et al. 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. *Lancet* **2019**, *394*, 1915–1928. [[CrossRef](#)]
11. Simon, L.; Campos, A.; Leyton, L.; Quest, A.F.G. Caveolin-1 function at the plasma membrane and in intracellular compartments in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 435–453. [[CrossRef](#)]
12. Singh, V.; Lamaze, C. Membrane tension buffering by caveolae: A role in cancer? *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 505–517. [[CrossRef](#)]
13. Jung, A.C.; Ray, A.M.; Ramolu, L.; Macabre, C.; Simon, F.; Noulet, F.; Blandin, A.F.; Renner, G.; Lehmann, M.; Choulier, L.; et al. Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties. *Oncotarget* **2015**, *6*, 41884–41901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sun, J.; Lu, Y.; Yu, C.; Xu, T.; Nie, G.; Miao, B.; Zhang, X. Involvement of the TGF-beta1 pathway in caveolin-1-associated regulation of head and neck tumor cell metastasis. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 1298–1304. [[CrossRef](#)]
15. Zhang, H.; Su, L.; Muller, S.; Tighiouart, M.; Xu, Z.; Zhang, X.; Shin, H.J.; Hunt, J.; Sun, S.Y.; Shin, D.M.; et al. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 1684–1694. [[CrossRef](#)]
16. Couet, J.; Sargiacomo, M.; Lisanti, M.P. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30429–30438. [[CrossRef](#)]
17. Wang, K.; Zhu, X.; Mei, D.; Ding, Z. Caveolin-1 contributes to anoikis resistance in human gastric cancer SGC-7901 cells via regulating Src-dependent EGFR-ITGB1 signaling. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2018**, *32*, e22202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bazzani, L.; Donnini, S.; Giachetti, A.; Christofori, G.; Ziche, M. PGE2 mediates EGFR internalization and nuclear translocation via caveolin endocytosis promoting its transcriptional activity and proliferation in human NSCLC cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 14939–14958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Overmiller, A.M.; McGuinn, K.P.; Roberts, B.J.; Cooper, F.; Brennan-Crispi, D.M.; Deguchi, T.; Peltonen, S.; Wahl, J.K., III; Mahoney, M.G. c-Src/Cav1-dependent activation of the EGFR by Dsg2. *Oncotarget* **2016**, *7*, 37536–37555. [[CrossRef](#)]
20. Luan, T.Y.; Zhu, T.N.; Cui, Y.J.; Zhang, G.; Song, X.J.; Gao, D.M.; Zhang, Y.M.; Zhao, Q.L.; Liu, S.; Su, T.Y.; et al. Expression of caveolin-1 is correlated with lung adenocarcinoma proliferation, migration, and invasion. *Med. Oncol.* **2015**, *32*, 207. [[CrossRef](#)]
21. Sekhar, S.C.; Kasai, T.; Satoh, A.; Shigehiro, T.; Mizutani, A.; Murakami, H.; El-Aarag, B.Y.; Salomon, D.S.; Massaguer, A.; Llorens, R.D.; et al. Identification of caveolin-1 as a potential causative factor in the generation of trastuzumab resistance in breast cancer cells. *J. Cancer* **2013**, *4*, 391–401. [[CrossRef](#)]
22. Dittmann, K.; Mayer, C.; Kehlbach, R.; Rodemann, H.P. Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol. Cancer* **2008**, *7*, 69. [[CrossRef](#)]
23. Dittmann, K.; Mayer, C.; Kehlbach, R.; Rothmund, M.C.; Rodemann, H.P. Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport. *Radiother. Oncol.* **2009**, *92*, 379–382. [[CrossRef](#)]
24. Masuelli, L.; Budillon, A.; Marzocchella, L.; Mrozek, M.A.; Vitolo, D.; Gennaro, E.D.; Losito, S.; Sale, P.; Longo, F.; Ionna, F.; et al. Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/alpha-beta catenins complex and multiple ErbB receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3344–3353. [[CrossRef](#)]
25. Chung, Y.C.; Chang, C.M.; Wei, W.C.; Chang, T.W.; Chang, K.J.; Chao, W.T. Metformin-induced caveolin-1 expression promotes T-DM1 drug efficacy in breast cancer cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3930. [[CrossRef](#)]
26. Cui, Y.; Zhu, T.; Song, X.; Liu, J.; Liu, S.; Zhao, R. Downregulation of caveolin-1 increased EGFR-TKIs sensitivity in lung adenocarcinoma cell line with EGFR mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 733–739. [[CrossRef](#)]
27. Chung, Y.C.; Kuo, J.F.; Wei, W.C.; Chang, K.J.; Chao, W.T. Caveolin-1 dependent endocytosis enhances the chemosensitivity of HER-2 positive breast cancer cells to trastuzumab emtansine (T-DM1). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133072. [[CrossRef](#)]
28. Yamaguchi, T.; Lu, C.; Ida, L.; Yanagisawa, K.; Usukura, J.; Cheng, J.; Hotta, N.; Shimada, Y.; Isomura, H.; Suzuki, M.; et al. ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10060. [[CrossRef](#)]

29. Kriegs, M.; Kasten-Pisula, U.; Riepen, B.; Hoffer, K.; Struve, N.; Myllynen, L.; Braig, F.; Binder, M.; Rieckmann, T.; Grenman, R.; et al. Radiosensitization of HNSCC cells by EGFR inhibition depends on the induction of cell cycle arrests. *Oncotarget* **2016**, *7*, 45122–45133. [[CrossRef](#)]
30. Bossi, P.; Bergamini, C.; Siano, M.; Rocca, M.C.; Sponghini, A.P.; Favales, F.; Giannoccaro, M.; Marchesi, E.; Cortelazzi, B.; Perrone, F.; et al. Functional genomics uncover the biology behind the responsiveness of head and neck squamous cell cancer patients to cetuximab. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3961–3970. [[CrossRef](#)]
31. Cecco, L.D.; Nicolau, M.; Giannoccaro, M.; Daidone, M.G.; Bossi, P.; Locati, L.; Licitra, L.; Canevari, S. Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data. *Oncotarget* **2015**, *6*, 9627–9642. [[CrossRef](#)]
32. Job, S.; Reynies, A.; Heller, B.; Weiss, A.; Guerin, E.; Macabre, C.; Ledrappier, S.; Bour, C.; Wasylyk, C.; Etienne-Selloum, N.; et al. Preferential response of basal-like head and neck squamous cell carcinoma cell lines to EGFR-targeted therapy depending on EREG-driven oncogenic addiction. *Cancers* **2019**, *11*, 795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **2015**, *517*, 576–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chung, C.H.; Parker, J.S.; Karaca, G.; Wu, J.; Funkhouser, W.K.; Moore, D.; Butterfoss, D.; Xiang, D.; Zanation, A.; Yin, X.; et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* **2004**, *5*, 489–500. [[CrossRef](#)]
35. Keck, M.K.; Zuo, Z.; Khattri, A.; Stricker, T.P.; Brown, C.D.; Imanguli, M.; Rieke, D.; Endhardt, K.; Fang, P.; Bragelmann, J.; et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 870–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Walter, V.; Yin, X.; Wilkerson, M.D.; Cabanski, C.R.; Zhao, N.; Du, Y.; Ang, M.K.; Hayward, M.C.; Salazar, A.H.; Hoadley, K.A.; et al. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56823. [[CrossRef](#)]
37. Liu, B.S.; Xia, H.W.; Zhou, S.; Liu, Q.; Tang, Q.L.; Bi, N.X.; Zhou, J.T.; Gong, Q.Y.; Nie, Y.Z.; Bi, F. Inhibition of YAP reverses primary resistance to EGFR inhibitors in colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 2171–2182. [[CrossRef](#)]
38. Hung, K.F.; Lin, S.C.; Liu, C.J.; Chang, C.S.; Chang, K.W.; Kao, S.Y. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* **2003**, *32*, 461–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Ketteler, J.; Klein, D. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 2092–2104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Rosenthal, D.I.; Harari, P.M.; Giralt, J.; Bell, D.; Raben, D.; Liu, J.; Schulten, J.; Ang, K.K.; Bonner, J.A. Association of human papillomavirus and p16 status with outcomes in the IMCL-9815 phase III registration trial for patients with locoregionally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy with or without cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1300–1308. [[CrossRef](#)]
41. Szturz, P.; Cristina, V.; Herrera Gomez, R.G.; Bourhis, J.; Simon, C.; Vermorken, J.B. Cisplatin eligibility issues and alternative regimens in locoregionally advanced head and neck cancer: Recommendations for clinical practice. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dassonville, O.; Formento, J.L.; Francoual, M.; Ramaioli, A.; Santini, J.; Schneider, M.; Demard, F.; Milano, G. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J. Clin. Oncol.* **1993**, *11*, 1873–1878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Grandis, J.R.; Melhem, M.F.; Barnes, E.L.; Tweardy, D.J. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **1996**, *78*, 1284–1292. [[CrossRef](#)]
44. Sok, J.C.; Coppelli, F.M.; Thomas, S.M.; Lango, M.N.; Xi, S.; Hunt, J.L.; Freilino, M.L.; Graner, M.W.; Wikstrand, C.J.; Bigner, D.D.; et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 5064–5073. [[CrossRef](#)]
45. Wheeler, S.E.; Suzuki, S.; Thomas, S.M.; Sen, M.; Leeman-Neill, R.J.; Chiosea, S.I.; Kuan, C.T.; Bigner, D.D.; Gooding, W.E.; Lai, S.Y.; et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene* **2010**, *29*, 5135–5145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sun, S.; Wu, Y.; Guo, W.; Yu, F.; Kong, L.; Ren, Y.; Wang, Y.; Yao, X.; Jing, C.; Zhang, C.; et al. STAT3/HOTAIR signaling axis regulates HNSCC growth in an EZH2-dependent manner. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2665–2677. [[CrossRef](#)]
47. Sen, M.; Joyce, S.; Panahandeh, M.; Li, C.; Thomas, S.M.; Maxwell, J.; Wang, L.; Gooding, W.E.; Johnson, D.E.; Grandis, J.R. Targeting Stat3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4986–4996. [[CrossRef](#)]
48. D’Amato, V.; Rosa, R.; D’Amato, C.; Formisano, L.; Marciano, R.; Nappi, L.; Raimondo, L.; Di Mauro, C.; Servetto, A.; Fusciello, C.; et al. The dual PI3K/mTOR inhibitor PKI-587 enhances sensitivity to cetuximab in EGFR-resistant human head and neck cancer models. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 2887–2895. [[CrossRef](#)]
49. Baro, M.; Lopez Sambrooks, C.; Burtneess, B.A.; Lemmon, M.A.; Contessa, J.N. Neuregulin signaling is a mechanism of therapeutic resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 2124–2134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Iida, M.; Bahrar, H.; Brand, T.M.; Pearson, H.E.; Coan, J.P.; Orbuch, R.A.; Flanigan, B.G.; Swick, A.D.; Prabakaran, P.J.; Lantto, J.; et al. Targeting the HER family with pan-HER effectively overcomes resistance to cetuximab. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 2175–2186. [[CrossRef](#)]

51. Cavalot, A.; Martone, T.; Roggero, N.; Brondino, G.; Pagano, M.; Cortesina, G. Prognostic impact of HER-2/neu expression on squamous head and neck carcinomas. *Head Neck* **2007**, *29*, 655–664. [[CrossRef](#)]
52. Yonesaka, K.; Zejnullahu, K.; Okamoto, I.; Satoh, T.; Cappuzzo, F.; Souglakos, J.; Ercan, D.; Rogers, A.; Roncalli, M.; Takeda, M.; et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 99ra86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ouyang, X.; Barling, A.; Lesch, A.; Tyner, J.W.; Choonoo, G.; Zheng, C.; Jeng, S.; West, T.M.; Clayburgh, D.; Courtneidge, S.A.; et al. Induction of anaplastic lymphoma kinase (ALK) as a novel mechanism of EGFR inhibitor resistance in head and neck squamous cell carcinoma patient-derived models. *Cancer Biol. Ther.* **2018**, *19*, 921–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kochanny, S.E.; Worden, F.P.; Adkins, D.R.; Lim, D.W.; Bauman, J.E.; Wagner, S.A.; Brisson, R.J.; Karrison, T.G.; Stadler, W.M.; Vokes, E.E.; et al. A randomized phase 2 network trial of tivantinib plus cetuximab versus cetuximab in patients with recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Novoplansky, O.; Fury, M.; Prasad, M.; Yegodayev, K.; Zorea, J.; Cohen, L.; Pelossof, R.; Cohen, L.; Katabi, N.; Cecchi, F.; et al. MET activation confers resistance to cetuximab, and prevents HER2 and HER3 upregulation in head and neck cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 748–762. [[CrossRef](#)]
56. Leonard, B.; Brand, T.M.; O’Keefe, R.A.; Lee, E.D.; Zeng, Y.; Kemmer, J.D.; Li, H.; Grandis, J.R.; Bhola, N.E. BET inhibition overcomes receptor tyrosine kinase-mediated cetuximab resistance in HNSCC. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 4331–4343. [[CrossRef](#)]
57. Brand, T.M.; Iida, M.; Stein, A.P.; Corrigan, K.L.; Braverman, C.M.; Luthar, N.; Toulany, M.; Gill, P.S.; Salgia, R.; Kimple, R.J.; et al. AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5152–5164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Braig, F.; Voigtlaender, M.; Schieferdecker, A.; Busch, C.J.; Laban, S.; Grob, T.; Kriegs, M.; Knecht, R.; Bokemeyer, C.; Binder, M. 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*, 42988–42995. [[CrossRef](#)]
59. Nair, S.; Trummell, H.Q.; Rajbhandari, R.; Thudi, N.K.; Nozell, S.E.; Warram, J.M.; Willey, C.D.; Yang, E.S.; Placzek, W.J.; Bonner, J.A.; et al. Novel EGFR ectodomain mutations associated with ligand-independent activation and cetuximab resistance in head and neck cancer. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0229077. [[CrossRef](#)]
60. Yang, J.; Zhu, T.; Zhao, R.; Gao, D.; Cui, Y.; Wang, K.; Guo, Y. Caveolin-1 inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells by suppressing phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 332–341. [[CrossRef](#)]
61. Han, F.; Zhang, J.; Shao, J.; Yi, X. Caveolin-1 promotes an invasive phenotype and predicts poor prognosis in large cell lung carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* **2014**, *210*, 514–520. [[CrossRef](#)]
62. Han, F.; Gu, D.; Chen, Q.; Zhu, H. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas* **2009**, *38*, 766–774. [[CrossRef](#)]
63. Gu, D.; Li, H.; Wang, Z.; Chen, Q.; Jiang, J.; Zhu, H. Caveolin-1 inhibits the growth of human laryngeal squamous cell carcinoma and down regulates EGFR-MAPKs signaling pathway. *Laryngoscope* **2007**, *117*, 1782–1789. [[CrossRef](#)]
64. Xu, L.; Qu, X.; Li, H.; Li, C.; Liu, J.; Zheng, H.; Liu, Y. Src/caveolin-1-regulated EGFR activation antagonizes TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* **2014**, *32*, 318–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Yamaguchi, T.; Hayashi, M.; Ida, L.; Yamamoto, M.; Lu, C.; Kajino, T.; Cheng, J.; Nakatochi, M.; Isomura, H.; Yamazaki, M.; et al. ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma. *Oncogene* **2019**, *38*, 5142–5157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Pereira, P.M.R.; Sharma, S.K.; Carter, L.M.; Edwards, K.J.; Pourat, J.; Ragupathi, A.; Janjigian, Y.Y.; Durack, J.C.; Lewis, J.S. Caveolin-1 mediates cellular distribution of HER2 and affects trastuzumab binding and therapeutic efficacy. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5137. [[CrossRef](#)]
67. Li, H.Y.; Qu, C.; Zhang, Y.J.; Sun, J.; Han, C.; Liu, J.; Zou, W. Caveolin-1 is involved in DNA damage and repair signaling in X-irradiated Chang liver cells. *Sheng Li Xue Bao* **2017**, *69*, 759–766.
68. Singh, B.; Carpenter, G.; Coffey, R.J. EGF receptor ligands: Recent advances. *F1000Research* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
69. Moreno-Vicente, R.; Pavon, D.M.; Martin-Padura, I.; Catala-Montoro, M.; Diez-Sanchez, A.; Quilez-Alvarez, A.; Lopez, J.A.; Sanchez-Alvarez, M.; Vazquez, J.; Strippoli, R.; et al. Caveolin-1 modulates mechanotransduction responses to substrate stiffness through actin-dependent control of YAP. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1679–1680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Sanchez-Vega, F.; Mina, M.; Armenia, J.; Chatila, W.K.; Luna, A.; La, K.C.; Dimitriadou, S.; Liu, D.L.; Kantheti, H.S.; Saghafeina, S.; et al. Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell* **2018**, *173*, 321–337.e10. [[CrossRef](#)]
71. Urtasun, R.; Latasa, M.U.; Demartis, M.I.; Balzani, S.; Goni, S.; Garcia-Irigoyen, O.; Elizalde, M.; Azcona, M.; Pascale, R.M.; Feo, F.; et al. Connective tissue growth factor autocriny in human hepatocellular carcinoma: Oncogenic role and regulation by epidermal growth factor receptor/yes-associated protein-mediated activation. *Hepatology* **2011**, *54*, 2149–2158. [[CrossRef](#)]
72. He, C.; Mao, D.; Hua, G.; Lv, X.; Chen, X.; Angeletti, P.C.; Dong, J.; Remmenga, S.W.; Rodabaugh, K.J.; Zhou, J.; et al. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 1426–1449. [[CrossRef](#)]

73. Yoshikawa, K.; Noguchi, K.; Nakano, Y.; Yamamura, M.; Takaoka, K.; Hashimoto-Tamaoki, T.; Kishimoto, H. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 2364–2370. [[CrossRef](#)]
74. Akervall, J.; Nandalur, S.; Zhang, J.; Qian, C.N.; Goldstein, N.; Gyllerup, P.; Gardinger, Y.; Alm, J.; Lorenc, K.; Nilsson, K.; et al. A novel panel of biomarkers predicts radioresistance in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50*, 570–581. [[CrossRef](#)]

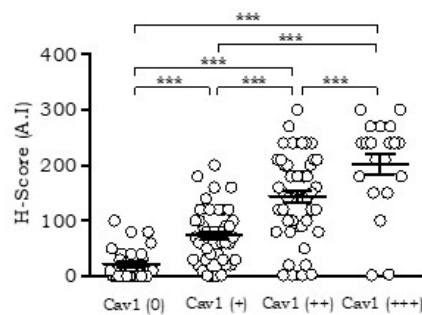
Supplementary Materials: Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Mickaël Burgy, Aude Jehl, Omblin Conrad, Sophie Foppolo, Véronique Bruban, Nelly Etienne-Selloum, Alain C Jung, Murielle Masson, Christine Macabre Sonia Ledrappier, Hélène Burckel, Carole Mura, Georges No  l, Christian Borel, François Fasquelle, Mihaela-Alina Onea, Marie-Pierre Chenard, Alicia Thiéry, Monique Dontenwill and Sophie Martin

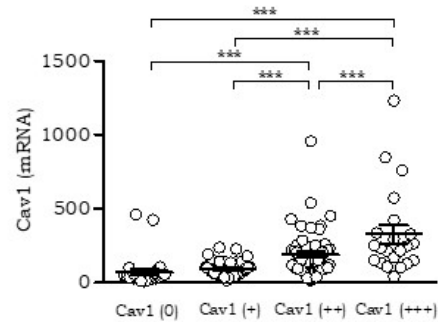
Table S1. Antibodies.

Antibodies	Species	Dilution	Suppliers
Caveolin-1 (N-20, sc-894)	Rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (MAB374)	Mouse	1:10000	EMD Millipore [�]
Cleaved PARP (#9541, Asp214)	Rabbit	1:1000	
TAZ (D3I6D)	Rabbit	1:1000	
YAP (14074S)	Rabbit	1:1000	
pYAP S127 (D9W2I)	Rabbit	1:1000	
EGFR (D1D4) XP [�]	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology [�]
p44/42 MAPK (#9102)	Rabbit	1:1000	
Phospho-p44/42 MAPK (#9101, Thr202/Tyr204)	Rabbit	1:1000	
AKT (#9272)	Rabbit	1:1000	
Phospho-AKT (#4060, D9E, Ser473)	Rabbit	1:1000	
Anti-mouse IgG HRP-conjugate	Goat	1:10000	Promega [�]
Anti-rabbit IgG HRP-conjugate			

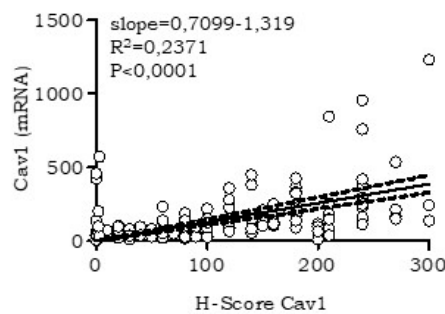
Supplementary data 1



Supplementary data 2



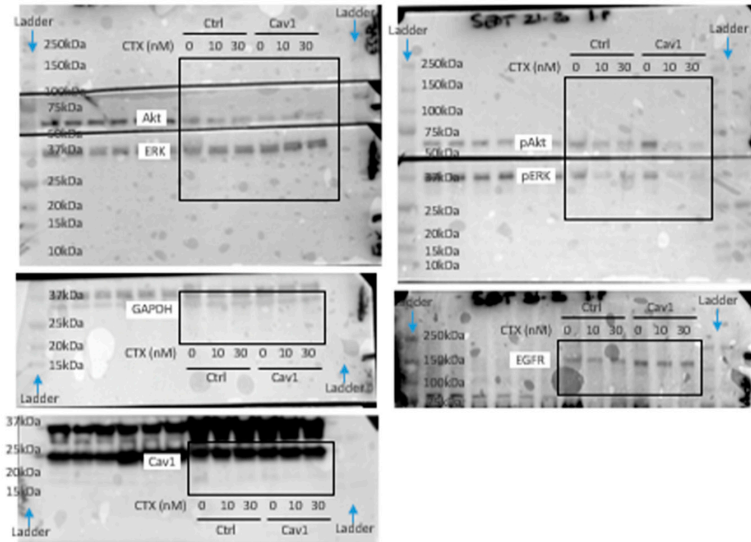
Supplementary data 3



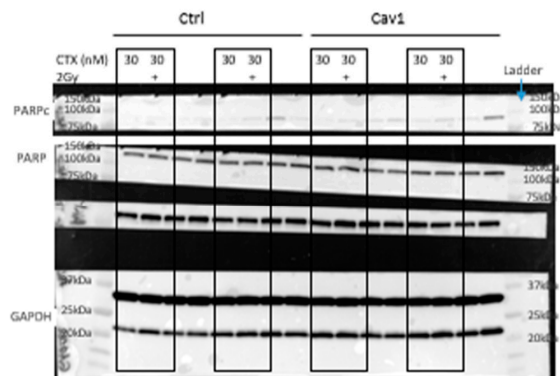
Data S1–S3: Cav1 expression in human HNSCC primary tumor tissues 1, The H-score was calculated as a percentage of cells stained for Cav1 (0, 1, 2 or 3) using the formula ($1 \times (\% \text{ cells } 1) + 2 \times (\% \text{ cells } 2) + 3 \times (\% \text{ cells } 3)$). Histograms show the Cav1 H-score in each subgroup identified by IHC. 2, Histograms show the mRNA expression level of Cav1 in each subgroup identified by IHC. 3, Correlation curve between the mRNA expression level of Cav1 and the Cav1 H-score. Each bar represents the mean \pm SEM with *** $p < 0.001$.

Original western blots:

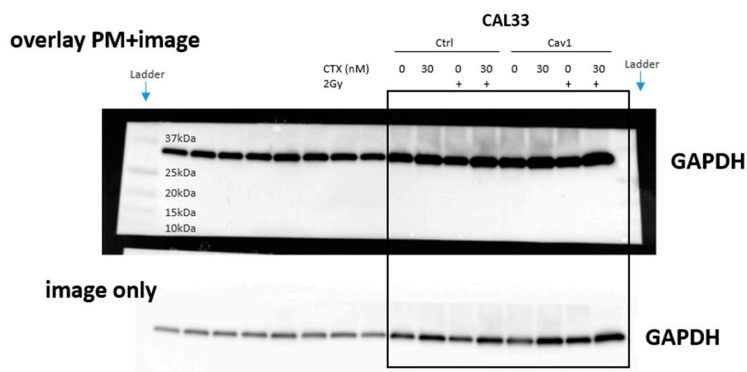
Original blot (overlay PM marker+image) - FIGURE 1B



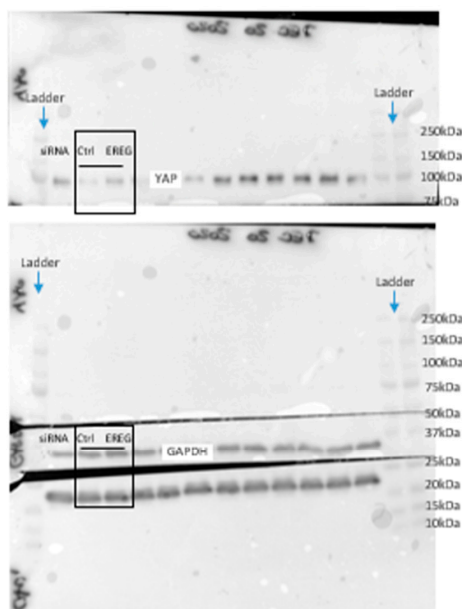
Original blot (overlay PM marker+image) - FIGURE 2E



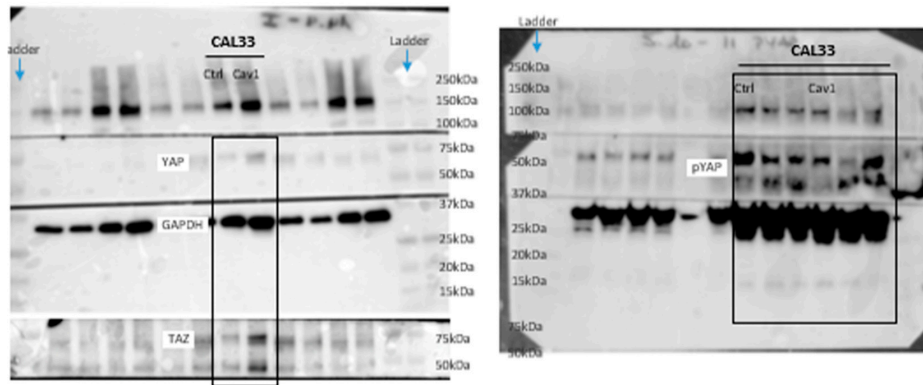
Original blot (overlay PM marker+image) - FIGURE 4B (GAPDH)



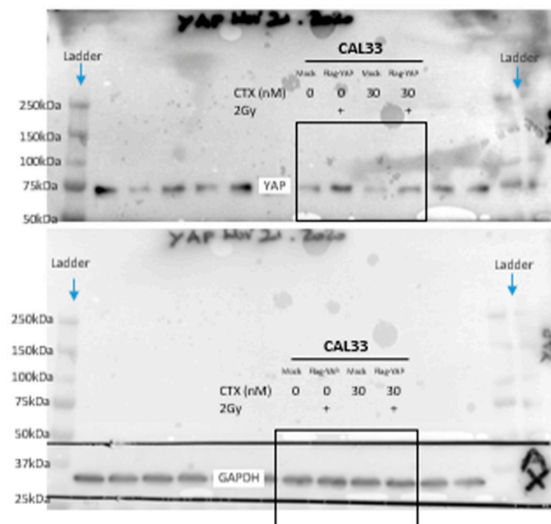
Original blot (overlay PM marker+image) - FIGURE 5A



Original blot (overlay PM marker+image) - FIGURE 5B



Original blot (overlay PM marker+image) - FIGURE 5D



Discussion

Les cancers de la tête et du cou causent encore chaque année un nombre important de décès, malgré une prise en charge thérapeutique bien définie, des effets complémentaires des traitements et un accès aux soins facilité. En effet, le taux de survie à 3 ans n'évolue quasiment pas depuis plus de 30 ans et reste établi aux alentours de 65% (Cooper et al., 2004). Ce pourcentage s'explique notamment en raison des récurrences qui sont, dans 50% des cas locorégionales, et dans 20 à 30% des cas de type métastases à distance (Vermorken and Specenier, 2010).

Afin d'investiguer ces récurrences, le parti a été pris de les étudier dans deux papiers distincts sous l'angle de l'expression de la Cav1. En effet, l'expression de cette protéine a été décrite comme biphasique dans le processus de cancérisation des cancers de la tête et du cou (Hung et al., 2003). Ainsi, l'expression de la Cav1 augmente dans un premier temps lors de la transition histologique entre l'épithélium et le carcinome épidermoïde primaire mais cette expression se voit diminuer dans un second temps pour basculer vers un carcinome métastatique (Zhang et al., 2008). Ainsi, une première étude a été menée par notre équipe sur une cohorte de patients ayant pour but de mettre en exergue des biomarqueurs moléculaires spécifiques aux patients à haut risque métastatique, c'est-à-dire des patients qui présentent un premier événement de récurrence dans les 3 ans post-traitement, un phénomène de rechute par métastases *versus* des patients sans événement de récurrence. Dans ce contexte, l'expression faible ou nulle de la Cav1 a été observée chez les patients présentant un cancer des VADS avec rechute métastatique post-traitement (Jung et al., 2015). Cette expression faible ou nulle est également associée à un pronostic de survie défavorable.

En vue de compléter les données permettant d'ouvrir la voie des explications des mauvais taux de survie, notre équipe s'est plus particulièrement attelée à expliquer les phénomènes de rechute de type locorégionale. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, recueilli des données issues de la clinique en nous basant sur une étude rétrospective de 173 patients. Au sein de cette cohorte, nous avons pu mettre en évidence qu'une expression importante de la Cav1 favorise une rechute de type locorégionale et confirme le lien avec la métastase pour les patients présentant une tumeur où la Cav1 est faiblement exprimée ou non exprimée. C'est pourquoi, nous pouvons qualifier la Cav1 de biomarqueur pronostique de l'évolution de la tumeur primitive, permettant ainsi de stratifier les cancers ORL avancés selon l'expression de cette protéine.

En effet, une expression faible ou nulle semble engager la tumeur vers des évènements métastatiques à distance alors qu'une surexpression tend plutôt vers des récurrences locorégionales.

Dans le papier *Cav1 / EREG / YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, le but était donc de trouver des explications au phénomène de rechute locorégionale après un co-traitement associant l'effet radiosensibilisateur de cétuximab et la radiothérapie. Aussi, nous avons mis en évidence que la surexpression de la Cav1 maintenait la croissance, la survie et l'évasion des cellules exposées à la radiothérapie post-traitement par du cétuximab. De plus, la Cav1 semble jouer un rôle crucial dans le trafic de l'EGFR pouvant expliquer ces points de résistance aux traitements. En effet, après un traitement par de la radiothérapie, la Cav1 permet la translocation de l'EGFR vers le noyau afin qu'il conduise le signal d'activation de la protéine kinase dépendante de l'ADN ou DNA-PK afin de favoriser la réparation de l'ADN endommagé par les radiations (Dittmann et al., 2008) - (Dittmann et al., 2009) - (H.-Y. Li et al., 2017). De plus, l'EGFR, dont le transport intracellulaire est favorisé par la Cav1, présente également une forte activité transcriptionnelle avec une régulation positive de la cycline D1 codée par le gène *CCDN1* mais aussi du proto-oncogène *MYC*, deux acteurs qui favorisent la prolifération mais également la survie cellulaires (Bazzani et al., 2018). Néanmoins, grâce à notre étude où la Cav1 est surexprimée nous avons pu mettre en avant une disparité concernant la localisation de l'EGFR en comparaison aux cellules contrôle. Ainsi, dans les cellules qui surexpriment la Cav1, l'EGFR est concentré sous forme de grappes ponctuelles au niveau de la membrane plasmique lorsque les cellules sont traitées par du cétuximab et/ou de la radiothérapie, alors que pour les cellules contrôle l'EGFR est internalisé. Donc, dans les cellules surexprimant la Cav1, la concentration d'EGFR au sein de radeaux lipidiques empêche l'internalisation du récepteur. Ce phénomène bloque donc l'expression du gène cible de l'EGFR, *MYC*, mais aussi l'expression d'un des ligands endogènes de l'EGFR : *EREG*.

EREG correspond au gène qui code pour l'épiréguline, il s'agit d'un ligand endogène de l'EGFR qui a été décrit par Job *et al.* en 2019 comme modulant la sensibilité des cancers de la tête et du cou de sous-type basal aux traitements ciblant l'EGFR en raison d'une dépendance existant entre la signalisation de l'EGFR et celle *EREG* via une boucle d'auto-amplification oncogénique (Job et al., 2019).

De plus, nous savons qu'EGFR, et plus précisément son taux d'expression, peut être employé comme biomarqueur prédictif de la réponse aux traitements anti-EGFR (Singh et al., 2016). Effectivement, dans notre étude nous nous sommes rendu compte que la surexpression de la Cav1 provoque la diminution de l'expression d'EGFR. Lorsque seule l'expression d'EGFR est diminuée, sans fluctuation de l'expression de la Cav1, il est à noter une phénotypie en termes de résistance au cétuximab en comparaison aux résultats obtenus lorsque la Cav1 est surexprimée. EGFR semble donc être une cible clé de la résistance aux traitements médiée par la Cav1 qui à elle seule ne peut être considérée comme un biomarqueur prédictif.

La question qui reste à éclaircir est celle concernant l'explication de la suppression d'EGFR dans les cellules qui surexpriment la Cav1. Pour tenter de trouver des explications, nous nous sommes intéressés de plus près à la régulation de l'activité de YAP par la Cav1 (Moreno-Vicente et al., 2018). En effet, 42% des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou HPV-négatifs présentent des altérations de la voie HIPPO (Sanchez-Vega et al., 2018). Lorsque l'EGFR est activé, YAP opère une translocation nucléaire favorisant l'expression d'EGFR et de l'EGFR (Urtasun et al., 2011) - (He et al., 2015) entraînant une boucle autocrine entre les voies EGFR et HIPPO. De plus, nous avons démontré que la Cav1 permettait l'activation de YAP par répression d'EGFR en faveur de la prolifération et de la survie cellulaires.

Nos données montrent clairement que la Cav1 favorise la résistance au cétuximab et/ou à la radiothérapie *via* l'axe Cav1 / EGFR / YAP. Il semble donc tout à fait indiqué de poursuivre les investigations mais cette fois en se consacrant à l'étude des cellules dont l'expression d'EGFR a été réprimée afin de le positionner comme un potentiel biomarqueur prédictif dans les cancers des VADS pris en charge par le cétuximab. Les conclusions de cet article scientifique sont résumées au sein de la figure qui suit (*Figure 92*).

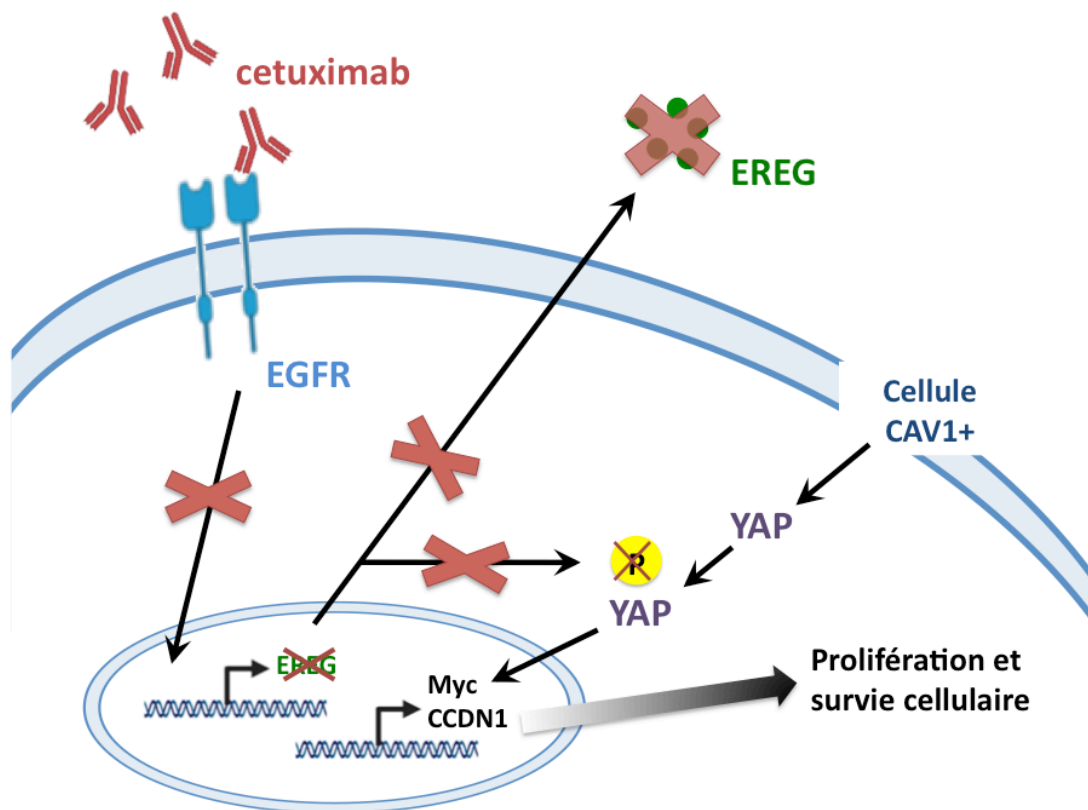


Figure 92 : Schéma récapitulatif des conclusions apportées par l'article scientifique Cav1 / EREG / YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Burgy and Jehl et al., 2021)

Article scientifique n°2, 2022 *soumis*

Jehl, A., Conrad, O., Burgy, M., Foppolo, S., Bruban, V., Vauchelles, R., Ronzani, C., Etienne-Selloum, N., Ronzani C., Jung, M.- P., Chenard, Dourlhes T., Danic A., Schultz P., Dontenwill, M., Martin, S.

Blocking EREG / GPX– 4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction

Introduction

Les résultats obtenus par notre équipe à travers les deux précédents articles scientifiques portant sur les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ont permis d'identifier la Cav1 comme un biomarqueur pronostique de l'évolution de la tumeur primitive. Ils ont également permis d'élucider les processus moléculaires et cellulaires aboutissant à la rechute métastatique lorsque l'expression de la Cav1 est faible ou abolie et ceux inhérents à la rechute locorégionale en cas de surexpression de cette protéine (Jung et al., 2015) - (Burgy and Jehl et al., 2021).

De plus, l'article de 2021 a mis en exergue l'implication de l'axe Cav1 / EREG / YAP dans la résistance à la prise en charge thérapeutique basée sur la seule thérapie ciblée employée dans les cancers des VADS : le cétuximab. Ainsi, dans les cellules qui surexpriment la Cav1, la prolifération et la survie cellulaires sont maintenues malgré un traitement au moyen du cétuximab ce qui signe un phénotype agressif de la tumeur primitive. Afin de mettre en évidence le phénomène de résistance à la thérapie ciblée observé, nous avons identifié une cible clé, un des ligands endogènes de l'EGFR qu'est EREG dont l'expression est influencée par celle de la Cav1. En effet, lorsque la Cav1 est surexprimée, l'expression d'EREG est diminuée voire abolie (Burgy and Jehl et al., 2021).

Fort de ces constats et notamment à la suite des conclusions de l'article de 2021, nous avons mis en parallèle de nos résultats ceux obtenus par les travaux de Job *et al.* qui décrivent en 2019 une boucle d'auto-amplification oncogénique comme modulant la sensibilité des cancers de la tête et du cou de sous-type basal aux traitements ciblant l'EGFR (Job et al., 2019). L'implication d'EREG a d'ores et déjà été étudiée dans les cancers, ainsi EREG est décrit comme jouant un rôle important dans le développement des cancers à différentes étapes, allant de l'initiation de la carcinogénèse à des stades avancés du cancer (Aguilar-Cazares et al., 2019). Ce ligand soluble cible l'EGFR qui permet ensuite les cascades de signalisation comprenant à la fois PI3K / AKT / mTOR et RAS / RAF / MAPK / ERK favorisant ainsi la prolifération cellulaire, l'angiogénèse et la survie cellulaire (Toyoda et al., 1995) - (Komurasaki et al., 1997) - (Toyoda et al., 1997).

Afin de poursuivre les investigations quant à la résistance des cellules des cancers de la tête et du cou face à un traitement par du cétuximab, nous avons choisi d'étudier d'une part les mécanismes de la baisse de l'expression d'EGFR. Pour ce faire, nous avons donc réduit l'expression d'EGFR au moyen d'un siARN. En effet, nous savons, grâce aux résultats publiés en 2021, que l'expression d'EGFR est dépendante de l'expression de la Cav1. Lorsque la Cav1 est surexprimée, l'expression d'EGFR est drastiquement diminuée voire abolie. A travers les travaux envisagés nous souhaitons donc d'une part déterminer l'impact sur le phénotype de progression tumorale d'une inhibition de l'expression d'EGFR et son influence quant à la réponse à un traitement par du cétuximab.

D'autre part, nous proposons de réaliser une preuve de concept pour appuyer nos conclusions en utilisant un modèle tridimensionnel complexe tenant compte de l'hétérogénéité tumorale, à savoir un modèle tumoroïde de cancers de la tête et du cou. En effet, plusieurs études indiquent que les conditions de culture 3D permettent de refléter davantage les conditions de croissance *in vivo* des tumeurs comparées aux conditions de culture cellulaire en 2D (Yoshii et al., 2015) - (Tanaka et al., 2018). La culture 3D effectuée directement à partir de pièces opératoires d'un patient permet de récapituler et de conserver les mêmes caractéristiques histologiques que la tumeur d'origine. Cette culture tridimensionnelle contient également des cellules souches cancéreuses dont les caractéristiques sont similaires à celles présentes au sein de la tumeur du patient (Tanaka et al., 2018) - (Driehuis et al., 2019). Ainsi pour notre projet, les pièces opératoires correspondront à des résections chirurgicales de tumeurs issues de patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou HPV négatif de classification TMN \geq T3 et/ou \geq N2a et M0 dont la prise en charge thérapeutique a nécessité une exérèse tumorale. Après l'adaptation d'un protocole de mise en culture et de maintien des tumoroïdes optimal au sein du laboratoire, les tumoroïdes établis pourront être analysés en termes de caractéristiques moléculaires avec notamment l'évaluation de l'expression de la Cav1 ou encore celles d'EGFR et de l'EGFR. Enfin, ce modèle permettra de déterminer la réponse cellulaire après une exposition à du cétuximab, avec notamment l'évaluation de la croissance tumorale et de la viabilité des cellules.

Les résultats de ce projet sont présentés ci-dessous au sein de l'article soumis en 2022 *Blocking EGFR / GPX-4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction.*

Blocking EREG / GPX4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction

Aude Jehl¹, Omblin Conrad¹, Mickaël Burgy^{1,2}, Sophie Foppolo¹, Véronique Bruban¹, Romain Vauchelles¹, Carole Ronzani³, Nelly Etienne-Selloum^{1,4}, Marie-Pierre Chenard⁵, Aurélien Danic⁶, Thomas Dourlhes⁶, Philippe Schultz⁶, Monique Dontenwill¹ and Sophie Martin^{1,*}

1 Laboratory of Bioimaging and Pathology, University of Strasbourg, UMR7021 CNRS, 67401 Illkirch, France; dr.jehlaude@gmail.com (A.J.); omblin.conrad@etu.unistra.fr (O.C.); m.burgy@icans.eu (M.B.); sophie.foppolo@unistra.fr (S.F.); veronique.bruban@unistra.fr (V.B.); romain.vauchelles@unistra.fr (R.V.); nelly.etienne-selloum@unistra.fr (N.E.-S); monique.dontenwill@unistra.fr (M. D.); sophie.martin@unistra.fr (S.M.).

2 Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France

3 Laboratoire de Design and Application of Bioactive Molecules, University of Strasbourg, UMR7199, CNRS, 67400 Illkirch, France; ronzani@unistra.fr (C.R.)

4 Department of Pharmacy, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France

5 Department of Pathology, Strasbourg University Hospital, 67200 Strasbourg, France; Marie-Pierrette.CHENARD@chru-strasbourg.fr (M.-P.C.)

6 Department of Otolaryngology and Cervico-Facial Surgery, Strasbourg University Hospital, 67200 Strasbourg, France; aurelien.danic@chru-strasbourg.fr (A.D.); thomas.dourlhes@chru-strasbourg.fr (T.D.), philippe.schultz@chru-strasbourg.fr (P.S.)

* Correspondence: sophie.martin@unistra.fr; Tel.: +3-336-885-4197; Fax: +3-336-885-4313

Abstract: Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) affect nearly 932,000 people and cause about 450,000 deaths each year worldwide, they rank sixth among the most frequently observed cancers. 60% of cases are diagnosed at locally-advanced stage (LA-HSNCC) of disease and the therapeutic management is based only on the TNM classification and anatomopathological analysis. One of the possible treatment is targeted therapy *via* cetuximab (CTX), but there is no predictive biomarker for the response to CTX that allows optimisation of the patient's therapeutic management. We recently reported that caveolin-1 (Cav1) expression predicted locoregional relapse of HNSCC due to resistance to CTX and radiotherapy. Epiregulin (EREG), an endogenous EGFR ligand, was identified as a key target of Cav1-mediated resistance to treatment. Repression of EREG was associated with a

decrease of tumour progression features with a mitochondrial dysfunction. As no apoptosis and no autophagy were observed in EREG-negative cells, we focused on ferroptosis. We showed that this latter is decreased in EREG-negative cells, while CTX treatment induced greater ferroptosis in these cells. Therefore, we can suggest that low expression of EREG could be used as a predictive biomarker to predict sensitivity to CTX in HNSCC *via* ferroptosis activation. Moreover, we propose a co-treatment with a combination of CTX and a ferroptosis inducers: RSL3 or metformin drastically. This combination decreases the survival of EREG negative cells. Another model was used to support our results, a tumoroid model obtained from surgical specimens of CTX-resistant patients who respond favourably to the suggested combination.

Keywords: head and neck cancers, EREG, ferroptosis, tumoroid, biomarkers, metabolism, autophagy

Author Contributions: *Participated in research design:* A.J., S.M. *Conducted experiments:* A.J., S.F., O.C., M.B., V.B., C.R. *Performed data analysis:* A.J., S.M., S.F., C.R. *Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* A.J., S.M., O.C., M.D. *Provided and processed samples:* P.S., M.-P.C., T.D., A.D. *Provided drugs:* N.-E.S. *Data analysis:* A.J., S.M., S.F., R.V.

1. INTRODUCTION

With nearly 932,000 new cases and 450,000 deaths in 2018 worldwide, head and neck cancers, and more particularly head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), rank 6th among the most frequently observed cancers in the world (1). Locally advanced HNSCC (LA-HNSCC, stage III/IV) represents 70% of patients at diagnosis. They require primary surgery followed by adjuvant (chemo)-radiotherapy or definitive chemoradiotherapy including cetuximab (CTX) (2, 3). The chimeric antibody CTX targets the epidermal growth factor receptor (EGFR), which happens to be overexpressed in more than 90% of HNSCC. CTX prevents ligands binding and dimerization with other HER family members (4, 5). Once bound, CTX blocks EGFR phosphorylation, signal transduction and promotes EGFR internalization thus extinguishing the oncogenic EGFR signaling (6, 7). Unfortunately, some patients do not benefit from CTX treatment, and others show recurrences soon after the end of

the treatment. Intrinsic or therapeutically acquired resistances to CTX are extensively studied to understand the mechanisms involved. We ourselves have recently shown the involvement of the caveolin-1/epiregulin/YAP axis in the resistance to CTX and irradiation therapy (8).

Epiregulin (EREG), encoded by the EREG gene located on chromosome 4q13.3, belongs to the ErbB family of ligands. The 162 amino acids transmembrane proform of EREG is proteolytically cleaved by ADAM17 (9) to release a soluble form of 46 amino acids (10). EREG shares 24-50% of its sequence with those of other members of the EGF family (10). EREG binds to EGFR (extracellular domain I and III that partially overlaps the EGF binding site (11)) and ErbB4.

It stimulates homodimers of EGFR and ErbB4 in addition to heterodimers of ErbB2 and ErbB3 leading to the activation and the transduction of downstream signaling pathways (12). In contrast to EGF, EREG leads to complete EGFR recycling and not to lysosomal degradation (13). EREG induces less stable EGFR dimers than EGF but unexpectedly this weakened dimerization elicits more sustained EGFR signaling than EGF (14). Low or non-existent in most human tissues, elevation of EREG expression is observed in early stages of cancer development in which EREG induces epithelial-mesenchymal transition (15). EREG is a transcriptional target of the oncogenic KRAS and is also overexpressed in cells with oncogenic mutation of EGFR and BRAF (16). EREG also promotes tumorigenicity, metastasis, drug resistance, cell plasticity and modulates the tumor microenvironment and metabolism (17). Increased expression of EREG is associated with short overall survival in patient with HNSCC/OSCC (11, 15, 18-20). Elevated levels of EREG appear to be a potential predictive biomarker of anti-EGFR therapies in several cancer types including HNSCC (21). We recently reported that overexpression of caveolin-1 in HNSCC is associated with the total loss of EREG as well as the oncogenic addiction to EGFR (9). Silencing EREG activates the YAP/TAZ pathway that enables cells to resist to CTX/radiotherapy. Resistance of HNSCC cells to therapy is linked to the protection of the mitochondria and drives the recurrence of caveolin-1 expressing HNSCC tumors (8).

How the loss of EREG affects the cellular metabolism and how it might influence the response to anti-EGFR therapies is only sparsely documented in HNSCC. In the present study, we show that silencing EREG reduces cells survival by

inducing mitochondria defects like what is observed during EGFR blockade by CTX. EREG silencing combined with CTX treatment reduce even further cell survival, mitochondrial ATP production and ECAR leading to the appearance of less metabolically active cells. EREG-silenced cells exposed to CTX were protected against autophagy but exert increased intracellular levels of Fe^{2+} , accumulation of lipid peroxides and the loss of GPX4, all of which are hallmarks of ferroptosis.

Finally, combining ferroptosis inducers (RSL3 and metformin) with CTX drastically reduces survival of HNSCC but also HNSCC patient-derived tumoroids. We for the first time demonstrated that silencing both EREG and the EGFR signaling can promote ferroptosis by markedly suppressing GPX4. Our study reveals the glutathione metabolism as a targetable vulnerability of HNSCC that should be exploited in CTX-based therapies.

2. MATERIALS & METHODS

2.1. Cell Culture, Transfection and Drugs

CAL27, CAL33 and SCC9 cell lines were purchased from the ATCC® and DSMZ (authenticated by STR profiling). All cell lines were tested negative for mycoplasma contamination. CAL27 and CAL33 were grown in DMEM (PAN Biotech) supplemented with 2 mM ultra-glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate and 10% heat inactivated FBS (Gibco). SCC9 were grown in DMEM-F12 (PAN Biotech) supplemented with 2.5 mM ultra-glutamine, 15 mM HEPES, 400 ng/mL hydrocortisone (Sigma) and 10% FBS (Gibco). EREG expression was downregulated by transfecting cell lines with 25 nM siRNAEREG (Human EREG and respective control siRNACtrl, SMARTPool from Dharmacon) using Lipofectamine 2000TM (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, France). Efficient EREG silencing was determined by western blot. When indicated, cells were treated with 30 nM of CTX (Erbix™, 5 mg/mL, Merck, a monoclonal antibody classified as an antineoplastic agent) or with 5 μM RSL3 (MedChemExpress, an inhibitor of glutathione peroxidase 4 GPX4) or with 1 mM metformin (MedChemExpress, a promoter of ferroptosis) alone or in combination with CTX.

2.2. Sphere Evasion Assay

After treatments, 500,000 cells were resuspended in 1 mL of regular culture medium supplemented with 20% methylcellulose. Spheroids were formed using the hanging drop culture method. Drops of 20 μ L cell suspension were placed into the lids of 60 mm dishes, which were inverted over the dishes. Dishes were cultured in humidified chambers for 48 hours to allow the formation of round aggregates. Spheroids were harvested and seeded in plastic 24 well plates (6 spheres/well) for additional 24 hours to allow evasion of cells from attached spheres. Pictures were taken using the Evos XI Core microscope (AMG) with a 10X magnification. The results were expressed, in pixels, as the evasion area of the cells relative to the area of the attached sphere (total area - area of the sphere) determined using ImageJ.

2.3. IncuCyte[®] Assay

After transfection, the cells are seeded (4,000 for CAL33 and 8,000 for CAL27 and SCC9 cells / 200 μ L / well) in 96-well plates. Plates were placed at 37°C and confluence, growth, cell health and morphology were monitored during 164 hours / 7 days. The percentage of confluence was determined using the IncuCyte[®] analysis software after normalization to day 0 (Essen BioScience, Sartorius, Goettingen, Germany).

2.4. Clonogenic Survival Assay

72 hours after transfection and/or additional 48 hours of treatment with 30 nM CTX or 5 μ M RSL3 or 1 mM metformin or co-treatments, cells were seeded (500 for CAL27 and SCC9 and 1000 for CAL33 cells / 2 mL / well) in 6-well plates and allowed to grow for 10 days. Cells were colored with crystal violet at 0.1% (Sigma-Aldrich). Colonies were counted to determine the plating efficiency (PE) and the surviving fraction (SF). PE = number of surviving cells/number of cells plated. SF = PE of the experimental group/PE of the control group.

2.5. Metabolic Assays

After treatment, 20,000 cells were plated in a Seahorse XF Cell Culture microplate in XF growth medium (non-buffered DMEM containing 10 mM glucose, 4 mM L-glutamine, and 2 mM sodium pyruvate). OCR (oxygen consumption rate), ECAR (extracellular acidification rate) and ATP consumption were measured using

the ATP rate assay procedure under basal conditions and in response to 1.5 μ M oligomycin, 0.5 μ M rotenone + antimycin A with the XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Agilent). The metabolic profiles were analyzed using the online Seahorse analytics platform.

2.6. Western Blot

72 hours after transfection and/or additional 48 hours of treatment with 30 nM CTX or 5 μ M RSL3 or 1 mM metformin or co-treatments, cells were lysed with the lysis buffer (1% Triton, 100 nM NaF, 10 mM Na₄O₇P₂, 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail (Roche) in PBS) for 30 minutes at 4°C and then sonicated. The supernatant was recovered by centrifugation at 14,000 rpm for 10 minutes at 4°C. 5 to 10 μ g of proteins were separated on a 4 – 20% TGX-denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE Bio-Rad Marnes-La-Coquette, France) and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier Cedex, France). Blots were probed with various antibodies (see supplementary Table 1). Proteins were visualized with enhanced chemiluminescence using the LAS4000 imager and densitometry analysis was performed using the ImageQuant Software (GE Healthcare, Tremblay-en-France, France).

2.7. Quantification of intracellular Fe²⁺ accumulation

72 hours after transfection and/or additional 48 hours of treatment with 30 nM CTX, cells were seeded at 20,000 cells for CAL27 and CAL33 and 15,000 cells for SCC9 during 24 hours in 96-well plates with opaque walls. Intracellular accumulation of Fe²⁺ was determined using the intracellular probe FerroOrange at 1 μ mol/L during 30 minutes (Dojindo, China, ref. F374). The fluorescence intensity was measured with Varioskan LUX (Thermo Scientific) plate reader. In parallel, cells were seeded at 30,000 for CAL27 and 20,000 for CAL33 and SCC9 in 8 wells LabTek for imaging with a confocal microscope LEICA TCS SPE II confocal microscope (Leica Microsystems SA, Nanterre Cedex, France), with a x20 magnification objective, and analyzed with ImageJ software.

2.8. Detection of the accumulation of lipid peroxides

72 hours after transfection and/or additional 48 hours of treatment with 30 nM CTX, cells were seeded 24 hours at 30,000 for CAL27 and 20,000 for CAL33 and

SCC9 in 8 wells LabTek. The accumulation of lipid peroxides was determined using the Liperfluo kit at 1 μ M for 30 minutes (Dojindo, China, L248). The cells are also seeded into LabTek wells for imaging with a confocal microscope LEICA TCS SPE II (Leica Microsystems SA, Nanterre Cedex, France), with a x20 magnification objective, and analyzed with ImageJ software.

2.9. Tumoroids culture

Tumoroids were extracted from head and neck cancer surgical resection following the protocol developed by Driehus et al. (22) and cultured in advanced DMEM/F12 supplemented with GlutaMax, Penicilin/streptomycin, 10mM HEPES, 10 μ M Y-27632 (Euromedex, ref. AB-M1817), 0.5 μ g/mL Caspofungin (Sigma, ref. SML0425), 1x B27 supplement (Thermo Fisher Scientific, ref. 17504-044), 1.25 mM N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich, ref. A9165), 10 mM Nicotinamide (Sigma-Aldrich, ref. N0636), 500 nM A83-01 (Sigma-Aldrich, ref. SML0788), 0.3 μ M CHIR99021 (Sigma-Aldrich, ref. SML1046), 50 ng/mL human EGF (PeproTech, ref. AF-100-15), 10 ng/mL human FGF10 (PeproTech, ref. 100-26), 5 ng/mL human FGF2 (PeproTech, ref. 100-18B), 1 μ M Prostaglandin E2 (Bio-technie, ref. 2296) and 1 μ M Forskolin (Bio-technie, ref. 1099), 4% (col/col) RSPO3-Fc fusion protein conditioned medium (ImmunoPrecise, ref. UCR001) and 4% (col/col) Noggin-Fc fusion protein conditioned medium (ImmunoPrecise, ref. UCN002). Tumoroids were plated at 2,500 cells / 10 μ l of 70% Cultrex UltiMatrix reduced growth factor basement membrane Extract (R&D System, ref. BME001) in 24 well plates. Tumoroids are treated or not with 30 nM CTX, 5 μ M RSL3, 1 mM metformin or co-treatments 7 days after plating for additional 10 days. The cell viability is assessed after exposure of cells to trypan blue (Bio-Rad, ref. 1450021) and reading *via* TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad). Moreover, this culture is monitored by imaging with a x4 and x20 magnification *via* a Evos XI Core microscope (AMG).

2.10. Immunohistochemistry on tumoroids

Following recovery, organoids were fixed in PFA 4% for 20 min and washed in PBS. After a 15 min permeabilization step in PBS / 0.1% Tween-20 and a 60 min blocking step in PBS / 0.01% Triton X-100 / 0.02% SDS / 2% BSA, tumoroids were incubated overnight at 4°C with EREG and Cav1 antibodies (#12048; Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Cyr-L'Ecole, France, dilution 1/1000 and #66067;

ProteinTech, dilution 1/1000). After washing in PBS / 0.01% Triton X-100 / 0.02% SDS / 0.2% BSA, cells were incubated for 3 hours at room temperature with appropriate secondary antibodies (Life Technologies; dilution 1/500) and DAPI (#D9542; Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier Cedex, France; 1 µg/mL). After washing twice in PBS / 0.01% Triton X-100 / 0.02% SDS / 0.2% BSA and twice in PBS, the slides were mounted using FUnGI medium (50% [v/v] glycerol, 9.4% [v/v] H₂O, 10.6 mM Tris base, 1.1 mM EDTA, 2.5 M fructose and 2.5 M urea). Images were acquired using a LEICA TCS SPE II confocal microscope (Leica Microsystems SA, Nanterre Cedex, France), with a x20 magnification objective, and analyzed with ImageJ software (<https://imagej.nih.gov>).

3. STATISTICAL ANALYSIS

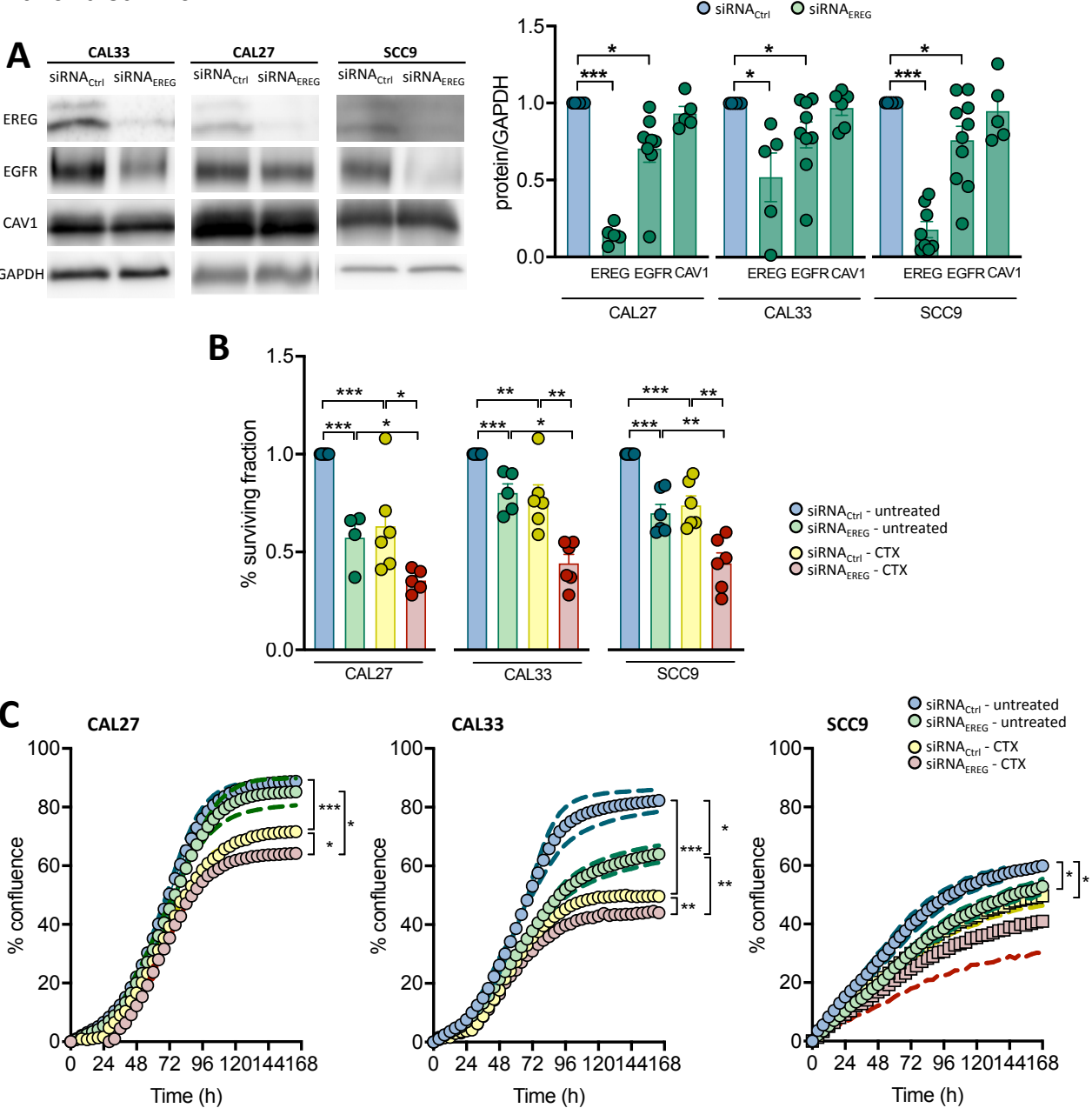
Quantitative variables are presented as their mean and standard deviations and compared to univariate analyses with a Student's t-test if following a Gaussian distribution (Shapiro–Wilk tests were used to assess the Gaussian distribution) or a Wilcoxon's rank test if non-Gaussian distribution.

4. RESULTS

4.1. Silencing EREG prevents survival and growth and sensitizes to CTX

We recently reported that decreased EREG expression conferred Cav1-overexpressing cells resistance to CTX/radiotherapy (8). We postulated that it was the result of a decrease in EREG-driven oncogenic addiction to EGFR. To go further, EREG was silenced in a panel of 3 basal-like HNSCC cell lines using siRNA. Silencing EREG does not alter Cav1 expression and exhibit significant reduction of EGFR, which is in contrast with the molecular alterations observed previously (Figure 1A). EREG-silenced cells (siRNA_{EREG}) show reduced clonogenic survival (Figure 1B). And although CTX significantly reduces the surviving of control cells (siRNA_{ctrl}) transfected cells, its effect is even more pronounced in EREG-silenced cells (Figure 1B; with 33±10% and 51±5% inhibition by CTX for siRNA_{ctrl} – CAL27 and siRNA_{EREG} – CAL27, 23±6% and 49±7% inhibition by CTX for siRNA_{ctrl} – CAL33 and siRNA_{EREG} – CAL33 and 27±5% and 45±5 inhibition by CTX for siRNA_{ctrl}-SCC9 and siRNA_{EREG} – SCC9, respectively). Reduced clonogenic survival is associated with altered growth capacity reflected here by the inability of cells to reach

confluency. Again, CTX is more prone to block growth of cells silenced for EREG (Figure 1C; with $19\pm 1\%$ and $28\pm 1\%$ inhibition by CTX for siRNA_{ctrl} – CAL27 and siRNA_{EREG} – CAL27, $39\pm 1\%$ and $46\pm 1\%$ inhibition by CTX for siRNA_{ctrl} – CAL33 and siRNA_{EREG} – CAL33 and $17\pm 3\%$ and $5\pm 2\%$ inhibition by CTX for siRNA_{ctrl} – SCC9 and siRNA_{EREG} – SCC9, respectively). Cleavage of PARP, reflecting apoptosis induction, could only barely be detected and only in cells exposed to CTX (Figure 1D). No additional cleavage could be observed in siRNA_{EREG} – transfected cells when compared to controls. Thus, apoptosis induction could not account for the reduction of survival and growth observed in siRNA_{EREG} – cells remaining untreated or treated with CTX. Taken together, these data show that concomitant silencing of EREG and EGFR targeting would be more effective in inhibiting tumor growth and survival.



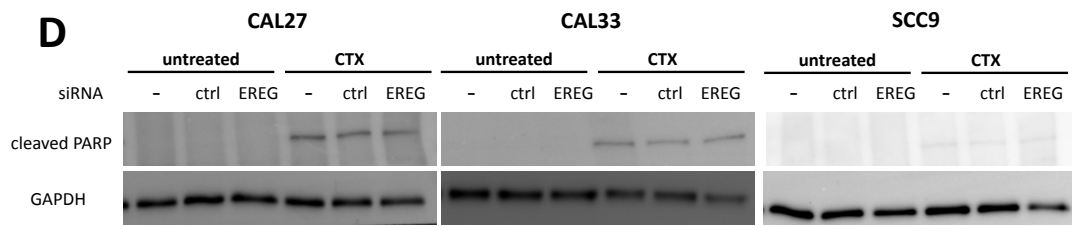


Figure 1. Silencing EREG prevents tumor growth and sensitizes to CTX

(A) Expression of EREG, EGFR, CAV1 and GAPDH was determined by western blot in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG. EREG levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27 n = 6, CAL33 n = 6 and SCC9 n = 8) ± SEM (*p < 0.05 and ***p < 0.001). EGFR levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27 and CAL33 n = 11 and SCC9 n = 13) ± SEM (*p < 0.05). Cav1 levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 6). (B) Clonogenic survival of CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG and treated with CTX (30 nM) were determined 8 days after plating. Histograms represent the surviving fraction in each condition. Data represent the mean (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 7) ± SEM (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001). (C) CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siCtrl or siEREG with or without CTX (30 nM) was determined during 168 hours (7 days). Data are represented as mean (CAL27 and CAL33 n = 4-5 and SCC9 n = 6-5) ± SEM (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001). (D) Expression of cleaved PARP and GAPDH was determined by western blot in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG with or without CTX (30 nM). Cleaved PARP levels were analyzed using GAPDH as a loading control.

4.2. Silencing EREG induces a mitochondrial dysfunction and inhibits autophagy

The metabolic reprogramming of cancer cells has a beneficial effect not only on tumor growth and survival but also on metastasis and chemoresistance. We therefore investigated how EREG might affect the mitochondrial metabolism. ATP Rate assays reveal that all three-cell lines exhibit different basal oxygen consumption (OCR), extracellular acidification (ECAR) and ATP production. CAL33 cells are the most energetic (Figure 2A - left). EREG-silencing significantly reduces OCR and ECAR (Figure 2A - left), and ATP production in all three-cell lines with a highest efficiency in the most energetic cell line: CAL33 (Figure 2A - right; with a 22±3%, 41±3% and 26±1% inhibition in siRNAEREG – CAL27, siRNAEREG – CAL33 and siRNAEREG – SCC9, respectively). Although CTX significantly reduces the production of ATP of both siRNActrl and siRNAEREG – transfected cells, SCC9 seem less sensitive to it (Figure 2A - right). EREG-silenced cells treated with CTX appear less metabolically active. Thus, silencing EREG and blocking EGFR with CTX cause mitochondria dysfunction, which is more important in highly metabolic cells. Autophagy is a critical protective mechanism against mitochondrial dysfunction. It maintains cellular homeostasis by removing damaged macromolecules and

organelles, including mitochondria. Expression of ULK-1, a kinase regulating early stages of the autophagosome formation, is only induced in cells exposed to CTX and no differences are observed between siRNA_{ctrl} and siRNA_{EREG} – transfected cells. In contrast, silencing EREG reduces the expression of beclin-1 and LC3B in CAL33 and SCC9 without affecting CAL27 cells (Figure 2B). Although CTX does not affect beclin-1 and LC3B by itself in any cell line tested, it reduces their expression even further in siRNA_{EREG}-transfected CAL33 and SCC9 cells without affecting CAL27 cells (Figure 2B). The data show that silencing both EREG and the EGFR signaling inhibit autophagy.

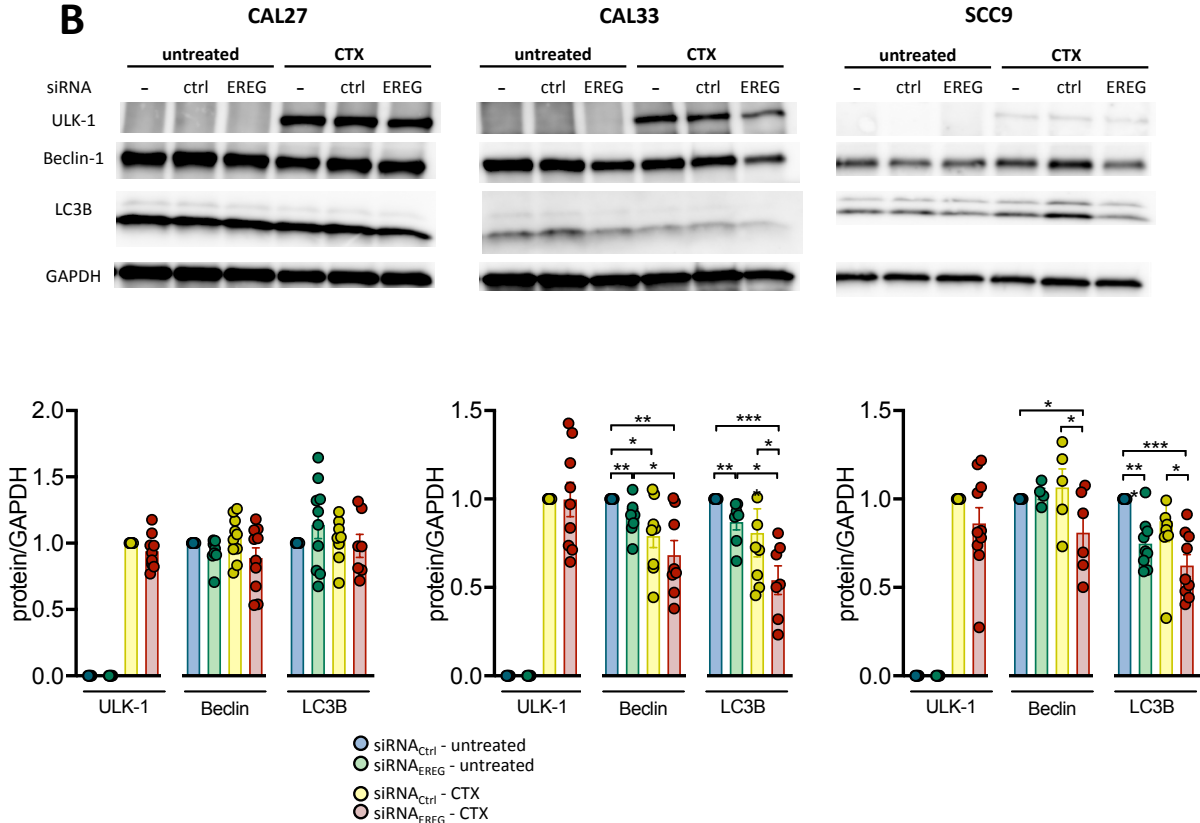
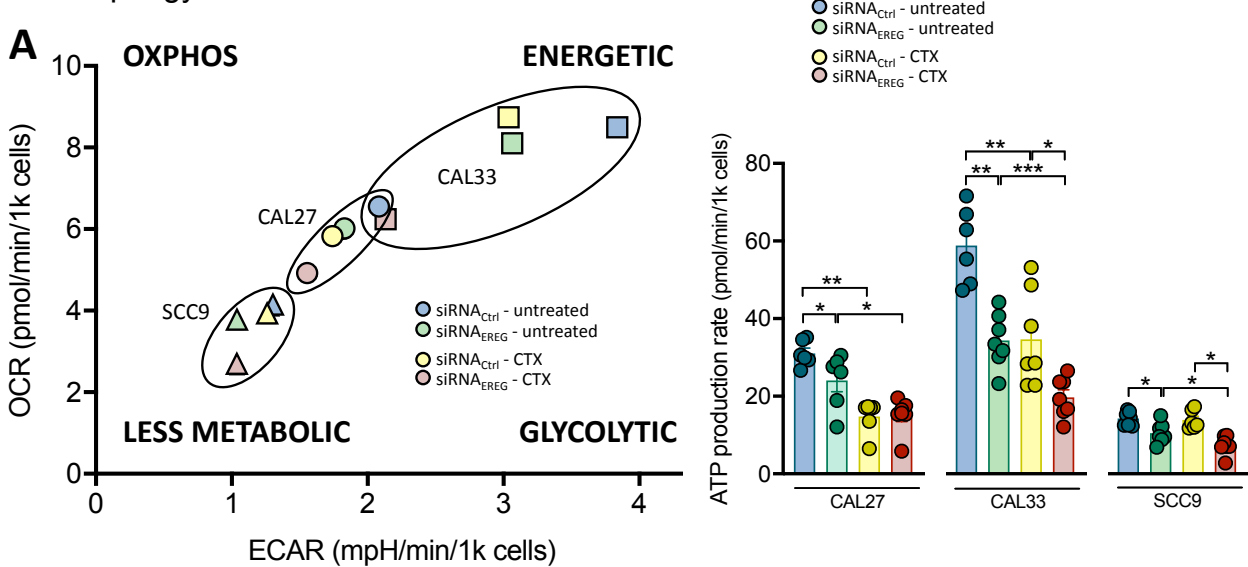
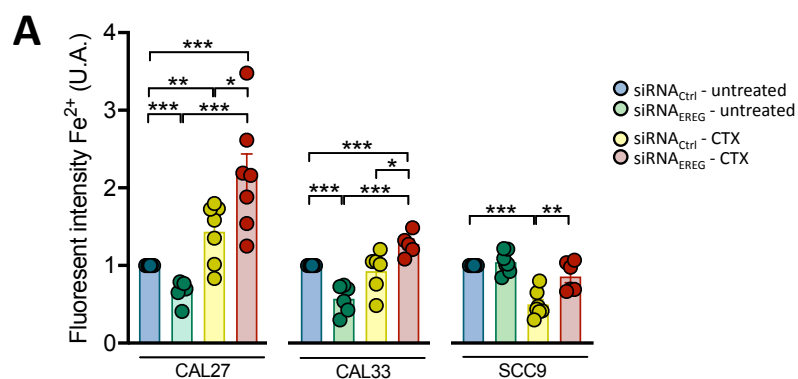


Figure 2. Silencing EREG induces a mitochondrial dysfunction and inhibits autophagy
(A) Energetic map of the three HNSCC cell lines CAL27, CAL33 and SCC9 transfected with siEREG or not and treated or not with CTX (30 nM). The ATP production in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNA_{Ctrl} and siRNA_{EREG} was determined 144 hours after transfection with or without treatment with CTX (30 nM). Data are represented as the mean (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 8– 9) ± SEM (*p < 0.05, **p < 0,001 and ***p < 0.0001). **(B)** Expression of ULK-1, Beclin-1, LC3B and GAPDH was determined by western blot in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNA_{Ctrl} and siRNA_{EREG} with or without CTX (30 nM). ULK-1, Beclin-1 and LC3B levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27 n = 11, CAL33 n = 9 and SCC9 n = 10) ± SEM (*p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001).

4.3. Silencing EREG promotes ferroptosis in response to CTX

We next focused on ferroptosis, an other programmed cell death, characterized by the accumulation of iron ions (Fe²⁺) and the increase in the production of lipid reactive oxygen species. The accumulation of Fe²⁺ was monitored using the FerroOrange probe. Silencing EREG significantly reduces Fe²⁺ staining in CAL27 and CAL33 cells (Figure 3A; with a 33±5%, 43±7% and 0±5% inhibition in siRNA_{EREG}-CAL27, siRNA_{EREG} – CAL33 and siRNA_{EREG} – SCC9, respectively). Although CTX does not affect Fe²⁺ accumulation in siRNA_{Ctrl} – cells, it significantly induces Fe²⁺ staining in siRNA_{EREG} – transfected CAL27 and CAL33 without affecting SCC9 (Figure 3A). Lipid peroxides were monitored using the LiperFluo probe and revealed similar staining profiles than the ones observed in Figure 3A. Thus, silencing EREG reduces lipid peroxides accumulation in CAL27 and CAL33 cells (Figure 3B). Turning to CTX, it significantly induces the accumulation of Fe²⁺ in siRNA_{EREG} – transfected CAL27 and CAL33 without affecting siRNA_{Ctrl} – cells and SCC9 cells (Figure 3A). Altogether, EREG-silencing prevents autophagic cell death while reprogramming cells to induce ferroptosis in the presence of CTX.



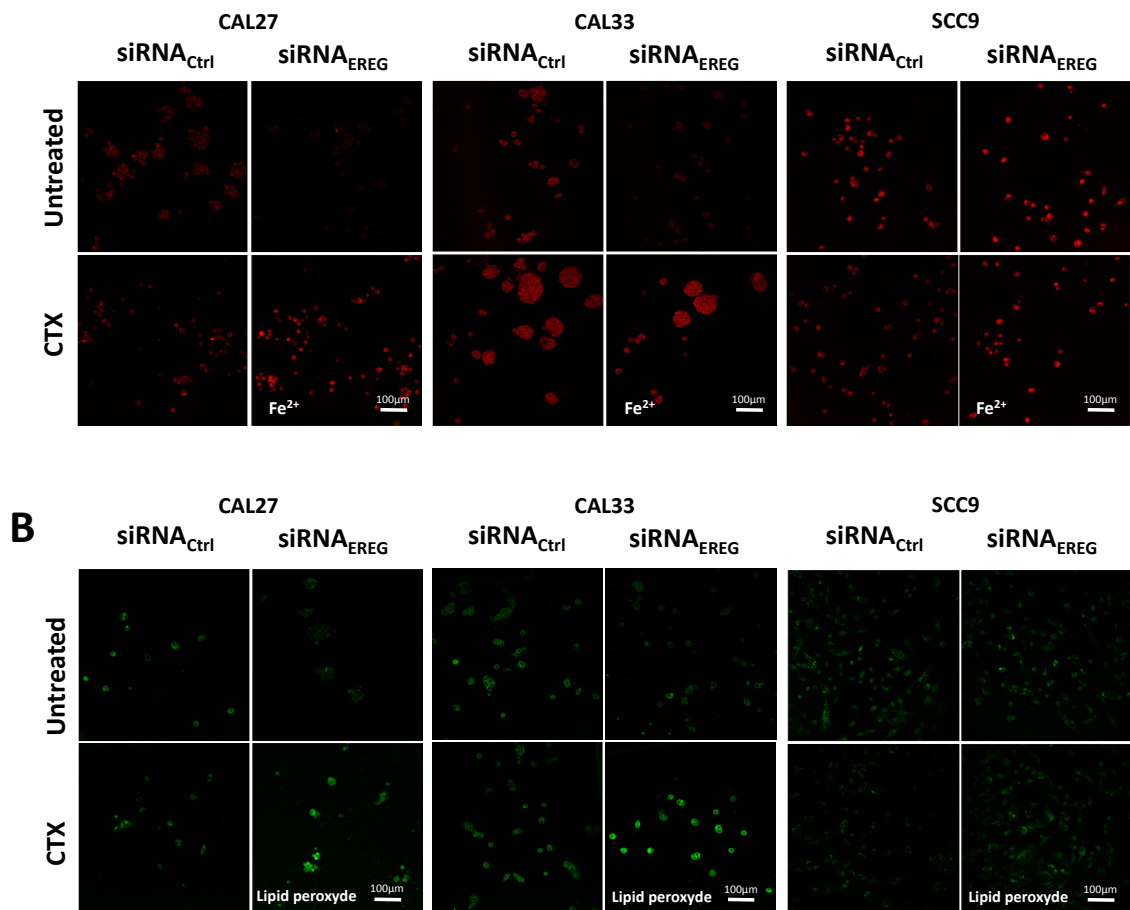


Figure 3. Silencing EREG promotes ferroptosis in response to CTX

(A) Intracellular Fe²⁺ detection with the FerroOrange probe, Dojindo. The fluorescence intensity is measured by a Varioskan (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 4) ± SEM (*p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001). Red fluorescence detection of intracellular Fe²⁺ by confocal microscopy in HNSCC cell lines siRNA_{Ctrl} and siRNA_{EREG} with or without CTX (30nM) (scale bar: 100 μm). (B) Lipid peroxide detection with the Liperflu probe, Dojindo. Green fluorescence detection of lipid peroxide by confocal microscopy in HNSCC cell lines siRNA_{Ctrl} and siRNA_{EREG} with or without CTX (30nM) (scale bar: 100 μm).

4.4. EREG silencing uncovers the vulnerability of cells to GPX4 inhibition

It has been shown that ferroptosis is initiated either by the loss of glutathione peroxidase 4 (GPX4, an enzyme involved in lipid repair) or the depletion of cysteine. GPX4 together with its co-factor glutathione (GSH) catalyzes the inhibition of lipid peroxides. Its loss is concomitant with the accumulation of peroxides in membranes that leads to the aggregation of destructive lipid ROS and ultimately to ferroptosis. Silencing EREG does not affect GPX4 expression in any of the cell lines tested. Exposure of the cells to CTX does not affect it either (Figure 4A). But treatment of siRNA_{EREG} cells with CTX results in a significant inhibition of GPX4 expression in

all three-cell lines (Figure 4A; with a $24\pm 9\%$, $42\pm 6\%$ and $26\pm 5\%$ inhibition in siRNAEREG – CAL27, siRNAEREG – CAL33 and siRNAEREG – SCC9, respectively). The cystine/glutamate antiporter system also called x-c or xCT (coded by the genes SLC7A11 and SLC3A2) imports extracellular cystine that will be further reduced into cysteine. Cysteine acts as a precursor for the synthesis of GSH, the cofactor of GPX4. GPX4 is also a direct transcriptional target of NRF2. SLC7A11 (as well as SLC1A5 and SLC7A5) and NRF2 being under the control of the oncogene c-Myc (23), we investigated how EREG and/or CTX might affect c-Myc expression in our system. C-Myc was neither affected by the silencing of EREG or by the treatment with CTX in any of the cell lines tested (Figure 4B). But treatment of siRNAEREG cells with CTX results in significant inhibition of c-Myc expression in all three-cell lines (Figure 4B; with a $54\pm 6\%$, $19\pm 9\%$ and $16\pm 6\%$ inhibition in siRNAEREG – CAL27, siRNAEREG – CAL33 and siRNAEREG – SCC9, respectively). Pharmacological inhibitors such as FIN56, FIN02 or RSL3 have been reported to either degrade GPX4 or inhibit its function. Metformin, already used in the treatment of diabetes, was recently described as promoting ferroptosis in different ways including by the inhibition of SLC7A11 (24, 25). Exposure to RSL3 significantly reduces the surviving fraction of both siRNActrl and siRNAEREG cells. Data obtained with RSL3 are not significantly different for those obtained with CTX alone in all three-cell lines (Figure 4C). In addition, a combination of CTX and RSL3 reduces the surviving fraction of siRNActrl-cells to similar levels as those obtained in siRNAEREG-cells treated with CTX (Figure 4C). Thus, the blockade of GPX4 might indeed be a key event to sensitize cells to CTX. Exposure of siRNAEREG – cells lead to an even further reduction of cell survival (Figure 4C). Metformin by itself inhibits siRNActrl and siRNAEREG – transfected CAL27 and SCC9 survival in any condition tested with siRNAEREG – transfected cells remaining the most sensitive (Figure 4D). Beside causing further reduction of siRNActrl and siRNAEREG – transfected CAL27 and SCC9 survival, the combination of CTX and metformin significantly reduced the surviving fraction of siRNAEREG – transfected CAL33 (Figure 4D). Altogether, data points toward GPX4 inhibition to sensitize HNSCC to CTX (Figure 4E).

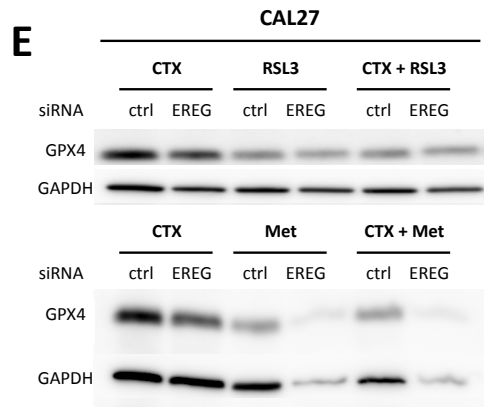
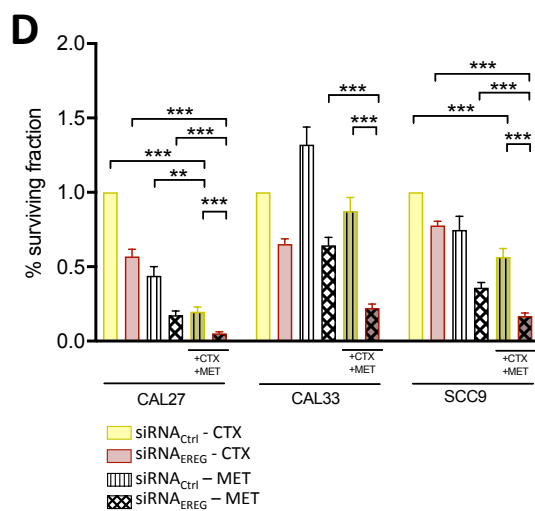
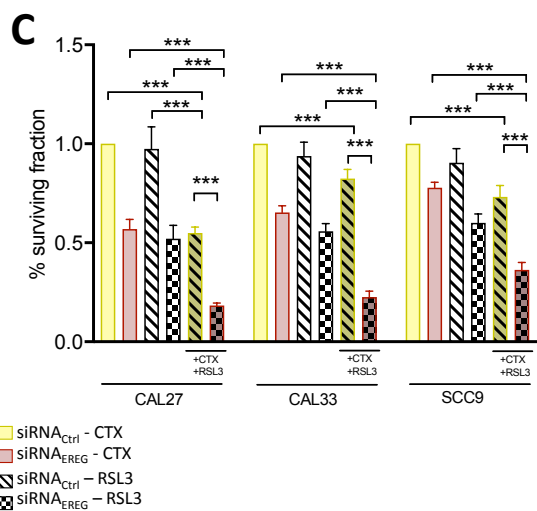
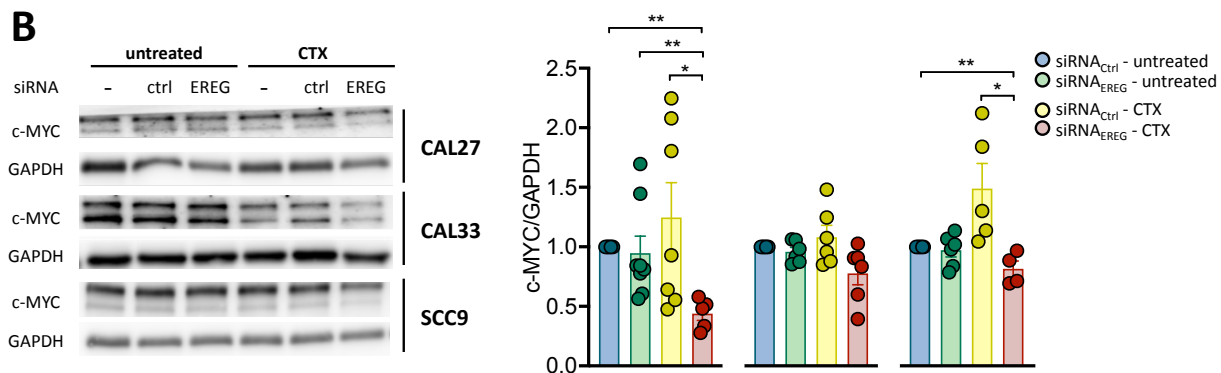
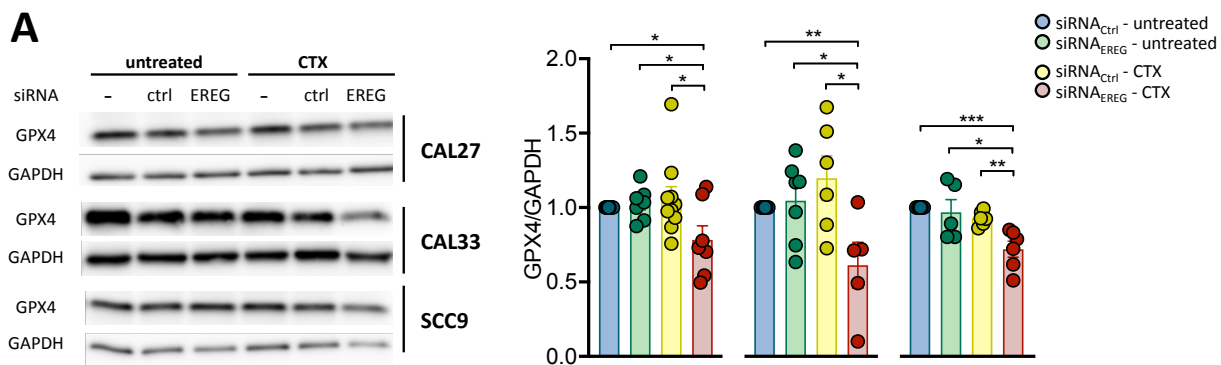
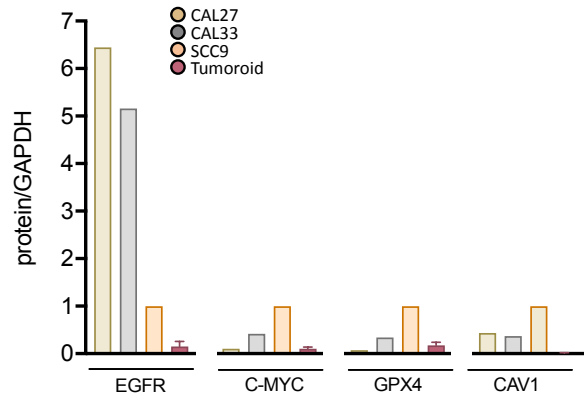
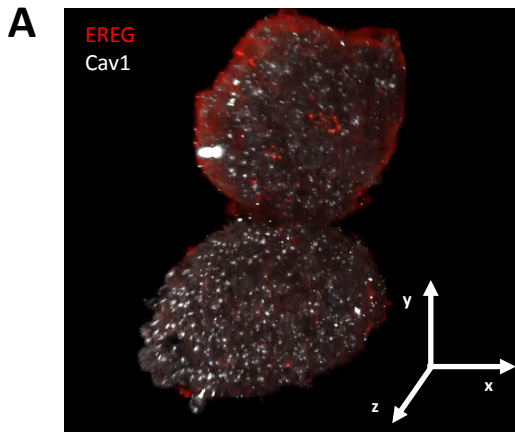


Figure 4. EREG silencing uncovers the vulnerability of cells to xCT and GPX4 inhibition

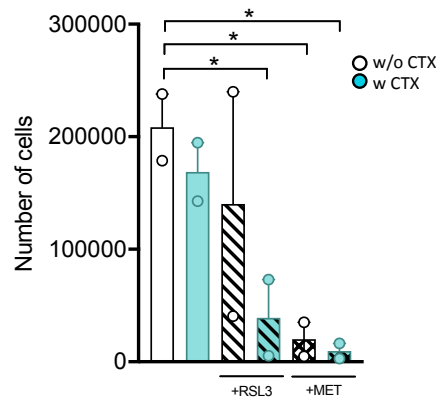
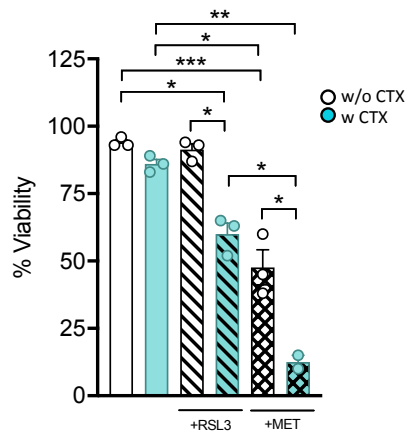
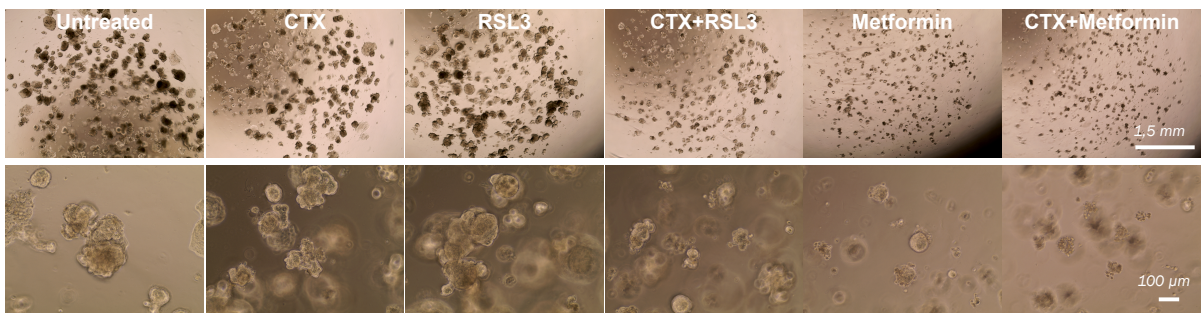
(A) Expression of GPX4 and GAPDH was determined by western blot in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG with or without CTX (30 nM). GPX4 levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27 n = 10, CAL33 and SCC9 n = 8) \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001). (B) Expression of c-MYC and GAPDH was determined by western blot in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG with or without CTX (30 nM). C-MYC levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27 and CAL33 n = 8 and SCC9 n = 7) \pm SEM (*p < 0.05 and **p < 0.001). (C) Clonogenic survival of CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG and treated with CTX (30 nM) with or without RSL3 (5 μ M) were determined 8 days after plating. Histograms represent the surviving fraction in each condition. Data are represented as the mean (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 4) \pm SEM (***p < 0.0001). (D) Clonogenic survival of CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siRNACtrl and siRNAEREG and treated with CTX (30 nM) with or without metformin (1mM) were determined 8 days after plating. Histograms represent the surviving fraction in each condition. Data are represented as the mean (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 4) \pm SEM (**p < 0.0001*** and p < 0.0001). (E) Expression of GPX4 and GAPDH was determined by western blot in CAL27 cells transfected with siRNAEREG with or without CTX (30 nM) with or without metformin (1 mM). GPX4 levels were analysed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27 n = 4) \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001).

4.5. GPX4 inhibition sensitize patient-derived tumoroid to CTX

In order to validate our hypothesis, we exposed patient-derived tumoroid expressing levels of EGFR, c-Myc and GPX4 close to CAL27 (Figure 5A - right) to CTX, RSL3, metformin and a combination of drugs for 10 days. Noteworthy, EREG is heterogeneously expressed in tumoroid and restricted in Cav1-negative cells as reported in our previous publication (Figure 5A - left). Tumoroids are treated 7 days after plating in 3D drops of basement membrane extract to allow formation. CTX and RSL3 alone only mildly affect the number and the viability of cells (Figure 5B). In contrast, the combination of CTX and RSL3 reduces tumoroid viability to 57 \pm 5% (Figure 5B). Viability of tumoroid is significantly reduced by metformin alone (41 \pm 3%) and even further when metformin is combined with CTX (12 \pm 2%). In these conditions (CTX+Metformin), only "grape cluster" shapes can be observed at higher magnification reflecting high cell death (Figure 5B). Finally, exposure of tumoroids to CTX does not affect GPX4 expression (Figure 5C). GPX4 is significantly reduced by RSL3 alone (30 \pm 10%) and even further when RSL3 is combined with CTX (80 \pm 9%). It is also significantly reduced by metformin alone (76 \pm 14%) and totally lost when metformin is combined with CTX (Figure 5C). Altogether, data confirm that efficacy of targeting xCT and GPX4 in CTX-resistant tumors.



B



C

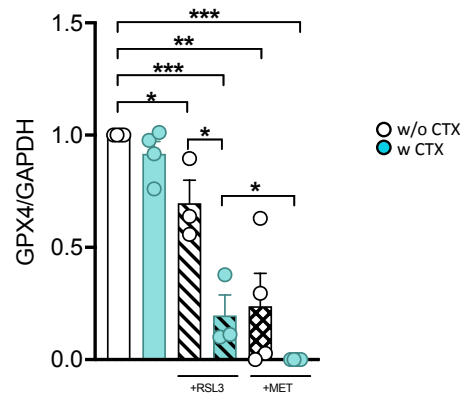
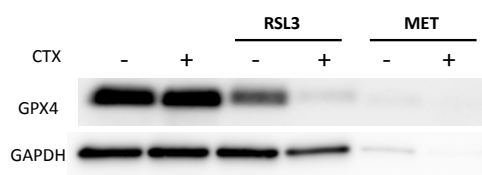


Figure 5. GPX4 inhibition sensitize patient-derived tumoroid to CTX

(A) Confocal image of human HNSCC tumoroids labeled with EREG (red) and Cav1 (grey) and cleared with FUnGI (x20 air objective). Scale bar = 50 μ m. Expression of EGFR, c-Myc, GPX4, CAV1 and GAPDH was determined by western blot in CAL27, CAL33 and SCC9 cells transfected with siEREG with or without CTX (30 nM) and with or without RSL3 (5 μ M) and with or without metformin (1 mM). GPX4 levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (CAL27, CAL33 and SCC9 n = 4) \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001 and ****p < 0.00001) (B) Pictures taken 10 days after treatment or co-treatment of tumoroids with CTX (30 nM) and with or without RSL3 (5 μ M) and with or without metformin (1 mM) in a 3D matrix. Pictures were taken using the Evos XI Core microscope (AMG, Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) with x4 and x20 magnification. Percentage of viability and number of cells in tumoroids with or without CTX (30 nM) and with or without RSL3 (5 μ M) and with or without metformin (1 mM) after 10 days of culture was determined. Each bar represents the mean (n = 3) \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001). (C) Expression of GPX4 and GAPDH was determined by western blot in tumoroids with or without CTX (30 nM) and with or without RSL3 (5 μ M) and with or without metformin (1 mM). GPX4 levels were analyzed using GAPDH as a loading control. Each bar represents the mean (n = 4) \pm SEM (*p < 0.05, **p < 0.001 and ***p < 0.0001).

5. DISCUSSION

Dysregulation of EREG may contribute to the progression of various cancers including HNSCC and may be a putative mechanism of resistance to EGFR targeted therapies. EREG is usually overexpressed in HNSCC and correlates with short overall survival and progression-free survival (11, 15, 18-20). EREG conducts an even more potent mitogenic signal than EGF in HNSCC mimicking EGFR oncogenic mutations (11, 20). Job et al. recently described a subgroup of HPV-negative HNSCC named “basal” sharing molecular similarities such as the upregulation of genes involved in the EGFR signaling pathway including EREG and AREG (21). Cells sharing these characteristics appear to be more sensitive to EGFR-targeted therapy with CTX being the least efficient. Because suppression of EREG expression reduces cell survival, the authors suggested that cells may be addicted to an EREG feedback loop and that EREG should be considered as a functional biomarker for HNSCC sensitivity to EGFR blockade (21). In line with this study, we observed that HNSCC tumor cells expressing caveolin-1 could use EREG silencing, but not AREG silencing, to overcome oncogenic dependence on EGFR and develop resistance to CTX/irradiation combination therapy (8). Resistance was due at least in part to the silencing of the HIPPO pathway leading to the activation of YAP/TAZ (8). Cross-suppression of both AREG and EREG has also been reported to lead to the emergence of CTX resistance related to the loss of cell addiction to EGFR compensated by the hyperactivation and addiction to FGFR3 in melanoma (26).

We show here that direct suppression of EREG expression reduces both EGFR expression and HNSCC basal cell survival. But rather than driving resistance to CTX, loss of EREG reduces survival even further. While it cannot be excluded that long-term EREG silencing may lead to the emergence of CTX resistance, acute targeting of EREG combined to CTX is effective in reducing cell survival and could be a feasible antitumor strategy for HNSCC. Fepixnebart (LY3016859, developed by Eli Lilly and Co.) is a monoclonal antibody that binds epiregulin and TGF- α that is well tolerated and efficient in neutralizing both targets (27). Currently in phase II for back and neuropathic pain and phase III for diabetic neuropathies, it would be interesting to determine its anti-tumor effect and adjuvant effect to EGFR-targeting therapies. Besides its autocrine feedback loop, EREG is also secreted by component of the tumor microenvironment such as macrophages (15) and cancer-associated fibroblasts (CAF) (28). Macrophages-derived EREG induces EGFR-TKI resistance in NSCLC and CAF-derived EREG promotes OSCC invasion and metastasis through induction of EMT. Thus targeting EREG might not only prevent therapy resistance but also HNSCC progression.

Aberrant and reprogramming metabolism represent malignant tumor hallmarks that are required for cancer cells to proliferate and progress. The metabolism of cancer cells is mainly based on nonoxidative glycolysis followed by the fermentation of lactic acid to produce ATP; phenomenon known as the Warburg effect. EREG/EGFR signaling enhance glycolysis by increasing glucose consumption, lactate production, extracellular acidification (ECAR), intracellular levels of ATP as well as by activating several glycolytic genes (29, 30). But HNSCC also depend on glutamine for producing energy (31), which is imported in cells by the Na⁺-glutamine/Na⁺-cysteine exchanger ASCT2. Besides serving as a source of carbon and nitrogen for macromolecule synthesis, glutamine provide α -ketoglutarate for the tricarboxylic acid (TCA) cycle and contribute to the production of the most powerful antioxidant, glutathione (GSH) (for review, see (23)). Production of GSH also requires cysteine that is imported into cells through the x-c or xCT cystine/glutamate antiporter. GSH serves as a cofactor of the glutathione peroxidase 4 (GPX4) to suppresses destructive lipid reactive oxygen species (ROS). This pathway plays a key role in the regulation of ferroptosis which is a regulated cell death triggered by an iron-dependent lipid peroxidation (32). Both GPX4 and x-c antiporter are crucial regulators of ferroptosis. Here we show that silencing EREG as well as blocking

EGFR lead indeed to mitochondrial defects characterized by a reduction of ATP production, oxygen consumption (OCR) and ECAR. Combining EREG silencing with EGFR blockade shift cells from an energetic state toward a less metabolic phenotype. If the dysfunction of the mitochondria could affect cell survival through energetic stress, death could neither be attributed to apoptosis which was undetectable or to autophagy which was inhibited. Mitochondria play a major role in regulating oxidative metabolism, they are the main source of reactive oxygen species (ROS) and are the primary site of Fe²⁺ iron storage and utilization. Therefore, the dysregulation of mitochondria induced by the silencing of EREG and the inhibition of EGFR might alter the iron metabolism and generate a redox imbalance strong enough to trigger ferroptosis. Here, we show that the silencing of EREG combined with the blockade of EGFR lead to the accumulation of Fe²⁺ and lipid peroxides associated to the downregulation of GPX4. No ferroptosis could be achieved by the loss of EREG alone or by the treatment with CTX. In accordance, although CTX downregulates ASCT2 *via* a CTX-dependent EGFR endocytosis, it does not alter survival by itself. But it decreases the intracellular uptake of glutamine and the levels of GSH which sensitizes HNSCC to ROS-induced death (33, 34). In colorectal cancer cells, CTX neither affected proliferation or survival by itself even though it inhibited NRF2 signaling (known to promote GPX4 and HO-1 transcription). By targeting NRF2/HO-1, CTX enhances RSL-3 induced ferroptosis (35). Further studies will be needed to determine if those molecular targets are also altered by the loss of EREG. However, we did show the inhibition of c-Myc and GPX4 expression in EREG-silenced cells treated by CTX. We previously reported that the oncogene c-Myc, a known target of EREG/EGFR, is downregulated by CTX and in EREG-/caveolin-1-expressing cells (8, 11). As c-Myc regulates ASCT2, LAT1, x-c antiporter as well as NRF2 (23, 36), it deserves further investigations.

Inducing ferroptosis seems an attractive potential anti-cancer strategy with broad clinical implications. Several preclinical studies show that ferroptosis inducers can synergize with traditional chemotherapeutics (35, 37, 38). They target either the depletion of the cellular antioxidant GSH through the x-c antiporter (Erastin) or directly GPX4 (RSL3). Here, the loss of GPX4 is associated with the induction of ferroptosis in EREG-silenced cells exposed to CTX. Inhibiting GPX4 using RSL3 reduces the survival of control cells exposed to CTX to levels equivalent to those observed in EREG-silenced cells exposed to CTX. But RSL3 also sensitizes EREG-

silenced cells to CTX to an even greater extent. The maximum decrease in cell viability correspond to a steep decrease of GPX4. Data uncover the value of targeting GPX4 to effectively sensitize tumor cells to CTX. In accordance, overexpression of GPX4 was described in EGFR-TKI-resistant lung adenocarcinoma and colorectal cancers. RSL3 restores their sensitivity to EGFR-TKI (35, 38). Similar results could be obtained using metformin widely used for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). Its use in T2DM has been associated with cancer incidence and mortality decrease, including in HNSCC (for review (39-42)). This effect seems to be due to the reduction of circulating insulin since both the insulin-IGF system and hyperglycemia have been associated with cancer risk. But metformin has also direct anti-tumor effect *via* the induction of energetic stress. It inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I leading to mitochondrial dysfunctions, changes in the levels of ROS and the iron homeostasis (for review, (43)). Acting independently of GPX4, metformin also downregulates SLC7A11 (the catalytic unit of the x-c cytine/glutamate antiporter) protein stability and expression by inhibiting UFM1 expression and subsequent UFMylation of SLC7A11 (25). Metformin increases intracellular total ROS and lipid ROS levels, reduces intracellular GSH which ultimately lead to ferroptosis (25). Metformin was also recently reported to induce ferroptosis in breast cancer by inhibiting autophagy (44). In our hands, metformin was more effective in reducing cell survival than RSL3, which is probably due to its multiple targets. Its co-administration with CTX in control cells demonstrated an adjuvant effect of metformin that is even more pronounced in EREG-silenced cells. Again, the maximum decrease in cell viability correspond to a steep decrease of GPX4. Although targeting of the x-c antiporter or GPX4 sensitizes control cells to CTX treatment, the most striking effects are seen in cells where EREG is lost. As a proof of concept, patient-derived HNSCC tumoroids showing resistance to CTX were co-treated with RSL3 or metformin. Tumoroids survival was drastically decreased with RSL3-CTX co-treatment and was almost completely abrogated in the response to metformin-CTX. The maximum diminution of cell viability is associated with the strongest reduction of GPX4 levels.

To our knowledge, this is the first study reporting that a loss of EREG might sensitize HNSCC to CTX through the induction of GPX4-dependent ferroptosis. To date, only high expression of EREG was considered to predict the response of patient to anti-EGFR and EGFR-TKI therapies. But care should be taken since

emerging studies report that secreted EREG in the microenvironment might support therapy resistance and tumor progression (15, 28). Thus, using EREG expression levels to identify patients likely to benefit from EGFR-TKI therapies could lead to the exclusion of some of them who would be better responders. Here we propose to combine ferroptosis inducers with CTX. Our data clearly show that the combination of both reduces the survival of tumors expressing EREG and that the effect is even more pronounced in tumors where EREG is lost. This is also the first study validating the efficacy of using ferroptosis inducers in combination with CTX to inhibit survival in a patient-derived tumoroid model resistant to CTX. In conclusion, loss of EREG might be considered in clinical settings as a predictive biomarker for patients that might benefit the most from the combination of ferroptosis inducers and CTX.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354(6):567-78.
3. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):21-8.
4. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.* 1995;1(11):1311-8.
5. Masuelli L, Budillon A, Marzocchella L, Mrozek MA, Vitolo D, Di Gennaro E, et al. Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/alpha-beta catenins complex and multiple ErbB receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol.* 2012;227(9):3344-53.
6. Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(9):777-92.
7. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1160-74.

8. Burgy M, Jehl A, Conrad O, Foppolo S, Bruban V, Etienne-Selloum N, et al. Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12).
9. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol*. 2004;164(5):769-79.
10. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Isobe T, Okuyama T, et al. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7495-500.
11. Liu S, Wang Y, Han Y, Xia W, Zhang L, Xu S, et al. EREG-driven oncogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma exhibits higher sensitivity to Erlotinib therapy. *Theranostics*. 2020;10(23):10589-605.
12. Komurasaki T, Toyoda H, Uchida D, Morimoto S. Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene*. 1997;15(23):2841-8.
13. Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grovdal L, et al. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*. 2009;10(8):1115-27.
14. Freed DM, Bessman NJ, Kiyatkin A, Salazar-Cavazos E, Byrne PO, Moore JO, et al. EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics. *Cell*. 2017;171(3):683-95 e18.
15. Wang Y, Jing Y, Ding L, Zhang X, Song Y, Chen S, et al. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):274.
16. Sunaga N, Kaira K. Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*. 2015;6:91-8.
17. Cheng WL, Feng PH, Lee KY, Chen KY, Sun WL, Van Hiep N, et al. The Role of EREG/EGFR Pathway in Tumor Progression. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
18. Shigeishi H, Higashikawa K, Hiraoka M, Fujimoto S, Mitani Y, Ohta K, et al. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep*. 2008;19(6):1557-64.
19. Kogashiwa Y, Inoue H, Kuba K, Araki R, Yasuda M, Nakahira M, et al. Prognostic role of epiregulin/amphiregulin expression in recurrent/metastatic head and neck cancer treated with cetuximab. *Head Neck*. 2018;40(11):2424-31.
20. Hu K, Li SL, Gan YH, Wang CY, Yu GY. Epiregulin promotes migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83 through activation of ERK and Akt. *Oral Oncol*. 2009;45(2):156-63.

21. Job S, Reynies A, Heller B, Weiss A, Guerin E, Macabre C, et al. Preferential Response of Basal-Like Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines to EGFR-Targeted Therapy Depending on EREG-Driven Oncogenic Addiction. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).
22. Driehuis E, Kretzschmar K, Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc*. 2020;15(10):3380-409.
23. Bhutia YD, Babu E, Ramachandran S, Ganapathy V. Amino Acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res*. 2015;75(9):1782-8.
24. Wu XY, Xu WW, Huan XK, Wu GN, Li G, Zhou YH, et al. Mechanisms of cancer cell killing by metformin: a review on different cell death pathways. *Mol Cell Biochem*. 2022.
25. Yang J, Zhou Y, Xie S, Wang J, Li Z, Chen L, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):206.
26. Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Queralt B, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, de Llorens R, et al. Cross-suppression of EGFR ligands amphiregulin and epiregulin and de-repression of FGFR3 signalling contribute to cetuximab resistance in wild-type KRAS tumour cells. *Br J Cancer*. 2012;106(8):1406-14.
27. Sloan-Lancaster J, Raddad E, Deeg MA, Eli M, Flynt A, Tumlin J. Evaluation of the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Efficacy After Single and Multiple Dosings of LY3016859 in Healthy Subjects and Patients With Diabetic Nephropathy. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2018;7(7):759-72.
28. Ma S, Zhang L, Ren Y, Dai W, Chen T, Luo L, et al. Epiregulin confers EGFR-TKI resistance via EGFR/ErbB2 heterodimer in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 2021;40(14):2596-609.
29. Poliakova M, Aebersold DM, Zimmer Y, Medova M. The relevance of tyrosine kinase inhibitors for global metabolic pathways in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):27.
30. He M, Jin Q, Chen C, Liu Y, Ye X, Jiang Y, et al. The miR-186-3p/EGFR axis orchestrates tamoxifen resistance and aerobic glycolysis in breast cancer cells. *Oncogene*. 2019;38(28):5551-65.
31. Zhang Z, Liu R, Shuai Y, Huang Y, Jin R, Wang X, et al. ASCT2 (SLC1A5)-dependent glutamine uptake is involved in the progression of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2020;122(1):82-93.
32. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):165-76.

33. Lu H, Li X, Lu Y, Qiu S, Fan Z. ASCT2 (SLC1A5) is an EGFR-associated protein that can be co-targeted by cetuximab to sensitize cancer cells to ROS-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2016;381(1):23-30.
34. Tao X, Lu Y, Qiu S, Wang Y, Qin J, Fan Z. AP1G1 is involved in cetuximab-mediated downregulation of ASCT2-EGFR complex and sensitization of human head and neck squamous cell carcinoma cells to ROS-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 2017;408:33-42.
35. Yang J, Mo J, Dai J, Ye C, Cen W, Zheng X, et al. Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling pathway in KRAS mutant colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2021;12(11):1079.
36. Zhou RP, Chen Y, Wei X, Yu B, Xiong ZG, Lu C, et al. Novel insights into ferroptosis: Implications for age-related diseases. *Theranostics.* 2020;10(26):11976-97.
37. Roh JL, Kim EH, Jang HJ, Park JY, Shin D. Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett.* 2016;381(1):96-103.
38. Zhang C, Wang C, Yang Z, Bai Y, Shukuya T, Poh ME, et al. Identification of GPX4 as a therapeutic target for lung adenocarcinoma after EGFR-TKI resistance. *Transl Lung Cancer Res.* 2022;11(5):786-801.
39. Vilaseca I, Fuster G, Aviles-Jurado FX. The impact of diabetes in head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;28(2):107-11.
40. Figueiredo RA, Weiderpass E, Tajara EH, Strom P, Carvalho AL, de Carvalho MB, et al. Diabetes mellitus, metformin and head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2016;61:47-54.
41. Ogunsakin A, Infield J, Zuber J, Solomon SS. Metformin Associated With Improved Outcomes in Diabetic Patients With Laryngeal and Oropharyngeal Carcinoma. *Am J Med Sci.* 2018;356(6):574-5.
42. Tsou YA, Chang WC, Lin CD, Chang RL, Tsai MH, Shih LC, et al. Metformin Increases Survival in Hypopharyngeal Cancer Patients with Diabetes Mellitus: Retrospective Cohort Study and Cell-Based Analysis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(3).
43. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(3):143-56.
44. Chen J, Qin C, Zhou Y, Chen Y, Mao M, Yang J. Metformin may induce ferroptosis by inhibiting autophagy via lncRNA H19 in breast cancer. *FEBS Open Bio.* 2022;12(1):146-53.

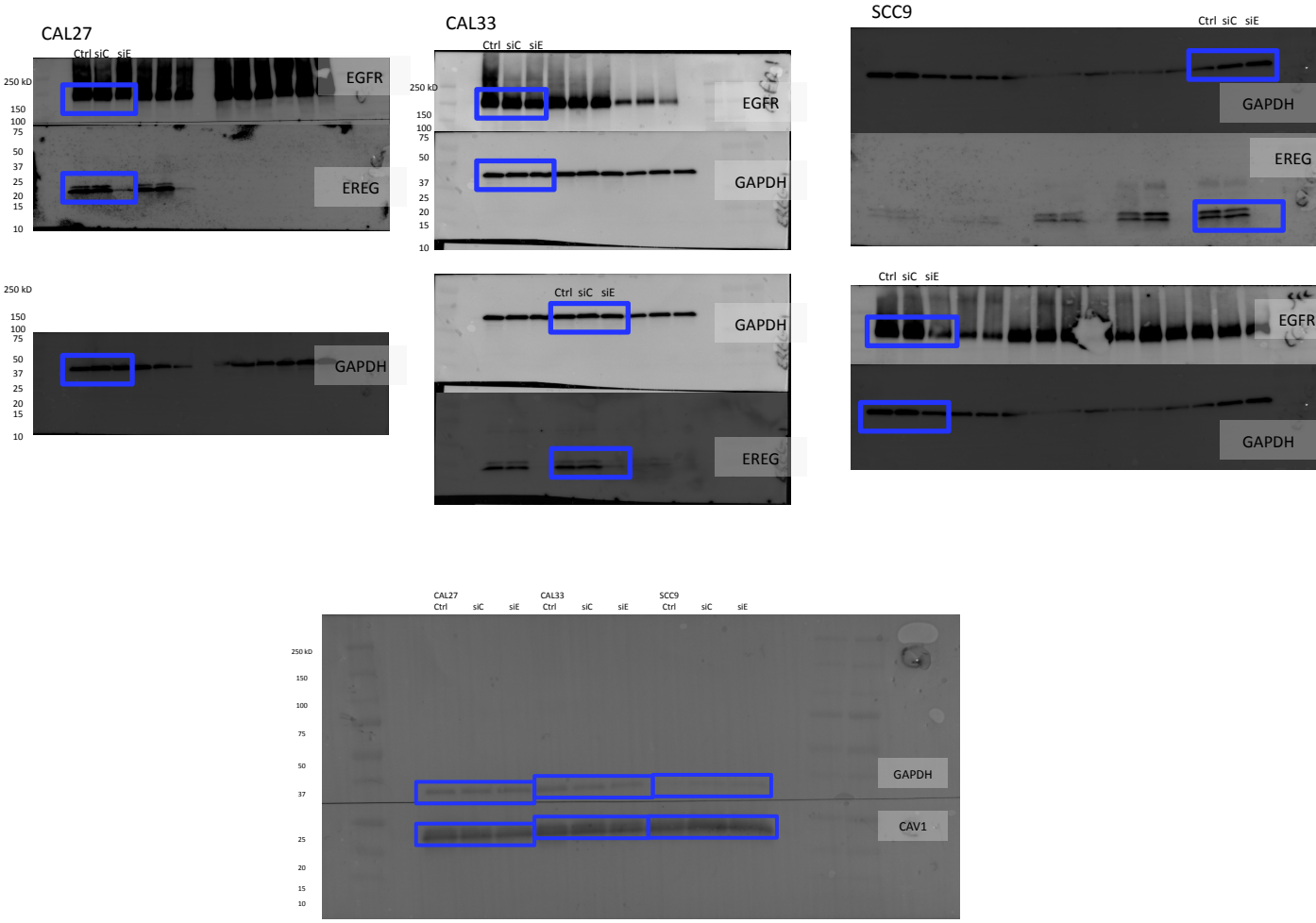
Supplementary Materials: Blocking EREG / GPX4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction

Aude Jehl, Omblin Conrad, Mickaël Burgy, Sophie Foppolo, Véronique Bruban, Romain Vauchelles, Carole Ronzani, Nelly Etienne-Selloum, Marie-Pierre Chenard, Aurélien Danic, Thomas Dourlhes, Philippe Schultz, Monique Dontenwill and Sophie Martin

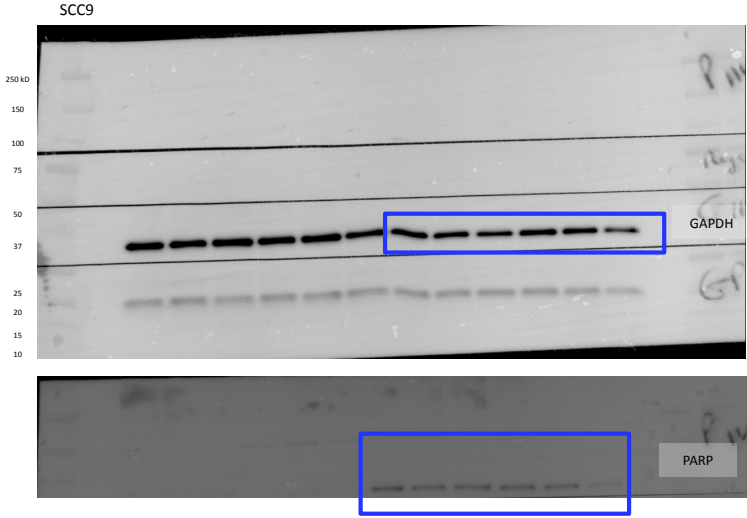
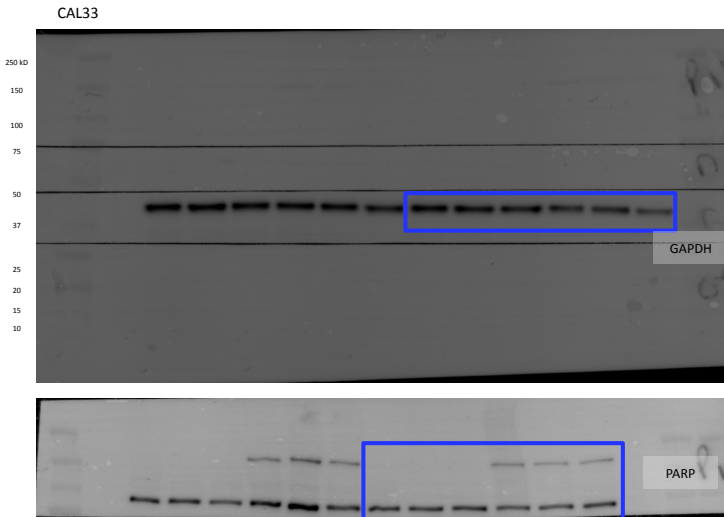
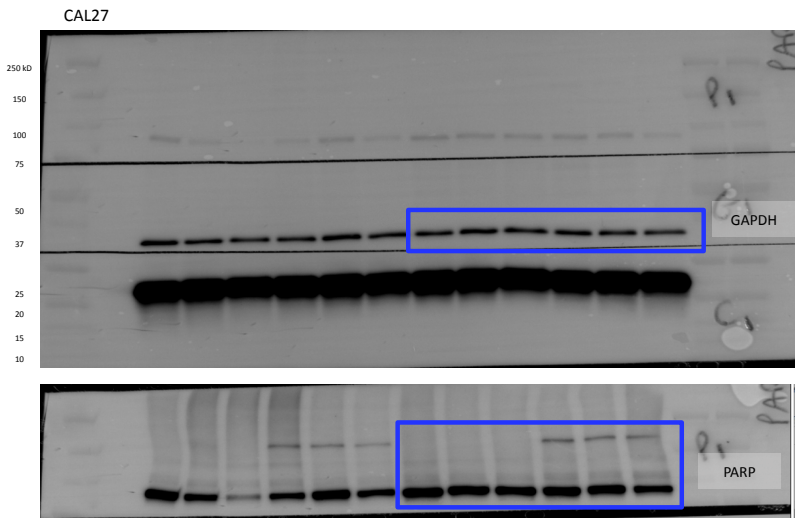
Table S1. Antibodies.

Antibody	Species	Dilution	Suppliers
Beclin-1 #3738	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology [®]
Caveolin-1 (D4663) #3267S	Rabbit	1:1000	
EREG (D4O5I) #12048	Rabbit	1:1000	
EGFR (D38B1) #4267S	Rabbit	1:1000	
LC3B (D11) #3868	Rabbit	1:1000	
Cleaved PARP (Asp214) #9541	Rabbit	1:1000	
ULK1 (D8H5) #8054	Rabbit	1:1000	
GAPDH (MAB374)	Mouse	1:10000	EMD Millipore [®]
GPX4 (EPNCIR144) #ab125066	Rabbit	1:1000	Abcam [®]
c-MYC (9E10) sc-40	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology [®]
Anti-mouse IgG HRP-conjugate	Goat	1:10000	Promega [®]
Anti-rabbit IgG HRP-conjugate			

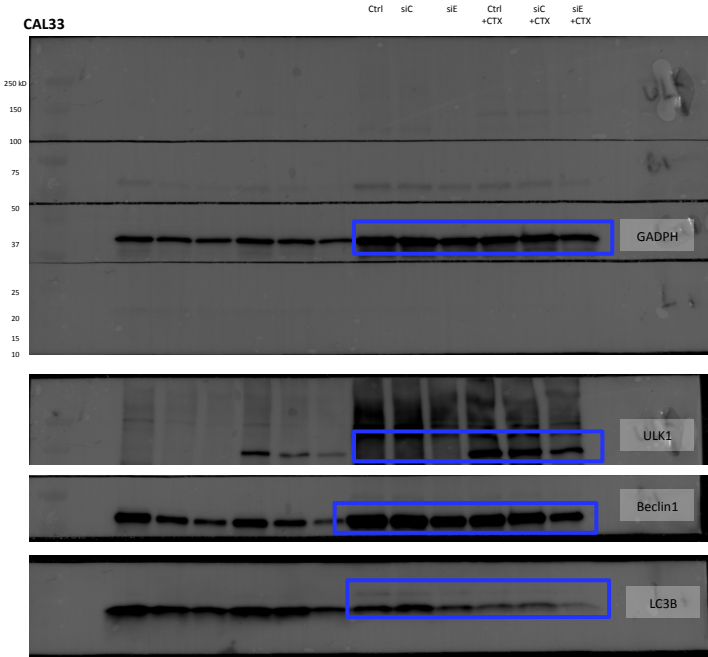
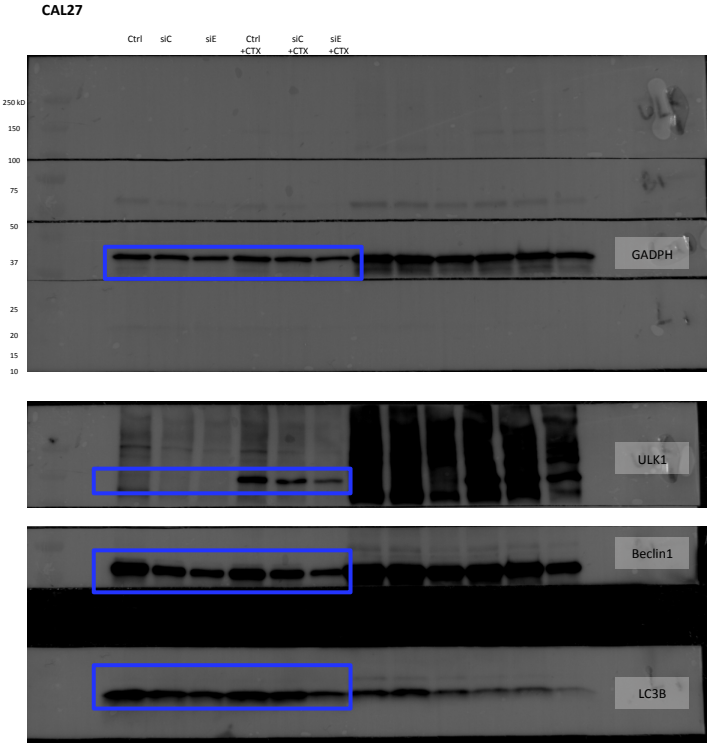
Original blot – Figure 1A

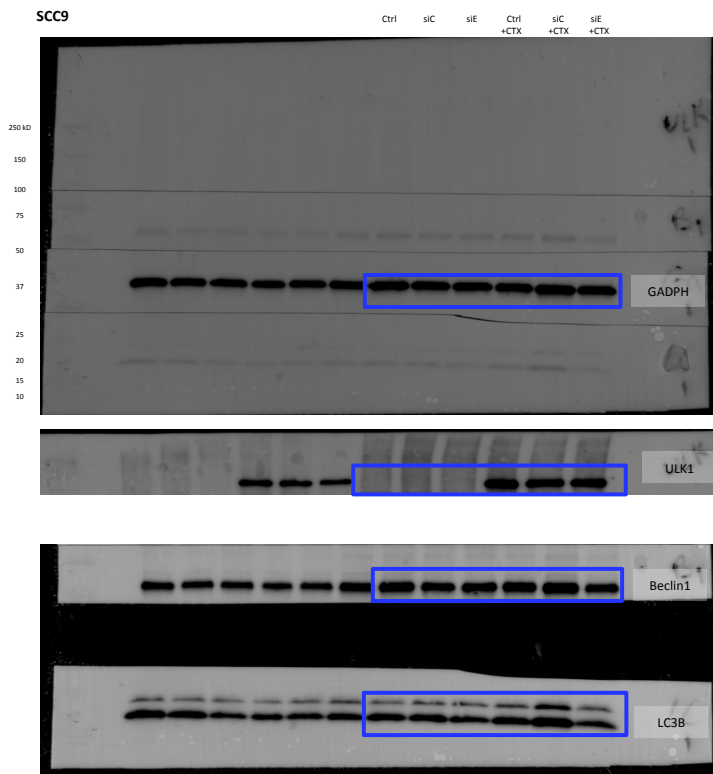


Original blot – Figure 1D

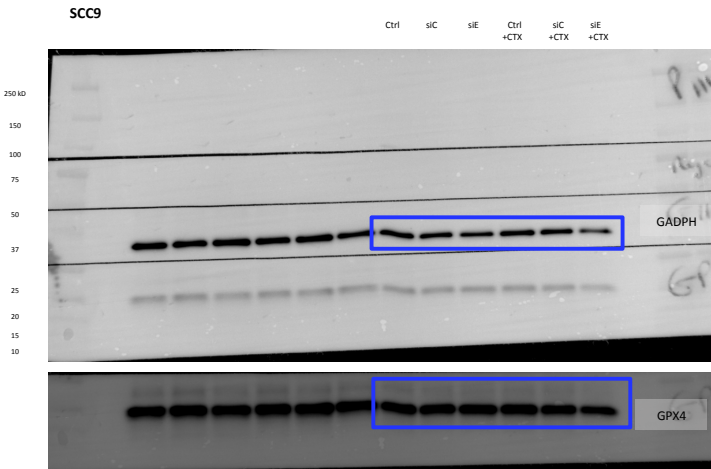
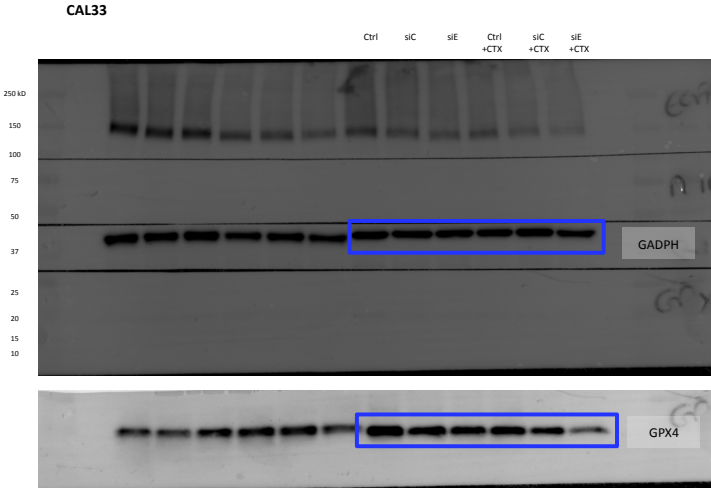
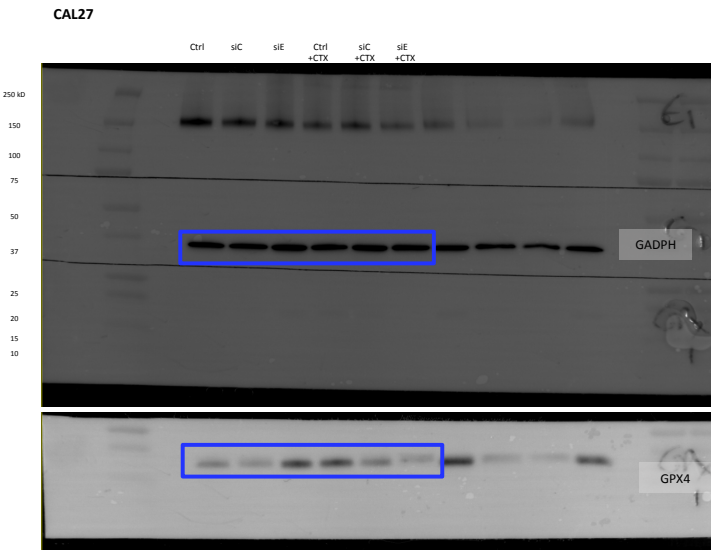


Original blot – Figure 2D

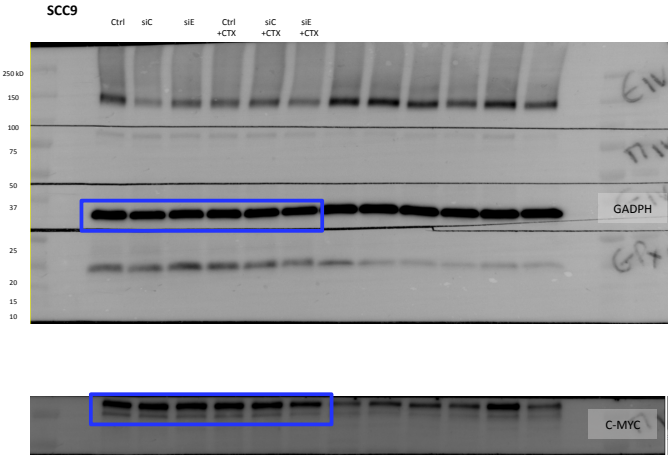
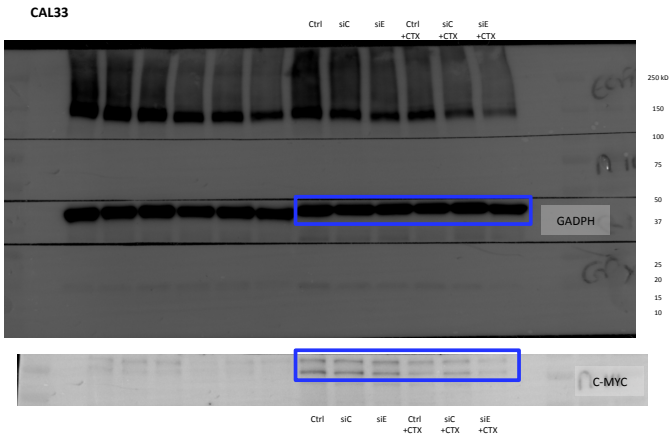
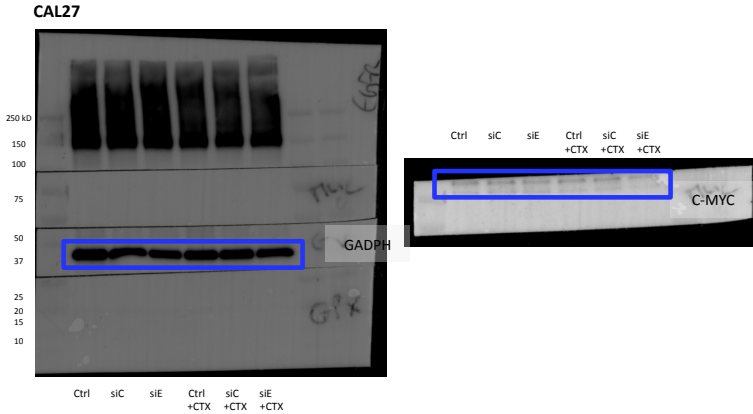




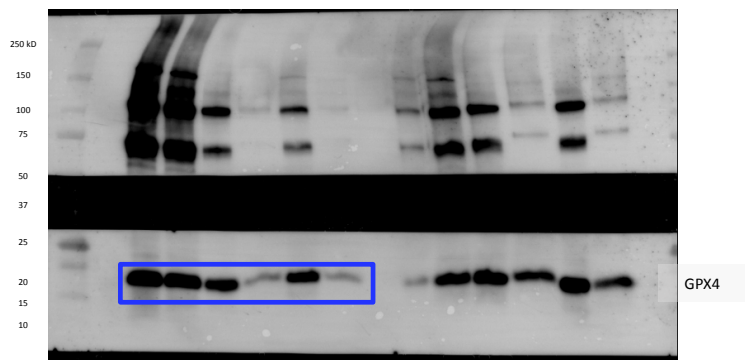
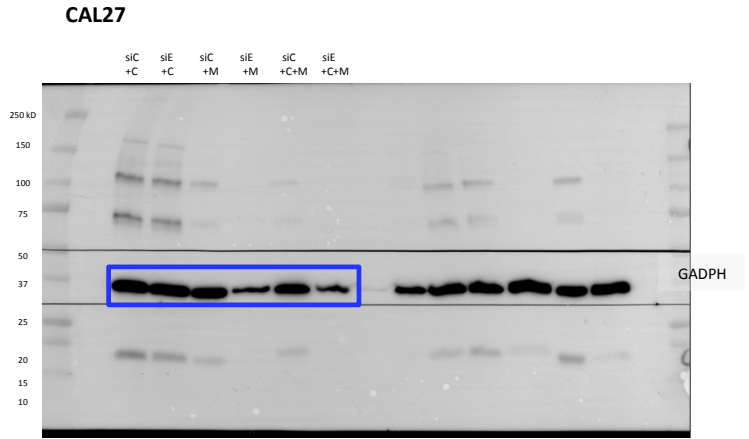
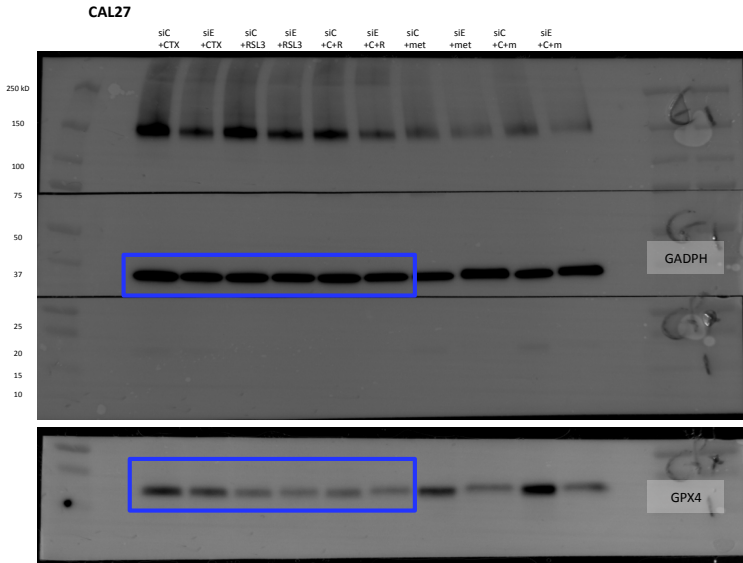
Original blot – Figure 4A



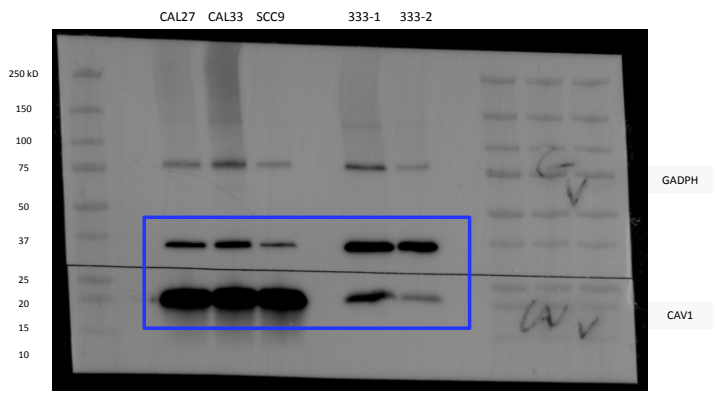
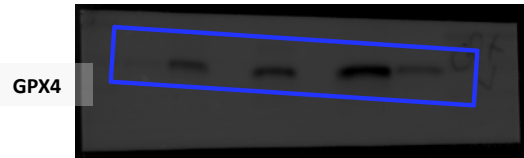
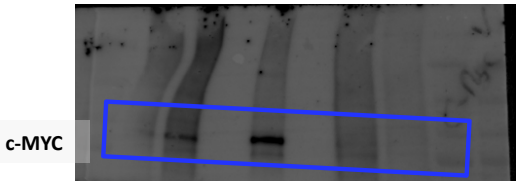
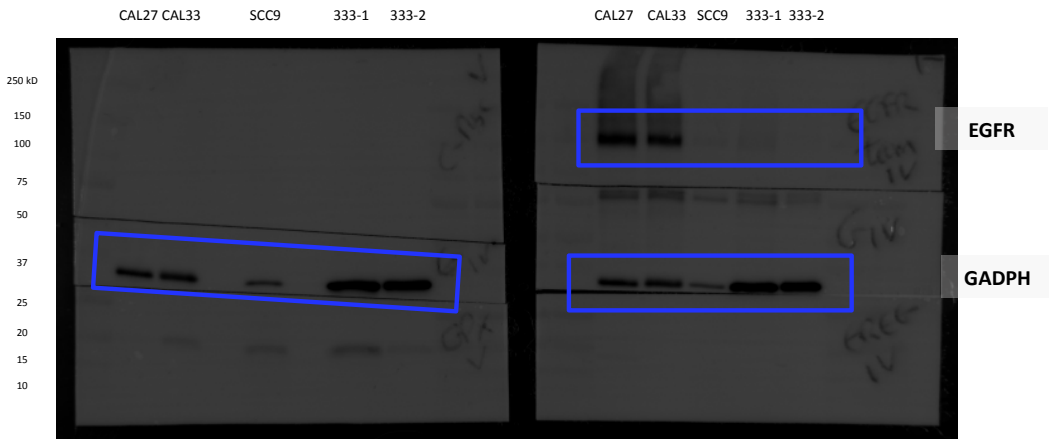
Original blot – Figure 4B



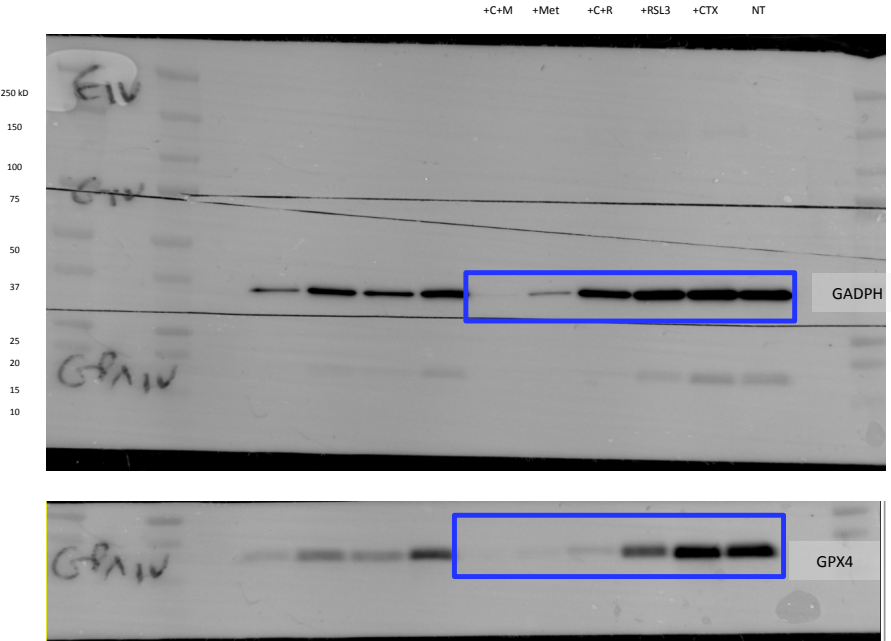
Original blot – Figure 4D



Original blot – Figure 5A



Original blot – Figure 5C



Discussion

D'après les travaux de Job *et al.* en 2015, la surexpression d'EREG dans les cancers des VADS est impliquée dans l'activation des voies de signalisation médiée par l'EGFR au sein d'une boucle oncogène d'addiction qui explique la sensibilité au cétuximab. Cette caractéristique est présente au sein du sous-type basal des cancers ORL, sous-type étudié par notre équipe. Ainsi, d'après ces travaux les auteurs proposent l'expression d'EREG comme un biomarqueur prédictif pour anticiper la réponse tumorale à un traitement anti-EGFR (Job *et al.*, 2019). Notre équipe s'est donc interrogée sur le lien entre l'expression de la Cav1 et celle d'EREG, nous avons alors pu montrer que la surexpression de la Cav1 provoque une limitation de l'expression d'EREG et qu'une résistance aux traitements (cétuximab et radiothérapie) apparaît suite à l'activation de YAP (Burgy and Jehl *et al.*, 2021).

Afin de poursuivre nos investigations quant à la résistance plus spécifique au cétuximab nous avons décidé de focaliser notre attention sur les conséquences d'expression réduite d'EREG (sans altération de l'expression de la Cav1). Dans ce cas, nous avons observé une diminution de la survie à long terme mais également une réduction de l'expression de l'EGFR, cible du cétuximab. Malgré la diminution de l'expression de l'EGFR, lorsque les cellules siEREG sont traitées, la survie clonogénique diminue davantage. Ainsi, par cette étude nous mettons d'ores et déjà en exergue l'intérêt d'un ciblage d'EREG combiné à la thérapie ciblée visant l'EGFR, à savoir le cétuximab. Au-delà de sa production au sein de la boucle oncogène d'addiction, EREG est également sécrété par les macrophages (Wang *et al.*, 2019) ce qui entraîne une résistance aux anti-EGFR (TKI) dans les cancers du poumon à petites cellules, mais aussi par les CAF (Ma *et al.*, 2021) ce qui conduit à des métastases dans les cancers des VADS par induction de l'EMT. Une action médicamenteuse sur EREG pourrait effectivement prévenir la résistance à la thérapie ciblée mais également limiter la progression tumorale dans les cancers ORL. Les processus liés à la progression tumorale sont intimement liés à la reprogrammation métabolique qui bascule alors vers l'effet Warburg afin de répondre aux besoins énergétiques des cellules cancéreuses. La signalisation faisant intervenir EREG et EGFR est décrite comme favorisant la glycolyse (Poliaková *et al.*, 2018) - (He *et al.*, 2019). De plus, les cellules tumorales de la tête et du cou puisent leur énergie à partir de la glutamine internalisée grâce au transporteur ASCT2. Cet acide aminé, en complément de la cystéine (importée par le transporteur xCT), est également impliqué dans la synthèse du GSH, effecteur du système antioxydant des cellules (Bhutia *et al.*, 2015).

En effet, le GSH correspond au cofacteur de la GPX4 qui vise à limiter l'accumulation des ROS et notamment les profils lipidiques de ceux-ci. Par cette action régulatrice des ROS lipidiques, la GPX4 ainsi que le transporteur xCT jouent un rôle central dans l'activation de la ferroptose. Par nos travaux, nous montrons que l'activité mitochondriale des cellules siEREG est altérée et ce d'autant plus lors d'un traitement par du cétuximab où les cellules sont alors moins énergétiques. Etant donné que les mitochondries sont impliquées dans la génération de ROS et correspondent au site de stockage du Fe^{2+} elles peuvent donc jouer un rôle important dans la régulation de la ferroptose. En parallèle, les autres morts cellulaires programmées que sont l'apoptose et l'autophagie ne permettent pas d'expliquer la diminution du processus de progression tumorale ni dans les cellules siEREG ni dans celles où elles ont été exposées à du cétuximab. Aussi, nos travaux mettent en lumière l'activation de la ferroptose lors d'un traitement par du cétuximab sur des cellules siEREG. En effet, la thérapie ciblée seule ne suffit pas à induire cette mort cellulaire mais permet néanmoins de réduire l'absorption intracellulaire de la glutamine suite à l'endocytose concomitante de l'ASCT2 et l'EGFR post-traitement au cétuximab. Cette action empêche donc une régulation optimale de l'accumulation des ROS et notamment des ROS lipidiques en raison d'une altération des niveaux de GSH (Lu et al., 2016) - (Tao et al., 2017). En parallèle, nous avons déterminé les niveaux d'expression de c-Myc et de la GPX4 qui sont tous deux diminués au sein des cellules siEREG traitées par du cétuximab. Notre attention s'est portée sur c-Myc étant donné que celui-ci est régulé à la baisse par le cétuximab dans les cellules surexprimant la Cav1 et donc où l'expression d'EREG est restreinte (Burgy and Jehl et al., 2021), mais également en raison de son lien avec l'ASCT2 et le transporteur xCT qu'il régule (Bhutia et al., 2015) - (Zhou et al., 2020). D'après nos résultats, l'induction de la ferroptose à visée anticancéreuse paraît particulièrement intéressante d'autant que plusieurs études précliniques démontrent une action conjointe et bénéfique des inducteurs de la ferroptose et des traitements anti-tumoraux, dont le cétuximab (Jiawen Yang et al., 2021) - (Roh et al., 2016) - (Zhang et al., 2022). Nous avons donc tout d'abord décidé d'évaluer l'intérêt de l'administration de la molécule de RSL3 qui cible directement la GPX4 et inhibe donc son action sur les cellules siEREG. Ainsi, la molécule de RSL3 entraîne une diminution de la survie cellulaire et de manière encore plus importante lors d'un co-traitement l'associant au cétuximab. Ces résultats sont corrélés avec une réduction drastique des niveaux d'expression de la GPX4.

En parallèle, d'après la littérature, une surexpression de la GPX4 est décrite dans les adénocarcinomes pulmonaires (Zhang et al., 2022) et dans les cancers colorectaux (Jiawen Yang et al., 2021) résistants aux anti-EGFR et une exposition à la molécule de RSL3 rétablit leur sensibilité. Ainsi, l'administration concomitante du cétuximab et de la molécule de RSL3 semble pertinente à visée anti-tumorale. En complément de ces résultats, nous avons souhaité étudier les effets d'une seconde molécule décrite comme inductrice de la ferroptose, il s'agit de la metformine. Celle-ci ne cible pas la GPX4 directement mais son action consiste à inhiber l'expression de l'UFM1 et donc l'UFMylation de SLC7A11 (unité catalytique de l'antiporteur x-c cytine/glutamate) (Jingjing Yang et al., 2021). Par ce biais, les niveaux intracellulaires de ROS lipidiques augmentent alors que les niveaux de GSH diminuent induisant donc la ferroptose. De plus, nous savons à présent que la metformine induit la ferroptose dans le cancer du sein tout en inhibant l'autophagie (Chen et al., 2021). Cette molécule et sa toxicité sont connues puisqu'elle est déjà employée dans le traitement du diabète de type 2. En parallèle de cette indication, des études ont pu démontrer que son administration restreint l'incidence et la mortalité des cancers et notamment des cancers des VADS (Vilaseca et al., 2020) - (Figueiredo et al., 2016) - (Ogunsakin et al., 2018) - (Tsou et al., 2021). Ces effets sont liés à une diminution de l'insuline circulante et à une induction du stress énergétique par inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale perturbant la régulation de la production de ROS et l'homéostasie du fer (Pernicova and Korbonits, 2014). En raison de l'ensemble de ces points, il nous a donc paru pertinent d'évaluer son intérêt dans notre contexte. Effectivement, l'efficacité de la metformine est encore plus importante que celle de la molécule de RSL3 notamment en association avec du cétuximab dans les cellules siEREG en termes de réduction de la survie à long terme des cellules.

In fine, nous avons pu montrer des effets notamment de réduction de la survie des cellules co-traitées au cétuximab et à la molécule de RSL3 mais également co-traitées par du cétuximab et de la metformine avec des effets plus drastiques dans un contexte d'inhibition de l'expression d'EREG.

Afin d'étayer davantage nos propos, nous avons décidé d'apporter une preuve de concept par l'utilisation d'un modèle plus complexe, un modèle 3D obtenu à partir de pièces opératoires de patients et permettant de récapituler l'hétérogénéité intra- et intertumorale (Yoshii et al., 2015) - (Tanaka et al., 2018) - (Driehuis et al., 2019).

Ces tumeurs, résistantes au cétuximab d'après l'étude de leur viabilité, sont également traitées *via* la molécule de RSL3 seule ou en combinaison avec du cétuximab. En parallèle, les tumeurs sont exposées à un co-traitement associant le cétuximab et la metformine. Grâce à ces co-traitements, la viabilité cellulaire a été restreinte et de manière d'autant plus drastique lors d'une combinaison du cétuximab et de la metformine corrélée à une diminution de l'expression de la GPX4.

Ces travaux ont donc permis de mettre en lumière pour la première fois l'intérêt de l'évaluation de la régulation négative d'EREG dans les cancers des VADS afin de caractériser leur sensibilité au cétuximab par induction d'une mort cellulaire récemment décrite, la ferroptose. Nous mettons également en exergue l'intérêt, en termes de réduction de la progression tumorale, d'une combinaison du cétuximab avec des inducteurs de la ferroptose et cela de manière encore plus intéressante dans les cellules où l'expression d'EREG est réduite. De manière innovante, cette étude démontre l'efficacité de la combinaison du cétuximab avec des inducteurs de la ferroptose sur un modèle tumoral dérivé de cellules de patient résistantes au cétuximab avec une réduction de la survie cellulaire.

En définitive, la régulation négative d'EREG pourrait être considérée comme un biomarqueur prédictif de la sensibilité au cétuximab et de l'éligibilité des patients à un co-traitement associant le cétuximab et des inducteurs de la ferroptose notamment la metformine qui pourrait alors bénéficier d'un repositionnement thérapeutique suite à des études plus approfondies.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse portant sur les cancers des VADS s'est inscrit dans un contexte de recherche translationnelle, à l'interface entre la clinique et le pendant fondamental. En effet, le contexte de ces cancers est encore défavorable pour les patients avec des taux de survie faibles et une qualité de vie impactée. Ces caractéristiques défavorables sont liées notamment à des rechutes particulièrement fréquentes en raison d'un défaut de biomarqueurs à la fois pronostiques mais également prédictifs et d'un manque de nouvelles options thérapeutiques dans ces cancers.

A une échelle plus globale, ce travail de thèse rentre dans la dynamique relativement récente d'une attention plus grande portée sur ces cancers avec notamment la première conférence européenne sur les cancers ORL qui s'est tenue à Lille en 2001 et qui a donné l'impulsion pour la création en 2006 de la Société européenne de la tête et du cou (*European Head & Neck Society*: EHNS). Cette organisation vise à favoriser le partage des connaissances sur le plan de la recherche, de l'éducation, de la formation mais également en matière de prévention des maladies et de l'apport de soins aux patients. Cet organisme s'articule de manière pluridisciplinaire allant des chercheurs aux cliniciens (*European Head & Neck Society*, 2022). L'EHNS organise par exemple depuis maintenant 9 ans, la campagne *Make sense* dans le but de faire connaître ce cancer au grand public et de le sensibiliser aux signes d'alerte afin d'améliorer le délai du diagnostic aujourd'hui encore trop tardif (*European Head and Neck Society*, 2022).

Au niveau national, il existe également une dynamique autour des cancers et notamment des cancers ORL depuis le début du XXI^{ème} par le biais de stratégies de lutte contre les cancers. Celles-ci s'articulent depuis 2003 par une succession de plans cancer afin de : « *mobiliser les acteurs de santé publique autour de la prévention, du dépistage, des soins, de la recherche et de l'accompagnement du patient et de ses proches* » (*Institut National du Cancer*, 2022). Ainsi, trois plans cancer se sont succédés, le premier de 2003 à 2007 avec un axe particulier autour de la prévention notamment afin de réduire la consommation de tabac et d'alcool qui représente, en France, le principal facteur de risque des cancers ORL. Puis, deux autres plans ont suivi, l'un de 2009 à 2013 et l'autre de 2014 à 2019. A l'heure actuelle, nous sommes dans l'initiation de la stratégie décennale de lutte contre les cancers qui va s'étaler sur la période de 2021 jusqu'à 2030 et qui a pour objectifs de réduire le nombre de cancers évitables en accentuant la prévention, de promouvoir davantage le diagnostic, d'améliorer la qualité de vie des patients mais également le taux de survie des cancers de plus mauvais pronostic.

Fort de ces constats en termes de contexte défavorable pour les cancers ORL et sous l'impulsion de l'intérêt de la recherche dans ces cancers, l'attention de notre équipe s'est portée sur ceux-ci, avec dès 2015 une première publication. Celle-ci était à l'interface entre les données cliniques et la recherche fondamentale. Elle a permis de mettre en exergue un lien entre l'expression faible ou abolie de la Cav1 et l'engagement de la tumeur primitive vers un processus de métastases (Jung et al., 2015).

Ces données ont ensuite été complétées lors mon arrivée au sein du laboratoire et de l'équipe de *Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques* en portant notre regard sur l'implication de l'expression de la Cav1 au sein d'une cohorte de patients. Ces patients ont été stratifiés selon l'expression de la Cav1 dans la tumeur primitive. D'une part, nous avons alors pu mettre en évidence que pour des tumeurs surexprimant la Cav1 celle-ci rechutaient préférentiellement de manière locorégionale avec un taux de survie faible. D'autre part, bien que les résultats ne soient pas significatifs, il semblerait qu'une expression faible ou abolie de la Cav1 conduit plutôt à des rechutes métastatiques, résultats qui tendaient vers ceux de la première publication de l'équipe. Grâce à ces résultats cliniques, nous avons souhaité expliquer les processus cellulaires et moléculaires liés à une rechute locorégionale et donc à une surexpression de la Cav1 afin de positionner cette protéine comme potentiel biomarqueur pronostique dans les cancers des VADS. De plus, nous avons souhaité déterminer l'impact de l'expression de la Cav1 lors d'un traitement par thérapie ciblée (cétuximab) associée ou non à de la radiothérapie qui correspond à la prise en charge usuelle chez les patients présentant une tumeur localement avancée non éligibles au cisplatine. La conclusion de ce deuxième point visait à définir le caractère prédictif de la Cav1 dans les cancers ORL.

Grâce à nos recherches, nous avons pu aboutir à un article, qui correspond à mon premier article scientifique en premier co-auteur : *Cav1 / EREG / YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Les résultats présentés dans cette publication montrent qu'une surexpression de la Cav1 au sein de lignées cellulaires commerciales de cancers ORL traitées par du kétuximab associé ou non à des radiations permet aux cellules de survivre à long terme, les protège de l'effet cytostatique des traitements et maintient leur capacité évasive (Burgy and Jehl et al., 2021). Afin d'expliquer le lien qui existe entre l'expression de la Cav1 et la résistance identifiée au kétuximab, nous nous sommes intéressés de plus près à l'addiction oncogène identifiée par les travaux de Job et al., en 2015 (Job et al., 2019).

Nous avons alors pu mettre en évidence que la surexpression de la Cav1 au sein de cellules traitées par du cétuximab est associée à une diminution de l'addiction oncogène à l'EGFR induite par EREG. De plus, nous avons identifié l'implication de la voie Hippo-YAP dont l'activité est restaurée en cas d'inhibition d'EREG et donc de surexpression de la Cav1 (Burgy and Jehl et al., 2021).

Les résultats fournis *via* cet article scientifique associés à ceux établis avant mon arrivée au laboratoire permettent donc de conclure sur l'intérêt pronostique de la Cav1 dans les cancers ORL. En effet, lorsque cette protéine est surexprimée, la tumeur primitive s'engage préférentiellement vers une rechute locorégionale corrélée à un mauvais pronostic, alors qu'une expression diminuée ou abolie de la Cav1 est identifiée comme conduisant la tumeur primitive vers un devenir métastatique (Jung et al., 2015) - (Burgy and Jehl et al., 2021). Concernant la résistance aux traitements, l'intérêt de la Cav1 en tant que biomarqueur prédictif est partiel puisque nous avons pu identifier l'intérêt de l'axe Cav1 / EREG / YAP avec comme protéine qui semble être la clé : EREG (Burgy and Jehl et al., 2021). Néanmoins, pour comprendre davantage son implication dans la résistance, notamment au cétuximab, nous avons poursuivi nos recherches en se focalisant sur EREG.

Ainsi, un autre article scientifique a été conduit durant la dernière année de mon travail de thèse : *Blocking EREG / GPX4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction*. Nous avons alors pu mettre en lumière que par la seule manipulation d'extinction de l'expression d'EREG, nous obtenons une diminution du phénotype de progression tumorale, diminution accentuée par une exposition au cétuximab. Nous avons alors axé notre recherche sur le métabolisme cellulaire étant donné l'implication des mitochondries dans les phénomènes de résistance aux thérapies (Burgy and Jehl et al., 2021). Ainsi, les cellules identifiées précédemment traitées par du cétuximab où l'expression d'EREG est réduite, présentent un dysfonctionnement mitochondrial associé à une inhibition de l'autophagie. Ces phénomènes sont corrélés avec une perturbation négative de la production de GPX4 ce qui provoque l'induction d'une autre mort cellulaire programmée : la ferroptose.

Suite à nos résultats, nous proposons EREG comme biomarqueur prédictif de la réponse au cétuximab. En effet, une faible expression d'EREG semble rendre les cellules sensibles au cétuximab par induction de la ferroptose.

Néanmoins, malgré une réponse cellulaire encourageante, des cellules survivent tout de même c'est pourquoi nous proposons d'associer au cétuximab des molécules accentuant davantage l'activation de la ferroptose, à savoir la molécule de RSL3 ou la metformine. Effectivement, la combinaison du cétuximab et de la molécule RSL3 ou du cétuximab et de la metformine dans les cellules exprimant faiblement EREG conduit à une diminution drastique de la survie cellulaire. Pour compléter nos données et apporter une preuve de concept nous avons pu utiliser un modèle tumoroïde qui reflète l'hétérogénéité intra- mais également inter-tumorale. Ce modèle a été adapté au sein du laboratoire à partir de ma deuxième année de thèse et valorisé dans mon deuxième papier scientifique. *In fine*, nous avons pu corréler nos résultats sur les lignées cellulaires avec ceux obtenus *via* le modèle tumoroïde où une diminution importante de la viabilité et du nombre de cellules après un co-traitement est notifiée (Jehl *et al.*, soumis). D'un point de vue clinique, il serait donc envisageable d'analyser les niveaux d'expression d'EREG au sein de la tumeur primitive afin d'adapter la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, en cas d'une expression faible de cette protéine, le patient pourrait être traité par une association de cétuximab et d'inducteurs de la ferroptose.

Avant de présenter les perspectives inhérentes à ces travaux de recherche durant les trois dernières années, il est important de rappeler le contexte. En effet, les principaux résultats ont été obtenus par l'étude de lignées cellulaires de cancers des VADS appartenant au sous-type basal. Il serait donc particulièrement intéressant d'évaluer les autres sous-types de cancers ORL décrits et voir les éventuelles différences.

Si nous mettons en parallèle les données recueillies tout au long de mes trois années de recherche, il y a tout d'abord, la mise en évidence de l'axe Cav1 / EREG / YAP impliqué dans la résistance au cétuximab et à la radiothérapie, résultats obtenus par l'utilisation d'un modèle *in vitro* de lignées cellulaires de cancers des VADS. Cet axe se caractérise par une surexpression de la Cav1 qui lève l'addiction à la boucle oncogénique de l'EGFR médiée par EREG qui se voit diminuer, ce qui favorise donc l'activité transcriptionnelle de YAP et de ce fait la survie et la progression tumorale. Ces résultats ont abouti à mon premier article scientifique publié en 2021. Ensuite, le second article actuellement soumis (2022) met en exergue qu'une limitation de l'expression d'EREG lève la résistance au cétuximab sans faire fluctuer les niveaux d'expression de la Cav1. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en avant que les cellules avec de faibles taux d'expression d'EREG et d'EGFR sont sensibles au cétuximab *via* l'activation de la ferroptose.

Lorsque celle-ci est accentuée par l'exposition à un co-traitement à base de cétuximab et d'un inducteur de ferroptose (RSL3 ou metformine), l'impact défavorable sur la survie cellulaire est particulièrement important. Malgré ces résultats il serait pertinent de poursuivre les investigations afin d'identifier l'influence de la surexpression de la Cav1 (qui provoque l'inhibition d'EREG) sur la réponse à l'association du cétuximab avec un inducteur de ferroptose. Le but étant de démontrer si cette association, malgré la surexpression de la Cav1, peut lever la résistance de ces cellules à la thérapie ciblée par accentuation de la ferroptose. D'autant que celles-ci présentent une activité transcriptionnelle de YAP, qui lui-même est un effecteur positif de la ferroptose.

J'ai également eu l'opportunité de mettre en place au sein du laboratoire la mise en culture de pièces de résections chirurgicales issues du patient afin d'obtenir un modèle complexe 3D, les tumoroides. Ce modèle nous a permis de mettre en avant, là encore, l'intérêt des co-traitements associant le cétuximab à un inducteur de la ferroptose en laissant apparaître tout de même des différences de réponse inter-tumoroides. Cette fluctuation trouve une explication dans la définition même du modèle qui vise justement l'hétérogénéité intra- mais également inter-tumorale. Concernant les perspectives, il serait donc intéressant de confirmer l'utilisation de la Cav1 et d'EREG en tant que potentiels biomarqueurs pour la prise en charge thérapeutique par le cétuximab. De plus, pourquoi ne pas renforcer la proposition de repositionnement thérapeutique de la metformine et de l'adaptation de l'utilisation du cétuximab en étudiant dans un premier temps la réponse des patients atteints d'un diabète de type 2 traités donc par une association metformine et cétuximab dans un contexte de cancer ORL. Grâce à ce modèle, il pourrait être utile d'étudier l'implication du microenvironnement sur l'expression totale d'EREG et donc son influence sur la réponse au cétuximab et sur celle suivant le co-traitement précité. Enfin, il serait possible pour aller plus loin, d'évaluer la possibilité de la mesure d'EREG circulant notamment au moyen de biopsies liquides en combinant ces données avec les résultats d'expression tumorale de la Cav1 en immunohistochimie. Selon les résultats préliminaires, il serait envisageable de proposer un co-traitement associant le cétuximab avec un inducteur de la ferroptose en cas de faible expression d'EREG et d'un taux normal de Cav1. En cas de surexpression de la Cav1 et donc d'une expression faible ou abolie d'EREG, si les résultats permettent de montrer une levée de la résistance au cétuximab par un co-traitement de cette thérapie ciblée avec un inducteur de ferroptose, alors proposer ce même co-traitement en clinique.

Evidemment ces derniers points représentent des perspectives lointaines et nécessitent encore beaucoup d'études *in vitro*. De manière peut-être plus accessible et précoce, le modèle tumoroïde offre de belles perspectives pour la réalisation de tests médicamenteux afin de proposer d'éventuels repositionnements thérapeutiques mais aussi pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. A plus long terme, ce modèle pourra s'intégrer à la tendance actuelle de la médecine personnalisée avec une mise en culture rapide des pièces opératoires, une évaluation de l'expression de biomarqueurs et des tests de différents anticancéreux. La réponse de ce modèle pourrait alors orienter les cliniciens dans la prise en charge thérapeutique du patient.

Bibliographie

A

Abada, A., Elazar, Z., 2014. Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep.* 15, 839–852. <https://doi.org/10.15252/embr.201439076>

Abdul Razak, A.R., Soulières, D., Laurie, S.A., Hotte, S.J., Singh, S., Winkquist, E., Chia, S., Le Tourneau, C., Nguyen-Tan, P.-F., Chen, E.X., Chan, K.K., Wang, T., Giri, N., Mormont, C., Quinn, S., Siu, L.L., 2013. A phase II trial of dacomitinib, an oral pan-human EGF receptor (HER) inhibitor, as first-line treatment in recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 24, 761–769. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds503>

Adkins, D., Ley, J., Neupane, P., Worden, F., Sacco, A.G., Palka, K., Grilley-Olson, J.E., Maggiore, R., Salama, N.N., Trinkaus, K., Van Tine, B.A., Steuer, C.E., Saba, N.F., Oppelt, P., 2019. Palbociclib and cetuximab in platinum-resistant and in cetuximab-resistant human papillomavirus-unrelated head and neck cancer: a multicentre, multigroup, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 20, 1295–1305. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30405-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30405-X)

Adkins, D.R., Lin, J.-C., Sacco, A., Ley, J., Oppelt, P., Vanchenko, V., Komashko, N., Yen, C.-J., Wise-Draper, T., Lopez-Picazo Gonzalez, J., Radulovic, S., Shen, Q., Thurm, H., Martini, J.-F., Hoffman, J., Huang, X., Melichar, B., Tahara, M., 2021. Palbociclib and cetuximab compared with placebo and cetuximab in platinum-resistant, cetuximab-naïve, human papillomavirus-unrelated recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: A double-blind, randomized, phase 2 trial. *Oral Oncol.* 115, 105192. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105192>

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, 2020. Glossaire ANSM, Evènement Indésirable Grave [08.24.2022]. URL <https://ansm.sante.fr/glossaire/E>

Agilent Technologies, 2019. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide. User Guide 20 [05.30.2022]. URL <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-assay-kits-reagents-cell-assay-media/seahorse-xf-cell-mito-stress-test-kit-740885>

Agilent Technologies, 2018. XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit User Guide. User Guide 24 [05.30.2022]. URL <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-assay-kits-reagents-cell-assay-media/seahorse-xf-real-time-atp-rate->

assay-kit-740889

Agilent Technologies, 2017. Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit User Guide. User Guide 22 [05.30.2022]. URL <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-assay-kits-reagents-cell-assay-media/seahorse-xf-glycolysis-stress-test-kit-740886>

Aguilar-Cazares, D., Chavez-Dominguez, R., Carlos-Reyes, A., Lopez-Camarillo, C., Hernandez de la Cruz, O.N., Lopez-Gonzalez, J.S., 2019. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front. Oncol.* 9, 1399. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01399>

Allen, C.T., Lewis, J.S., El-Mofty, S.K., Haughey, B.H., Nussenbaum, B., 2010. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *The Laryngoscope* 120, 1756–1772. <https://doi.org/10.1002/lary.20936>

Almangush, A., Pirinen, M., Heikkinen, I., Mäkitie, A.A., Salo, T., Leivo, I., 2018. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Br. J. Cancer* 118, 577–586. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.425>

Anderson, R.G.W., 1998. THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199–225. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.199>

Anderson, R.G.W., Jacobson, K., 2002. A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science* 296, 1821–1825. <https://doi.org/10.1126/science.1068886>

Andler, R., Guignard, R., Spilka, S., Le Nézet, O., Pasquereau, A., Richard, J.-B., Nguyen-Thanh, V., 2018. Consommation de tabac et usage de cigarette électronique en France. *Rev. Mal. Respir.* 35, 673–685. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.01.008>

Anticancer Fund, European Society for Medical Oncology, 2015. Cancers de la tête et du cou - Que sont les cancers de la tête et du cou - Laissez-nous vous expliquer. Série Guides pour les patients ESMO/ACF basée sur les recommandations de pratique clinique de l'ESMO 36 [06.16.2022]. URL

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjZ7ZOyn->

[_5AhUByRoKHXxQDokQFnoECAyQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.esmo.org%2Fcontent%2Fdownload%2F65719%2F1182654%2F1%2FESMO-ACF-Cancers-de-la-Tete-et-du-Cou-Guide-pour-les-Patients.pdf&usq=AOvVaw0gY_fDf16WLRDKmf0ECZgm](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwjZ7ZOyn-_5AhUByRoKHXxQDokQFnoECAyQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.esmo.org%2Fcontent%2Fdownload%2F65719%2F1182654%2F1%2FESMO-ACF-Cancers-de-la-Tete-et-du-Cou-Guide-pour-les-Patients.pdf&usq=AOvVaw0gY_fDf16WLRDKmf0ECZgm)

Antoni, D.N., Burckel, H., Josset, É., Noël, G., Mornex, F., 2014. Radiobiology of ablative dose in stereotactic irradiation: data update. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* 18, 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2014.04.003>

Argiris, A., Kotsakis, A.P., Hoang, T., Worden, F.P., Savvides, P., Gibson, M.K., Gyanchandani, R., Blumenschein, G.R., Chen, H.X., Grandis, J.R., Harari, P.M., Kies, M.S., Kim, S., 2013. Cetuximab and bevacizumab: preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 24, 220–225. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds245>

Atanackovic, D., Blum, I., Cao, Y., Wenzel, S., Bartels, K., Faltz, C., Hossfeld, D.K., Hegewisch-Becker, S., Bokemeyer, C., Leuwer, R., 2006. Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1218–1225. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.9.3174>

B

Bancroft, C.C., Chen, Z., Dong, G., Sunwoo, J.B., Yeh, N., Park, C., Van Waes, C., 2001. Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 435–442.

Barak, V., Meirovitz, A., Leibovici, V., Rachmut, J., Peretz, T., Eliashar, R., Gross, M., 2015. The Diagnostic and Prognostic Value of Tumor Markers (CEA, SCC, CYFRA 21-1, TPS) in Head and Neck Cancer Patients. *Anticancer Res.* 35, 5519–5524.

Baro, M., Lopez Sambrooks, C., Burtness, B.A., Lemmon, M.A., Contessa, J.N., 2019. Neuregulin Signaling Is a Mechanism of Therapeutic Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 18, 2124–2134. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0163>

Bauman, J.E., Duvvuri, U., Thomas, S., Gooding, W.E., Clump, D.A., Karlovits, B., Wehbe, A., Miller, F.R., Kim, S., Sen, M., Heron, D.E., Grandis, J.R., Argiris, A., 2018. Phase 1 study of EGFR-antisense DNA, cetuximab, and radiotherapy in head and neck cancer with preclinical correlates. *Cancer* 124, 3881–3889. <https://doi.org/10.1002/cncr.31651>

Bauman, J.E., Ohr, J., Gooding, W.E., Ferris, R.L., Duvvuri, U., Kim, S., Johnson, J.T., Soloff, A.C., Wallweber, G., Winslow, J., Gaither-Davis, A., Grandis, J.R., Stabile, L.P., 2020. Phase I Study of Ficlaturumab and Cetuximab in Cetuximab-Resistant, Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer. *Cancers* 12, 1537. <https://doi.org/10.3390/cancers12061537>

Bazzani, L., Donnini, S., Giachetti, A., Christofori, G., Ziche, M., 2018. PGE2 mediates EGFR internalization and nuclear translocation via caveolin endocytosis promoting its

transcriptional activity and proliferation in human NSCLC cells. *Oncotarget* 9, 14939–14958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24499>

Bender, F.C., Reymond, M.A., Bron, C., Quest, A.F.G., 2000. Caveolin-1 Levels Are Down-Regulated in Human Colon Tumors, and Ectopic Expression of Caveolin-1 in Colon Carcinoma Cell Lines Reduces Cell Tumorigenicity¹. *Cancer Res.* 60, 5870–5878.

Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefèbvre, J.-L., Greiner, R.H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M., European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931, 2004. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 1945–1952. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032641>

Bhutia, Y.D., Babu, E., Ramachandran, S., Ganapathy, V., 2015. Amino Acid transporters in cancer and their relevance to “glutamine addiction”: novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res.* 75, 1782–1788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3745>

Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>

Blanco, R., Carrillo-Beltrán, D., Corvalán, A.H., Aguayo, F., 2021. High-Risk Human Papillomavirus and Epstein–Barr Virus Coinfection: A Potential Role in Head and Neck Carcinogenesis. *Biology* 10, 1232. <https://doi.org/10.3390/biology10121232>

Blatt, S., Voelxen, N., Sagheb, K., Pabst, A.M., Walenta, S., Schroeder, T., Mueller-Klieser, W., Ziebart, T., 2016. Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin. Oral Investig.* 20, 2097–2104. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1699-6>

Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Winn, D.M., Austin, D.F., Greenberg, R.S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J.B., Stemhagen, A., Fraumeni, J.F., 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 48, 3282–3287.

Boidot, R., Végran, F., Meulle, A., Le Breton, A., Dessy, C., Sonveaux, P., Lizard-Nacol, S., Feron, O., 2012. Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res.* 72, 939–948. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2474>

Bonaldi, C., Andriantafika, F., Chyderiotis, S., Boussac-Zarebska, M., Cao, B., Benmarhnia, T., 2016. Les décès attribuables au tabagisme en France. Dernières estimations et tendance, années 2000 à 2013. *Bull Epidémiol Hebd* 13.

Bonaldi, C., Hill, C., 2018. LA MORTALITÉ ATTRIBUABLE À L'ALCOOL EN FRANCE EN 2015 / ALCOHOL-ATTRIBUTABLE MORTALITY IN FRANCE IN 2015 12.

Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M.S., Baselga, J., Yousoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E.K., Ang, K.K., 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 354, 567–578. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa053422>

Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R.K., Raben, D., Baselga, J., Spencer, S.A., Zhu, J., Yousoufian, H., Rowinsky, E.K., Ang, K.K., 2010. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* 11, 21–28. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70311-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70311-0)

Bonuccelli, G., Casimiro, M.C., Sotgia, F., Wang, C., Liu, M., Katiyar, S., Zhou, J., Dew, E., Capozza, F., Daumer, K.M., Minetti, C., Milliman, J.N., Alpy, F., Rio, M.-C., Tomasetto, C., Mercier, I., Flomenberg, N., Frank, P.G., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., 2009. Caveolin-1 (P132L), a common breast cancer mutation, confers mammary cell invasiveness and defines a novel stem cell/metastasis-associated gene signature. *Am. J. Pathol.* 174, 1650–1662. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080648>

Bonuccelli, G., Tsigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R.G., Chiavarina, B., Frank, P.G., Flomenberg, N., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2010. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 3506–3514. <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12731>

Bossard, N., Remontet, L., Jooste, V., Monnereau, A., Belot, A., Roche, L., Colonna, M., Grosclaude, P., 2013. Survie nette: concept, estimation et illustration à partir des résultats de la dernière étude du réseau Francim. *Bull Epidémiol Hebd* (43-44-45):559-65.

Brizel, D.M., Sibley, G.S., Prosnitz, L.R., Scher, R.L., Dewhirst, M.W., 1997. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38, 285–289. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(97\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(97)00101-6)

Brodie, S.A., Lombardo, C., Li, G., Kowalski, J., Gandhi, K., You, S., Khuri, F.R., Marcus, A., Vertino, P.M., Brandes, J.C., 2014. Aberrant promoter methylation of caveolin-1 is associated with favorable response to taxane-platinum combination chemotherapy in advanced NSCLC. *PloS One* 9, e107124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107124>

Brooks, P.J., Theruvathu, J.A., 2005. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol Fayettev. N* 35, 187–193.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.009>

Brotin, E., Meryet-Figuère, M., Simonin, K., Duval, R.E., Villedieu, M., Leroy-Dudal, J., Saison-Behmoaras, E., Gauduchon, P., Denoyelle, C., Poulain, L., 2010. Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int. J. Cancer* 126, 885–895. <https://doi.org/10.1002/ijc.24787>

Bryere, J., Dejardin, O., Launay, L., Colonna, M., Grosclaude, P., Launoy, G., Réseau français des registres des cancers (Francim), 2017. Environnement socioéconomique et incidence des cancers en France. *Bull Epidemiol Hebd* 68–77.

Burgy, M., Jehl, A., Conrad, O., Foppolo, S., Bruban, V., Etienne-Selloum, N., Jung, A.C., Masson, M., Macabre, C., Ledrappier, S., Burckel, H., Mura, C., Noël, G., Borel, C., Fasquelle, F., Onea, M.-A., Chenard, M.-P., Thiéry, A., Dontenwill, M., Martin, S., 2021. Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* 13, 3038. <https://doi.org/10.3390/cancers13123038>

Burtneß, B., Haddad, R., Dinis, J., Trigo, J., Yokota, T., de Souza Viana, L., Romanov, I., Vermorken, J., Bourhis, J., Tahara, M., Martins Segalla, J.G., Psyrrí, A., Vasilevskaya, I., Nangia, C.S., Chaves-Conde, M., Kiyota, N., Homma, A., Holeckova, P., Del Campo, J.M., Asarawala, N., Nicolau, U.R., Rauch, D., Even, C., Wang, B., Gibson, N., Ehrnrooth, E., Harrington, K., Cohen, E.E.W., LUX-Head & Neck 2 investigators, 2019a. Afatinib vs Placebo as Adjuvant Therapy After Chemoradiotherapy in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 5, 1170–1180. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1146>

Burtneß, B., Harrington, K.J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., Castro, G. de, Psyrrí, A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., Fuereder, T., Hughes, B.G.M., Mesía, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Ishak, W.Z.W., Hong, R.-L., Mendoza, René González, Roy, A., Zhang, Y., Gumuscu, B., Cheng, J.D., Jin, F., Rischin, D., Lerzo, G., Tatangelo, M., Varela, M., Zarba, J.J., Boyer, M., Gan, H., Gao, B., Hughes, B., Mallesara, G., Rischin, D., Taylor, A., Burian, M., Fuereder, T., Greil, R., Barrios, C.H., Junior, D.O. de C., Castro, G., Franke, F.A., Giroto, G., Lima, I.P.F., Nicolau, U.R., Pinto, G.D.J., Santos, L., Victorino, A.-P., Chua, N., Couture, F., Gregg, R., Hansen, A., Hilton, J., McCarthy, J., Soulieres, D., Ascuí, R., Gonzalez, P., Villanueva, L., Torregroza, M., Zambrano, A., Holeckova, P., Kral, Z., Melichar, B., Prausova, J., Vosmik, M., Andersen, M., Gyldenkerne, N., Jurgens, H., Putnik, K., Reinikainen, P., Gruenwald, V., Laban, S., Aravantinos, G., Boukovinas, I., Georgoulías, V., Psyrrí, A., Kwong, D., Al-Farhat, Y., Csoszi, T., Erfan, J., Horvai, G., Landherr, L., Remenar, E., Ruzsa, A., Szota, J., Billan, S., Gluck, I., Gutfeld, O., Popovtzer,

A., Benasso, M., Bui, S., Ferrari, V., Licitra, L., Nole, F., Fujii, T., Fujimoto, Y., Hanai, N., Hara, H., Matsumoto, K., Mitsugi, K., Monden, N., Nakayama, M., Okami, K., Oridate, N., Shiga, K., Shimizu, Y., Sugasawa, M., Tahara, M., Takahashi, M., Takahashi, S., Tanaka, K., Ueda, T., Yamaguchi, H., Yamazaki, T., Yasumatsu, R., Yokota, T., Yoshizaki, T., Kudaba, I., Stara, Z., Ishak, W.Z.W., Cheah, S.K., Ponce, J.A., Mendoza, Rene Gonzalez, Hernandez, C.H., Soto, F.M., Buter, J., Hoeben, A., Oosting, S., Suijkerbuijk, K., Bratland, A., Brydoey, M., Alvarez, R., Mas, L., Caguioa, P., Querol, J., Regala, E.E., Tamayo, M.B., Villegas, E.M., Kawecki, A., Karpenko, A., Klochikhin, A., Smolin, A., Zarubenkoy, O., Goh, B.C., Cohen, G., Toit, J. du, Jordaan, C., Landers, G., Ruff, P., Szpak, W., Tabane, N., Brana, I., Docampo, L.I., Lavernia, J., Mesia, R., Abel, E., Muratidu, V., Nielsen, N., Cristina, V., Rordorf, T., Rothschild, S., Hong, R.-L., Wang, H.-M., Yang, M.-H., Yeh, S.-P., Yen, C.-J., Ngamphaiboon, N., Soparattanapaisarn, N., Sriuranpong, V., Aksoy, S., Cicin, I., Ekenel, M., Harputluoglu, H., Ozyilkan, O., Harrington, K., Agarwala, S., Ali, H., Alter, R., Anderson, D., Bruce, J., Burtness, B., Campbell, N., Conde, M., Deeken, J., Edenfield, W., Feldman, L., Gaughan, E., Goueli, B., Halmos, B., Hegde, U., Hunis, B., Jotte, R., Karnad, A., Khan, S., Laudi, N., Laux, D., Martincic, D., McCune, S., McGaughey, D., Misiukiewicz, K., Mulford, D., Nadler, E., Neupane, P., Nunnink, J., Ohr, J., O'Malley, M., Patson, B., Paul, D., Popa, E., Powell, S., Redman, R., Rella, V., Lima, C.R., Sivapiragasam, A., Su, Y., Sukari, A., Wong, S., Yilmaz, E., Yorio, J., 2019b. 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7)

Byrne, D.P., Dart, C., Rigden, D.J., 2012. Evaluating Caveolin Interactions: Do Proteins Interact with the Caveolin Scaffolding Domain through a Widespread Aromatic Residue-Rich Motif? *PLoS ONE* 7, e44879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044879>

C

Calais, G., Alfonsi, M., Bardet, E., Sire, C., Germain, T., Bergerot, P., Rhein, B., Tortochaux, J., Oudinot, P., Bertrand, P., 1999. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 2081–2086. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.24.2081>

Califano, J., Westra, W.H., Meininger, G., Corio, R., Koch, W.M., Sidransky, D., 2000. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions.

Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 6, 347–352.

Canning, M., Guo, G., Yu, M., Myint, C., Groves, M.W., Byrd, J.K., Cui, Y., 2019. Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 52. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00052>

Centre de Lutte Contre le Cancer Leon Bernard, 2022. Classification du CIRC par localisations cancéreuses | Cancer et environnement [05.30.3033]. URL <https://www.cancer-environnement.fr/479-Classification-par-localisations-cancereuses.ce.aspx#!%C3%A8vre>

Chaachouay, H., Ohneseit, P., Toulany, M., Kehlbach, R., Multhoff, G., Rodemann, H.P., 2011. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 99, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.002>

Chatterjee, M., Ben-Josef, E., Robb, R., Vedaie, M., Seum, S., Thirumoorthy, K., Palanichamy, K., Harbrecht, M., Chakravarti, A., Williams, T.M., 2017. Caveolae-Mediated Endocytosis is Critical for Albumin Cellular Uptake and Response to Albumin-Bound Chemotherapy. *Cancer Res.* 77, 5925–5937. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0604>

Chatterjee, M., Ben-Josef, E., Thomas, D.G., Morgan, M.A., Zalupski, M.M., Khan, G., Andrew Robinson, C., Griffith, K.A., Chen, C.-S., Ludwig, T., Bekaii-Saab, T., Chakravarti, A., Williams, T.M., 2015. Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. *Sci. Rep.* 5, 10867. <https://doi.org/10.1038/srep10867>

Chen, D., Che, G., 2014. Value of caveolin-1 in cancer progression and prognosis: Emphasis on cancer-associated fibroblasts, human cancer cells and mechanism of caveolin-1 expression (Review). *Oncol. Lett.* 8, 1409–1421. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2385>

Chen, J., Qin, C., Zhou, Y., Chen, Y., Mao, M., Yang, J., 2021. Metformin may induce ferroptosis by inhibiting autophagy via lncRNA H19 in breast cancer. *FEBS Open Bio* 12, 146–153. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13314>

Chen, J., Zhang, S., Li, Y., Tang, Z., Kong, W., 2014. Hexokinase 2 overexpression promotes the proliferation and survival of laryngeal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 3743–3753. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1496-2>

Chen, P.-H., Mahmood, Q., Mariottini, G.L., Chiang, T.-A., Lee, K.-W., 2017. Adverse Health Effects of Betel Quid and the Risk of Oral and Pharyngeal Cancers. *BioMed Res. Int.* 2017, 3904098. <https://doi.org/10.1155/2017/3904098>

Chen, Y.-J., Chang, J.T.-C., Liao, C.-T., Wang, H.-M., Yen, T.-C., Chiu, C.-C., Lu, Y.-C., Li,

H.-F., Cheng, A.-J., 2008. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci.* 99, 1507–1514. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00863.x>

Chiavarina, B., Whitaker-Menezes, D., Migneco, G., Martinez-Outschoorn, U.E., Pavlides, S., Howell, A., Tanowitz, H.B., Casimiro, M.C., Wang, C., Pestell, R.G., Grieshaber, P., Caro, J., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2010. HIF1- α functions as a tumor promoter in cancer associated fibroblasts, and as a tumor suppressor in breast cancer cells: Autophagy drives compartment-specific oncogenesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 3534–3551. <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12908>

Chin, D., Boyle, G.M., Theile, D.R., Parsons, P.G., Coman, W.B., 2004. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br. J. Plast. Surg.* 57, 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2004.06.010>

Choong, N.W., Kozloff, M., Taber, D., Hu, H.S., Wade, J., Ivy, P., Karrison, T.G., Dekker, A., Vokes, E.E., Cohen, E.E.W., 2010. Phase II study of sunitinib malate in head and neck squamous cell carcinoma. *Invest. New Drugs* 28, 677–683. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9296-7>

CHRU de Nancy, 2022. Journées de dépistage cancers ORL organisées par le CHRU de Nancy [08.11.2022]. URL <https://www.chru-nancy.fr/index.php/depistage-cancers-ork>

Chu, Y.-H., Kao, S.-W., Tantoh, D.M., Ko, P.-C., Lan, S.-J., Liaw, Y.-P., 2019. Association between fine particulate matter and oral cancer among Taiwanese men. *J. Investig. Med.* 67, 34–38. <https://doi.org/10.1136/jim-2016-000263>

Chung, C.H., Parker, J.S., Karaca, G., Wu, J., Funkhouser, W.K., Moore, D., Butterfoss, D., Xiang, D., Zanation, A., Yin, X., Shockley, W.W., Weissler, M.C., Dressler, L.G., Shores, C.G., Yarbrough, W.G., Perou, C.M., 2004. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 5, 489–500. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00112-6)

Cohen, E.E., Hong, D.S., Draper, T.W., William, W.N., Schrijvers, D., Nin, R.M., Scott, M.L., Lyne, P., Mugundu, G., McCoon, P., Cook, C.E., Mehta, M.M., Keilholz, U., 2017. Phase 1b/2 Study (SCORES) assessing safety, tolerability, and preliminary anti-tumor activity of durvalumab plus AZD9150 or AZD5069 in patients with advanced solid malignancies and squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Ann. Oncol.* 28, v403. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx376.001>

Cohen, E.E.W., Davis, D.W., Karrison, T.G., Seiwert, T.Y., Wong, S.J., Nattam, S., Kozloff, M.F., Clark, J.I., Yan, D.-H., Liu, W., Pierce, C., Dancey, J.E., Stenson, K., Blair, E., Dekker,

A., Vokes, E.E., 2009. Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *Lancet Oncol.* 10, 247–257. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70002-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70002-6)

Contessa, J.N., Abell, A., Valerie, K., Lin, P.-S., Schmidt-Ullrich, R.K., 2006. ErbB receptor tyrosine kinase network inhibition radiosensitizes carcinoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 65, 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.02.025>

Cooper, J.S., Pajak, T.F., Forastiere, A.A., Jacobs, J., Campbell, B.H., Saxman, S.B., Kish, J.A., Kim, H.E., Cmelak, A.J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J.F., Chao, K.S.C., Schultz, C.J., Lee, N., Fu, K.K., Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup, 2004. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 350, 1937–1944. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032646>

Cosset, E.C., Godet, J., Entz-Werlé, N., Guérin, E., Guenot, D., Froelich, S., Bonnet, D., Pinel, S., Plenat, F., Chastagner, P., Dontenwill, M., Martin, S., 2012. Involvement of the TGF β pathway in the regulation of $\alpha 5 \beta 1$ integrins by caveolin-1 in human glioblastoma. *Int. J. Cancer* 131, 601–611. <https://doi.org/10.1002/ijc.26415>

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., Lisanti, M.P., 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 6525–6533. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6525>

Coy, J.F., Dübel, S., Kioschis, P., Thomas, K., Micklem, G., Delius, H., Poustka, A., 1996. Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: implications for the evolution of new vertebrate genes. *Genomics* 32, 309–316. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0124>

Cuffel, C., Rivals, J.-P., Zaugg, Y., Salvi, S., Seelentag, W., Speiser, D.E., Liénard, D., Monnier, P., Romero, P., Bron, L., Rimoldi, D., 2011. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 128, 2625–2634. <https://doi.org/10.1002/ijc.25607>

Curry, J.M., Tuluc, M., Whitaker-Menezes, D., Ames, J.A., Anantharaman, A., Butera, A., Leiby, B., Cognetti, D.M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Martinez-Outschoorn, U.E., 2013. Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1371–1384. <https://doi.org/10.4161/cc.24092>



Danielsen, P.H., Møller, P., Jensen, K.A., Sharma, A.K., Wallin, H., Bossi, R., Autrup, H., Mølhave, L., Ravanat, J.-L., Briedé, J.J., de Kok, T.M., Loft, S., 2011. Oxidative Stress, DNA Damage, and Inflammation Induced by Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter in Human A549 and THP-1 Cell Lines. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 168–184. <https://doi.org/10.1021/tx100407m>

Dassonville, O., Formento, J.L., Francoual, M., Ramaioli, A., Santini, J., Schneider, M., Demard, F., Milano, G., 1993. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 11, 1873–1878. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.10.1873>

Dayyani, F., Etzel, C.J., Liu, M., Ho, C.-H., Lippman, S.M., Tsao, A.S., 2010. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2, 15. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-2-15>

De Cecco, L., Nicolau, M., Giannoccaro, M., Daidone, M.G., Bossi, P., Locati, L., Licitra, L., Canevari, S., 2015. Head and neck cancer subtypes with biological and clinical relevance: Meta-analysis of gene-expression data. *Oncotarget* 6, 9627–9642.

de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604–617.

de Ruiter, E.J., Mulder, F.J., Koomen, B.M., Speel, E.-J., van den Hout, M.F.C.M., de Roest, R.H., Bloemena, E., Devriese, L.A., Willems, S.M., 2021. Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 34, 1125–1132. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0644-7>

De Schutter, H., Spaepen, M., Mc Bride, W.H., Nuyts, S., 2007. The clinical relevance of microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma: a critical review. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 734–741. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201845>

de Sousa, E.A., Lourenço, S.V., de Moraes, F.P.P., Vartanian, J.G., Gonçalves-Filho, J., Kowalski, L.P., Soares, F.A., Coutinho-Camillo, C.M., 2015. Head and neck squamous cell carcinoma lymphatic spread and survival: Relevance of vascular endothelial growth factor family for tumor evaluation. *Head Neck* 37, 1410–1416. <https://doi.org/10.1002/hed.23765>

Defossez, G., Le Guyader-Peyrou, S., Uhry, Z., Grosclaude, P., Colonna, M., Dantony, E., 2019. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Synthèse. Saint-Maurice : Santé publique France 20.

Denko, N.C., 2008. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* 8, 705–713. <https://doi.org/10.1038/nrc2468>

Dikic, I., Elazar, Z., 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

Dittmann, K., Mayer, C., Kehlbach, R., Rodemann, H.P., 2008. Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol. Cancer* 7, 69. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-69>

Dittmann, K., Mayer, C., Kehlbach, R., Rothmund, M.-C., Peter Rodemann, H., 2009. Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 92, 379–382. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.003>

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., Morrison, B., Stockwell, B.R., 2012. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* 149, 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

Dojindo Molecular Technologies, 2020. Technical Manual Liperfluo. [05.25.2022]. URL <https://dojindo.com/product/liperfluo-l248/>

Dojindo Molecular Technologies, 2019. Technical Manual FerroOrange. [05.25.2022]. URL <https://dojindo.com/product/ferroorange-f374/>

Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., 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. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00050-3)

Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Haller, H., Kurzchalia, T.V., 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449–2452. <https://doi.org/10.1126/science.1062688>

Driehuis, E., Kolders, S., Spelier, S., Löhmußaar, K., Willems, S.M., Devriese, L.A., de Bree, R., de Ruiter, E.J., Korving, J., Begthel, H., van Es, J.H., Geurts, V., He, G.-W., van Jaarsveld, R.H., Oka, R., Muraro, M.J., Vivié, J., Zandvliet, M.M.J.M., Hendrickx, A.P.A., Iakobachvili, N., Sridevi, P., Kranenburg, O., van Boxtel, R., Kops, G.J.P.L., Tuveson, D.A.,

Peters, P.J., van Oudenaarden, A., Clevers, H., 2019. Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy. *Cancer Discov.* 9, 852–871. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1522>

Driehuis, E., Kretschmar, K., Clevers, H., 2020. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat. Protoc.* 15, 3380–3409. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0379-4>

Dunn, L.A., Fury, M.G., Xiao, H., Baxi, S.S., Sherman, E.J., Korte, S., Pfister, C., Haque, S., Katabi, N., Ho, A.L., Pfister, D.G., 2017. A phase II study of temsirolimus added to low-dose weekly carboplatin and paclitaxel for patients with recurrent and/or metastatic (R/M) head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28, 2533–2538. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx346>

E

Ebert, B.L., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 29083–29089. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29083>

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., Asara, J.M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., Shaw, R.J., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461. <https://doi.org/10.1126/science.1196371>

Elmusrati, A., Wang, J., Wang, C.-Y., 2021. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral Sci.* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00131-7>

Engelman, J.A., Zhang, X.L., Lisanti, M.P., 1999. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett.* 448, 221–230. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00365-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00365-8)

Engelman, J.A., Zhang, X.L., Lisanti, M.P., 1998. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett.* 436, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01134-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01134-X)

Eriksen, J.G., Maare, C., Johansen, J., Primdahl, H., Evensen, J.F., Kristensen, C.A.,

Andersen, L.J., Overgaard, J., 2014. Evaluation of the EGFR-Inhibitor Zalutumumab Given With Primary Curative (Chemo)radiation Therapy to Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Results of the DAHANCA 19 Randomized Phase 3 Trial: Definitive Management of Head-and-Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 88, 465. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.11.021>

European Head & Neck Society, 2022. The European Head and Neck Society (EHNS): A True Multidisciplinary Platform for Head and Neck Oncology [06.20.2022]. URL <https://www.ehns.org/site/about-us/11-about-ehns/205-introduction.html>.

European Head and Neck Society, 2022. Données sur le cancer des VADS - Make Sense Campaign [06.20.2022]. Make Sense Campaign. URL <https://makesensecampaign.eu/fr/donnees-sur-le-cancer-des-vads/cancer-resources/>

F

Faber, A., Barth, C., Hörmann, K., Kassner, S., Schultz, J.D., Sommer, U., Stern-Straeter, J., Thorn, C., Goessler, U.R., 2011. CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 26, 321–326. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1322>

Fantin, V.R., St-Pierre, J., Leder, P., 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425–434. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>

Fayette, J., Fontaine-Delaruelle, C., Ambrun, A., Daveau, C., Poupart, M., Ramade, A., Zrounba, P., Neidhardt, E.-M., Péron, J., Diallo, A., Céruse, P., 2016. Neoadjuvant modified TPF (docetaxel, cisplatin, fluorouracil) for patients unfit to standard TPF in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: a study of 48 patients. *Oncotarget* 7, 37297–37304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8934>

Feinstein, T.M., Raez, L.E., Rajasenan, K.K., Gibson, M.K., Savvides, P., Karamouzis, M.V., Garg, N., Johnson, R., Branstetter, B.F., Argiris, A.E., 2008. Pemetrexed (P) and bevacizumab (B) in patients (pts) with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): updated results of a phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 26, 6069–6069. https://doi.org/10.1200/jco.2008.26.15_suppl.6069

Felicetti, F., Parolini, I., Bottero, L., Fecchi, K., Errico, M.C., Raggi, C., Biffoni, M., Spadaro, F., Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Carè, A., 2009. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *Int. J. Cancer* 125, 1514–1522. <https://doi.org/10.1002/ijc.24451>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor,

- A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferlito, A., Shaha, A.R., Silver, C.E., Rinaldo, A., Mondin, V., 2001. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J. Oto-Rhino-Laryngol. Its Relat. Spec.* 63, 202–207. <https://doi.org/10.1159/000055740>
- Ferris, R.L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A.D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E.E., Even, C., Worden, F., Saba, N.F., Iglesias Docampo, L.C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., Geese, W.J., Kopit, J., Shaw, J.W., Gillison, M.L., 2016. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* 375, 1856–1867. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>
- Ferris, R.L., Hunt, J.L., Ferrone, S., 2005. Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I Defects in Head and Neck Cancer: Molecular Mechanisms and Clinical Significance. *Immunol. Res.* 33, 113–134. <https://doi.org/10.1385/IR:33:2:113>
- Ferris, R.L., Lenz, H.-J., Trotta, A.M., García-Foncillas, J., Schulten, J., Audhuy, F., Merlano, M., Milano, G., 2018. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.008>
- Ferris, R.L., Whiteside, T.L., Ferrone, S., 2006. Immune Escape Associated with Functional Defects in Antigen-Processing Machinery in Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 3890–3895. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2750>
- Figueiredo, R.A. de O., Weiderpass, E., Tajara, E.H., Ström, P., Carvalho, A.L., de Carvalho, M.B., Kanda, J.L., Moyses, R.A., Wünsch-Filho, V., 2016. Diabetes mellitus, metformin and head and neck cancer. *Oral Oncol.* 61, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.08.006>
- Firth, J.D., Ebert, B.L., Ratcliffe, P.J., 1995. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 270, 21021–21027. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21021>
- Fondation contre le Cancer, 2022. Dysplasie | Lexique | Fondation contre le Cancer [05.30.2022]. URL <https://www.cancer.be/lexique/d/dysplasie>
- Freedman, N.D., Park, Y., Subar, A.F., Hollenbeck, A.R., Leitzmann, M.F., Schatzkin, A., Abnet, C.C., 2008. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United

States prospective cohort study. *Int. J. Cancer* 122, 2330–2336. <https://doi.org/10.1002/ijc.23319>

Fridolfsson, H.N., Roth, D.M., Insel, P.A., Patel, H.H., 2014. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J.* 28, 3823–3831. <https://doi.org/10.1096/fj.14-252320>

Fumagalli, I., Dugue, D., Bibault, J.E., Clémenson, C., Vozenin, M.C., Mondini, M., Deutsch, E., 2015. Cytotoxic effect of lapatinib is restricted to human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *OncoTargets Ther.* 8, 335–345. <https://doi.org/10.2147/OTT.S68235>

Fung, S.Y.H., Lam, J.W.K., Chan, K.C.A., 2016. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chin. Clin. Oncol.* 5, 18–18. <https://doi.org/10.21037/cco.2016.03.07>

Furuya, D., Tsuji, N., Yagihashi, A., Watanabe, N., 2005. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity. *Exp. Cell Res.* 307, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.023>

Fury, M.G., Lee, N.Y., Sherman, E., Lisa, D., Kelly, K., Lipson, B., Carlson, D., Stambuk, H., Haque, S., Shen, R., Kraus, D., Shah, J., Pfister, D.G., 2012. A phase 2 study of bevacizumab with cisplatin plus intensity-modulated radiation therapy for stage III/IVB head and neck squamous cell cancer. *Cancer* 118, 5008–5014. <https://doi.org/10.1002/cncr.27498>

G

Galbiati, F., Volonté, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P.G., Zhu, L., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., 2001. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 2229–2244. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2229>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.-M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele,

N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkentin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B.R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Galzi, J.-L., 2021. Ontologie et état des lieux de la recherche sur les organoïdes en France.

Gao, M., Jiang, X., 2018. To eat or not to eat—the metabolic flavor of ferroptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 51, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.11.001>

Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., Jiang, X., 2016. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res.* 26, 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>

Gargalovic, P., Dory, L., 2003. Cellular apoptosis is associated with increased caveolin-1 expression in macrophages. *J. Lipid Res.* 44, 1622–1632. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300140-JLR200>

Geiger, J.L., Bauman, J.E., Gibson, M.K., Gooding, W.E., Varadarajan, P., Kotsakis, A., Martin, D., Gutkind, J.S., Hedberg, M.L., Grandis, J.R., Argiris, A., 2016. Phase II trial of everolimus in patients with previously treated recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 38, 1759–1764. <https://doi.org/10.1002/hed.24501>

Geoffrois, L., Martin, L., Garaud, P., De Raucourt, D., Miny, J., Maingon, P., Lafond, C.,

Tuchais, C., Sire, C., Babin, E., Coutte, A., Tao, Y., Rolland, F., Girard-Calais, M.H., Bourhis, J., 2016. Induction docetaxel platinum 5-FU (TPF) followed by cetuximab-radiotherapy (cetux-RT) versus concurrent chemo-radiotherapy (CT/RT) in patients with N2b/c-N3 non operated stage III-IV squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN): Results of the GORTEC 2007-02 phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 34, 6000–6000. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.6000

Gilbert, J., Schell, M.J., Zhao, X., Murphy, B., Tanvetyanon, T., Leon, M.E., Neil Hayes, D., Haigentz, M., Saba, N., Nieva, J., Bishop, J., Sidransky, D., Ravi, R., Bedi, A., Chung, C.H., 2015. A randomized phase II efficacy and correlative studies of cetuximab with or without sorafenib in recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 51, 376–382. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.12.011>

Goel, B., Tiwari, A.K., Pandey, R.K., Singh, A.P., Kumar, S., Sinha, A., Jain, S.K., Khattri, A., 2022. Therapeutic approaches for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma-An update on clinical trials. *Transl. Oncol.* 21, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101426>

Goetz, J.G., Lajoie, P., Wiseman, S.M., Nabi, I.R., 2008. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 715–735. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9160-9>

Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., Cerezo, A., Klein-Szanto, A.J.P., Garcia, R., Keely, P.J., Sánchez-Mateos, P., Cukierman, E., Del Pozo, M.A., 2011. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146, 148–163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.040>

Grandis, J.R., Twardy, D.J., 1993a. TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 17F, 188–191. <https://doi.org/10.1002/jcb.240531027>

Grandis, J.R., Twardy, D.J., 1993b. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 53, 3579–3584.

Granville, C.A., Warfel, N., Tsurutani, J., Hollander, M.C., Robertson, M., Fox, S.D., Veenstra, T.D., Issaq, H.J., Linnoila, R.I., Dennis, P.A., 2007. Identification of a highly effective rapamycin schedule that markedly reduces the size, multiplicity, and phenotypic progression of tobacco carcinogen-induced murine lung tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 2281–2289. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2570>

Greco, G., Catanzaro, E., Fimognari, C., 2021. Natural Products as Inducers of Non-

Canonical Cell Death: A Weapon against Cancer. *Cancers* 13, 304. <https://doi.org/10.3390/cancers13020304>

Grimm, M., Cetindis, M., Lehmann, M., Biegner, T., Munz, A., Teriete, P., Kraut, W., Reinert, S., 2014. Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis - indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? *J. Transl. Med.* 12, 208. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-208>

Grünwald, V., Keilholz, U., Boehm, A., Guntinas-Lichius, O., Hennemann, B., Schmoll, H.J., Ivanyi, P., Abbas, M., Lehmann, U., Koch, A., Karch, A., Zörner, A., Gauler, T.C., 2015. TEMHEAD: a single-arm multicentre phase II study of temsirolimus in platin- and cetuximab refractory recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) of the German SCCHN Group (AIO). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 561–567. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu571>

Gschwind, A., Fischer, O.M., Ullrich, A., 2004. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 361–370. <https://doi.org/10.1038/nrc1360>

Gu, D., Li, H., Wang, Z., Chen, Q., Jiang, J., Zhu, H., 2007. Caveolin-1 Inhibits the Growth of Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Down Regulates EGFR-MAPKs Signaling Pathway. *The Laryngoscope* 117, 1782–1789. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e31811edd31>

Gu, X., Reagan, A.M., McClellan, M.E., Elliott, M.H., 2017. Caveolins and caveolae in ocular physiology and pathophysiology. *Prog. Retin. Eye Res.* 56, 84–106. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.09.005>

Guha, N., Boffetta, P., Wunsch Filho, V., Eluf Neto, J., Shangina, O., Zaridze, D., Curado, M.P., Koifman, S., Matos, E., Menezes, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Fernandez, L., Mates, D., Daudt, A.W., Lissowska, J., Dikshit, R., Brennan, P., 2007. Oral Health and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck and Esophagus: Results of Two Multicentric Case-Control Studies. *Am. J. Epidemiol.* 166, 1159–1173. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm193>

Guigay, J., Aupérin, A., Fayette, J., Saada-Bouزيد, E., Lafond, C., Taberna, M., Geoffrois, L., Martin, L., Capitain, O., Cupissol, D., Castanie, H., Vansteene, D., Schafhausen, P., Johnson, A., Even, C., Sire, C., Duplomb, S., Evrard, C., Delord, J.-P., Laguerre, B., Zanetta, S., Chevassus-Clément, C., Frasin, A., Louat, F., Sinigaglia, L., Keilholz, U., Bourhis, J., Mesia, R., Baba-Hamed, N., Babin, E., Bera, G., Betrian-Lagarde, S., Blot, E., Bompas, E., Borel, C., Boucekoua, M., Moal, L.B.L., Bruyas, A., Calais, G., Carpiuc, I., Chapet, S., Chatellier, T., Chauffert, B., Cheli, S., Clatot, F., Cojocarasu, O., Cornelly, A., Coutte, A., Dalloz, P.,

Darloy, F., Delhommeau, M., Raucourt, D.D., Debelleix, C., Debourdeau, P., Dillies-Legrain, A.F., Do, P., Dubos-Arvis, C., Ducoulombier, A., Kouri, C.E., Falkowski, S., Ferrand, F.-R., Gatineau, M., Gervais, R., Gras, L., Guillet, P., Hasbini, A., Henault, S., Gomez, R.G.H., Huguet, F., Kaminsky, M.C., Lagrange, A., Lavau-Denes, S., Caer, H.L., Foll, C.L., Lefebvre, G., Linot, B., Lopez, Q., Lortholary, A., Matias, M., Mayache-Badis, L., Minne, F., Mollon, D., Neidhardt, E.M., Pavillet, J., Peyrade, F., Pointreau, Y., Ramee, J.-F., Rauche, C., Richard, S., Rizzo, C., Rolland, F., Schlurmann, F., Stefani, L., Tassy, L., Tazi, Y., Thery, J.-C., Zein, F.T.E., Toullec, C., Tourani, J.-M., Toussaint, P., Vanbockstael, J., Vauleon, E., Viret, F., Waler, S., Atzpodien, J., Behrens, C., Busch, C.J., Dietz, A., Feldmann, G., Fietkau, R., Granizka, T., Grewe, J., Guntinas-Lichinus, O., Hadler-Mikesch, K., Hahn, D., Inhestern, J., Kellner, K., Klinghammer, K., Kronenberger, R., Luedtke-Heckenkamp, K., Ochsenreither, S., Otremba, B., Peuker, C.A., Pirlich, M., Rothmann, F., Tometten, M., Wohlfarth, S., Zebralla, V., Zipfel, M., Klein, J.C.A., Arrazubi, V., Daroqui, J.C., Castelo, B., Cirauqui, B.C., Hernandez, J.J.C., Gallego, O., Docampo, L.C.I., Pousa, A.L., Prado, M.M.D., Martinez-Trufero, J., Borgonon, M.P., Ruiz, E.P., Garcia, V.Q., Casadevall, J.R., Fernandez, S.V., 2021. Cetuximab, docetaxel, and cisplatin versus platinum, fluorouracil, and cetuximab as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous-cell carcinoma (GORTEC 2014-01 TPExtreme): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 22, 463–475. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30755-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30755-5)

Guihard, S., Jung, A.-C., Noël, G., 2012. Carcinomes épidermoïdes oropharyngés liés à l'infection par les papillomavirus humains de haut risque oncogénique : aspects cliniques, biologiques et perspectives thérapeutiques. *Cancer/Radiothérapie, Dossier "Radiobiologie"* (2e partie), coordonné par Eric Deutsch 16, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2011.11.001>

Guizard, A.-V., Lapôtre-Ledoux, B., Velten, M., Lecoffe, C., Lafay, L., Coureau, G., 2020. *Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 – Lèvre, bouche, pharynx.* Boulogne-Billancourt : Institut national du cancer 12.

Gulati, S., Desai, J., Palackdharry, S.M., Morris, J.C., Zhu, Z., Jandarov, R., Riaz, M.K., Takiar, V., Mierzwa, M., Gutkind, J.S., Molinolo, A., Desai, P.B., Sadraei, N.H., Wise-Draper, T.M., 2020. Phase 1 dose-finding study of metformin in combination with concurrent cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell cancer. *Cancer* 126, 354–362. <https://doi.org/10.1002/cncr.32539>

H

Ha, P.K., Chang, S.S., Glazer, C.A., Califano, J.A., Sidransky, D., 2009. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 45, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.015>

Hachet-Haas, M., Balabanian, K., Rohmer, F., Pons, F., Franchet, C., Lecat, S., Chow, K.Y.C., Dagher, R., Gizzi, P., Didier, B., Lagane, B., Kellenberger, E., Bonnet, D., Baleux, F., Haiech, J., Parmentier, M., Frossard, N., Arenzana-Seisdedos, F., Hibert, M., Galzi, J., 2008. Small Neutralizing Molecules to Inhibit Actions of the Chemokine CXCL12 *. *J. Biol. Chem.* 283, 23189–23199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803947200>

Hadad, S., Iwamoto, T., Jordan, L., Purdie, C., Bray, S., Baker, L., Jellema, G., Deharo, S., Hardie, D.G., Pusztai, L., Moulder-Thompson, S., Dewar, J.A., Thompson, A.M., 2011. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 783–794. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1612-1>

Han, F., Gu, D., Chen, Q., Zhu, H., 2009. Caveolin-1 acts as a tumor suppressor by down-regulating epidermal growth factor receptor-mitogen-activated protein kinase signaling pathway in pancreatic carcinoma cell lines. *Pancreas* 38, 766–774. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181b2bd11>

Han, F., Zhang, J., Shao, J., Yi, X., 2014. Caveolin-1 promotes an invasive phenotype and predicts poor prognosis in large cell lung carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 210, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.04.010>

Haute Autorité de Santé, 2019. Cancer : recherche d'un déficit en enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) avant chimiothérapie [08.11.2022]. URL https://www.has-sante.fr/jcms/c_2966449/fr/cancer-recherche-d-un-deficit-en-enzyme-dihydropyrimidine-deshydrogenase-dpd-avant-chimiotherapie

Haute Autorité de Santé (HAS), 2009. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique - Cancer des voies aérodigestives supérieures. GUIDE - AFFECTION LONGUE DURÉE. [05.26.2022]. URL https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj5r4Hsou_5AhW__bsIHeqNCFsQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fhas-sante.fr%2Fjcms%2Fc_892158%2Fen%2Fald-n-30-guide-medecin-sur-le-cancer-des-voies-aero-digestives-superieures&usg=AOvVaw2sBIVCW1V_qHSLoko6jT0e

He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P.C., Dong, J., Remmenga, S.W., Rodabaugh, K.J., Zhou, J., Lambert, P.F., Yang, P., Davis, J.S., Wang, C., 2015. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Mol. Med.* 7, 1426–1449. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404976>

He, M., Jin, Q., Chen, C., Liu, Y., Ye, X., Jiang, Y., Ji, F., Qian, H., Gan, D., Yue, S., Zhu, W., Chen, T., 2019. The miR-186-3p/EREG axis orchestrates tamoxifen resistance and aerobic glycolysis in breast cancer cells. *Oncogene* 38, 5551–5565. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0817-3>

Hecht, S.S., 1998. Biochemistry, Biology, and Carcinogenicity of Tobacco-Specific N-Nitrosamines. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 559–603. <https://doi.org/10.1021/tx980005y>

Hehlgans, S., Eke, I., Storch, K., Haase, M., Baretton, G.B., Cordes, N., 2009. Caveolin-1 mediated radioresistance of 3D grown pancreatic cancer cells. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 92, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.07.004>

Hennessey, P.T., Westra, W.H., Califano, J.A., 2009. Human Papillomavirus and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Dent. Res.* 88, 300–306. <https://doi.org/10.1177/0022034509333371>

Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Sugiyama, M., Sakai, E., Uchiyama, T., Suzuki, K., Iida, H., Sakamoto, Y., Yoneda, K., Koide, T., Tokoro, C., Abe, Y., Inamori, M., Nakagama, H., Nakajima, A., 2010. Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-term Clinical Trial. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 3, 1077–1083. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0186>

Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I.S., Jäättelä, M., 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol. Cell* 25, 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.009>

Huang, Y., Ognjenovic, J., Karandur, D., Miller, K., Merk, A., Subramaniam, S., Kuriyan, J., 2021. A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor. *eLife* 10, e73218. <https://doi.org/10.7554/eLife.73218>

Hulit, J., Bash, T., Fu, M., Galbiati, F., Albanese, C., Sage, D.R., Schlegel, A., Zhurinsky, J., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A., Lisanti, M.P., Pestell, R.G., 2000. The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 275, 21203–21209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000321200>

Humans, I.W.G. on the E. of C.R. to, 2004. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking.

International Agency for Research on Cancer.

Hung, K.-F., Lin, S.-C., Liu, C.-J., Chang, C.-S., Chang, K.-W., Kao, S.-Y., 2003. The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* 32, 461–467. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2003.00185.x>

Hynes, N.E., Lane, H.A., 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5, 341–354. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>

I

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), 2019. Les principes de la radiothérapie [06.06.2022]. URL <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/exposition-patients-sante-radioprotection/radiotherapie/radiotherapie-cancer/Pages/1-radiotherapie-principes.aspx>

Institut National de la Statistique et des études économiques, 2016. Définition - Taux d'incidence | Insee [05.19.2022]. URL <https://www.insee.fr/fr/metadonnees/definition/c1060>

Institut National du Cancer, 2022. Le Plan cancer 2003-2007 [08.21.2022]. URL <https://www.e-cancer.fr/Institut-national-du-cancer/Strategie-de-lutte-contre-les-cancers-en-France/Les-Plans-cancer/Le-Plan-cancer-2003-2007>

Institut National du Cancer, 2018. Papillomavirus et cancer. Fiches repère / Dépistage 8. [06.18.2022]. URL

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi_puqbo-_5AhUMgv0HHQIOBi4QFnoECAoQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.e-cancer.fr%2FExpertises-et-publications%2FCatalogue-des-publications%2FPapillomavirus-et-cancer&usg=AOvVaw3dUj41RXVio74zJS2CBKgE

Institut National du Cancer, 2011. La situation du cancer en France en 2011. Rapports & synthèses. [06.18.2022]. URL

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi_m-Cwo-_5AhVRw4UKHQfHB5kQFnoECAcQAQ&url=http%3A%2F%2Feduscol.education.fr%2Fsti%2Fsites%2Feduscol.education.fr.sti%2Ffiles%2Fressources%2Fpedagogiques%2F305%2F305-cancer-france-2011.pdf&usg=AOvVaw2RLeS7w83iLZ22BegPCD9r

International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2022. Cancer today

[08.09.2022]. URL <http://gco.iarc.fr/today/home>

Ito, T., Fujieda, S., Tsuzuki, H., Sunaga, H., Fan, G., Sugimoto, C., Fukuda, M., Saito, H., 1999. Decreased expression of Bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 140, 81–91. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00055-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00055-5)

J

Järvinen, A.-K., Autio, R., Haapa-Paananen, S., Wolf, M., Saarela, M., Grénman, R., Leivo, I., Kallioniemi, O., Mäkitie, A.A., Monni, O., 2006. Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses. *Oncogene* 25, 6997–7008. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209690>

Jéhannin-Ligier, K., Belot, A., Guizard, A.-V., Bossard, N., Launoy, G., Uhry, Z., the FRANCIM network, 2017. Incidence trends for potentially human papillomavirus-related and -unrelated head and neck cancers in France using population-based cancer registries data: 1980-2012: Incidence trends for potentially human papillomavirus-related and -unrelated head and neck cancers in France. *Int. J. Cancer* 140, 2032–2039. <https://doi.org/10.1002/ijc.30631>

Jethwa, A.R., Khariwala, S.S., 2017. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 36, 411–423. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9689-6>

Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S.-J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., Gu, W., 2015. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* 520, 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>

Jimeno, A., Posner, M.R., Wirth, L.J., Saba, N.F., Cohen, R.B., Popa, E.C., Argiris, A., Grossmann, K.F., Sukari, A., Wilson, D., Zhang, X., Sun, J., Glasser, C., Attie, K.M., Sherman, M.L., Pandya, S.S., Weiss, J., 2016. A phase 2 study of dalantercept, an activin receptor-like kinase-1 ligand trap, in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 122, 3641–3649. <https://doi.org/10.1002/cncr.30317>

Job, S., de Reyniès, A., Heller, B., Weiss, A., Guérin, E., Macabre, C., Ledrappier, S., Bour, C., Wasylyk, C., Etienne-Selloum, N., Brino, L., Gaidon, C., Wasylyk, B., Jung, A.C., 2019. Preferential Response of Basal-Like Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines to EGFR-Targeted Therapy Depending on EREG-Driven Oncogenic Addiction. *Cancers* 11, 795. <https://doi.org/10.3390/cancers11060795>

Johnson, D.E., Burtneis, B., Leemans, C.R., Lui, V.W.Y., Bauman, J.E., Grandis, J.R., 2020.

Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 6, 92. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>

Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., Venema, R.C., 1997. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 18522–18525. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18522>

Jung, A.C., Ray, A.-M., Ramolu, L., Macabre, C., Simon, F., Noulet, F., Blandin, A.-F., Renner, G., Lehmann, M., Choulier, L., Kessler, H., Abecassis, J., Dontenwill, M., Martin, S., 2015. Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties. *Oncotarget* 6, 41884–41901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6099>

Jung, K.H., LoRusso, P., Burris, H., Gordon, M., Bang, Y.-J., Hellmann, M.D., Cervantes, A., Ochoa de Olza, M., Marabelle, A., Hodi, F.S., Ahn, M.-J., Emens, L.A., Barlesi, F., Hamid, O., Calvo, E., McDermott, D., Soliman, H., Rhee, I., Lin, R., Pourmohamad, T., Suchomel, J., Tshako, A., Morrissey, K., Mahrus, S., Morley, R., Pirzkall, A., Davis, S.L., 2019. Phase I Study of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Navoximod (GDC-0919) Administered with PD-L1 Inhibitor (Atezolizumab) in Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 3220–3228. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2740>

K

Kalyankrishna, S., Grandis, J.R., 2006. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 2666–2672. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.8306>

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507–1513. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>

Kang, J., Park, J.H., Lee, H.J., Jo, U., Park, J.K., Seo, J.H., Kim, Y.H., Kim, I., Park, K.H., 2016. Caveolin-1 Modulates Docetaxel-Induced Cell Death in Breast Cancer Cell Subtypes through Different Mechanisms. *Cancer Res. Treat.* 48, 715–726. <https://doi.org/10.4143/crt.2015.227>

Keck, M.K., Zuo, Z., Khattri, A., Stricker, T.P., Brown, C.D., Imanguli, M., Rieke, D., Endhardt, K., Fang, P., Brägelmann, J., DeBoer, R., El-Dinali, M., Aktolga, S., Lei, Z., Tan, P., Rozen, S.G., Salgia, R., Weichselbaum, R.R., Lingen, M.W., Story, M.D., Ang, K.K.,

- Cohen, E.E.W., White, K.P., Vokes, E.E., Seiwert, T.Y., 2015. Integrative Analysis of Head and Neck Cancer Identifies Two Biologically Distinct HPV and Three Non-HPV Subtypes. *Clin. Cancer Res.* 21, 870–881. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2481>
- Ketteler, J., Klein, D., 2018. Caveolin-1, cancer and therapy resistance. *Int. J. Cancer* 143, 2092–2104. <https://doi.org/10.1002/ijc.31369>
- Khariwala, S.S., Ma, B., Ruszczak, C., Carmella, S.G., Lindgren, B., Hatsukami, D.K., Hecht, S.S., Stepanov, I., 2017. High Level of Tobacco Carcinogen–Derived DNA Damage in Oral Cells Is an Independent Predictor of Oral/Head and Neck Cancer Risk in Smokers. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 10, 507–513. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-17-0140>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.-L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kisoda, S., Mouri, Y., Kitamura, N., Yamamoto, T., Miyoshi, K., Kudo, Y., 2022. The role of partial-EMT in the progression of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Oral Biosci.* 64, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.job.2022.02.004>
- Komurasaki, T., Toyoda, H., Uchida, D., Morimoto, S., 1997. Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene* 15, 2841–2848. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201458>
- Kumar, D., 2017. Regulation of glycolysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Postdoc J. J. Postdr. Res. Postdr. Aff.* 5, 14–28.
- Kwon, Y., Kim, M., Jung, H.S., Kim, Y., Jeoung, D., 2019. Targeting Autophagy for Overcoming Resistance to Anti-EGFR Treatments. *Cancers* 11, 1374. <https://doi.org/10.3390/cancers11091374>

∟

- Laban, S., Atanackovic, D., Luetkens, T., Knecht, R., Busch, C.-J., Freytag, M., Spagnoli, G., Ritter, G., Hoffmann, T.K., Knuth, A., Sauter, G., Wilczak, W., Blessmann, M., Borgmann, K., Muenscher, A., Clauditz, T.S., 2014. Simultaneous cytoplasmic and nuclear protein expression of melanoma antigen-A family and NY-ESO-1 cancer-testis antigens represents an independent marker for poor survival in head and neck cancer. *Int. J. Cancer* 135, 1142–1152. <https://doi.org/10.1002/ijc.28752>
- Laban, S., Gangkofner, D.S., Holzinger, D., Schroeder, L., Eichmüller, S.B., Zörnig, I., Jäger,

D., Wichmann, G., Dietz, A., Broglie, M.A., Herold-Mende, C.C., Dyckhoff, G., Boscolo-Rizzo, P., Ezić, J., Marienfeld, R., Möller, P., Kraus, J.M., Völkel, G., Kestler, H.A., Brunner, C., Schuler, P.J., Wigand, M.C., Theodoraki, M.-N., Doescher, J., Hoffmann, T.K., Pawlita, M., Waterboer, T., Butt, J., 2019. Antibody Responses to Cancer Antigens Identify Patients with a Poor Prognosis among HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 7405–7412. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1490>

Laban, S., Steinmeister, L., Gleißner, L., Grob, T.J., Grénman, R., Petersen, C., Gal, A., Knecht, R., Dikomey, E., Kriegs, M., 2013. Sorafenib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to ionizing radiation. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 109, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.07.003>

Lacko, M., Braakhuis, B.J.M., Sturgis, E.M., Boedeker, C.C., Suárez, C., Rinaldo, A., Ferlito, A., Takes, R.P., 2014. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 89, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.09.034>

Leemans, C.R., Snijders, P.J.F., Brakenhoff, R.H., 2018. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 18, 269–282. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>

Lenarduzzi, M., Hui, A.B.Y., Yue, S., Ito, E., Shi, W., Williams, J., Bruce, J., Sakemura-Nakatsugawa, N., Xu, W., Schimmer, A., Liu, F.-F., 2013. Hemochromatosis Enhances Tumor Progression via Upregulation of Intracellular Iron in Head and Neck Cancer. *PLoS ONE* 8, e74075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074075>

Li, H.-Y., Qu, C., Zhang, Y.-J., Sun, J., Han, C., Liu, J., Zou, W., 2017. Caveolin-1 is involved in DNA damage and repair signaling in X-irradiated Chang liver cells. *Sheng Li Xue Bao* 69, 759–766.

Li, J., Hassan, G.S., Williams, T.M., Minetti, C., Pestell, R.G., Tanowitz, H.B., Frank, P.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2005. Loss of caveolin-1 causes the hyper-proliferation of intestinal crypt stem cells, with increased sensitivity to whole body gamma-radiation. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1817–1825. <https://doi.org/10.4161/cc.4.12.2199>

Li, S., Mai, Z., Gu, W., Ogbuehi, A.C., Acharya, A., Pelekos, G., Ning, W., Liu, X., Deng, Y., Li, H., Lethaus, B., Savkovic, V., Zimmerer, R., Ziebolz, D., Schmalz, G., Wang, H., Xiao, H., Zhao, J., 2021. Molecular Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma Based on Immunosuppression Genes Using a Deep Learning Approach. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 687245. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.687245>

Li, S., Schmitz, K.R., Jeffrey, P.D., Wiltzius, J.J.W., Kussie, P., Ferguson, K.M., 2005. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer*

Cell 7, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.003>

Li, S., Seitz, R., Lisanti, M.P., 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 3863–3868.

Li, S.-J., Guo, W., Ren, G.-X., Huang, G., Chen, T., Song, S.-L., 2008. Expression of Glut-1 in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas, and compared with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulation in positron emission tomography. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 46, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2007.11.003>

Li, X., Pan, X., Zhang, H., Lei, D., Liu, D., Xu, F., Luan, X., 2008. Overexpression of cFLIP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinicopathologic correlations. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 609–615. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0325-7>

Li, Y.-C., Cheng, A.-J., Lee, L.-Y., Huang, Y.-C., Chang, J.T.-C., 2019. Multifaceted Mechanisms of Areca Nuts in Oral Carcinogenesis: the Molecular Pathology from Precancerous Condition to Malignant Transformation. *J. Cancer* 10, 4054–4062. <https://doi.org/10.7150/jca.29765>

Li, Z., Wang, N., Huang, C., Bao, Y., Jiang, Y., Zhu, G., 2017. Downregulation of caveolin-1 increases the sensitivity of drug-resistant colorectal cancer HCT116 cells to 5-fluorouracil. *Oncol. Lett.* 13, 483–487. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5390>

Ligue contre le Cancer, 2009. Les cancers des voies aérodigestives supérieures 36.

Lin, L., Baehrecke, E.H., 2015. Autophagy, cell death, and cancer. *Mol. Cell. Oncol.* 2, e985913. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.985913>

Lindqvist, L.M., Frank, D., McArthur, K., Dite, T.A., Lazarou, M., Oakhill, J.S., Kile, B.T., Vaux, D.L., 2018. Autophagy induced during apoptosis degrades mitochondria and inhibits type I interferon secretion. *Cell Death Differ.* 25, 784–796. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0017-z>

Liu, H., He, Z., von Rütte, T., Yousefi, S., Hunger, R.E., Simon, H.-U., 2013. Downregulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. *Sci. Transl. Med.* 5, 202ra123. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005864>

Liu, H., Scholz, C., Zang, C., Sefe, J.H., Habel, P., Regierer, A.-C., Schulz, C.-O., Possinger, K., Eucker, J., 2012. Metformin and the mTOR inhibitor everolimus (RAD001) sensitize breast cancer cells to the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs in vitro. *Anticancer Res.* 32, 1627–1637.

Liu, J.-P., Chen, W., Schwarzer, A.P., Li, H., 2010. Telomerase in cancer immunotherapy.

- Biochim. Biophys. Acta 1805, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.09.001>
- Liu, W.-R., Jin, L., Tian, M.-X., Jiang, X.-F., Yang, L.-X., Ding, Z.-B., Shen, Y.-H., Peng, Y.-F., Gao, D.-M., Zhou, J., Qiu, S.-J., Dai, Z., Fan, J., Shi, Y.-H., 2016. Caveolin-1 promotes tumor growth and metastasis via autophagy inhibition in hepatocellular carcinoma. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 40, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.017>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lu, H., Li, X., Lu, Y., Qiu, S., Fan, Z., 2016. ASCT2 (SLC1A5) is an EGFR-associated protein that can be co-targeted by cetuximab to sensitize cancer cells to ROS-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 381, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.020>
- Lu, T., Zhang, Z., Pan, X., Zhang, J., Wang, X., Wang, M., Li, H., Yan, M., Chen, W., 2022. Caveolin-1 promotes cancer progression via inhibiting ferroptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 51, 52–62. <https://doi.org/10.1111/jop.13267>
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., Hunter, T., 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4, 499–515. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00304-0)
- Luo, W.-R., Gao, F., Li, S.-Y., Yao, K.-T., 2012. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* 61, 1072–1081. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04350.x>
- Lupu-Plesu, M., Claren, A., Martial, S., N'Diaye, P.-D., Lebrigand, K., Pons, N., Ambrosetti, D., Peyrottes, I., Feuillade, J., Hérault, J., Dufies, M., Doyen, J., Pagès, G., 2017. Effects of proton versus photon irradiation on (lymph)angiogenic, inflammatory, proliferative and anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogenesis* 6, e354. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.56>

M

- Ma, S., Zhang, L., Ren, Y., Dai, W., Chen, T., Luo, L., Zeng, J., Mi, K., Lang, J., Cao, B., 2021. Epiregulin confers EGFR-TKI resistance via EGFR/ErbB2 heterodimer in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 40, 2596–2609. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01734-4>

Ma, W.W., Saif, M.W., El-Rayes, B.F., Fakih, M.G., Cartwright, T.H., Posey, J.A., King, T.R., von Borstel, R.W., Bamat, M.K., 2017. Emergency use of uridine triacetate for the prevention and treatment of life-threatening 5-fluorouracil and capecitabine toxicity. *Cancer* 123, 345–356. <https://doi.org/10.1002/cncr.30321>

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, 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. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J.A., Geneste, O., Kroemer, G., 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26, 2527–2539. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601689>

Majidpoor, J., Mortezaee, K., 2021. Steps in metastasis: an updated review. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 38, 3. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w>

Mäkitie, A.A., Almangush, A., Rodrigo, J.P., Ferlito, A., Leivo, I., 2019. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 41, 3712–3718. <https://doi.org/10.1002/hed.25872>

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., Morris, L.G., 2016. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 1, e89829. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829>

Marant-Micallef, C., Shield, K.D., Vignat, J., Hill, C., Rogel, A., Menvielle, G., Dossus, L., Ormsby, J.-N., Rehm, J., Rushton, L., Vineis, P., Parkin, M., Bray, F., Soerjomataram, I., 2018. Nombre et fractions de cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine en 2015 : résultats principaux. *Bull. Epidemiol. Hebd.* 2018;(21):432-42.

Marsh, D., Suchak, K., Moutasim, K.A., Vallath, S., Hopper, C., Jerjes, W., Upile, T., Kalavrezos, N., Violette, S.M., Weinreb, P.H., Chester, K.A., Chana, J.S., Marshall, J.F., Hart, I.R., Hackshaw, A.K., Piper, K., Thomas, G.J., 2011. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J. Pathol.* 223, 470–481. <https://doi.org/10.1002/path.2830>

Martin, S., Cosset, E.C., Terrand, J., Maglott, A., Takeda, K., Dontenwill, M., 2009. Caveolin-1 regulates glioblastoma aggressiveness through the control of alpha(5)beta(1) integrin expression and modulates glioblastoma responsiveness to SJ749, an alpha(5)beta(1) integrin antagonist. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 354–367. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.019>

Martin, S., Phillips, D.C., Szekely-Szucs, K., Elghazi, L., Desmots, F., Houghton, J.A., 2005. Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae. *Cancer Res.* 65, 11447–11458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1494>

Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2015. Caveolae and signalling in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 225–237. <https://doi.org/10.1038/nrc3915>

Martins, R.G., Parvathaneni, U., Bauman, J.E., Sharma, A.K., Raez, L.E., Papagikos, M.A., Yunus, F., Kurland, B.F., Eaton, K.D., Liao, J.J., Mendez, E., Futran, N., Wang, D.X., Chai, X., Wallace, S.G., Austin, M., Schmidt, R., Hayes, D.N., 2013. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 1415–1421. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3299>

Maruya, S., Issa, J.-P.J., Weber, R.S., Rosenthal, D.I., Haviland, J.C., Lotan, R., El-Naggar, A.K., 2004. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 3825–3830. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0370>

Masood, R., Hochstim, C., Cervenka, B., Zu, S., Baniwal, S.K., Patel, V., Kobiellak, A., Sinha, U.K., 2013. A novel orthotopic mouse model of head and neck cancer and lymph node metastasis. *Oncogenesis* 2, e68. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.33>

Masuelli, L., Budillon, A., Marzocchella, L., Mrozek, M.-A., Vitolo, D., Di Gennaro, E., Losito, S., Sale, P., Longo, F., Ionna, F., Lista, F., Muraro, R., Modesti, A., Bei, R., 2012. Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/ α - β catenins complex and multiple erbb receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Cell. Physiol.* 227, 3344–3353. <https://doi.org/10.1002/jcp.24034>

Mathupala, S.P., Rempel, A., Pedersen, P.L., 2001. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* 276, 43407–43412.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M108181200>

Mellanen, P., Minn, H., Grénman, R., Härkönen, P., 1994. Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int. J. Cancer* 56, 622–629. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910560503>

Memmott, R.M., Mercado, J.R., Maier, C.R., Kawabata, S., Fox, S.D., Dennis, P.A., 2010. Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 3, 1066–1076. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0055>

Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J., Huang, G., 2013. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 65, 904–910. <https://doi.org/10.1002/iub.1216>

Mitchell, T.C., Hamid, O., Smith, D.C., Bauer, T.M., Wasser, J.S., Olszanski, A.J., Luke, J.J., Balmanoukian, A.S., Schmidt, E.V., Zhao, Y., Gong, X., Maleski, J., Leopold, L., Gajewski, T.F., 2018. Epcadostat Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Solid Tumors: Phase I Results From a Multicenter, Open-Label Phase I/II Trial (ECHO-202/KEYNOTE-037). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 36, 3223–3230. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.9602>

Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>

Moreno-Vicente, R., Pavón, D.M., Martín-Padura, I., Català-Montoro, M., Díez-Sánchez, A., Quílez-Álvarez, A., López, J.A., Sánchez-Álvarez, M., Vázquez, J., Strippoli, R., Del Pozo, M.A., 2018. Caveolin-1 Modulates Mechanotransduction Responses to Substrate Stiffness through Actin-Dependent Control of YAP. *Cell Rep.* 25, 1622-1635.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.024>

Muller, D., Millon, R., Lidereau, R., Engelmann, A., Bronner, G., Flesch, H., Eber, M., Methlin, G., Abecassis, J., 1994. Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer. B. Oral Oncol.* 30B, 113–120. [https://doi.org/10.1016/0964-1955\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0964-1955(94)90062-0)

Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., Simons, K., 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10339–10343. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.22.10339>



Nam, H.Y., Han, M.W., Chang, H.W., Lee, Y.S., Lee, M., Lee, Hyang Ju, Lee, B.W., Lee, Hee Jin, Lee, K.E., Jung, M.K., Jeon, H., Choi, S.-H., Park, N.H., Kim, S.Y., Kim, S.W.,

2013. Radioresistant cancer cells can be conditioned to enter senescence by mTOR inhibition. *Cancer Res.* 73, 4267–4277. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3516>

Neiva, K.G., Zhang, Z., Miyazawa, M., Warner, K.A., Karl, E., 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. <https://doi.org/10.1593/neo.09266>

Nirmala, J.G., Lopus, M., 2020. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol. Toxicol.* 36, 145–164. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>

Nohata, N., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Mutallip, M., Fujimura, L., Yoshino, H., Kawakami, K., Chiyomaru, T., Enokida, H., Nakagawa, M., Okamoto, Y., Seki, N., 2011. Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 38, 209–217. https://doi.org/10.3892/ijo_00000840

Ogunsakin, A., Infield, J., Zuber, J., Solomon, S.S., 2018. Metformin Associated With Improved Outcomes in Diabetic Patients With Laryngeal and Oropharyngeal Carcinoma. *Am. J. Med. Sci.* 356, 574–575. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.09.002>

O

Onco Occitanie Réseau Régional de Cancérologie, 2020. ORL - CMF Référentiel Tête et Cou, 2020. [05.22.2022]. URL <https://www.onco-occitanie.fr/pro/article/publication-du-referentiel-regional-des-cancers-de-la-tete-et-du-cou>

Overmiller, A.M., McGuinn, K.P., Roberts, B.J., Cooper, F., Brennan-Crispi, D.M., Deguchi, T., Peltonen, S., James K., W., Mahoney, M.G., 2016. c-Src/Cav1-dependent activation of the EGFR by Dsg2. *Oncotarget* 7, 37536–37555. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7675>

P

Pai, S.I., Westra, W.H., 2009. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 49–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>

Partlová, S., Bouček, J., Kloudová, K., Lukešová, E., Zábrodský, M., Grega, M., Fučíková, J., Truxová, I., Tachezy, R., Špíšek, R., Fialová, A., 2015. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 4, e965570. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.965570>

Parton, R.G., del Pozo, M.A., 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 98–112. <https://doi.org/10.1038/nrm3512>

Parton, R.G., Simons, K., 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185–194. <https://doi.org/10.1038/nrm2122>

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>

Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.-H., Huang, P., 2006. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 4633–4646. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209597>

Peltanova, B., Raudenska, M., Masarik, M., 2019. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol. Cancer* 18, 63. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0983-5>

Pernicova, I., Korbonits, M., 2014. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 143–156. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>

Phoebe E. Fielding, *, Phuonglan Chau, ‡, Dong Liu, ‡, Thomas A. Spencer, † and, Christopher J. Fielding†, †, 2004. Mechanism of Platelet-Derived Growth Factor-Dependent Caveolin-1 Phosphorylation: Relationship to Sterol Binding and the Role of Serine-80†. *ACS Publ.* <https://doi.org/10.1021/bi035442c>

Pickup, M.W., Mouw, J.K., Weaver, V.M., 2014. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 15, 1243–1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>

Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Azevedo-Silva, J., Casal, M., Schmitt, F.C., Baltazar, F., 2012. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 127–139. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9428-1>

Pinheiro, C., Reis, R.M., Ricardo, S., Longatto-Filho, A., Schmitt, F., Baltazar, F., 2010. Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 427694. <https://doi.org/10.1155/2010/427694>

Pisani, P., Airoidi, M., Allais, A., Aluffi Valletti, P., Battista, M., Benazzo, M., Briatore, R., Cacciola, S., Cocuzza, S., Colombo, A., Conti, B., Costanzo, A., della Vecchia, L., Denaro, N., Fantozzi, C., Galizia, D., Garzaro, M., Genta, I., Iasi, G.A., Krengli, M., Landolfo, V., Lanza, G.V., Magnano, M., Mancuso, M., Maroldi, R., Masini, L., Merlano, M.C., Piemonte, M., Pisani, S., Prina-Mello, A., Prioglio, L., Ruggiu, M.G., Scasso, F., Serra, A., Valente, G.,

Zannetti, M., Zigliani, A., 2020. Metastatic disease in head & neck oncology. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 40, S1–S86. <https://doi.org/10.14639/0392-100X-suppl.1-40-2020>

Podar, K., Shringarpure, R., Tai, Y.-T., Simoncini, M., Sattler, M., Ishitsuka, K., Richardson, P.G., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., 2004. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Res.* 64, 7500–7506. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0124>

Poliaková, M., Aebersold, D.M., Zimmer, Y., Medová, M., 2018. The relevance of tyrosine kinase inhibitors for global metabolic pathways in cancer. *Mol. Cancer* 17, 27. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0798-9>

Posner, M.R., Hershock, D.M., Blajman, C.R., Mickiewicz, E., Winquist, E., Gorbounova, V., Tjulandin, S., Shin, D.M., Cullen, K., Ervin, T.J., Murphy, B.A., Raez, L.E., Cohen, R.B., Spaulding, M., Tishler, R.B., Roth, B., Viroglio, R. del C., Venkatesan, V., Romanov, I., Agarwala, S., Harter, K.W., Dugan, M., Cmelak, A., Markoe, A.M., Read, P.W., Steinbrenner, L., Colevas, A.D., Norris, C.M., Haddad, R.I., TAX 324 Study Group, 2007. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 1705–1715. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa070956>

Pulte, D., Brenner, H., 2010. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *The Oncologist* 15, 994–1001. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0289>

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., Deschler, D.G., Varvares, M.A., Mylvaganam, R., Rozenblatt-Rosen, O., Rocco, J.W., Faquin, W.C., Lin, D.T., Regev, A., Bernstein, B.E., 2017. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* 171, 1611-1624.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.044>

9

Quennet, V., Yaromina, A., Zips, D., Rosner, A., Walenta, S., Baumann, M., Mueller-Klieser, W., 2006. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 81, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2006.08.012>

Quest, A.F., Lobos-González, L., Nuñez, S., Sanhueza, C., Fernández, J.-G., Aguirre, A., Rodríguez, D., Leyton, L., Torres, V., 2013. The caveolin-1 connection to cell death and survival. *Curr. Mol. Med.* 13, 266–281. <https://doi.org/10.2174/156652413804810745>

R

- Raudenská, M., Balvan, J., Masařík, M., 2021. Cell death in head and neck cancer pathogenesis and treatment. *Cell Death Dis.* 12, 192. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03474-5>
- Ravid, D., Maor, S., Werner, H., Liscovitch, M., 2006. Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv. Enzyme Regul.* 46, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2006.01.022>
- Razani, B., Lisanti, M.P., 2001. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest.* 108, 1553–1561.
- Redon, R., Muller, D., Caulee, K., Wanherdrick, K., Abecassis, J., du Manoir, S., 2001. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res.* 61, 4122–4129.
- Ren, J.-H., He, W.-S., Nong, L., Zhu, Q.-Y., Hu, K., Zhang, R.-G., Huang, L.-L., Zhu, F., Wu, G., 2010. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 25, 75–80. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0701>
- Réseau régional de cancérologie Hauts-de-France, Agence régionale de santé (ARS) Hauts-de-France, 2019. Référentiel régional de prise en charge des cancers VADS - 2019. ONCO Hauts de France 86. [05.27.2022]. URL <https://www.onco-hdf.fr/actualite/referentiel-regional-de-prise-en-charge-des-cancers-vads-2019/>
- Reymond, N., d'Água, B.B., Ridley, A.J., 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 13, 858–870. <https://doi.org/10.1038/nrc3628>
- Riedel, F., Götte, K., Bergler, W., Rojas, W., Hörmann, K., 2000. Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer. *Head Neck* 22, 183–189. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0347\(200003\)22:2<183::aid-hed11>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0347(200003)22:2<183::aid-hed11>3.0.co;2-r)
- Rieth, M.D., Lee, J., Glover, K.J., 2012. Probing the caveolin-1 P132L mutant: Critical insights into its oligomeric behavior and structure. *Biochemistry* 51, 3911–3918. <https://doi.org/10.1021/bi3001853>
- Rikiishi, H., 2012. Autophagic action of new targeting agents in head and neck oncology. *Cancer Biol. Ther.* 13, 978–991. <https://doi.org/10.4161/cbt.21079>

- Risom, L., Møller, P., Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 592, 119–137. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012>
- Roberti, A., Valdes, A.F., Torrecillas, R., Fraga, M.F., Fernandez, A.F., 2019. Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. *Clin. Epigenetics* 11, 81. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0675-4>
- Rodriguez, D.A., Tapia, J.C., Fernandez, J.G., Torres, V.A., Muñoz, N., Galleguillos, D., Leyton, L., Quest, A.F.G., 2009. Caveolin-1-mediated suppression of cyclooxygenase-2 via a beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcriptional mechanism reduced prostaglandin E2 production and survivin expression. *Mol. Biol. Cell* 20, 2297–2310. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0939>
- Roh, J.-L., Kim, E.H., Jang, H.J., Park, J.Y., Shin, D., 2016. Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett.* 381, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.035>
- Romanowska, K., Sobecka, A., Rawłuszkó-Wieczorek, A.A., Suchorska, W.M., Golusiński, W., 2020. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Epigenetic Landscape. *Diagnostics* 11, 34. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010034>
- Rubinstein, A.D., Eisenstein, M., Ber, Y., Bialik, S., Kimchi, A., 2011. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 44, 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.014>

S

- Samanna, V., Ma, T., Mak, T. w., Rogers, M., Chellaiah, M. a., 2007. Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function. *J. Cell. Physiol.* 213, 710–720. <https://doi.org/10.1002/jcp.21137>
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W.K., Luna, A., La, K.C., Dimitriadoy, S., Liu, D.L., Kantheti, H.S., Saghafeinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M.H., Liang, W.-W., Foltz, S.M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., Ochoa, A., Gross, B., Gao, J., Zhang, H., Kundra, R., Kandoth, C., Bahceci, I., Dervishi, L., Dogrusoz, U., Zhou, W., Shen, H., Laird, P.W., Way, G.P., Greene, C.S., Liang, H., Xiao, Y., Wang, C., Iavarone, A., Berger, A.H., Bivona, T.G., Lazar, A.J., Hammer, G.D., Giordano, T., Kwong, L.N., McArthur, G., Huang, C., Tward, A.D., Frederick, M.J., McCormick, F., Meyerson, M., Cancer Genome Atlas Research Network, Van Allen, E.M., Cherniack, A.D., Ciriello, G.,

Sander, C., Schultz, N., 2018. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 173, 321-337.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>

Sapkota, A., Gajalakshmi, V., Jetly, D.H., Roychowdhury, S., Dikshit, R.P., Brennan, P., Hashibe, M., Boffetta, P., 2008. Indoor air pollution from solid fuels and risk of hypopharyngeal/laryngeal and lung cancers: a multicentric case-control study from India. *Int. J. Epidemiol.* 37, 321–328. <https://doi.org/10.1093/ije/dym261>

Sasahira, T., Kiritani, T., 2018. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E2413. <https://doi.org/10.3390/ijms19082413>

Sattler, U.G.A., Meyer, S.S., Quennet, V., Hoerner, C., Knoerzer, H., Fabian, C., Yaromina, A., Zips, D., Walenta, S., Baumann, M., Mueller-Klieser, W., 2010. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 94, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.11.007>

Savage, K., Lambros, M.B.K., Robertson, D., Jones, R.L., Jones, C., Mackay, A., James, M., Hornick, J.L., Pereira, E.M., Milanezi, F., Fletcher, C.D.M., Schmitt, F.C., Ashworth, A., Reis-Filho, J.S., 2007. Caveolin 1 Is Overexpressed and Amplified in a Subset of Basal-like and Metaplastic Breast Carcinomas: A Morphologic, Ultrastructural, Immunohistochemical, and In situ Hybridization Analysis. *Clin. Cancer Res.* 13, 90–101. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1371>

Scaltriti, M., Baselga, J., 2006. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin. Cancer Res.* 12, 5268–5272. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1554>

Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., Johnson, R.S., 2001. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3436–3444. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.10.3436-3444.2001>

Seiwert, T.Y., Burtness, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J.P., Heath, K., McClanahan, T., Luceford, J., Gause, C., Cheng, J.D., Chow, L.Q., 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. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30066-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30066-3)

Seiwert, T.Y., Fayette, J., Cupissol, D., Del Campo, J.M., Clement, P.M., Hitt, R., Degardin, M., Zhang, W., Blackman, A., Ehrnrooth, E., Cohen, E.E.W., 2014. A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 25, 1813–1820.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdu216>

Sekhar, S.C., Kasai, T., Satoh, A., Shigehiro, T., Mizutani, A., Murakami, H., El-Aarag, B.Y., Ds, S., Massaguer, A., de Llorens, R., Seno, M., 2013. Identification of Caveolin-1 as a Potential Causative Factor in the Generation of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer Cells. *J. Cancer* 4, 391–401. <https://doi.org/10.7150/jca.6470>

Semenza, G.L., 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.009>

Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.L., 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757–23763.

Seront, E., Boidot, R., Bouzin, C., Karroum, O., Jordan, B.F., Gallez, B., Machiels, J.-P., Feron, O., 2013. Tumour hypoxia determines the potential of combining mTOR and autophagy inhibitors to treat mammary tumours. *Br. J. Cancer* 109, 2597–2606. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.644>

Sethi, N., Wright, A., Wood, H., Rabbitts, P., 2014. MicroRNAs and head and neck cancer: Reviewing the first decade of research. *Eur. J. Cancer* 50, 2619–2635. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.07.012>

Shajahan, A.N., Wang, A., Decker, M., Minshall, R.D., Liu, M.C., Clarke, R., 2007. Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 282, 5934–5943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608857200>

Shan, L., Hao, Y., Wang, S., Korotcov, A., Zhang, R., Wang, T., Califano, J., Gu, X., Sridhar, R., Bhujwalla, Z.M., Wang, P.C., 2008. Visualizing Head and Neck Tumors in Vivo Using Near-Infrared Fluorescent Transferrin Conjugate. *Mol. Imaging* 7, 7290.2008.0006. <https://doi.org/10.2310/7290.2008.0006>

Shi, M., Cui, J., Du, J., Wei, D., Jia, Z., Zhang, J., Zhu, Z., Gao, Y., Xie, K., 2014. A novel KLF4/LDHA signaling pathway regulates aerobic glycolysis in and progression of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20, 4370–4380. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0186>

Shi, Y., Tan, S.-H., Ng, S., Zhou, J., Yang, N.-D., Koo, G.-B., McMahon, K.-A., Parton, R.G., Hill, M.M., Del Pozo, M.A., Kim, Y.-S., Shen, H.-M., 2015. Critical role of CAV1/caveolin-1 in cell stress responses in human breast cancer cells via modulation of lysosomal function and autophagy. *Autophagy* 11, 769–784. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034411>

Singh, B., Carpenter, G., Coffey, R.J., 2016. EGF receptor ligands: recent advances.

F1000Research 5, F1000 Faculty Rev-2270. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9025.1>

Smith, I.M., Glazer, C.A., Mithani, S.K., Ochs, M.F., Sun, W., Bhan, S., Vostrov, A., Abdullaev, Z., Lobanenkova, V., Gray, A., Liu, C., Chang, S.S., Ostrow, K.L., Westra, W.H., Begum, S., Dhara, M., Califano, J., 2009. Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testis antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. *PloS One* 4, e4961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004961>

Sobhakumari, A., Schickling, B.M., Love-Homan, L., Raeburn, A., Fletcher, E.V.M., Case, A.J., Domann, F.E., Miller, F.J., Simons, A.L., 2013. NOX4 mediates cytoprotective autophagy induced by the EGFR inhibitor erlotinib in head and neck cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 736–745. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.013>

Sotgia, F., Del Galdo, F., Casimiro, M.C., Bonuccelli, G., Mercier, I., Whitaker-Menezes, D., Daumer, K.M., Zhou, J., Wang, C., Katiyar, S., Xu, H., Bosco, E., Quong, A.A., Aronow, B., Witkiewicz, A.K., Minetti, C., Frank, P.G., Jimenez, S.A., Knudsen, E.S., Pestell, R.G., Lisanti, M.P., 2009. Caveolin-1^{-/-} Null Mammary Stromal Fibroblasts Share Characteristics with Human Breast Cancer-Associated Fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 174, 746–761. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080658>

Sterz, C.M., Kulle, C., Dakic, B., Makarova, G., Böttcher, M.C., Bette, M., Werner, J.A., Mandic, R., 2010. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol.* 46, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.11.011>

Stockwell, B.R., Friedmann Angeli, J.P., Bayir, H., Bush, A.I., Conrad, M., Dixon, S.J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S.K., Kagan, V.E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M.E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G.C., Park, J., Ran, Q., Rosenfeld, C.S., Salnikow, K., Tang, D., Torti, F.M., Torti, S.V., Toyokuni, S., Woerpel, K.A., Zhang, D.D., 2017. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 171, 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>

Sturgis, E.M., Castillo, E.J., Li, L., Zheng, R., Eicher, S.A., Clayman, G.L., Strom, S.S., Spitz, M.R., Wei, Q., 1999. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 20, 2125–2129. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.11.2125>

Su, S.-C., Lin, C.-W., Liu, Y.-F., Fan, W.-L., Chen, M.-K., Yu, C.-P., Yang, W.-E., Su, C.-W., Chuang, C.-Y., Li, W.-H., Chung, W.-H., Yang, S.-F., 2017. Exome Sequencing of Oral Squamous Cell Carcinoma Reveals Molecular Subgroups and Novel Therapeutic Opportunities. *Theranostics* 7, 1088–1099. <https://doi.org/10.7150/thno.18551>

Subramaniam, S., Balasundaram, V., Nithya, S., Kiran, P., 2015. Nimotuzumab with Induction Chemotherapy and Chemo-Radiation in Patients with Advanced Head and Neck Cancer. *J. Cancer Ther.* 6, 146–152. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.62016>

Sun, W., Liu, Y., Glazer, C.A., Shao, C., Bhan, S., Demokan, S., Zhao, M., Rudek, M.A., Ha, P.K., Califano, J.A., 2010. TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 857–866. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2604>

Sunaga, N., Miyajima, K., Suzuki, M., Sato, M., White, M.A., Ramirez, R.D., Shay, J.W., Gazdar, A.F., Minna, J.D., 2004. Different Roles for Caveolin-1 in the Development of Non-Small Cell Lung Cancer versus Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 64, 4277–4285. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3941>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

T

Tanaka, N., Osman, A.A., Takahashi, Y., Lindemann, A., Patel, A.A., Zhao, M., Takahashi, H., Myers, J.N., 2018. Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity. *Oral Oncol.* 87, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.10.018>

Tang, D., Kang, R., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., Kroemer, G., 2019. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 29, 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>

Tang, Y., Zeng, X., He, F., Liao, Y., Qian, N., Toi, M., 2012. Caveolin-1 is related to invasion, survival, and poor prognosis in hepatocellular cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 29, 977–984. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9900-5>

Tang, Z.-H., Cao, W.-X., Su, M.-X., Chen, X., Lu, J.-J., 2017. Osimertinib induces autophagy and apoptosis via reactive oxygen species generation in non-small cell lung cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 321, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.02.017>

Tao, X., Lu, Y., Qiu, S., Wang, Y., Qin, J., Fan, Z., 2017. AP1G1 is involved in cetuximab-mediated downregulation of ASCT2-EGFR complex and sensitization of human head and

neck squamous cell carcinoma cells to ROS-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 408, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.012>

Theodoraki, M.-N., Laban, S., Hoffmann, T.K., 2022. [Immunotherapy of head and neck cancer : Highlights of the ASCO and ESMO annual meetings 2021]. *HNO* 70, 271–277. <https://doi.org/10.1007/s00106-021-01142-w>

Thompson, T.C., Timme, T.L., Li, L., Goltsov, A., 1999. Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis* 233–237.

Timme, T.L., Goltsov, A., Tahir, S., Li, L., Wang, J., Ren, C., Johnston, R.N., Thompson, T.C., 2000. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 19, 3256–3265. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203654>

Torres, V.A., Tapia, J.C., Rodríguez, D.A., Párraga, M., Lisboa, P., Montoya, M., Leyton, L., Quest, A.F.G., 2006. Caveolin-1 controls cell proliferation and cell death by suppressing expression of the inhibitor of apoptosis protein survivin. *J. Cell Sci.* 119, 1812–1823. <https://doi.org/10.1242/jcs.02894>

Toyoda, H., Komurasaki, T., Ikeda, Y., Yoshimoto, M., Morimoto, S., 1995. Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS Lett.* 377, 403–407. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01403-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01403-9)

Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Morimoto, S., 1997. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem. J.* 326, 69–75.

Tsapras, P., Nezis, I.P., 2017. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ.* 24, 1369–1379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.43>

Tsou, Y.-A., Chang, W.-C., Lin, C.-D., Chang, R.-L., Tsai, M.-H., Shih, L.-C., Staniczek, T., Wu, T.-F., Hsu, H.-Y., Chang, W.-D., Lai, C.-H., Chen, C.-M., 2021. Metformin Increases Survival in Hypopharyngeal Cancer Patients with Diabetes Mellitus: Retrospective Cohort Study and Cell-Based Analysis. *Pharmaceuticals* 14, 191. <https://doi.org/10.3390/ph14030191>

Türeci, O., Chen, Y.T., Sahin, U., Güre, A.O., Zwick, C., Villena, C., Tsang, S., Seitz, G., Old, L.J., Pfreundschuh, M., 1998. Expression of SSX genes in human tumors. *Int. J. Cancer* 77, 19–23. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980703\)77:1<19::aid-ijc4>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980703)77:1<19::aid-ijc4>3.0.co;2-2)

u

UNICANCER, 2022. A Phase II Trial Assessing Bintrafusp Alfa, a Bifunctional Fusion Protein Targeting TGF- β and PD-L1, in a Pre-operative Setting for Resectable and Untreated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Clinical trial registration No. NCT04428047). clinicaltrials.gov.

Urtasun, R., Latasa, M.U., Demartis, M.I., Balzani, S., Goñi, S., Garcia-Irigoyen, O., Elizalde, M., Azcona, M., Pascale, R.M., Feo, F., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., Muntané, J., Prieto, J., Berasain, C., Avila, M.A., 2011. Connective tissue growth factor autocriny in human hepatocellular carcinoma: oncogenic role and regulation by epidermal growth factor receptor/yes-associated protein-mediated activation. *Hepatology*. Baltimore, Md 54, 2149–2158. <https://doi.org/10.1002/hep.24587>

✓

Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., Hitt, R., 2008. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* 1116–1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802656>

Vermorken, J.B., Specenier, P., 2010. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 21 Suppl 7, vii252-261. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq453>

Vermorken, J.B., Stöhlmacher-Williams, J., Davidenko, I., Licitra, L., Winkvist, E., Villanueva, C., Foa, P., Rottey, S., Skladowski, K., Tahara, M., Pai, V.R., Faivre, S., Blajman, C.R., Forastiere, A.A., Stein, B.N., Oliner, K.S., Pan, Z., Bach, B.A., SPECTRUM investigators, 2013. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 14, 697–710. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70181-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70181-5)

VIDAL, 2020. ERBITUX 5 mg/ml sol p perf [08.06.2022]. VIDAL. URL <https://www.vidal.fr/medicaments/erbitux-5-mg-ml-sol-p-perf-79024.html>

Viens, L.J., 2016. Human Papillomavirus–Associated Cancers — United States, 2008–2012. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6526a1>

Vilaseca, I., Fuster, G., Avilés-Jurado, F.-X., 2020. The impact of diabetes in head and neck cancer. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 28, 107–111. <https://doi.org/10.1097/MOO.0000000000000606>

Virós, D., Camacho, M., Zarraonandia, I., García, J., Quer, M., Vila, L., León, X., 2013. Prognostic role of MMP-9 expression in head and neck carcinoma patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. *Oral Oncol.* 49, 322–325. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.10.005>

von Witzleben, A., Wang, C., Laban, S., Savelyeva, N., Ottensmeier, C.H., 2020. HNSCC: Tumour Antigens and Their Targeting by Immunotherapy. *Cells* 9, 2103. <https://doi.org/10.3390/cells9092103>

ω

Walter, V., Yin, X., Wilkerson, M.D., Cabanski, C.R., Zhao, N., Du, Y., Ang, M.K., Hayward, M.C., Salazar, A.H., Hoadley, K.A., Fritchie, K., Sailey, C.G., Weissler, M.C., Shockley, W.W., Zanation, A.M., Hackman, T., Thorne, L.B., Funkhouser, W.D., Muldrew, K.L., Olshan, A.F., Randell, S.H., Wright, F.A., Shores, C.G., Hayes, D.N., 2013. Molecular Subtypes in Head and Neck Cancer Exhibit Distinct Patterns of Chromosomal Gain and Loss of Canonical Cancer Genes. *PLOS ONE* 8, e56823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056823>

Wang, K., Zhu, X., Mei, D., Ding, Z., 2018. Caveolin-1 contributes to anoikis resistance in human gastric cancer SGC-7901 cells via regulating Src-dependent EGFR-ITGB1 signaling. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32, e22202. <https://doi.org/10.1002/jbt.22202>

Wang, Y., Jing, Y., Ding, L., Zhang, X., Song, Y., Chen, S., Zhao, X., Huang, X., Pu, Y., Wang, Z., Ni, Y., Hu, Q., 2019. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 38, 274. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1277-x>

Wanka, C., Steinbach, J.P., Rieger, J., 2012. Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) protects glioma cells from starvation-induced cell death by up-regulating respiration and improving cellular redox homeostasis. *J. Biol. Chem.* 287, 33436–33446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.384578>

Warburg, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE

BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>

Wei, Q., Eicher, S.A., Guan, Y., Cheng, L., Xu, J., Young, L.N., Saunders, K.C., Jiang, H., Hong, W.K., Spitz, M.R., Strom, S.S., 1998. Reduced expression of hMLH1 and hGTBP/hMSH6: a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 7, 309–314.

Wei, Y., Xu, X., 2016. UFMylation: A Unique & Fashionable Modification for Life. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.04.001>

Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Birbe, R.C., Howell, A., Pavlides, S., Gandara, R., Pestell, R.G., Sotgia, F., Philp, N.J., Lisanti, M.P., 2011. Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 1772–1783. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15659>

Whiteside, T.L., 2005. Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 95–105. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-5050-6>

Wiechen, K., Diatchenko, L., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Schober, H., Arlt, K., Zhumabayeva, B., Siebert, P.D., Dietel, M., Schäfer, R., Sers, C., 2001. Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am. J. Pathol.* 159, 1635–1643. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63010-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63010-6)

Williams, E.D., Gao, D., Redfern, A., Thompson, E.W., 2019. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 19, 716–732. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>

Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Vandenabeele, P., 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 1, e18. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.16>

Wong, I.C.K., Ng, Y.-K., Lui, V.W.Y., 2014. Cancers of the lung, head and neck on the rise: perspectives on the genotoxicity of air pollution. *Chin. J. Cancer* 33, 476–480. <https://doi.org/10.5732/cjc.014.10093>

Wu, S., Dai, X., Xie, D., 2019. Identification and Validation of an Immune-Related RNA Signature to Predict Survival of Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front. Genet.* 10, 1252. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01252>

Wu, X., Yeerna, H., Goto, Y., Ando, T., Wu, V.H., Zhang, X., Wang, Z., Amornphimoltham, P., Murphy, A.N., Tamayo, P., Chen, Q., Lippman, S.M., Gutkind, J.S., 2019. Metformin

Inhibits Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Acting Directly on Carcinoma-Initiating Cells. *Cancer Res.* 79, 4360–4370. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3525>

Wykoff, C.C., Beasley, N.J., Watson, P.H., Turner, K.J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G.D., Turley, H., Talks, K.L., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Harris, A.L., 2000. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60, 7075–7083.

X

Xia, H., Khalil, W., Kahm, J., Jessurun, J., Kleidon, J., Henke, C.A., 2010. Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 176, 2626–2637. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091117>

Xie, N., Yu, P., Liu, H., Liu, X., Hou, J., Chen, X., Huang, H., Wang, C., 2019. Validation of the International Tumor Budding Consensus Conference (2016) recommendations in oral tongue squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 48, 451–458. <https://doi.org/10.1111/jop.12856>

Xie, X., Clausen, O.P., De Angelis, P., Boysen, M., 1999. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 86, 913–920. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19990915\)86:6<913::aid-cncr4>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19990915)86:6<913::aid-cncr4>3.0.co;2-a)

Xing, Y., Zhang, J., Lin, H., Gold, K.A., Sturgis, E.M., Garden, A.S., Lee, J.J., William, W.N., 2016. Relationship between level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 122, 534–545. <https://doi.org/10.1002/cncr.29780>

Y

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., Smith, R., Lessnick, S.L., Sahasrabudhe, S., Stockwell, B.R., 2007. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447, 864–868. <https://doi.org/10.1038/nature05859>

Yamaguchi, T., Hayashi, M., Ida, L., Yamamoto, M., Lu, C., Kajino, T., Cheng, J., Nakatochi, M., Isomura, H., Yamazaki, M., Suzuki, M., Fujimoto, T., Takahashi, T., 2019.

ROR1-CAVIN3 interaction required for caveolae-dependent endocytosis and pro-survival signaling in lung adenocarcinoma. *Oncogene* 38, 5142–5157. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0785-7>

Yamaguchi, T., Lu, C., Ida, L., Yanagisawa, K., Usukura, J., Cheng, J., Hotta, N., Shimada, Y., Isomura, H., Suzuki, M., Fujimoto, T., Takahashi, T., 2016. ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat. Commun.* 7, 10060. <https://doi.org/10.1038/ncomms10060>

Yang, Jiawen, Mo, J., Dai, J., Ye, C., Cen, W., Zheng, X., Jiang, L., Ye, L., 2021. Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling pathway in KRAS mutant colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 12, 1079. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04367-3>

Yang, Jingjing, Zhou, Y., Xie, S., Wang, J., Li, Z., Chen, L., Mao, M., Chen, C., Huang, A., Chen, Y., Zhang, X., Khan, N.U.H., Wang, L., Zhou, J., 2021. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 40, 206. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02012-7>

Yang, J., Zhu, T., Zhao, R., Gao, D., Cui, Y., Wang, K., Guo, Y., 2018. Caveolin-1 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Human Colorectal Cancer Cells by Suppressing Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 24, 332–341. <https://doi.org/10.12659/MSM.907782>

Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., Wu, K.-J., 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* 10, 295–305. <https://doi.org/10.1038/ncb1691>

Yang, Y., Ma, Z., Hu, W., Wang, D., Jiang, S., Fan, C., Di, S., Liu, D., Sun, Y., Yi, W., 2016. Caveolin-1/-3: therapeutic targets for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* 111, 45. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0561-6>

Yang, Z., Liu, Y., Wei, X., Zhou, X., Gong, C., Zhang, T., Jin, P., Xu, S., Ma, D., Gao, Q., 2015. Co-targeting EGFR and Autophagy Impairs Ovarian Cancer Cell Survival during Detachment from the ECM. *Curr. Cancer Drug Targets* 15, 215–226. <https://doi.org/10.2174/1568009615666150126161939>

Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., Sinicrope, F.A., 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 10, 1533–1541. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0047>

Yegya-Raman, N., Jhavar, S.R., Jabbour, S.K., Hussain, S., Kim, S., 2018. Radiation Therapy for Tracheobronchial Metastases from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

Cureus 10, e3151. <https://doi.org/10.7759/cureus.3151>

Yoshii, Y., Furukawa, T., Waki, A., Okuyama, H., Inoue, M., Itoh, M., Zhang, M.-R., Wakizaka, H., Sogawa, C., Kiyono, Y., Yoshii, H., Fujibayashi, Y., Saga, T., 2015. High-throughput screening with nanoimprinting 3D culture for efficient drug development by mimicking the tumor environment. *Biomaterials* 51, 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.008>

Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.-D., Zhang, J., Kester, M., Wang, H.-G., 2012. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 12455–12468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309104>

Yu, S.S., Cirillo, N., 2020. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J. Cell. Physiol.* 235, 65–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.28963>

Z

Zech, H.B., Moeckelmann, N., Boettcher, A., Muenscher, A., Binder, M., Vettorazzi, E., Bokemeyer, C., Schafhausen, P., Betz, C.S., Busch, C.-J., 2020. Phase III study of nivolumab alone or combined with ipilimumab as immunotherapy versus standard of care in resectable head and neck squamous cell carcinoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* 16, 3035–3043. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0595>

Zeng, Q., Chen, S., You, Z., Yang, F., Carey, T.E., Saims, D., Wang, C.-Y., 2002. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B. *J. Biol. Chem.* 277, 25203–25208. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201598200>

Zhang, C., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Zhao, Y., Hong, X., Lin, M., Yu, H., Liu, L., Levine, A.J., Hu, W., Feng, Z., 2013. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat. Commun.* 4, 2935. <https://doi.org/10.1038/ncomms3935>

Zhang, C., Wang, C., Yang, Z., Bai, Y., Shukuya, T., Poh, M.-E., Ekman, S., Li, J., Xu, Y., Deng, S., 2022. Identification of GPX4 as a therapeutic target for lung adenocarcinoma after EGFR-TKI resistance. *Transl. Lung Cancer Res.* 11, 786–801. <https://doi.org/10.21037/tlcr-22-318>

Zhang, H., Su, L., Müller, S., Tighiouart, M., Xu, Z., Zhang, X., Shin, H.J.C., Hunt, J., Sun, S.-Y., Shin, D.M., Chen, Z.G., 2008. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth

and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 99, 1684–1694. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604735>

Zhang, M., Lee, S.-J., An, C., Xu, J., Joshi, B., Nabi, I.R., Choi, A.M.K., Jin, Y., 2011. Caveolin-1 mediates Fas–BID signaling in hyperoxia-induced apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1252–1262. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.031>

Zhang, P., Li, S., Zhang, T., Cui, F., Shi, J.-H., Zhao, F., Sheng, X., 2021. Characterization of Molecular Subtypes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma With Distinct Prognosis and Treatment Responsiveness. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 711348. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711348>

Zhang, Z., Filho, M.S., Nör, J.E., 2012. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 48, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.10.004>

Zhang, Z.-B., Cai, L., Zheng, S.-G., Xiong, Y., Dong, J.-H., 2009. Overexpression of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma with metastasis and worse prognosis: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density and unpaired artery. *Pathol. Oncol. Res. POR* 15, 495–502. <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9144-7>

Zhao, X., Ma, C., Cai, X., Lei, D., Liu, D., Xu, F., Jin, T., Liu, J., Pan, X., 2011. RNA interference of caveolin-1 via lentiviral vector inhibits growth of hypopharyngeal squamous cell carcinoma FaDu cells In Vitro and In Vivo. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 12, 397–401.

Zhou, R.-P., Chen, Y., Wei, X., Yu, B., Xiong, Z.-G., Lu, C., Hu, W., 2020. Novel insights into ferroptosis: Implications for age-related diseases. *Theranostics* 10, 11976–11997. <https://doi.org/10.7150/thno.50663>

Zhu, J., Wu, Y.-N., Zhang, W., Zhang, X.-M., Ding, X., Li, H.-Q., Geng, M., Xie, Z.-Q., Wu, H.-M., 2014. Monocarboxylate transporter 4 facilitates cell proliferation and migration and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *PloS One* 9, e87904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087904>

Ziober, B.L., Silverman, S.S., Kramer, R.H., 2001. Adhesive mechanisms regulating invasion and metastasis in oral cancer. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 12, 499–510. <https://doi.org/10.1177/10454411010120060401>

Zorat, P.L., Paccagnella, A., Cavaniglia, G., Loreggian, L., Gava, A., Mione, C.A., Boldrin, F., Marchiori, C., Lunghi, F., Fede, A., Bordin, A., Da Mosto, M.C., Sileni, V.C., Orlando, A., Jirillo, A., Tomio, L., Pappagallo, G.L., Ghi, M.G., 2004. Randomized phase III trial of neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: 10-year follow-up. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1714–1717. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh306>

Zou, M., Li, Y., Xia, S., Chu, Q., Xiao, X., Qiu, H., Chen, Y., Zheng, Z., Liu, F., Zhuang, L., Yu, S., 2017. Knockdown of CAVEOLIN-1 Sensitizes Human Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer Cells to Radiation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 44, 778–791. <https://doi.org/10.1159/000485291>

Zou, W., Ma, X., Hua, W., Chen, B., Cai, G., 2015. Caveolin-1 mediates chemoresistance in cisplatin-resistant ovarian cancer cells by targeting apoptosis through the Notch-1/Akt/NF- κ B pathway. *Oncol. Rep.* 34, 3256–3263. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4320>

Annexes

Annexe 1 : Publication en 3^{ème} auteur – miR-30a/e-3p restores tumor immunity in HNSCC by targeting TGFβ/BMP/PD-L1, en cours de finalisation

Article scientifique n°3 en cours de finalisation

Conrad, O., Burgy, M., **Jehl, A.**, Foppolo, S., Bruban, V., Jung, A.C., Onea, M.-A.,
Chenard, Dourlhes T., Danic A., Schultz P., Dontenwill, M., Martin, S.

**miR-30a/e-3p restores tumor immunity in HNSCC
by targeting TGFβ/BMP/PD-L1**

Abstract

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is the 6th most common cancer worldwide (Sung et al., 2021). 70% of patients exhibit advanced HNSCC stage at diagnosis and their 5-year survival rate is less than 50% because therapeutic management is only based on the TNM classification and no reliable biomarkers for diagnosis or prognosis are available. In the last few years, miRNAs profile was studied in HNSCC and differences of expression between tumour *versus* healthy tissue were highlighted. Studies have suggested that miRNAs have the potential to become biomarkers (Sethi et al., 2014). Here, we studied members of the miR-30 family, which act as antitumor miRNAs in HNSCC. We investigated the role of miR-30a-3p and miR-30e-3p expression on HNSCC relapses and clinical prognosis. Their expressions were analysed in 122 HNSCC HPV-negative, locally advanced tumours. miRNAs level of expression was correlated with clinical data and it showed that low level of miR-30a-3p and miR-30e-3p was correlated with higher risk of relapses and lower survival rate. Thus, these miRNAs have the potential to become biomarkers for relapses and prognosis. Next, we studied in vitro features of relapses and survival by overexpressing miR-30a-3p and miR-30e-3p in HNSCC cell lines. Colony formation, proliferation and apoptosis assays showed that survival was reduced when miRNAs were overexpressed in cells. In addition, spheroid evasion assay showed that migration was also reduced compared to control. Then, we wanted to determine the underlying pathway by which miRNAs affected these malignant biological functions. Screening TCGA database and evaluating connection of identified targets using STRING showed that miR-30a-3p and miR-30e-3p target several genes that happen to belong to the TGF- β network. Repression of this pathway was confirmed using RT-qPCR, western blot and immunofluorescence analyses. Pharmacological inhibition of the most affected targets, TGFBR1 and BMPR2, recapitulated effects observed by direct expression of miRNAs, suggesting that miRNAs exert antitumor activity through the inhibition of TGFBR1 and BMPR2. Beside their potential as biomarkers, miRNAs might be used to target one of the most important immunosuppressive pathway in HNSCC (O. Conrad *et al.*, en cours de finalisation).

Annexe 2 : Communication poster présentée lors des Journées du Campus d'Illkirch primée par les membres du jury les 23 et 24 mai 2022, Faculté de Pharmacie, Illkirch – Strasbourg

**Communication poster primée lors des Journées du
Campus d'Illkirch par les membres du jury les 23 et 24 mai
2022**

Jehl, A., Foppolo, S., Ronzani C., Etienne-Selloum, N., Martin, S.

**Epiregulin: predictive biomarker of Cetuximab-
induced ferroptosis in head and neck cancers**

Epiregulin: predictive biomarker of Cetuximab-induced ferroptosis in head and neck cancers

Aude JEHL¹, S. FOPPOLO¹, C. RONZANI², N. ETIENNE-SELLOUM¹ and Sophie MARTIN¹

¹ Laboratoire de Bioimagerie et Pathologies, UMR7021 CNRS

² Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, UMR7199 CNRS



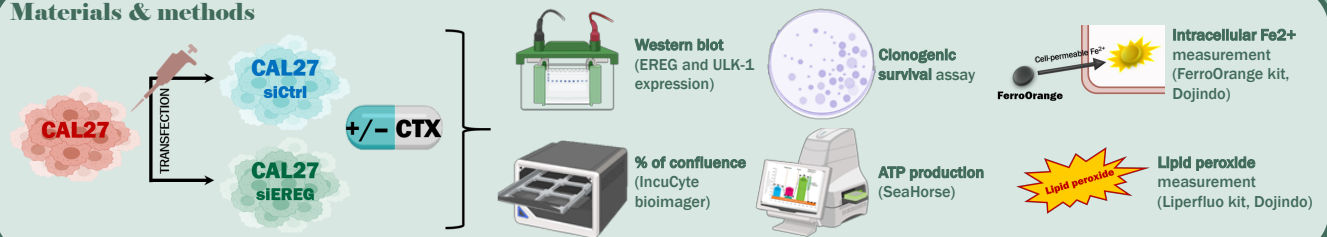
École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

Laboratoire
de bioimagerie et pathologies | LBP
de l'Université de Strasbourg et du CNRS

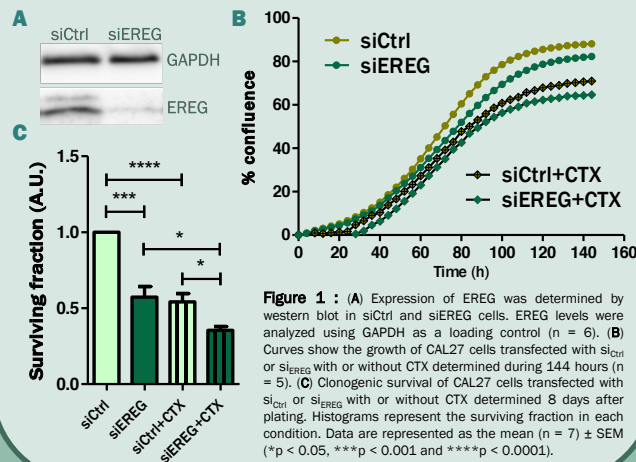
With **932,000 new cases** and **450,000 deaths** in 2018 worldwide, head and neck cancers are the **6th most frequently** observed cancer in the world. Currently, 70% of these cancers are diagnosed at an advanced stage and the 5-year survival rate is 60%, with very little change over the last few decades. The interest in research on these cancers is all the more important, as according to the *Globocan 2020 report*, the incidence of these cancers is expected to **increase by 30% by 2030**. The therapeutic management is based only on the TNM (tumour, node and metastasis) classification and anatomopathological analysis. One of the possible treatments is targeted therapy via **Cetuximab (CTX)**, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR). Currently, there is **no predictive biomarker** for the response to CTX that allows optimisation of the patient's therapeutic management. We recently reported that caveolin-1 (Cav1) expression predicted locoregional relapse of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) due to resistance to CTX and radiotherapy treatment. **Epiregulin (EREG)**, an endogenous EGFR ligand, was identified as a key target of Cav1-mediated resistance to treatment (M. Burgy and A. Jehl, *Cancers*, 2021). To go further, we studied HNSCC cells in which EREG was depleted using siRNA. Repression of EREG was associated with a decrease of tumour progression features and more specifically the production of ATP reflecting mitochondrial dysfunction as well as the activation of two programmed cell deaths, namely **autophagy** and **ferroptosis**.

Could EREG be used as a predictive biomarker of Cetuximab sensitivity via activation of cell death by autophagy and ferroptosis in head and neck cancers ?

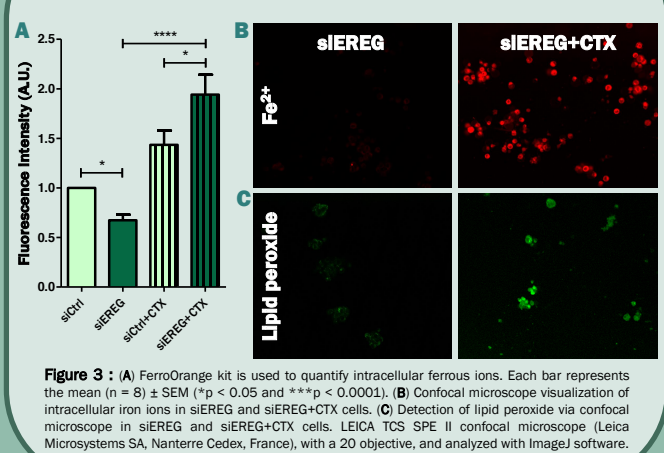
Materials & methods



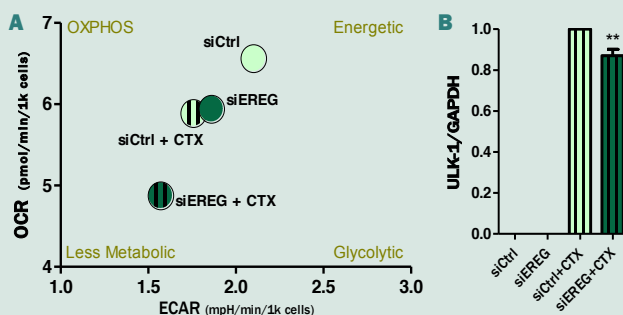
Reduction of tumour progression phenotype of siEREG cells after treatment with CTX



Ferroptosis: key programmed cell death in response to CTX treatment in siEREG cells

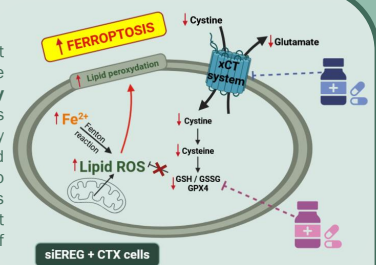


Altered mitochondrial function due to decreased EREG expression and to CTX treatment and reactivation of autophagy when CTX treatment



Conclusion

Therefore, we can suggest that **EREG** could be used as a predictive biomarker to predict sensitivity to CTX in HNSCC. Indeed, tumours with low expression of EREG may respond better to this targeted therapy. Moreover, the data also suggest that patients with tumours expressing low levels of EREG might be treated with a combination of CTX and a nutrient transporter inhibitor. Thereby, disrupting redox homeostasis resulting in the accumulation of peroxidised lipids and a deficit of antioxidant molecules. This disruption will **promote ferroptosis** for cytolytic purposes.



References

Hyuna Sung ; Jacques Ferlay ; Rebecca L Siegel ; Mathieu Laversanne ; Isabelle Soerjomataram ; Ahmedin Jamal ; Freddie Bray. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-249. doi: 10.3322/caac.21660

Burgy, M. and Jehl, A.; Conrad, O.; Foppolo, S.; Bruban, V.; Etienne-Selloum, N.; Jung, A.C.; Masson, M.; Macabre, C.; Ledrappier, S.; et al. Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **2021**, *13*, 3038. <https://doi.org/10.3390/cancers13123038>

Illustrations : BioRender.com



Annexe 3 : Communication poster présentée lors du 4^{ème} congrès SUNRiSE (The 4th SUNRiSE Meeting : Tumor Solid Cancer Stem Cell Network) primée par les membres du jury les 08 et 09 juin 2022, Institut Curie, Paris

**Communication poster primée lors du 4^{ème} congrès
international SUNRiSE par les membres du jury les 08 et
09 juin 2022**

Jehl, A.* and Conrad, O.*, Burgy, M., Foppolo, S., Schultz, P., Danic, A., Dourlhes, T.,
Jung, A., Chenard, M.-P., Martin, S.

*Co-auteurs

★Réalisation de la communication orale

**Caveolin-1/Epiregulin (EREG)/YAP Axis in the
Treatment Resistance of Caveolin-1-Expressing
Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**

Caveolin-1 / Epieregulin / YAP Axis in the Treatment Resistance of Caveolin-1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Aude JEHL^{1,*} and Omblin CONRAD^{1,*}, Mickaël BURGY^{1,2}, Sophie FOPPOLO¹, Philippe SCHULTZ², Aurélien DANIC², Thomas DOURLHES², Alain C. Jung^{3,4}, Marie-Pierre CHENARD⁵, Sophie MARTIN¹

1 Laboratory of Bioimaging and Pathology, University of Strasbourg, UMR7021 CNRS, 67401 Illkirch, France
 2 Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France
 3 Laboratory STREINTH, Inserm IRFAC U1113, University of Strasbourg, 67200 Strasbourg, France
 4 Laboratory of Tumor Biology, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France
 5 Department of Pathology, Strasbourg University Hospital, 67200 Strasbourg, France

* These authors contributed equally to the work

Laboratoire de bioimagerie et pathologies | LBP de l'Université de Strasbourg et du CNRS

ICANS INSTITUT DE CANCÉROLOGIE STRASBOURG EUROPE

CNRS GDR Organoides

Les Hôpitaux Universitaires de STRASBOURG

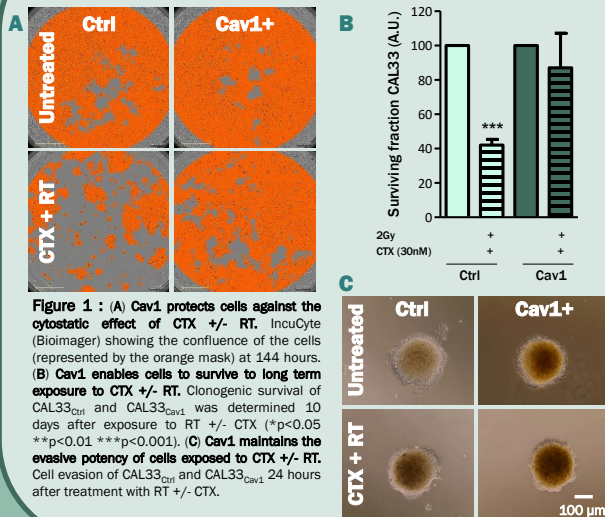


Inserm U1113 IRFAC

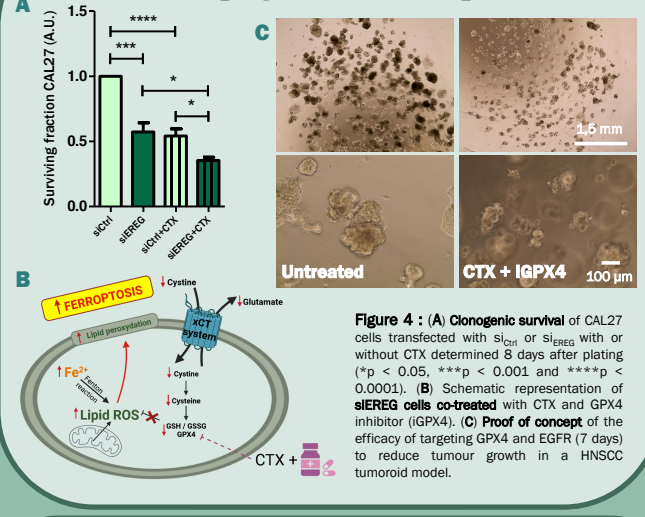
Head and neck cancers affected nearly **890,000 people** and caused about **450,000 deaths in 2018** worldwide. These cancers **rank 6th** among the most frequently observed cancers and the incidence of these cancers is expected to **increase by 30% by 2030** (GloboCan, 2020). Locally-advanced head and neck squamous cell carcinoma (LA-HNSCC) (stage III/IV according to the TNM classification of head and neck cancers 8th edition) represents about 60% of patients at diagnosis. They require a combination of therapies including a primary surgery followed by radiotherapy or chemoradiation in patients at high risk of relapse. The epithelial growth factor receptor (EGFR)-targeting antibody **Cetuximab (CTX) combined with radiotherapy (RT)** is the **only targeted therapy** that has been proven effective for the treatment of LA-HNSCC. **Relapses arise in 50% of patients** with HNSCC in the 5-years following treatment. In clinico-pathological practice, it is difficult to assign patients into classes of risk since **no reliable biomarkers** are available to predict the outcome of Human *Papillomavirus*-unrelated HNSCC. A body of evidence suggests that **caveolin-1 (Cav1)** may be involved in the resistance of HNSCC to anti-EGFR therapies (M. Burgy and A. Jehl, *Cancers*, 2021).

Resistance to the standard Cetuximab – radiotherapy regimen is mediated by the Caveolin-1 / Epieregulin / YAP axis

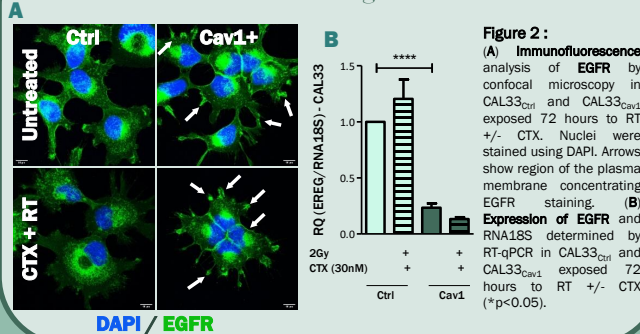
Caveolin-1 allows Cetuximab – radiotherapy resistance in head and neck cancers cells



Cetuximab treated EREG – silenced cells reduce tumour progression via ferroptosis



Caveolin-1 is associated with a decrease in EREG – driven oncogenic addiction

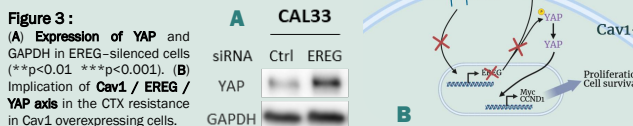


Tumoroid model highlights heterogeneity of caveolin-1 expression



Figure 5: Immunofluorescence analysis of Cav1 by confocal microscopy in tumoroid model. Nuclei were stained using DAPI.

Repression of EREG by Caveolin-1 is associated with activation of Hippo–YAP pathway



Conclusion

Tumoroids are self-organized 3D structures deriving from stem/progenitor cells that replicate the tumour and the microenvironment from which they were generated. They are considered as **promising tools for personalized and precision medicine**. HNSCC patient-derived tumoroids will be used to validate **Cav1** as a **biomarker** able to predict the **resistance** of tumours to CTX but also to identify alternative therapies for CTX-resistant tumours, such as dual **therapy combining** the cytostatic effects of CTX and the **antioxidant** action of a molecule **targeting GPX4** (A. Jehl, 2022, writing in progress).

References

Hyuna Sung, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jamal, Freddie Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-249. doi: 10.3322/caac.21660
 Burgy, M. and Jehl, A.; Conrad, O.; Foppolo, S.; Bruban, V.; Etienne-Seloum, N.; Jung, A.C.; Masson, M.; Macabre, C.; Ledrappier, S.; et al. Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* 2021, 13, 3038. <https://doi.org/10.3390/cancers13123038>
 Illustrations : BioRender.com



Best Poster

to *Aude Jehl*

June 8th & 9th 2022
Paris · Institut Curie



Annexe 4 : Liste des publications scientifiques et des communications orales réalisées durant les trois années de thèse

LISTE DES ARTICLES PUBLIES / SOUMIS

Burgy, M* and **Jehl, A***, Conrad, O., Foppolo, S., Bruban, V., Etienne-Selloum, N., Jung, A.C., Masson, M., Macabre, C., Ledrappier, S., Burckel, H., Mura, C., Noël, G., Borel, C., Fasquelle, F., Onea, M.-A., Chenard, M.- P., Thiéry, A., Dontenwill, M., Martin, S., 2021. **Cav1/EREG/YAP Axis in the Treatment Resistance of Cav1- Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma**. *Cancers* 13, 3038. <https://doi.org/10.3390/cancers13123038>.

*** Co-auteurs**

Jehl, A., Conrad, O., Burgy, M., Foppolo, S., Bruban, V., Etienne-Selloum, N., Ronzani C., Jung, A.C., Onea, M.- A., Chenard, Dourlhes T., Danic A., Schultz P., Dontenwill, M., Martin, S. **Blocking EREG/GPX-4 sensitizes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Cetuximab through ferroptosis induction.**

Article soumis

Conrad, O., Burgy, M., **Jehl, A.**, Foppolo, S., Bruban, V., Jung, A.C., Onea, M.-A., Chenard, Dourlhes T., Danic A., Schultz P., Dontenwill, M., Martin, S., 2021. **miR-30a/e-3p restores tumor immunity in HNSCC by targeting TGFβ/BMP/PD-L1.**

En cours de finalisation.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Caveolin-1 / EREG / YAP axis in the treatment resistance of caveolin 1-expressing head and neck squamous cell carcinoma, [Jehl, A.](#), Martin, S., *Les Journées du Campus d'Illkirch, 19 avril 2021, en visioconférence. Communication orale.*

Caveolin-1 / EREG / YAP axis in the resistance of caveolin-1-expressing head and neck squamous cell carcinoma, [Jehl, A.](#), Burgy, M., Conrad, O., Foppolo, S., Bruban, V., Etienne-Selloum, N., Jung, A.C., Masson, M., Macabre, C., Ledrappier, S., Burckel, H., Mura, C., Noël, G., Borel, C., Fasquelle, F., Onea, M.-A., Chenard, M.-P., Thiéry, A., Dontenwill, M., Martin, S., *ED Days, 21 et 22 avril 2021, en visioconférence. Poster.*

Epiregulin: predictive biomarker of Cetuximab-induced ferroptosis in head and neck cancers, [Jehl, A.](#), Foppolo, S., Ronzani C., Etienne-Selloum N., Martin S., *ED days, 21 et 22 avril 2021, Collège doctoral de Strasbourg. Poster.*

Epiregulin: predictive biomarker of Cetuximab-induced ferroptosis in head and neck cancers, [Jehl, A.](#), Foppolo, S., Ronzani C., Etienne-Selloum N., Martin S., *Les Journées du Campus d'Illkirch, 23 et 24 mai 2021, Faculté de Pharmacie Illkirch-Graffenstaden. Poster – Obtention du prix du meilleur poster des JCI 2022.*

Caveolin-1/Epiregulin (EREG)/YAP Axis in the Treatment Resistance of Caveolin-1-Expressing Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, [Jehl, A.](#) and Conrad, O., Burgy, M., Foppolo, S., Bruban, V., Etienne-Selloum, N., Jung, A.C., Masson, M., Macabre, C., Ledrappier, S., Burckel, H., Mura, C., Noël, G., Borel, C., Fasquelle, F., Onea, M.-A., Chenard, M.-P., Thiéry, A., Dontenwill, M., Martin, S., *4th international SUNRiSE meeting, 8 et 9 2022, Paris – Congrès international.*

Poster – Obtention du prix du meilleur poster du 4th international SUNRiSE meeting.

Cavéoline-1 prédictive de la métastase et de la rechute locorégionale des cancers des voies aérodigestives supérieures

Résumé

Ce projet de recherche translationnelle sur les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) a permis d'identifier la cavéoline-1 (Cav1) comme un biomarqueur pronostique de l'évolution d'une tumeur primitive des VADS. En effet, une surexpression de cette protéine favorise une rechute locorégionale alors qu'un déficit de Cav1 engage la tumeur vers un processus métastatique. De plus, nous avons mis en évidence l'implication de l'axe Cav1 / EREG / YAP dans la résistance au traitement (cétuximab et radiothérapie). Enfin, nous avons identifié l'épíreguline (EREG) comme la protéine clé de la résistance au cétuximab. Ainsi, un déficit d'EREG sensibilise les cellules au cétuximab par activation de la ferroptose et l'association de cette thérapie ciblée à la molécule de RSL3 ou à la metformine restreint drastiquement la survie cellulaire en accentuant cette mort cellulaire programmée. Ces derniers résultats ont pu être confirmés grâce à un modèle 3D complexe récapitulant l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale, à savoir le modèle tumoröide établi à partir de pièces opératoires de patients atteints d'un cancer des VADS.

Mots clés : cancers des voies aérodigestives supérieures, cavéoline-1 (Cav1), épíreguline (EREG), résistance, rechutes locorégionale et métastatique, GPX4, ferroptose, organoïdes / tumoröide.

Résumé en anglais

This translational research project on head and neck cancers has identified caveolin-1 (Cav1) as a prognostic biomarker for the evolution of a primary tumor of these cancers. Indeed, an overexpression of this protein favors a locoregional relapse whereas a deficiency of Cav1 engages the tumor towards a metastatic process. Moreover, we have highlighted the involvement of the Cav1 / EREG / YAP axis in the resistance to treatment (cetuximab and radiotherapy). Finally, we identified epiregulin (EREG) as the key protein in cetuximab resistance. Thus, a deficiency of EREG sensitizes cells to cetuximab by activation of ferroptosis and the association of this target therapy with the RSL3 molecule or metformin drastically restricts cell survival by accentuating this programmed cell death. These last results could be confirmed thanks to a complex 3D model recapitulating the intra- and inter-tumoral heterogeneity, namely the tumoroid model established from surgical parts of patients with head and neck cancer.

Keywords: head and neck cancers, caveolin-1 (Cav1), epiregulin (EREG), resistance, locoregional and metastatic relapse, GPX4, ferroptosis, organoid / tumoroid.