



**HAL**  
open science

**ETUDE DES ALTERATIONS EPIGENETIQUES  
DANS LES CANCERS DES VOIES  
AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES (VADS).  
IMPLICATION DANS LE DISGNOSTIC, LE SUIVI  
ET LE PRONOSTIC DES PATIENTS**

Christian Adrien Righini

► **To cite this version:**

Christian Adrien Righini. ETUDE DES ALTERATIONS EPIGENETIQUES DANS LES CANCERS DES VOIES AERO-DIGESTIVES SUPERIEURES (VADS). IMPLICATION DANS LE DISGNOSTIC, LE SUIVI ET LE PRONOSTIC DES PATIENTS. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00121319

**HAL Id: tel-00121319**

**<https://theses.hal.science/tel-00121319>**

Submitted on 21 Dec 2006

**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.

Sciences, Technologie, Santé

**THESE**

Pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1**

**Discipline : Biologie du développement-Oncogénèse**

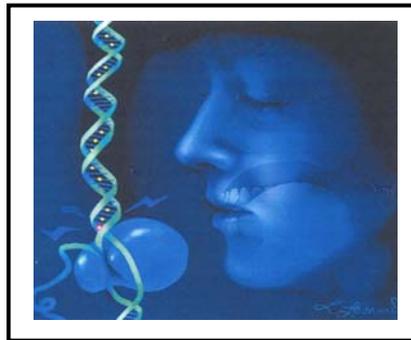
Présentée et soutenue publiquement par

**Christian Adrien RIGHINI**

Né le 06/10/1963

Le 19 décembre 2006

**Etude des altérations épigénétiques dans les cancers  
des voies aéro-digestives supérieures (VADS)  
Implication dans le diagnostic, le suivi et le pronostic des patients.**



**Membres du Jury**

<b>Président</b>	<b>Professeur Emile REYT</b>	<b>Université de Grenoble</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>Professeur Marie-Christine FAVROT</b>	<b>Université de Grenoble</b>
<b>Rapporteurs</b>	<b>Professeur Jean-Louis LEFEBVRE</b>	<b>CAC de Lille</b>
	<b>Docteur Gerard MILANO (HDR)</b>	<b>CAC de Nice</b>
<b>Examineurs</b>	<b>Professeur Elisabeth BRAMBILLA</b>	<b>Université de Grenoble</b>
	<b>Professeur Sophie ROUSSEAUX</b>	<b>Université de Grenoble</b>

---

## **Remerciements**

Je tiens à remercier

Monsieur le Professeur Christian Brambilla pour m'avoir soutenu dans ma démarche et pour m'avoir accueilli dans l'unité INSERM/UJF578.

Madame le Professeur Marie-Christine Favrot pour avoir accepté de diriger cette thèse et avoir activement soutenu mon travail, malgré un emploi du temps très serré. Vous avez su m'inculquer la rigueur et l'esprit de synthèse nécessaires à la recherche en biologie.

Monsieur le professeur Emile Reyt pour m'avoir encouragé dans ma démarche et m'avoir libéré autant que possible de mes obligations cliniques dans le service ORL sans quoi ce travail n'aurait pas vu le jour. L'intérêt que vous portez pour la biologie des cancers des VADS depuis votre arrivée dans le service a sans nul doute été un atout pour moi.

Monsieur le Professeur Jean-Louis Lefebvre pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Vos connaissances dans le domaine des cancers des VADS forcent l'admiration. Elles ont valeur d'exemple.

Monsieur le Docteur Gérard Milano pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Vos travaux dans le domaine de la biologie des cancers, dont les cancers des VADS sont reconnus par tous. J'espère que cette thèse sera l'occasion de développer des collaborations entre le centre anti-cancéreux Antoine Lacassagne et le CHU de Grenoble.

Madame le Professeur Elisabeth Brambilla pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail mais également pour m'avoir initié à la recherche en biologie lors de mon DEA, m'avoir orienté dans mon sujet de recherche pour ma thèse ainsi que pour le soutien logistique dans le domaine anatomopathologique.

Madame le Professeur Sophie Rousseaux pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail et d'avoir porté une oreille attentive à l'évolution de mes travaux à l'occasion, entre autre, de manifestations telles que les journées de la recherche de Grenoble.

Madame le Docteur Florence de Fraipont pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de ma thèse. Merci pour ton soutien moral dans les moments difficiles et tes explications techniques si précieuses qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout de ce travail.

Madame le Docteur Claire Faure pour son travail au combien important dans la réception et le conditionnement des prélèvements histologiques qui a permis de constituer la tumorothèque ORL indispensable à ce travail et qui, je l'espère, pourra servir à d'autres personnes et d'autres travaux. Tu n'es pas la seule à y avoir participé mais tu en as été la cheville ouvrière.

Monsieur le Professeur Jean-François Timsit pour son aide précieuse dans le domaine des analyses statistiques.

Toutes les techniciennes de l'unité fonctionnelle de cancérologie du Département de Biologie Intégrée pour leur aide technique, leurs encouragements et leur éternelle bonne humeur.

Madame Sylvie Veyrenc du laboratoire d'anatomopathologie pour tout le travail de préparation des prélèvements histologiques.

Mesdames Christine Moriscot et Sylvie Michelland pour leurs encouragements et les discussions passionnées que nous avons eu ensembles sur des sujets parfois très éloignés de la biologie.

Tout le personnel du service ORL, les unités d'hospitalisation, la consultation, le bloc opératoire pour leur aide précieuse dans le recueil des consentements éclairés des patients, des différents prélèvements et les liens qu'ils ont su assurer entre l'ORL et les différents laboratoires qui ont participé à ce travail.

Le Registre du Cancer de l'Isère pour m'avoir permis d'avoir des données très récentes concernant l'épidémiologie des cancers des VADS pour le département de l'Isère dont sont issus la majorité des patients traités dans le service ORL du CHU de Grenoble.

La Direction de la Recherche Clinique du CHU de Grenoble pour son soutien financier.

*Je dédie ce travail à mes parents et mes enfants Marion et Maxime.  
Vous êtes mon passé, mon présent et mon avenir.  
Merci pour votre soutien moral indéfectible.*

## **Etude des altérations épigénétiques dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS).**

**Implication dans le diagnostic, le suivi et le pronostic des patients.**

### **RESUME**

---

Depuis 20 ans, des progrès notables dans le traitement des cancers des VADS ont été réalisés, permettant une amélioration sensible du contrôle locorégional de la maladie mais sans améliorer la survie des patients. L'absence d'amélioration de la survie des patients s'explique par : le retard au diagnostic, un taux de rechute locale élevé et la survenue de seconds cancers. Le dépistage clinique n'a pas fait la preuve de son efficacité tant pour le dépistage primaire que secondaire. Par ailleurs, la clinique seule est incapable d'établir un pronostic pour chaque patient. Pour pallier à ces insuffisances, des recherches dans le domaine de la biologie de ces cancers ont été menées pour mieux comprendre leur cancérogenèse et rechercher des biomarqueurs pouvant avoir une valeur pronostique ou un intérêt dans le dépistage. En matière de cancérogenèse des cancers des VADS, 2 grands types de modifications ont été identifiés à l'échelon cellulaire : les altérations génétiques et épigénétiques. Notre travail s'est focalisé sur la méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs au niveau tumoral et salivaire. Seize gènes ont été étudiés dans le cadre d'une étude prospective. Nous avons pu définir un profil de méthylation à partir de 6 gènes avec une bonne corrélation entre les résultats obtenus au niveau tumoral et salivaire ; nos résultats nous ont permis de confirmer l'intérêt de l'étude de la salive des patients après traitement : la persistance ou la réapparition de méthylations précédant la rechute tumorale. Au niveau tumoral, la présence de méthylations n'a pas de valeur pronostique.

**MOTS CLES** Cancers malpighiens, salive, voies aéro-digestives supérieures, méthylation gènes suppresseurs de tumeur, biomarqueurs, dépistage, rechute, pronostic.

**Study of epigenetic alterations in cancers of the upper aerodigestive tracts (UADTs).  
Implication in patients' diagnosis, follow-up, and prognosis.**

**SUMMARY**

---

For the last 20 years, significant improvement in the treatment of the UADT tumors has been done, resulting in better locoregional disease control yet without improving the survival rate. This fact is attributed to : delay in diagnosis, high local relapse rate, and second cancer occurrence. Clinical screening has not been efficient for the detection of primary and secondary cancers. On the other hand, clinical screening cannot establish a prognosis for every patient. To palliate to these imperfections, studies in cancer biology have been performed to better understand the carcinogenesis and to find biomarkers that could have a prognostic value or an early detection benefit. In carcinogenesis of tumors of the UADTs, 2 main types of modifications have been identified at the cellular level: genetic and epigenetic alterations. Our work focused on methylation of tumor suppressor genes in tumors and saliva. Sixteen genes have thus been analyzed; we were then able to define a 6-gene methylation panel with a good correlation between results obtained in tumors and those obtained in saliva. Our results confirm the benefit of saliva analysis in cancer patients after treatment: persistence or reappearance of gene methylation precedes clinically evident tumor relapse. On the other hand, the presence of methylations in tumors has no prognostic value.

**KEY WORDS** Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, saliva, Upper Aerodigestive Tract, tumor suppressor gene methylation, biomarkers, detection, relapse, prognosis.

## **TABLES DES MATIERES**

**Introduction générale****Données de la littérature****Chapitre I - Les carcinomes des VADS**

1. Définition	5
2. Fréquence et évolution du nombre de cas	5
3. Les facteurs de risque	11
4. Classification histologique	19
5. Classification TNM et stades	21
6. Les traitements	22
7. Le pronostic	29

**Chapitre II – mécanismes biologiques (épigénétique exclue) impliqués dans les carcinomes des VADS**

1. Généralités	35
2. Les altérations cytogénétiques	38
3. Modification de l'ADN mitochondrial (ADNmt)	40
4. Les anti-oncogènes et oncogènes	40
5. Les anomalies cellulaires	45
6. Facteurs de risque génétiques et carcinomes des VADS	50
6a Génétique et métabolisation des carcinogènes du tabac	51
6b Génétique et réparation de l'ADN	52

**Chapitre III - Altérations épigénétiques dans les carcinomes des VADS**

1. Définition	56
2. Généralités	56
2a La méthylation, une empreinte sur l'ADN.	57
2b Profils de méthylation et expression génique	58
2c Rôle fondamental de la méthylation de l'ADN dans la progression tumorale	62
2d Les méthodes d'analyse de la méthylation de l'ADN	66
3. Epigénétique et carcinomes des VADS	69
3a Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau tumoral	69
3b Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau des tissus sains, des tissus situés en périphérie d'une tumeur et au niveau des lésions dysplasiques	73
3c Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau des liquides biologiques	73

**Chapitre IV – Biomarqueurs et cancers des VADS**

1. Définition d'un biomarqueur	77
2. Biomarqueurs et cancers des VADS	78
2a Justification de l'identification de biomarqueurs fiables et utiles pour les cliniciens dans la prise en charge des cancers des VADS	78
2b intérêts des biomarqueurs dans les cancers des VADS	79

## **Expérimentations – Résultats**

<b>1 - Introduction</b>	<b>84</b>
<b>2 - TP 53 et sa protéine p 53</b>	<b>84</b>
<b>3 - Etude de la méthylation de l'ADN dans les carcinomes des VADS</b>	<b>86</b>
<b>3a Objectifs</b>	<b>86</b>
<b>3b Matériel et méthodes</b>	<b>86</b>
<b>3c Résultats</b>	<b>97</b>

### Travaux publiés ou soumis à publication

Correlation between promoter gene methylation in head and neck tumors and saliva : a potential marker to monitor HNSCC recurrence (Righini C et al. Proc IFHNOS 2006; 224: P-259)

Tumor specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence (Righini C.A. et al., soumis pour publication à Clinical Cancer Research)

## **Discussion** **128**

### Travail soumis à publication

La méthylation des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures: Quelle signification clinique ? (Righini C.A. et al., soumis pour publication au Bulletin du Cancer)

## **Conclusions et perspectives** **164**

## **Bibliographie**

## **Annexes**

Annexe N°1 – Grade des recommandations. Extrait du guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations ANAES / Janvier 2000.

Annexe N°2 – Nombre de cas de cancers chez la femme enregistré au registre du cancer de l'Isère en 2002.

Annexe N°3 – Classification Histologique Internationale (WHO, 1991) des tumeurs malignes épithéliales de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.

Annexe N°4 – Course and prognosis of basaloid squamous cell carcinoma: a case-control study of 49 patients (E. Soriano and Ch. Righini. Ann Otolaryngol Chir Cervicofac, 2005; 122: 173-80.)

Annexe N°5 – Combined induction chemotherapy and radiotherapy in case of undifferentiated carcinoma of nasopharynx tumours (UCNT) (Ch. A. Righini et al. Rev Laryngol Otol Rhinol, 2006; 127 (sous presse).

Annexe N°6 – Classification T des tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.

Annexe N°7 – Use of tubed gastro-omental free flap for hypopharynx and cervical esophagus reconstruction after total laryngo-pharyngectomy (Ch A. Righini et al. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2005; 262: 362-7.)

Annexe N°8 – Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas (JP Lavielle and C. Righini. Oral Oncology, 1998; 34: 84-92.)

Annexe N°9 – Lettre d'information et déclaration de consentement pour collection de tissus ORL et de matériels biologiques.

Annexe N°10 – Consentements pour les populations témoins. 10a- Prélèvement tissu amygdalien ; 10b- Autorisation conservation prélèvement biologique (salive).

Annexe N°11 – Fiches de liaison. 11a - Fiche de liaison bloc ORL et DBI / Département d'anatomopathologie (tissu tumoral, tissu référent, salive et sang). 11 b – Fiche de liaison bloc ORL et Département d'anatomopathologie (ganglion).

Annexe N°12 - Base de données utilisées pour la publication soumise à « Clinical Cancer Research ».

## Figures

	<b>Page</b>
Figure N° 1 : Représentation anatomique des VADS sur une coupe sagittale médiane.	<b>5</b>
Figure N° 2 : Incidence des cancers en France en 1995 (d'après le réseau Francim, 1995).	<b>6</b>
Figure N° 3 : Incidence des cancers des VADS à l'échelon <u>mondial</u> , par localisation, chez l'homme (cavum exclu), ajustée selon l'âge, pour 100 000 habitants. Source : base de données Globocan 2002, version 2.0 (d'après Sjögren, 2006).	<b>7</b>
Figure N° 4 : Incidence des cancers de l'oro et hypopharynx chez l'homme et la femme (cavum exclu) <u>en Europe</u> , ajustée selon l'âge, pour 100 000 habitants. Source : base de données Eucan 1995 (d'après Sjögren, 2006).	<b>9</b>
Figure N° 5 : Evolution de la mortalité par cancer des voies aéro-digestives supérieures en France (d'après Hill, 1993).	<b>10</b>
Figure N° 6 : Les différents classes de substances cancérigènes isolées dans une cigarette en cours de combustion.	<b>12</b>
Figure N° 7 : Evolution de la consommation d'alcool en France (d'après Ledermann et al. ; Boulet et al.).	<b>13</b>
Figure N° 8 : Risque de cancers de l'endolarynx et de l'hypopharynx en fonction des consommations de tabac et d'alcool (d'après Tuyns et al., 1988).	<b>15</b>
Figure N° 9 : Coupes histologiques d'un carcinome verruqueux (2a), d'un carcinome basaloïde squameux (2b) et d'un carcinome papillaire (2c).	<b>20</b>
Figure N° 10 : Représentation de l'envahissement des voies lymphatiques par un cancer (d'après Cabarrot et al., 2004).	<b>22</b>
Figure N° 11 : Influence de la position dans le cycle cellulaire sur la survie après irradiation des cellules de mammifères (d'après Daly-Schweitzer, 1998).	<b>24</b>
Figure N° 12 : Exemple de distribution de dose pour un patient traité par IMRT pour une tumeur T1 N0 de l'amygdale gauche.	<b>25</b>
Figure N° 13 : Protocole de préservation des tumeurs laryngées et hypopharyngées appliqué au niveau national et international.	<b>26</b>
Figure N° 14 : Résultats de la méta-analyse sur les essais de la préservation d'organe dans le cancer du larynx et de l'hypopharynx (Pignon et al., 2000).	<b>27</b>
Figure N° 15 : Modulation de la voie du récepteur à l'EGF par la chimiothérapie.	<b>29</b>
Figure N° 16 : Histoire naturelle d'un cancer des VADS et les différents facteurs qui peuvent influencer sur l'évolution et le pronostic (d'après Kowalski et al, 2006).	<b>30</b>
Figure N° 17 : Taux de survie en fonction des sous localisations laryngées (d'après Méric et al., 2004).	<b>31</b>

Figure N° 18 : Relation entre la survie globale et le score de co-morbidité (d'après Piccirillo et Vlahiotis, 2006).	<b>34</b>
Figure N° 19 : Schéma théorique de l'évolution d'une tumeur maligne traitée (d'après Daly-Schweitzer, 1998).	<b>35</b>
Figure N° 20 : Aspects cliniques, histopathologiques et accumulation des anomalies moléculaires retrouvées aux différents stades de l'évolution d'une muqueuse normale au stade de cancer invasif au niveau de la cavité buccale (Selon Califano et al., 1996).	<b>37</b>
Figure N° 21 : Les différents types d'altérations moléculaires retrouvées dans les carcinomes des VADS (d'après thèse Temam, 2004).	<b>37</b>
Figure N° 22 : Régulation du cycle cellulaire par p21 <sup>Cip1</sup> , une CDK-I (Cycline Dépendante Kinase Inhibitrice) (d'après B. Arcangioli. <a href="http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm">http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm</a> ).	<b>42</b>
Figure N° 23 : Quelques gènes dont la transcription est activée par p53 phosphorylée à la suite de dommages sur l'ADN. (d'après Yorghos Remvikos : les multiples facettes de p53. <a href="http://www.avernes.fr/Oncologie/rubrique176">http://www.avernes.fr/Oncologie/rubrique176</a> ).	<b>44</b>
Figure N° 24 : Vue d'ensemble du cycle cellulaire (d'après B. Arcangioli. <a href="http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm">http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm</a> ).	<b>45</b>
Figure N° 25 : Vue générale de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines-CDK (d'après B. Arcangioli. <a href="http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm">http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm</a> ).	<b>46</b>
Figure N° 26 : Les principaux complexes cyclines-CDK dans le cycle cellulaire (d'après B. Arcangioli. <a href="http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm">http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm</a> ).	<b>47</b>
Figure N° 27 : Dégradation des cyclines par protéolyse (d'après B. Arcangioli. <a href="http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm">http://virologie.free.fr/11-cycle-cellulaire/cycle-cellulaire.htm</a> ).	<b>47</b>
Figure N° 28 : La réaction chimique de méthylation de l'ADN.	<b>56</b>
Figure N° 29 : Représentation schématique des différentes ADN méthyltransférases.	<b>58</b>
Figure N° 30 : Aspect d'un nucléosome en fonction de l'acétylation des histones (d'après Shaw, 2006a).	<b>60</b>
Figure N° 31 : Mécanismes de répression de la transcription (d'après Torrisani et al., 2003).	<b>61</b>
Figure N° 32 : Organisation des différents domaines protéiques des membres de la famille MBD. MBD : methyl CpG binding domain (d'après Wade, 2001).	<b>62</b>
Figure N° 33 : L'hypométhylation globale et l'hyperméthylation régionale dans la transformation tumorale (d'après Torrisani et al., 2003).	<b>63</b>
Figure N° 34 : Profils de méthylation dans 15 types de cancers différents (d'après Esteller et al., 2001).	<b>65</b>
Figure N° 35 : Modèles d'inactivation des deux allèles d'un même gène impliquant des mécanismes génétiques (mutation, délétion) et épigénétiques (hyperméthylation) (d'après Momparler et al., 2000).	<b>66</b>
Figure N° 36 : Effet sur l'ADN du traitement par le bisulfite de sodium.	<b>67</b>

Figure N° 37 : Matériel histologique reçu au laboratoire d'anatomopathologie.	<b>89</b>
Figure N° 38 : Traitement des prélèvements salivaires au laboratoire.	<b>91</b>
Figure N°39 : Résultats de la PCR effectuée sur une série de tumeurs.	<b>94</b>
Figure N° 40 : Spécificité et sensibilité de la MSP en fonction des gènes étudiés.	<b>96</b>
Figure N°41 : Cartographie du chromosome N°3 (cartographie des chromosomes de l'Institut Weizmann).	<b>123</b>
Figure N° 42 : Probabilité de rechute locale et de décès en fonction de la présence ou non d'au moins une gène méthylé au niveau tumoral.	<b>125</b>
Figure N°43 : Survie des patients en fonction des antécédents de radiothérapie et du stade tumoral.	<b>126</b>
Figure N° 44 : Molécules de 5-azacytidine et son précurseur, la 5-aza-CdR (d'après Yoo & Jones, 2006).	<b>144</b>
Figure N° 45 : Méthylation de la Cytosine grâce aux DNMTs et inhibition de la réaction par la 5-azacytidine (d'après Herman et al., 2003).	<b>145</b>

## **Tableaux**

	<b>Page</b>
Tableau N° 1 : Réparation des nombres de cas de cancers par sous localisation, <u>en France</u> , en 1995 chez l'homme et la femme (d'après Ménégot et al., 2002).	<b>9</b>
Tableau N° 2 : Classification histologique internationale WHO des tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.	<b>19</b>
Tableau N° 3 : Cancer de l'oropharynx. 3a/ Survie à 5 ans en fonction de la classification TNM et du stade. 3b/ Survie à 5 ans en fonction du nombre de ganglions envahis et de la présence ou non d'une rupture capsulaire ganglionnaire (d'après Méric et al., 2004).	<b>33</b>
Tableau N° 4 : liste des gènes étudiés dans les carcinomes des VADS avec leur dénomination abrégée et leur dénomination complète.	<b>69</b>
Tableau N° 5 : Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau tumoral. Revue de la littérature. Pourcentage de méthylation pour chaque gène.	<b>71</b>
Tableau N° 6 : Prévalence des méthylations de gènes suppresseurs de tumeurs au niveau de différents tissus non tumoraux.	<b>73</b>
Tableau N° 7 : Détection et analyse de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur dans le sérum et le plasma de patients porteurs d'un carcinome épidermoïde des VADS.	<b>75</b>
Tableau N° 8 : Principaux marqueurs biologiques ayant une valeur pronostique dans les cancers des VADS (d'après Lothaire et al., 2006).	<b>80</b>
Tableau N° 9 : Récapitulatif des gènes étudiés (étude personnelle).	<b>92</b>
Tableau N° 10 : Séquences des amorces utilisées pour les PCR, taille du segment amplifié et température d'hybridation.	<b>95</b>
Tableau N°11 : Détermination de la sensibilité de la MSP (gamme de dilution).	<b>96</b>
Tableau N° 12 : Pourcentage d'échantillons méthylés en fonction des gènes, au niveau tumoral (étude personnelle).	<b>97</b>
Tableau N° 13: Pourcentage d'échantillons méthylés en fonction des gènes, au niveau des salives prélevées au moment du diagnostic (étude personnelle).	<b>98</b>
Tableau N° 14 : Méthylation du gène Rar $\beta$ au niveau tumoral et au niveau du tissu sain référent correspondant.	<b>124</b>
Tableau N° 15 : Comparaison des profils de méthylation entre les cancers des VADS et les cancers malpighiens non à petite cellule du poumon.	<b>132</b>

## ***Abréviations***

3,4-B $\alpha$ P	3,4-benzo( $\alpha$ )pyrène
5-FU	5 – Fluoro uracile
Ac	Acétyl
ADNmt	ADN mitochondrial
BPDE	Benzo( $\alpha$ )pyrène-diol-époxyde
CDC	US Centers for Disease Control
CDDP	Cisplatine
CDK	Cyclin Dependant Kinase
Circ	Centre international de recherche sur le cancer
CO	Monoxyde de Carbone
CT	Chimiothérapie
CYP1A1	Cytochrome P450 1 A1
DNMTs	Methyl transférases
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FDG-TEP	2-deoxy-2[ <sup>18</sup> F] fluoro-D-glucose détecté par tomographie à émission de positron
GETTEC	Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou
GORTEC	Groupe Oncologie Radiothérapie Tête et Cou
GST	Glutathions-S-transferases
HAT	Histones – Acétylases
HDAC	Histones Déacétylases
HES	Hématoxyline éosine
HHV-6	Virus Herpétique Human 6
HOGG1	human 8-oxoguanine DNA glycosylase
HPV	Human Papilloma Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IHC	Immuno-Histo-Chimie
IMRT	Intensity Modulation Radiotherapy
IMS	Instabilité Micro Satellitaire (= MSI : Micro Satellite Instability)

LOH	Loss Of Heterozygosity (= perte d'hétérozygotie, perte d'allèle)
M	Méthyl (= groupement méthyl)
MBD	Methyl CpG-Binding Domain protein
MGG	May Grümwald Giemsa
MSP	Methylation Specific PCR
NLS	Nuclear Localization Signal
PCNA	Proliferating Cellular Nuclear Antigen
PK	Phosphokinases
RR	Risque Relatif
RT	Radiothérapie
SAH	S-adénosyl-homocystéine
SAM	S-adenosyl-méthionine
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor- $\beta$
TRD	Transcriptional Repression Domain
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UCNT	Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type
VADS	Voies Aérodigestives Supérieures
Vit A	Vitamine A
VEGF	Vascular Eipthelial Growth Factor
VZV	Virus Varicelle-Zona
WHO	Word Health Organization

## ***Présentation de l'unité INSERM/UJF 578***

Le centre de recherche de l'Institut Albert Bonniot (CR-IAB) regroupe l'Université Joseph Fourier, l'INSERM, le CNRS et le Centre Hospitalier et Universitaire de Grenoble (CHU).

Il est actuellement composé de 4 Unités mixtes de Recherche : INSERM U309, UMR 5538, INSERM EMI 0353 et INSERM/UJF 578.

L'activité de recherche menée au CR-IAB est centrée sur l'analyse des mécanismes de la différenciation cellulaire et de la transformation maligne. Cette activité est prolongée par une recherche de transfert et une recherche clinique dans deux types de tumeurs : 1) les hémopathies malignes ; 2) les cancers du poumon et des voies aéro-digestives supérieures (VADS).

L'unité INSERM/UJF 578 (Bases moléculaires de l'Initiation et de la Progression des Cancers du Poumon) est dirigée par Monsieur le Professeur Christian Brambilla.

Elle est structurée en deux groupes :

- le groupe 1, dirigé par Madame le Professeur Elisabeth Brambilla, dont la thématique de recherche est l'identification des bases moléculaires de la progression des cancers du poumon ;
- le groupe 2, dirigé par Madame le Professeur Marie-Christine Favrot, dont les thématiques de recherche sont l'identification de cibles diagnostiques et thérapeutiques, et le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les cancers du poumon et des VADS.

C'est au sein du groupe 2 de l'unité INSERM/UJF 578 que notre travail de thèse a été réalisé.

L'insitut Albert Bonniot est situé sur le site du CHU de Grenoble



## **INTRODUCTION GENERALE**

17 000 nouveaux cas de cancers malpighiens des voies aérodigestives supérieures (VADS) sont diagnostiqués chaque année en France.

Les facteurs de risque principaux sont le tabac et l'alcool.

Leur traitement repose sur : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Durant ces vingt dernières années, des progrès notables dans chaque type de traitement ont été réalisés. Ces progrès ont permis une amélioration sensible du contrôle locorégional de la maladie ; mais une constatation s'impose : cette amélioration ne s'est pas traduite par une amélioration de la survie des patients.

C'est ainsi que le pronostic global des cancers des VADS reste inchangé depuis vingt ans, avec 45 % de survie à 5 ans tous stades et localisations confondues.

Néanmoins, quel que soit la localisation, le pronostic est inversement proportionnel au stade, ce qui signifie que plus une tumeur est découverte à un stade précoce, meilleur est son pronostic.

Trois facteurs principaux expliquent l'absence d'amélioration de la survie des patients pris en charge pour un cancer des VADS :

- 1) le retard au diagnostic (2/3 des cancers sont diagnostiqués à un stade avancé, stades III-IV) ;
- 2) un taux de rechute locale qui est estimé entre 3 et 5% par an ;
- 3) la survenue de seconds cancers.

Hors, le dépistage clinique n'a pas fait la preuve de son efficacité tant pour le dépistage des premières localisations dans une population à risque, que pour le dépistage des rechutes ou des seconds cancers parmi les patients traités.

Par ailleurs, il n'existe aucun consensus concernant les modalités de cet examen clinique.

En effet :

- à quel rythme doit il être fait ?
- quel est le rôle respectif des médecins généralistes et des spécialistes d'organe dont les oto-rhino-laryngologistes ?
- doit il être couplé à un examen endoscopique systématique ?
- quelle place faut il donner à « l'auto-éducation » des patients concernant les signes fonctionnels d'alerte tels que l'odynophagie, l'otalgie réflexe et la dysphonie ?

---

Odynophagie : douleur à la déglutition de la salive. Ootalgie réflexe : douleur dans l'oreille sans atteinte otologique. Dysphonie : changement du timbre de voix.

La littérature est très pauvre et surtout très disparate à ce sujet avec des niveaux de preuve faibles selon la classification de l'ANAES (annexe 1).

En France, en 2005, des recommandations ont été faites par la Société Française d'ORL et de Chirurgie cervico-faciale concernant le suivi des patients traités pour un cancer des VADS (<http://sforl.org>, recommandations pour le suivi post-thérapeutique des cancers des voies aéro-digestives supérieures de l'adulte). Concernant le dépistage des rechutes et des seconds cancers, force est de constater que beaucoup de recommandations résultent d'un consensus professionnel et ne reposent donc pas sur des fondements scientifiques solides.

Par ailleurs, pour une localisation donnée, les cliniciens savent bien que deux patients ayant une tumeur avec un stade clinique identique traitée de la même façon, peuvent avoir une évolution et donc un pronostic radicalement opposé, l'un évoluant favorablement, l'autre non. Là encore, la clinique seule, est incapable d'établir un pronostic pour chaque patient.

Partant de ces constatations certaines équipes, dont la notre, se sont tournées vers la biologie, d'abord pour mieux comprendre la cancérogenèse des cancers des VADS, puis rechercher un ou plusieurs marqueurs biologiques qui puissent être utilisé pour :

- le dépistage des rechutes tumorales ou des seconds cancers ;
- prédire la réponse à un traitement tel que la chimiothérapie ;
- établir un pronostic.

Dans la littérature, plusieurs marqueurs pronostiques potentiels ont été identifiés, mais aucun n'a encore été validé en pratique clinique.

En effet, Le fait que ces marqueurs soient étudiés la plupart du temps séparément, ne permet pas de connaître l'impact relatif de chaque marqueur dans le pronostic des cancers des VADS.

De plus, il existe deux facteurs limitant pour leur utilisation en pratique clinique :

- 1) la complexité et la lourdeur (en temps, matériel et personnel) des techniques nécessaires à leur étude ;
- 2) le faible nombre de patients inclus dans les séries cliniques, limitant la puissance statistique des résultats obtenus.

Néanmoins, les avancées récentes en matière de connaissance du génome humain et le développement parallèle de nouvelles techniques biologiques laissent entrevoir une nouvelle ère dans l'étude de ces marqueurs.

La problématique est identique en ce qui concerne les marqueurs potentiels pour prédire la réponse à un traitement ou le dépistage .

En matière de cancérogenèse des cancers des VADS, deux grands types de modifications ont été identifiés à l'échelon cellulaire. Ce sont les modifications génétiques et les altérations épigénétiques.

Depuis une dizaine d'années, l'épigénétique des cancers quelque soit leur nature, suscite un intérêt grandissant auprès de la communauté scientifique et médicale.

Un tel engouement pour cette thématique est lié à la mise en évidence d'une corrélation étroite entre des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, qui conduit à un processus de tumorigénèse comparable à celui induit par les modifications génétiques.

La technique la plus utilisée pour la détection des méthylations est la MSP (Methylation Specific PCR) ; elle présente plusieurs avantages indéniables :

- il s'agit d'une méthode simple, sensible et spécifique ;
- elle utilise de l'ADN, donc un matériel biologique robuste par rapport à d'autres comme l'ARN ;
- L'amplification PCR permet de travailler à partir de petites quantités d'ADN ;
- Elle permet l'analyse d'une grande quantité de gènes au sein de différents milieux (tissus, fluides biologiques).

Tous ces avantages laissent entrevoir la perspective d'applications cliniques potentielles.

Nos travaux de recherche ont dans un premier temps porté sur l'analyse du gène TP53 et sa protéine p53, mais les résultats décevants que nous avons obtenus dans le domaine de la prédiction de la réponse à la chimiothérapie d'une part, et le suivi des patients d'autres part, nous a fait nous orienter vers l'étude de l'épigénétique.

Ce travail de thèse a porté sur l'étude de la méthylation de l'ADN dans les cancers des VADS, car nous sommes convaincus de l'intérêt de cet axe de recherche dans deux domaines où les avancées de la recherche fondamentale sont très attendues par les cliniciens :

- 1) la détection précoce des rechutes tumorales et des seconds cancers ;
- 2) la mise en évidence de facteurs pronostiques d'autre part.

Dans un premier temps, nous rappellerons les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, biologiques et la problématique des biomarqueurs dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.

Nous exposerons ensuite les résultats que nous avons obtenu en ce qui concerne l'étude de la méthylation de la région promotrice de gènes suppresseurs de tumeur au niveau tumoral et salivaire avec les implications que cela représente en matière de diagnostic, de valeur pronostique et de suivi pour les patients traités.

Ont été exclues de ce travail, les tumeurs du cavum, des cavités naso-sinusiennes, et des glandes salivaires compte tenu des spécificités épidémiologiques, thérapeutiques et pronostiques de ces tumeurs par rapport aux tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx et du pharyngo-larynx, sur lesquelles notre travail s'est focalisé.

# **DONNEES DE LA LITTERATURE**

## **CHAPITRE I**

### **Les carcinomes des VADS**

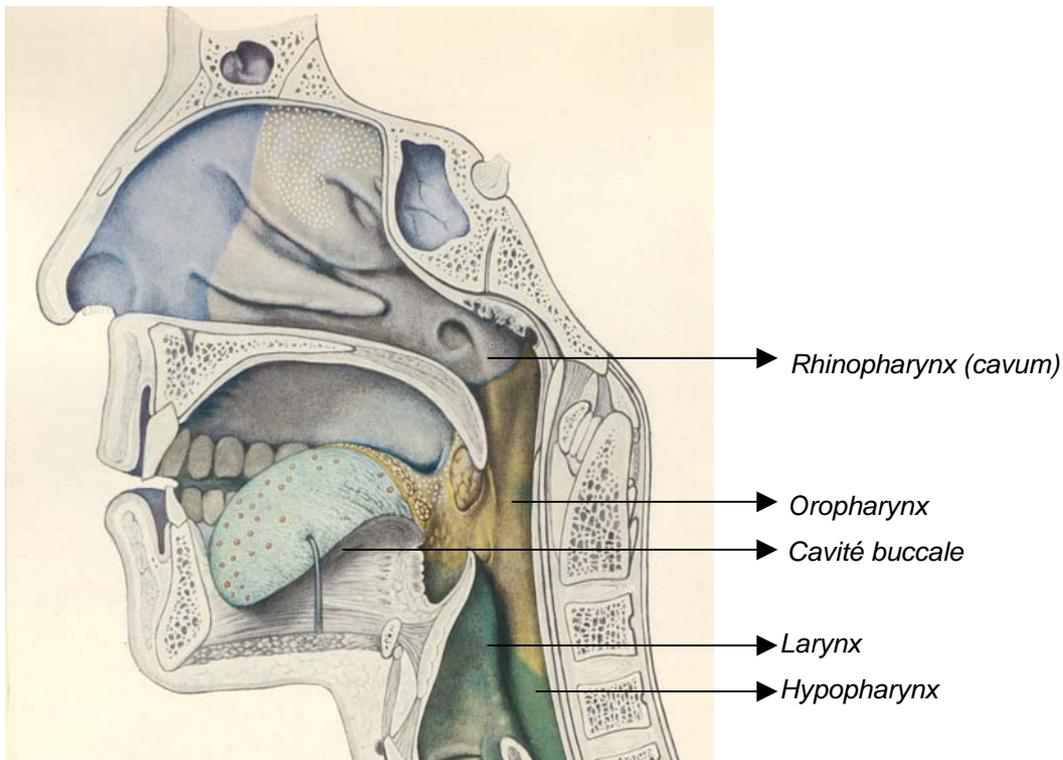
## 1. Définition

Les cancers des VADS sont subdivisés en 3 groupes :

- 1) les cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx ;
- 2) les cancers des cavités rhino-sinusiennes ;
- 3) les cancers des glandes salivaires.

Au sein des tumeurs pharyngées, on distingue les cancers du rhinopharynx (ou cavum), de l'oropharynx et de l'hypopharynx (figure N°1).

Figure N° 1 : Représentation anatomique des VADS sur une coupe sagittale médiane.



Comme nous l'avons dit en introduction, notre étude s'est focalisée sur les cancers du premier groupe, excepté le cavum, qui constitue la très grande majorité des tumeurs des VADS (90%).

## 2. Fréquence et évolution du nombre de cas

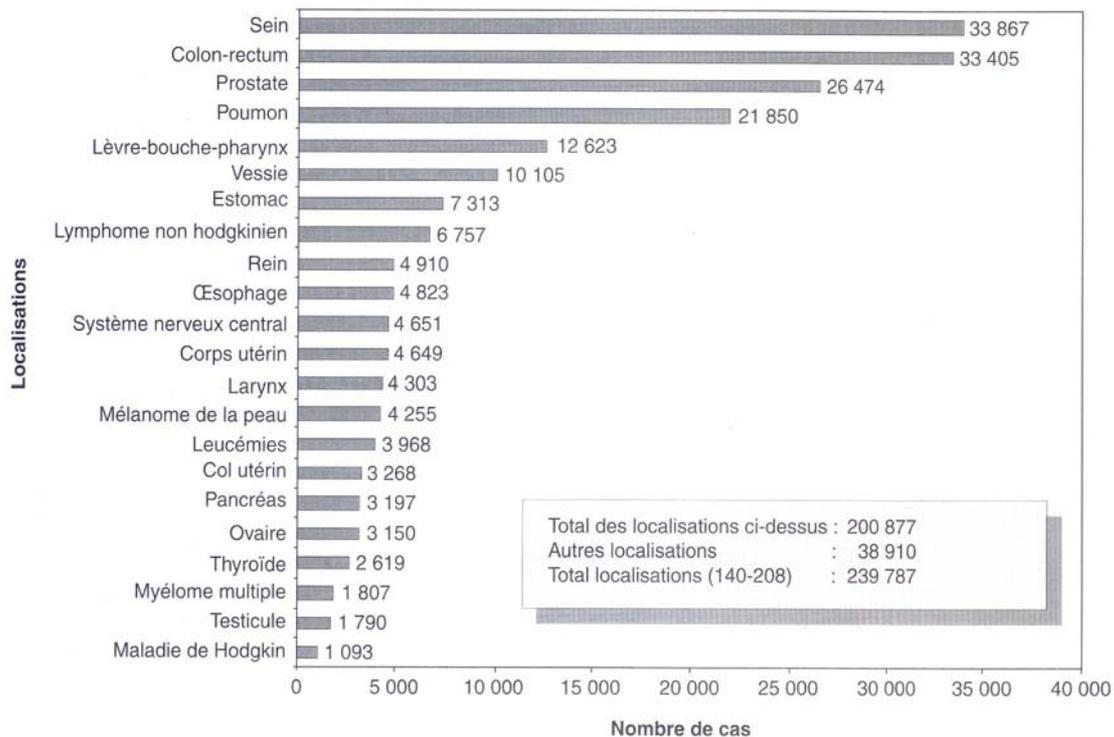
### - Fréquence

A l'échelon mondial, l'incidence annuelle des cancers des VADS est de 500 000 nouveaux cas (Jemal *et al.*, 2004).

Le nombre exact de cas observés en France est difficile à connaître. En effet, il n'existe que 11 registres du cancer répartis dans 11 départements, dont un en Isère, regroupés au sein du réseau Francim. Ces registres généraux du cancer ne couvrent que 11,5% de la population française (Marandas *et al.*, 2004). Les chiffres dont nous disposons sont de

surcroît relativement anciens. En 1995, 15 000 carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale et du pharyngo-larynx chez l'homme, et 2000 chez la femme ont été diagnostiqués en France (Hill, 2000 ; Ménégos & Chérié-challine, 1998 ; Réseau Francim, 1995). Ces chiffres placent ce groupe de cancers en 4<sup>ème</sup> position après les cancers de la prostate, des bronches et du rectum chez l'homme (figure N°2) ; il est beaucoup moins fréquent chez la femme (Ménégos & Chérié-challine, 1998).

Figure N° 2 : Incidence des cancers (hommes et femmes) en France en 1995 (d'après le réseau Francim, 1995).



Les variations géographiques sont importantes, entre pays, mais également au niveau français.

A l'échelon mondial, la comparaison est difficile ; elle a été établie pour la première fois par Parkin qui a pris en compte 184 populations (Parkin *et al.*, 1997). Selon Parkin, les taux d'incidence les plus élevés de cancers des VADS sont retrouvés en Europe, en Inde, dans certains pays d'Amérique du sud et d'Asie. Ces données ont été réactualisées en 2002 grâce aux données disponibles dans le logiciel Globocan fourni par le Centre international de recherche sur le cancer (Circ). Elles confirment les données de Parkin, mais en précisant que cette répartition s'applique à toutes les localisations tumorales, cavum exclu (Sjögren, 2006) (figure N°3).

Au niveau de la Communauté Européenne, une comparaison est possible grâce aux données disponibles dans les logiciels Eucan et Globocan fournis par le Circ. La France a le

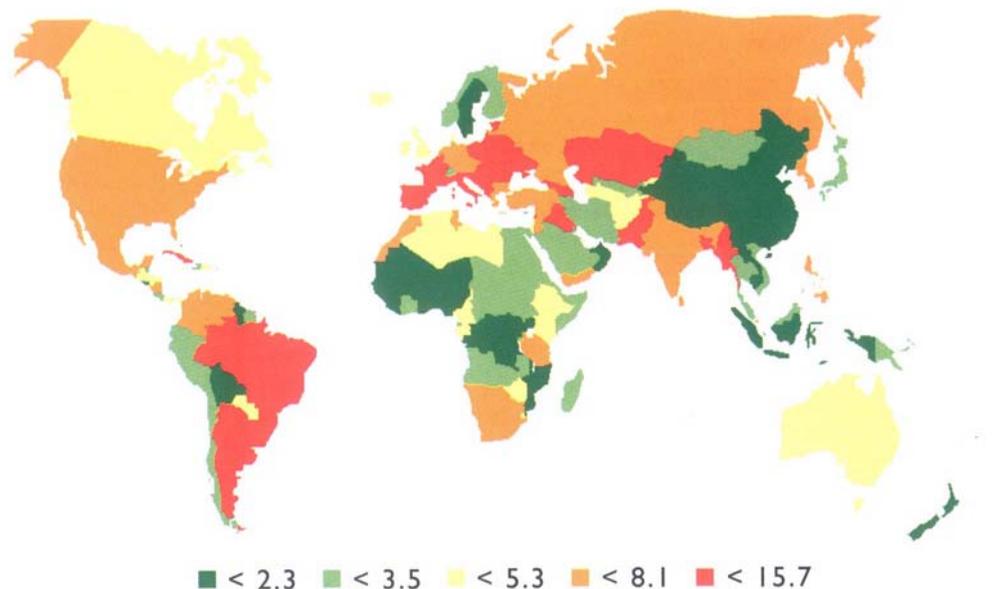
taux le plus élevé de cancers des VADS chez l'homme, et un taux intermédiaire chez la femme après le Danemark, la Hollande et la Finlande (Ferlay *et al.*, 1996). L'incidence des cancers de l'oro et hypopharynx y est particulièrement élevée par rapport aux autres pays européens (Sjögren, 2006) (Figure N°4). Cette différence s'explique vraisemblablement par une consommation d'alcool plus importante en France (Marandas *et al.*, 2004). Les taux les plus élevés sont observés chez l'homme dans les départements du Nord et du Pas-de-Calais ; les variations sont moins importantes chez la femme, et les taux les plus élevés sont observés en Île-de-France (Rezvani *et al.*, 1997).

Le nombre de cancers des VADS annuels recensés dans le département de l'Isère entre 1993 et 1995 était de 154 pour l'homme et 27 pour la femme, plaçant respectivement ce groupe de cancers au 6<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> rang de l'ensemble des cancers recensés durant cette période (Ménégoz *et al.*, 1999).

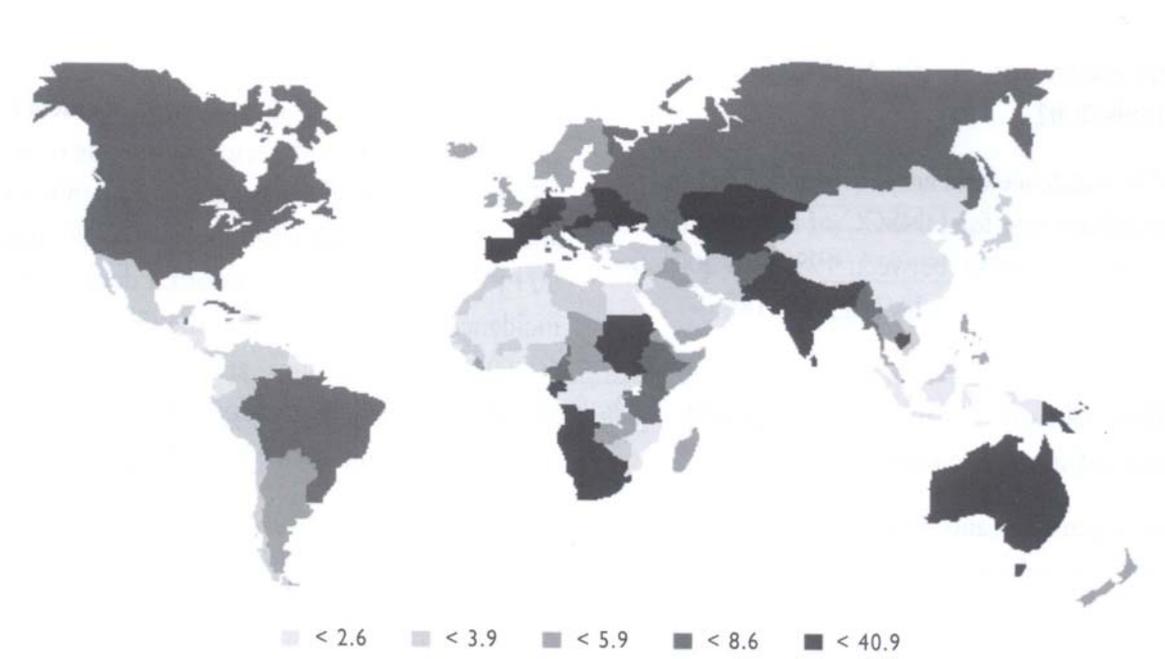
La distribution des cancers des VADS en France par sous localisations a été évaluée par le réseau Francim et les données de l'Inserm (Ménégoz *et al.*, 2002 ; Réseau Francim, 1995). La distribution des cancers de la cavité buccale, du pharynx et du larynx en fonction du sexe est résumée dans le tableau N°2.

Figure N° 3 : Incidence des cancers des VADS à l'échelon mondial, par localisation, chez l'homme (cavum exclu), ajustée selon l'âge, pour 100 000 habitants. Source : base de données Globocan 2002, version 2.0 (d'après Sjögren, 2006).

3 a : le larynx.



3 b : la cavité orale.



3 c : l'oro et hypophaynx.

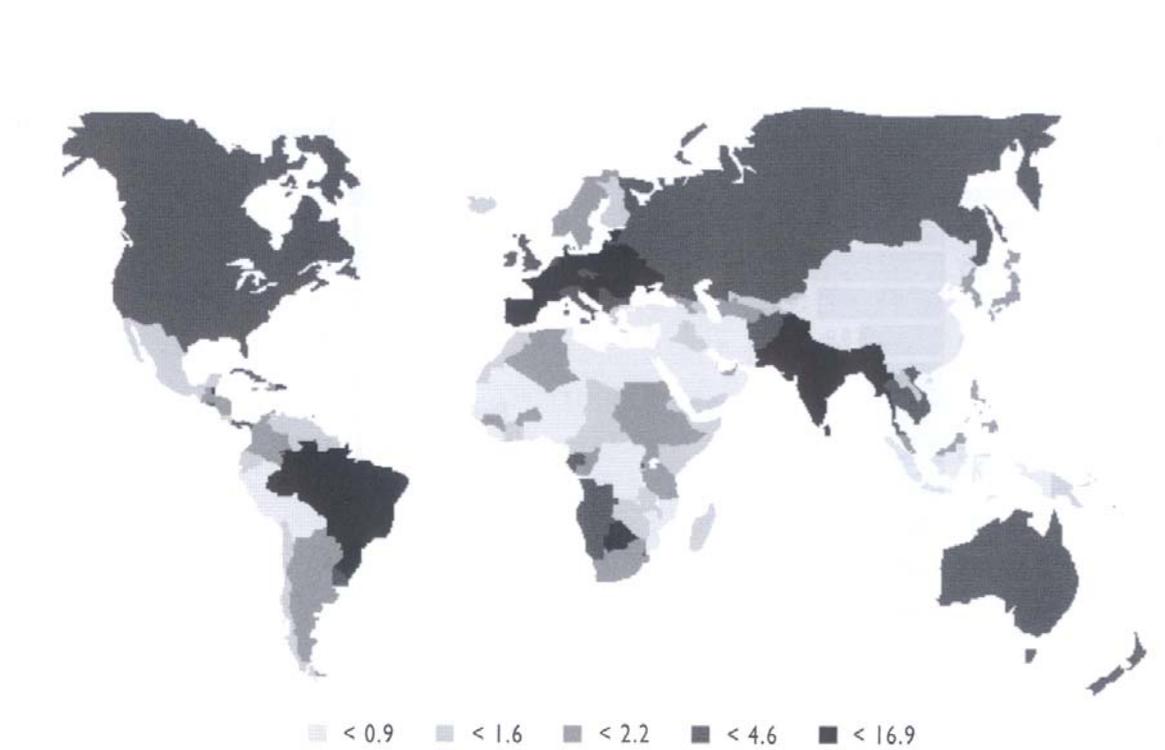


Figure N° 4 : Incidence des cancers de l'oro et hypoharynx chez l'homme et la femme (cavum exclu) en Europe, ajustée selon l'âge, pour 100 000 habitants. Source : base de données Eucan 1995 (d'après Sjögren, 2006).

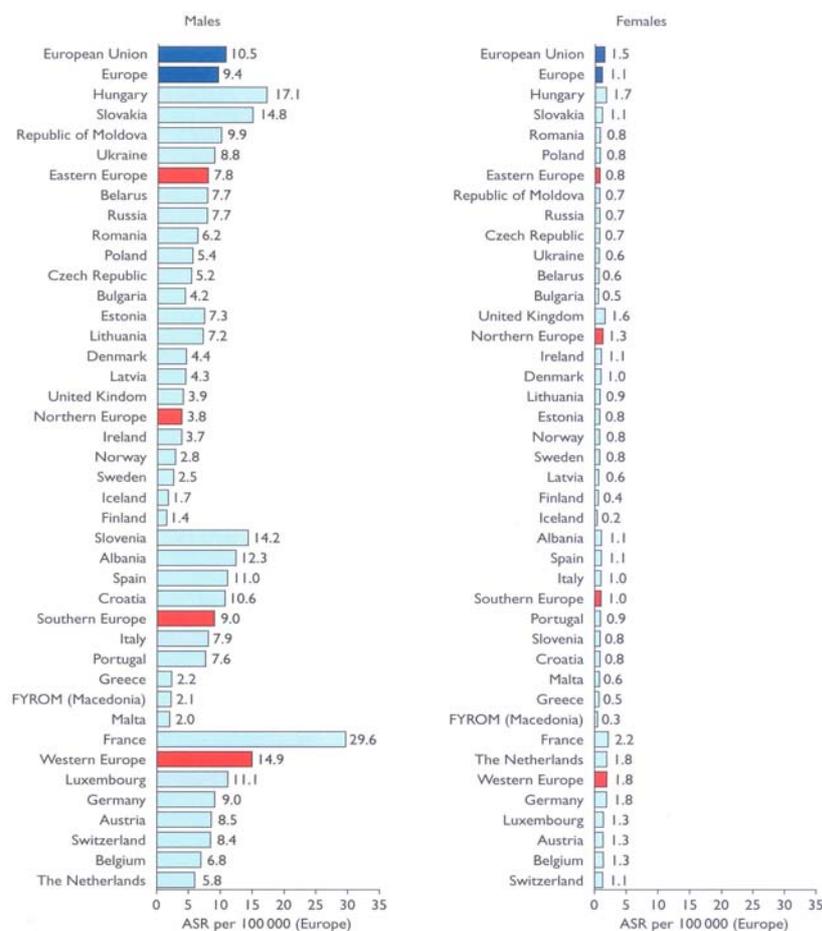


Tableau N° 1 : Répartition des nombres de cas de cancers par sous localisation, en France, en 1995 chez l'homme et la femme (d'après Ménégos et al., 2002).

Sous localisations	Nombre de cas (hommes)	Nombre de cas (femmes)
<i>Cavité buccale</i>	4129	667
<i>Larynx</i>	4044	548
<i>Hypopharynx</i>	2779	92
<i>Oropharynx</i>	2727	356
<b>Total</b>	<b>13679</b>	<b>1663</b>

Il est intéressant de constater qu'il existe des différences dans les sous-localisations en fonction du sexe, avec un taux cumulé de localisations oro et hypopharyngées moins important par rapport aux localisations laryngées chez la femme, ce qui n'est pas le cas chez l'homme.

- Evolution du nombre de cas

Les chiffres publiés en France entre 1975 et 1995 montrent une baisse nette de la fréquence des cancers des VADS chez l'homme alors que ceux ci ont augmenté chez la femme.

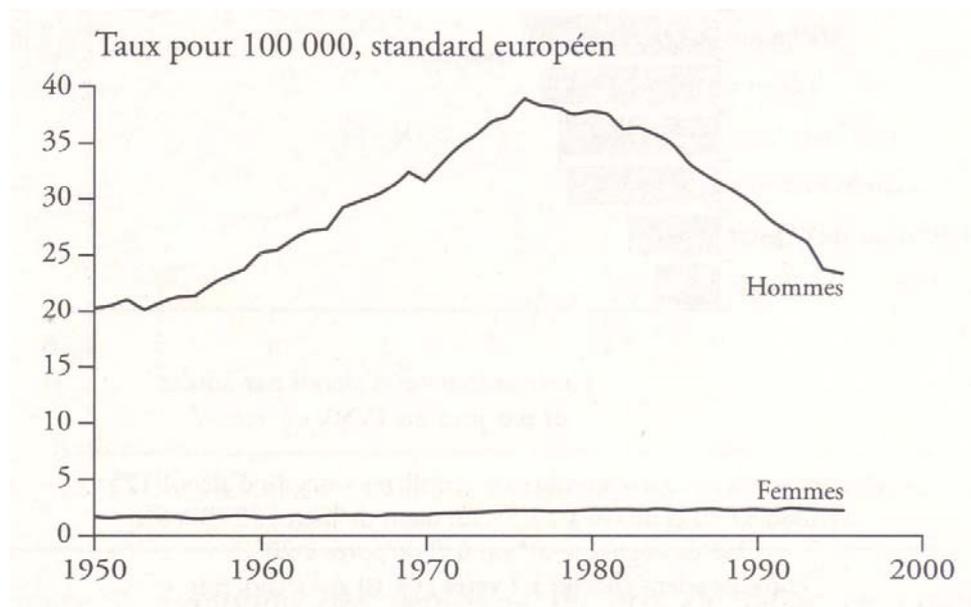
L'étude du Registre du Cancer de l'Isère (RCI) fait le constat d'une diminution de 1.4% par an ( $p < 0,0001$ ) du nombre de cancers des VADS, cette baisse n'étant à mettre qu'à l'actif du sexe masculin. La baisse est plus nette pour le larynx (-2.5% par an) et le plancher buccal (-2% par an) que pour les autres localisations (-1% par an). Chez la femme, on observe au contraire une augmentation de 3% par an des localisations pharyngées. Les données du RCI réactualisées en 2002 retrouvent un nombre de cas de cancers des VADS en progression chez les femmes (+22%), avec une augmentation essentiellement du nombre de cas de cancers de la cavité buccale et du pharynx (données non publiées, annexe 4).

Ces résultats observés au niveau du RCI, sont retrouvés dans chacun des registres du réseau Francim (Ménégoz *et al.*, 1998 ; Peng *et al.*, 2000).

Cette baisse du nombre de cas de cancers des VADS chez l'homme en France s'est accompagnée d'une baisse de la mortalité.

Entre 1950 et 1975, le taux de mortalité a régulièrement augmenté chez l'homme, passant de 20 à 39 pour 100 000 ; ce taux diminue depuis 1976, atteignant 23 pour 100 000 en 1995 (Hill *et al.*, 1993). Par contre, malgré l'augmentation du nombre de cas chez la femme, le taux de mortalité est resté stable (figure N°5)

Figure N° 5 : Evolution de la mortalité par cancer des voies aéro-digestives supérieures en France (d'après Hill, 1993).



Toutefois, nous sommes en train d'observer la fin des conséquences des comportements des années quarante et le début de celles des comportements des années soixante-dix. La consommation de tabac ayant augmenté jusqu'en 1980, le nombre de cancers va continuer

à être élevé au moins jusqu'en 2015-2020 (Hill, 2000). Le maintien à un niveau élevé des cas de cancers des VADS sera, en grande partie, lié aux nombre de cas croissants chez les femmes du fait d'un tabagisme accru dans cette population depuis le début des années soixante-dix ; la conséquence directe sera une augmentation du taux de mortalité par cancers des VADS chez la femme.

### **3. Les facteurs de risque**

Les agents supposés provoquer ou faciliter la survenue de cancers au niveau des VADS sont nombreux. La fréquence variable des cancers des VADS et de leur sous-localisation implique le rôle de différents facteurs exogènes.

En ce qui concerne les cancers de la cavité buccale, du pharynx et du larynx, figurent en première place le tabac et l'alcool.

#### ***Le tabac***

Le tabac peut être fumé, prisé ou chiqué.

Le tabac à chiquer est beaucoup moins toxique, mais il peut donner lieu à des cancers des lèvres ou de la face interne des joues, car il est habituellement mélangé à de la chaux, à des feuilles de bétel, et à des noix d'Arèque (Asie du sud est, Inde) (Ko *et al.*, 1995). Cependant, même utilisé seul, le tabac chiqué est toxique. C'est ainsi que Schantz et Guo-Pei (Schantz & Guo-Pei, 2002) attribuent l'augmentation des cancers de la langue chez les jeunes adultes aux Etats-Unis à la forte augmentation de tabac à chiquer, confirmant le rapport de l'IARC de 1985 (IARC, 1985). En France, le tabac à priser et à chiquer est d'utilisation très marginale (< 0.4% du tabac consommé) ; nous ne traiterons donc que le problème des cancers induits par l'usage du tabac fumé.

En France, c'est en 1954 qu'une première étude rétrospective de 4000 malades atteints de cancers des VADS et un nombre égal de sujets témoins non-fumeurs a permis d'établir une différence significative entre les deux groupes, et donc d'imputer le tabac comme facteur de risque (Marandas *et al.*, 2004). Vingt ans plus tard en Grande Bretagne, Doll et Petro démontrait que le risque de mortalité par cancer des VADS chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs était augmenté de 2 à 12 en fonction de la localisation, à l'exception des cancers des cavités rhino-sinusiennes et du cavum (Doll & et Petro, 1976).

Le risque accru de cancer est lié au contact de la fumée de tabac avec les lèvres, la cavité buccale, l'oropharynx, l'hypopharynx et le larynx (Marandas *et al.*, 2004). Une cigarette se compose d'un gramme de tabac, enrobé de papier qui est fait de chanvre, de lin et autres ingrédients pour améliorer sa combustibilité ; La fumée de cigarette résulte de la combustion incomplète du tabac. Elle contient 5 milliards de particules par millilitre.

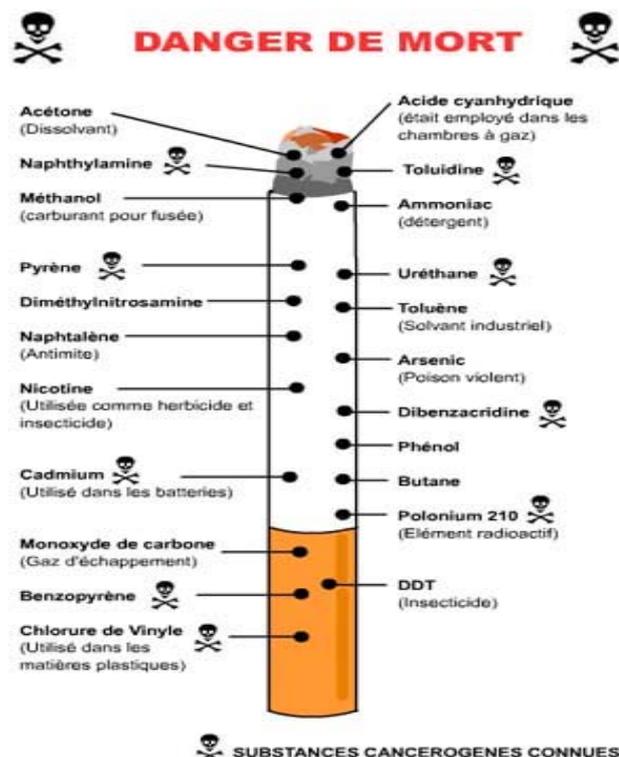
Du point de vue physiopathologique, on distingue au sein de ces particules 4 groupes de substances :

- 1) la nicotine ;
- 2) le monoxyde de carbone (CO) ;
- 3) les irritants (phénols, aldéhydes, acroléïne) ;
- 3) les substances cancérigènes regroupées en sous classes dont les 3 plus importantes sont les nitrosamines spécifiques du tabac, les arylamines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques dont le plus connu est le 3,4-benzo( $\alpha$ )pyrène (3,4-B $\alpha$ P).

Les substances cancérigènes sont, pour une partie d'entre elles, dissoutes dans la salive. Il s'agit en fait, pour la majorité, de pro-carcinogènes inactifs rendus actifs grâce aux cytochromes P450 1A1. C'est ainsi que le 3,4- B $\alpha$ P est transformé en un carcinogène actif : le Benzo ( $\alpha$ ) pyrène-diol-époxyde. Des travaux ont démontré que le Benzo ( $\alpha$ ) pyrène-diol-époxyde agissait directement sur l'ADN, plus précisément au niveau des exons 4, 5, 6, 7 et 8 du gène TP53 (Denissenko *et al.*, 1996, Blons *et al.*, 2003).

Il existe d'autres sous classes de produit regroupant plus de 50 substances cancérigènes (Fan, 2001) dont une partie est représentée dans la Figure N°6.

Figure N° 6: Les différents classes de substances cancérigènes isolées dans une cigarette en cours de combustion ; Ces substances sont marquées du symbole de mort.



On notera que la nicotine, le CO et les irritants ne comptent pas parmi les substances cancérigènes.

Dans toutes les études publiées, le risque de cancer croît avec l'intensité et l'ancienneté du tabagisme, avec une relation « dose-effet ». Actuellement, on estime que le seuil critique se situe à 20 paquets/année, ce qui correspond à une consommation d'un paquet par jour pendant 20 ans. Outre la consommation et l'ancienneté du tabagisme, d'autres facteurs entrent en jeu. Ce sont :

- 1) l'inhalation de la fumée, qui augmente le risque (André *et al.*, 1995) ;
- 2) la longueur du mégot, car c'est dans le mégot réduit que s'accumule le plus de substances toxiques ;
- 3) le filtre dont le rôle reste controversé, diminuant le risque pour certains auteurs, ne changeant rien pour d'autres (André *et al.*, 1995) ;
- 4) le type de tabac, le tabac brun étant plus toxique (Patrianokos & Hoffman, 1979).

Le tabagisme passif a été mis en cause dès 1981 par des auteurs japonais, le risque cancérigène pour un conjoint non-fumeur étant de 3 par rapport à un sujet témoin non exposé (Marandas *et al.*, 2004).

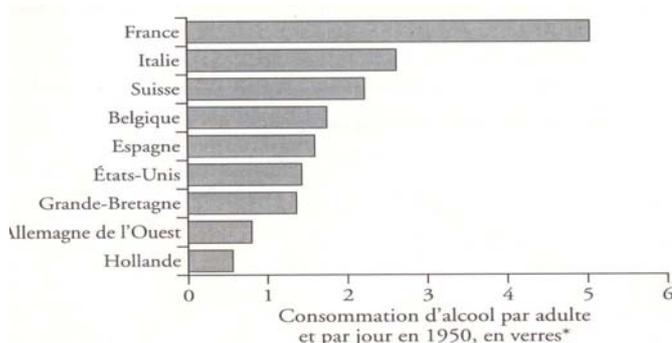
La poursuite de l'intoxication tabagique après guérison d'un premier cancer facilite l'apparition d'un second cancer des VADS. Silvermann a montré que la fréquence d'apparition d'un second cancer était de 18% chez le sujet ayant arrêté de fumer et de 30% en cas de poursuite de l'intoxication tabagique (Silvermann *et al.*, 1983).

### **L'alcool**

La consommation d'alcool est depuis longtemps très élevée en France par rapport aux autres pays de la Communauté Européenne. Cependant celle-ci a baissé régulièrement depuis 1950, alors qu'elle a augmenté dans les autres pays (Ledermann *et al.*, 1964 ; Boulet & Aubey, 1984) (Figures N°7 a et 7 b).

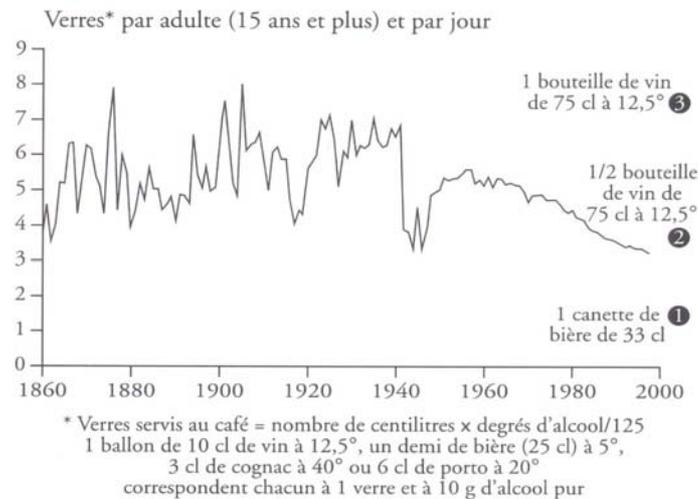
Figure 7 : Evolution de la consommation d'alcool en France (d'après Ledermann, 1964 ; Boulet & Aubey, 1984).

7 a



\* Verres servis au café = nombre de centilitres x degrés d'alcool/125  
1 ballon de 10 cl de vin à 12,5°, un demi de bière (25 cl) à 5°,  
3 cl de cognac à 40° ou 6 cl de porto à 20°,  
correspondent chacun à 1 verre et à 10 g d'alcool pur

7 b



Cette diminution a contribué à faire baisser en France la mortalité masculine par cancer de la cavité buccale, de l'oropharynx et de l'hypopharynx (Hill, 2000).

L'alcool seul, à la différence du tabac, ne provoque pas de cancer chez l'animal, même si certains cancérigènes comme les nitrosamines sont retrouvées dans des boissons alcoolisées, notamment la bière. Le mécanisme exact par lequel l'alcool provoque une transformation maligne des cellules épithéliales des VADS n'est pas encore élucidé (IARC, 2004). Néanmoins, on lui attribue comme rôles :

- 1) celui de solvant des carcinogènes résultant de la combustion du tabac, favorisant leur passage trans-muqueux ;
- 2) de diminuer la protection muqueuse par la salive par le biais de l'irritation locale provoquée par l'éthanol ;
- 3) d'activer les cytochromes P450 1A1 et donc de favoriser la transformation de pro-carcinogènes contenus dans la fumée de tabac en carcinogènes actifs (Maier *et al.*, 1994) ;
- 4) d'induire des déficiences nutritionnelles avec hypovitaminoses, Vit A en particulier, qui facilitent l'émergence des cancers d'une façon générale, par déficit en antioxydants.

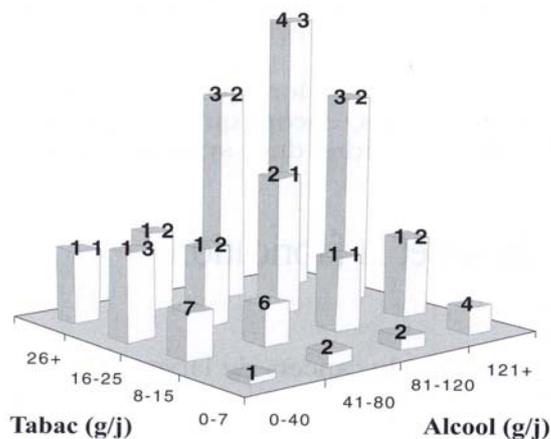
Une revue détaillée de la littérature sur le risque de cancer en fonction de la consommation d'alcool a conclu que, dans l'ensemble, celui-ci ne dépendait pas du type de boisson (IARC, 1988). Le risque de cancer augmente régulièrement avec la dose d'alcool pur contenu dans les boissons alcoolisées, sans effet de seuil (Hill, 2000).

L'intoxication tabagique et l'imprégnation éthylique sont souvent associées, et leurs effets sur le risque de cancer sont multiplicatifs (Franceschi *et al.*, 1990) . Cet effet synergique

entre les 2 toxiques est connu depuis les travaux de Rothman et Keller (Rothman & Keller, 1973). Dans cette étude, si le risque relatif (RR) était de 1 chez les « non-buveurs, non-fumeurs », il s'élevait à 2.33 chez les « grands-fumeurs, non buveurs », à 2.43 chez les « grands-buveurs, non-fumeurs », et à 15.5 chez les « grands-buveurs, grands-fumeurs ». Les figures 8 a et 8b montrent le risque de cancers de l'endolarynx et de l'hypopharynx en fonction des consommations de tabac et d'alcool (d'après Tuyns *et al.*, 1988).

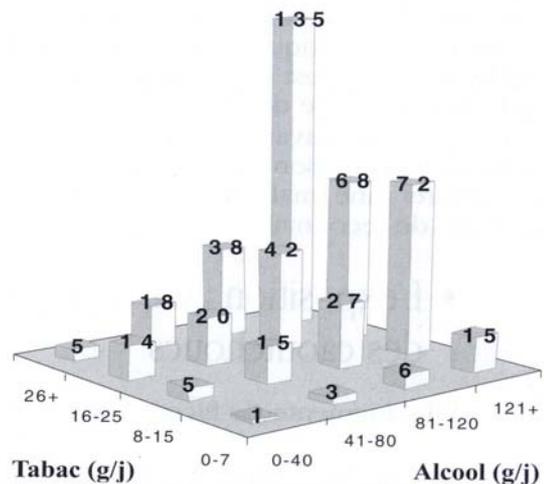
8 a

**Risque relatif de cancer de l'endolarynx**



8b

**Risque relatif de cancer de l'hypopharynx**



**Figure 8 a : Risque relatif de cancer de l'endolarynx** en fonction de la consommation de tabac et d'alcool. Grille de lecture : un sujet qui boit plus de 120g d'alcool et fume plus de 25 cigarettes par jour a un risque de cancer de l'endolarynx 43 fois plus élevé qu'un sujet de la catégorie de référence qui boit 40 g d'alcool ou moins et fume moins de 8 cigarettes par jour.

**Figure 8 b : Risque relatif de cancer de l'hypopharynx** en fonction de la consommation de tabac et d'alcool. Grille de lecture : un sujet qui boit plus de 120g d'alcool et fume plus de 25 cigarettes par jour a un risque de cancer de l'hypopharynx 135 fois plus élevé qu'un sujet de la catégorie de référence qui boit 40 g d'alcool ou moins et fume moins de 8 cigarettes par jour. (d'après Tuynset al., 1988).

Plusieurs études ont permis de constater que les trois localisations les plus fréquentes en cas d'intoxication alcoolique sont : 1) la cavité buccale ; 2) l'oropharynx ; 3) l'hypopharynx. Dans l' étude menée par l'Institut Curie, si le RR était de 1 chez les buveurs de moins de 40 g/24 h d'alcool, il s'élevait chez les buveurs de 160 g et plus à 67.8 pour le larynx, 88.7 pour l'oropharynx, 257.5 pour l'hypopharynx et 579 pour la cavité buccale (Guenel *et al.*, 1986).

### **Les autres facteurs de risque**

- Les facteurs viraux

Le rôle des virus dans la genèse des cancers buccaux, pharyngés et laryngés reste incertain.

S'il n'y a pas de preuve de la relation causale entre ces cancers et les *adénovirus*, les *cytomégalovirus*, le *virus varicelle-zona (VZV)*, le *virus herpétique humain 6 (HHV-6)* (Scully, 1992), en revanche, d'autres virus sont incriminés.

Ce sont les virus de la famille des *Human Papilloma Virus (HPV)* (Gillison *et al.*, 2000 ; Mork *et al.*, 2001).

Une étude épidémiologique rétrospective portant sur 292 patients atteints d'un carcinome des VADS et 1568 sujets témoins a montré, par détermination de la séropositivité *HPV-16*, que le risque était significativement associé à l'infection par l'*HPV16* (RR = 2.2) ; dans cette étude, les auteurs ont également pu démontrer que le risque était dépendant du site anatomique, avec un risque particulièrement élevé dans les cas de tumeurs de l'amygdale (RR = 10.2) et de la base de langue (RR=20.7), par rapport aux autres localisations (Blons *et al.*, 2003). D'autres études ont démontré la présence de particules virales en plus grande quantité, 50% en moyenne, dans les tumeurs de la cavité buccale et de l'oropharynx, par rapport à la muqueuse normale et ce, qu'il y ait ou non intoxication éthylo-tabagique (Gillison *et al.*, 2000 ; Miller & Jhonstone, 2001). C'est ainsi que Smith et ses collaborateurs ont pu démontrer l'intérêt de rechercher de l'*HPV* dans les cellules épithéliales de la cavité buccale collectées par brossage, pour l'identification des patients à risque de développer un carcinome épidermoïde, indépendamment du degré d'intoxication alcoolo-tabagique (Smith *et al.*, 2004).

En revanche pour les tumeurs du larynx, alors que la papillomatose laryngée est liée à l'infection par *HPV*, le risque de dégénérescence est faible et semble plus lié à une intoxication tabagique concomitante (Hobbs & Birchall, 2004).

Deux types d'*HPV* sont carcinogènes : l'*HPV 16 et 18*. Pour certains auteurs, ils agiraient en entraînant soit une mutation de TP53, soit une inactivation des protéines p53 et Rb par l'intermédiaire de deux oncoprotéines virales E6 et E7 (Mc Kaig *et al.*, 1998 ; Shima *et al.*, 2000 ; Temam *et al.*, 2000). Pour d'autres auteurs, ils n'interviendraient que comme co-carcinogènes (Park *et al.*, 1992).

Même si les études ne sont pas unanimes quant à la participation de l'*HPV* dans la cancérogenèse des carcinomes des VADS, il est vraisemblable que cet agent infectieux rende compte d'une partie des carcinomes des VADS diagnostiqués chez les patients ne présentant pas d'intoxication éthylo-tabagique (5 à 10% en fonction des études) (IARC, 2004).

#### - L'état dentaire

Il est habituel de souligner le mauvais état dentaire des patients pris en charge pour un cancer des VADS. Toutefois il est difficile de faire la part entre ce qui pourrait être le reflet d'un contexte socioculturel et ce qui serait un agent causal incontestable. On peut malgré

tout supposer que les traumatismes dentaires répétés sur des chicots dentaires, les modifications du pH salivaire engendrées par une infection chronique, puissent avoir un rôle au moins comme cofacteurs, dans la genèse de ces cancers (Maier *et al.*, 1993).

Seule une étude chinoise a conclu qu'un mauvais état dentaire pouvait être un facteur de risque indépendant pour les cancers de la cavité buccale (Zheng *et al.*, 1990). Toutefois, la majorité des études tendent à montrer que l'impact de l'éthylotabagisme prévaut largement sur le contexte dentaire ou prothétique dentaire (Marshall *et al.*, 1992).

L'examen au quotidien des patients atteints d'un cancer des VADS permet de constater une élévation globale de l'hygiène bucco-dentaire. Néanmoins, aucune étude n'a montré que la baisse de fréquence de ce type de cancer, puisse avoir un rapport avec la meilleure hygiène buccale de la population, même si quelques études comme celle de Winn estiment que ce rôle existe, tout en reconnaissant qu'il reste modeste (Winn *et al.*, 1991).

#### - Les facteurs professionnels

Ils sont difficiles à apprécier, car souvent étudiés dans des populations de patients porteurs d'un cancer des VADS, rarement dans des études cas-témoins. Il est difficile de faire la part des choses entre l'intoxication éthylotabagique et l'exposition à un éventuel toxique, ce d'autant que les patients sont dans la plupart du temps incapables de préciser à quel exposition ils sont soumis, du fait d'activités multiples avec des postes de travail variables. Le facteur « temps » est également à prendre en compte. Hors les études toxicologiques étant pour la très grande majorité rétrospectives, le facteur temps est difficile à évaluer. C'est dire qu'il faut prendre avec beaucoup de précautions les données sur les expositions professionnelles dans ce type de cancers.

Il existe toutefois quelques études qui retrouvent un rôle pathogène à certaines expositions comme les métaux, en particulier le Nickel (IARC, 1990), les polyvinyles (Tabershaw & Gaffey, 1974), l'exposition aux vapeurs de diesel (Muscat & Wynder, 1985), les aérosols d'huile (Eisen *et al.*, 1994) et enfin l'amiante (Muscat & Winder, 1992). Bien connue pour être la cause de nombreux cancers du poumon et de la plèvre, l'amiante est donnée, dans les travaux de Muscat, comme facteur d'une élévation modérée mais non significative de la fréquence des cancers des VADS ; en revanche, il est prouvé que l'exposition augmente le risque chez le sujet tabagique (Gustavsson *et al.*, 1998).

#### - Les facteurs nutritionnels

Un cas particulier mérite d'être individualisé, celui du syndrome de Plummer-Vinson ou Kelly Patterson, décrit simultanément et respectivement aux Etats-Unis et en Grande Bretagne (Marandas *et al.*, 2004). Il s'agit d'un syndrome associant une anémie sidéropénique et une atrophie des muqueuses digestives, retrouvé dans 50% à 90% des cas de cancers

rétrocricoiïdiens (cancers hypopharyngés), notamment chez la femme, et ce en dehors de toute exogénose. L'amélioration de la diététique avec l'apport de fer dans l'alimentation a fait chuter radicalement la fréquence de ce syndrome et de ce type de cancer (Rogers *et al.*, 1993).

Les carences vitaminiques, notamment en Vitamine A (Vit A) (Wald, 1987) et C (Block *et al.*, 1991) liées à une alimentation mal équilibrée, faciliteraient l'éclosion des cancers d'une façon générale. La moindre incidence des cancers en cas d'alimentation riche en légumes et en fruits est incontestable ; le risque de cancer de l'oropharynx est, par exemple, trois à cinq fois moindre selon l'importance relative de ce type d'alimentation (Negri *et al.*, 1994) . L'alimentation mal équilibrée qui caractérise les patients porteurs d'un cancer des VADS, pourrait être l'expression d'un contexte socio-économique, ou la traduction des désordres générés par l'alcoolisme autant que d'être de réels facteurs épidémiologiques, la valeur statistique de leur association au risque de cancer diminuant notablement lorsque les données sont ajustées sur le tabac et l'alcool (Franco *et al.*, 1989).

En raison de l'implication probable de carences vitaminiques dans la cancérogenèse des cancers des VADS, des essais thérapeutiques basés sur l'administration de dérivés de la Vit A ont été réalisés. Mackerras et ses collaborateurs ont ainsi pu démontrer que la prise de bêta-carotène pouvait diminuer le nombre de cancers des VADS (Mackerras *et al.*, 1988). Dans une première étude, Hong et ses collaborateurs avaient montré que l'administration d'un dérivé de la Vit A, l'Isotrétinoïne, pouvait prévenir l'apparition d'un second cancer, chez les patients ayant déjà eu un cancer des VADS (Hong *et al.*, 1990) ; ces résultats ont été infirmés récemment par la même équipe (Khuri *et al.*, 2006), dans une étude randomisée de phase III ayant inclus plus de mille patients. Dans le groupe de patients ayant reçu 30mg/24h d'Isotrétinoïne, l'apparition de second cancers n'était pas significativement diminuée par rapport au groupe n'ayant pas reçu de traitement. Ces résultats sont en accord avec une étude française publiée en 1996 (Bolla *et al.*, 1996), qui avait également démontré l'absence de bénéfice de l'administration d'un rétinoïde pour prévenir l'apparition d'un second cancer.

#### - Les autres facteurs

Déjà signalée par Almadori (Almadori *et al.*, 1990) en 1990 en Italie, la consommation de marijuana fait actuellement l'objet d'études aux Etats-Unis pour expliquer l'augmentation des cas chez les adultes de moins de 40 ans atteints de cancer des VADS, en particulier de la langue mobile (Marandas *et al.*, 2004). Ces études cliniques sont appuyées par des données expérimentales sur des modèles animaux (Zhang *et al.*, 1999).

Comme nous venons de le voir, les facteurs de risque en dehors du tabac et de l'alcool sont moins bien caractérisés. Néanmoins, leur identification et les travaux à leur sujet sont importants pour développer de nouvelles stratégies de prévention.

#### 4. Classification histologique

La cavité buccale, l'oropharynx et l'hypopharynx sont tapissés d'un épithélium digestif alors que le larynx est recouvert d'un épithélium respiratoire. Quelque soit la localisation, la très grande majorité des cancers se développent à partir de ce revêtement épithélial. Selon la classification WHO (WHO, 2005), on distingue parmi les tumeurs épithéliales malignes, les épithéliomas spinocellulaires (ou carcinomes épidermoïdes), Squamous Cell Carcinoma (SCC) des anglo-saxons, dont il existe différents sous groupes en fonction de la localisation (tableau N°1). Dans notre travail, seules les tumeurs appartenant à ce groupe ont été étudiées. Les autres types histologiques de tumeurs épithéliales sont résumés dans l'annexe 3.

Tableau N°2 : Classification histologique internationale WHO des tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.

#### Malignant epithelial tumours

##### Cavité buccale et oropharynx

Squamous cell carcinoma	8070/3 <sup>1</sup>
Verrucous carcinoma *	8051/3
Basaloid squamous cell carcinoma *	8083/3
Papillary squamous cell carcinoma *	8052/3
Spindle cell carcinoma	8074/3
Acantholytic squamous cell carcinoma	8075/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3

##### Hypopharynx et larynx

Squamous cell carcinoma	8070/3
Verrucous carcinoma	8051/3
Basaloid squamous cell carcinoma	8083/3
Papillary squamous cell carcinoma	8052/3
Spindle cell carcinoma	8074/3
Acantholytic squamous cell carcinoma	8075/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3

<sup>1</sup> : Morphology code of the International Classification of Diseases for oncology (ICD-O) {821} and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behavior is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours, and /1 for borderline or uncertain behavior.

\* : Ces trois types histologiques sont illustrés par des coupes histologiques regroupées dans la figure N° 9.

Le carcinome basaloïde squameux se différencie par son mauvais pronostic, celui-ci étant lié à un taux de métastases viscérales élevé (> 60%) ; en effet, les métastases représentent la première cause de décès des patients pour ce type de tumeur, ce qui est tout

à fait inhabituel pour les épithéliomas spinocellulaires. Nous avons confirmé cette particularité dans le cadre d'une étude cas-témoins comportant 49 patients, constituant la plus grande série mondiale de carcinomes basaloïdes squameux des VADS publiée à ce jour (Soriano & Righini , 2005) (annexe 4).

Parmi les tumeurs situées au niveau du cavum, on distingue un type histologique particulier à cette localisation : le carcinome indifférencié de type nasopharyngé, Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type (UCNT) des anglo-saxons.

Ce type de carcinome correspond à une répartition géographique et ethnique bien particulière avec trois zones d'endémie : le pourtour méditerranéen, l'Asie du sud est et la population esquimaux.

L'intoxication éthylo-tabagique n'est pas incriminée. Le rôle du virus Epstein-Barr, de certains facteurs nutritionnels et vraisemblablement génétiques est reconnu.

Il s'agit de tumeurs particulièrement chimio et radiosensibles, comme nous avons pu le confirmer dans une étude rétrospective comportant 44 patients (Righini *et al.*, 2006) (annexe 5).

Pour ces différentes raisons, ce type histologique a été écarté de notre étude par souci d'homogénéité dans nos résultats.

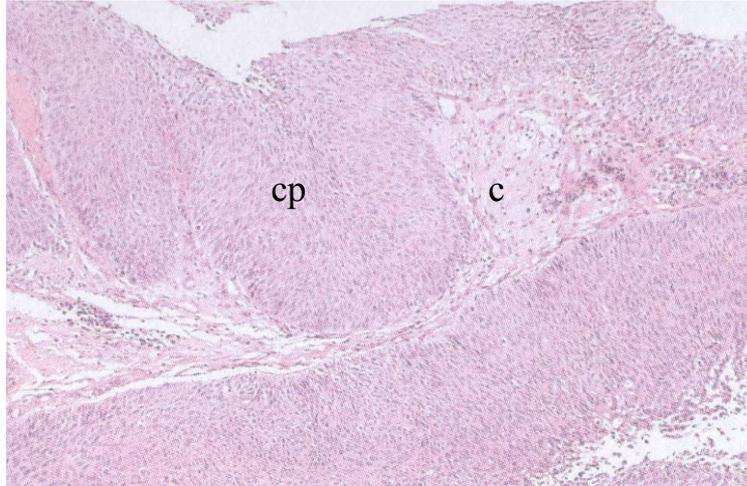
Figure N° 9 : Coupes histologiques d'un carcinome verruqueux (2a), d'un carcinome papillaire (2b) et d'un carcinome basaloïde squameux (2c). Coloration HES (Hématoxyline éosine).

2a (x 5)



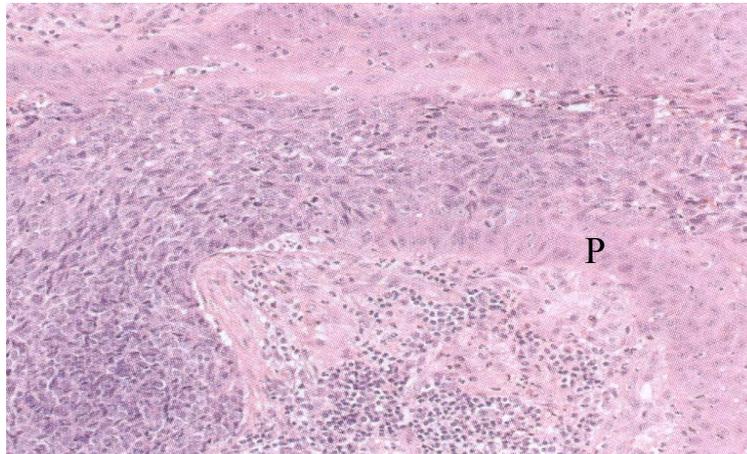
c : chorion tumoral ; cv : carcinome verruqueux caractérisé par une hypertrophie du revêtement de surface et une hyperkératose marquée.

2b (x10)



c : chorion ; cp : carcinome papillaire qui s'organise le long d'axes conjonctivo-vasculaires ramifiés.

2c (x20)



Contingent basaloïde d'un carcinome basaloïde squameux avec des zones où les cellules (avec un gros noyau régulier) s'organisent en palissade (P).

## 5. Classification TNM et stades

Pour chaque localisation, il existe une classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 2002). Cette classification est basée sur les données de l'examen clinique, des explorations endoscopiques et de l'imagerie médicale (tomodensitométrie, imagerie par résonance magnétique).

Il existe pour chaque localisation anatomique une classification T (annexe 6).

La classification N est M sont communes à toutes les localisations :

N

N1 : ganglion unique homolatéral  $\leq 3$  cm

N2a : ganglion unique homolatéral  $< 3$  cm,  $\leq 6$  cm

N2b : ganglions multiples homolatéraux  $\leq 6$  cm

N2c : ganglions bilatéraux, controlatéraux  $\leq 6$  cm

N3 : ganglion  $> 6$  cm

## M

Mx : renseignements insuffisants pour classer des métastases à distance

M0 : pas de métastases à distance

M1 : présence de métastase(s) à distance

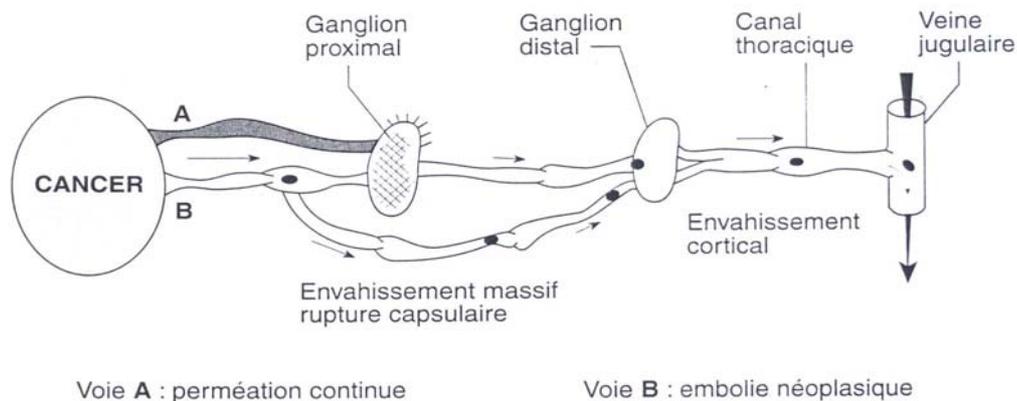
A partir de la classification TNM, pour chaque localisation, un regroupement par stades peut être fait (I à IV) (annexe 6).

La classification TNM a été modifiée 6 fois depuis 1968, chaque version gagnant en précision.

On notera néanmoins que dans la dernière classification, deux éléments ne sont toujours pas intégrés ; il s'agit (Temam *et al.*, 2004a) :

- 1) du niveau d'envahissement ganglionnaire (cervical supérieur, moyen et inférieur) ;
- 2) de la notion d'envahissement ganglionnaire dépassant le premier relais (figure N°15).

Figure N° 10 : Représentation de l'envahissement des voies lymphatiques par un cancer (d'après Cabarrot *et al.*, 2004). Ganglion proximal = premier relais ganglionnaire.



## 7. Les traitements

Les traitements des cancers des VADS comporte le traitement de la tumeur primitive et des aires ganglionnaires cervicales.

Trois types de traitements sont utilisés dans le traitement des cancers épidermoïdes de la cavité buccale, du pharynx et du larynx : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

### - La chirurgie

Durant ces trente dernières années, la chirurgie a connu deux axes de développement :

- 1) la chirurgie conservatrice dans les tumeurs de petit stade ;
- 2) la chirurgie reconstructrice en cas de tumeurs localement avancées.

La chirurgie conservatrice s'est développée essentiellement dans le traitement des tumeurs du larynx ; elle a permis de traiter certaines tumeurs avec la même efficacité carcinologique que les chirurgies mutilantes, comme la laryngectomie totale, sans avoir recours à la radiothérapie.

La chirurgie reconstructrice a également connu un grand essor notamment pour les tumeurs de la cavité buccale, de l'oro et de l'hypopharynx (Julieron, 2004 ; Righini *et al.*, 2005) (annexe 7). Ceci a eu indéniablement une répercussion favorable sur la qualité de vie des patients après traitement.

#### - La radiothérapie

Son rôle curateur est établi dans le traitement des cancers des VADS. Elle peut être utilisée seule, mais le plus souvent associée à la chirurgie et/ou la chimiothérapie.

La radiothérapie dite « standard » ou « avec un fractionnement classique » délivre 2 Gy par fraction (ou séance) 5 fois par semaine jusqu'à une dose totale de 60 à 70 Gy, en fonction du territoire irradié (tumeur, territoires ganglionnaires), et selon qu'il s'agit d'une radiothérapie post opératoire ou non (Bourhis *et al.*, 1997).

Des modifications du fractionnement d'une part, et l'adjonction d'une chimiothérapie (Chimio-radiothérapie, CT – RT) d'autre part, ont permis d'optimiser les résultats de la radiothérapie standard.

Il existe deux options principales pour modifier le fractionnement en vue d'améliorer l'index thérapeutique de la RT :

- 1) augmenter la dose totale par hyperfractionnement (RT hyperfractionnée) ;
- 2) diminuer le temps total par accélération (RT accélérée).

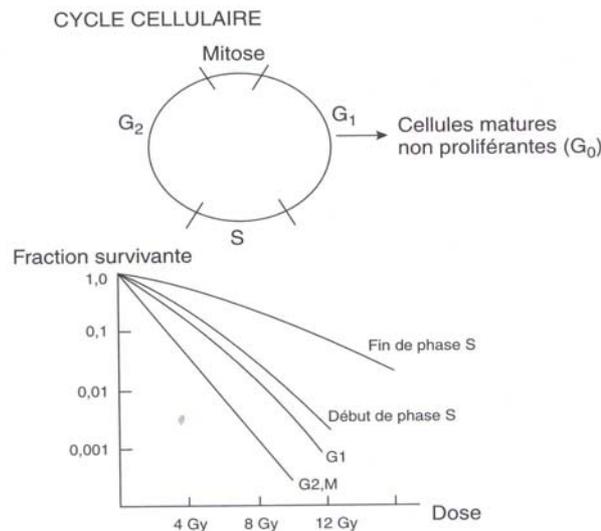
Une vingtaine d'études randomisées ont été réalisées pour comparer une RT conventionnelle à une RT à fractionnement modifié dans le traitement des carcinomes des VADS. Il ressort de ces études que la modification du fractionnement augmente le contrôle loco-régional (Bourhis *et al.*, 2000a) et la survie de 5% à 3 ans et 9% à 5 ans avec la radiothérapie hyperfractionnée (Bourhis *et al.*, 2004).

La justification de l'adjonction d'une chimiothérapie à la radiothérapie est de :

- 1) vaincre la radiorésistance de certaines cellules ;
- 2) d'inhiber les mécanismes de réparations des anomalies de l'ADN provoquées par l'irradiation ;
- 3) de redistribuer les cellules tumorales dans le cycle cellulaire pour augmenter leur radiosensibilité ;
- 4) d'éradiquer les micro-métastases.

Concernant le troisième point, il convient de préciser que la sensibilité des cellules vis à vis des radiations ionisantes varie en fonction de leur position dans le cycle cellulaire, cette sensibilité pouvant varier d'une souche cellulaire à l'autre. Les phases les plus sensibles étant M, le passage de G1 en S, la plus résistante étant la fin de la phase S (figure N° 11).

Figure N° 11 : Influence de la position dans le cycle cellulaire sur la survie après irradiation des cellules de mammifères (d'après Daly-Schweitzer, 1998).



La synchronisation par redistribution repose sur la destruction préférentielle des cellules en phase sensible, entraînant le passage des autres cellules initialement dans une phase de résistance, dans une phase plus sensible lors de l'irradiation suivante. C'est probablement ce mécanisme qui explique l'augmentation de l'effet de la radiothérapie lorsque l'on rajoute une chimiothérapie, mais également lorsque l'on modifie le fractionnement.

La CT-RT a permis une amélioration significative du contrôle local et de la survie (8% à 5 ans) des tumeurs localement avancées inopérables (Pignon *et al.*, 2000) et en post opératoire dans les tumeurs à haut risque de récurrence (présence d'embolies au sein de la pièce, marge d'exérèse insuffisante, présence de métastases ganglionnaires avec ou sans rupture capsulaire) (Bernier *et al.*, 2004).

Par contre :

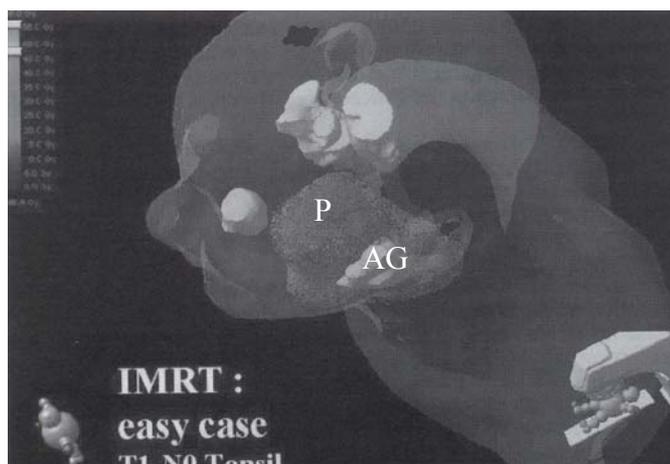
- 1) l'effet de la CT pour prévenir ou retarder les métastases à distance n'est pas confirmé dans la majorité des études.
- 2) l'association CT-RT augmente de façon significative la toxicité tardive, comme en témoignent les résultats de l'essai randomisé GORTEC (Denis *et al.*, 2003), qui montre un excès de toxicité tardive dans le bras comportant la chimiothérapie.

D'autres approches sont en cours d'évaluation et en particulier l'escalade de dose par radiothérapie conformationnelle par IMRT (radiothérapie conformationnelle avec modulation de dose) et l'utilisation concomitante de nouveaux agents biomodulateurs en association avec l'irradiation, l'anti-récepteur EGF par exemple (Bourhis & Lartigau, 2000b ; Grégoire & Maingon, 2004).

L'IMRT est développée depuis moins de 10 ans. Elle permet d'obtenir une meilleure adaptation de la distribution de la dose à la forme exacte du volume cible, tout en respectant les contraintes de protection des organes critiques, en particulier la moelle épinière.

Les premiers résultats publiés sont encourageants, mais il s'agit de comparaisons historiques et non randomisées. Par ailleurs, il est probable que l'IMRT permettra la conservation d'une fonction salivaire proche de la normale pour les tumeurs de petit volume et bien latéralisées (Chao et al., 2001) (figure N°11).

Figure N° 12 : Exemple de distribution de dose pour un patient traité par IMRT pour une tumeur T1 N0 de l'amygdale gauche. Dans ce cas, l'IMRT permet d'exclure totalement la parotide controlatérale. P : parotide gauche ; AG : amygdale gauche.



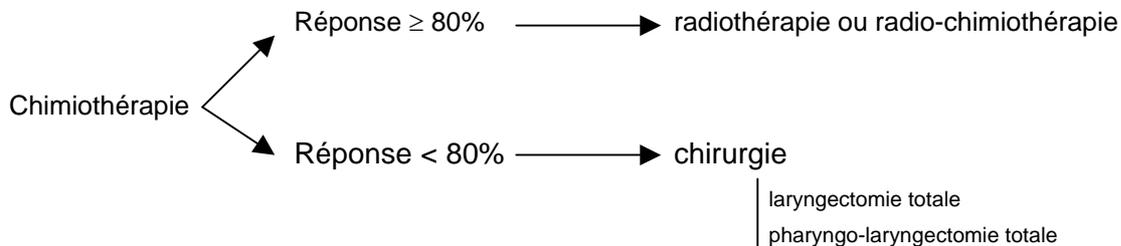
#### - La chimiothérapie

Elle peut être utilisée en association avec la radiothérapie comme vu précédemment, dans le cadre de protocole de préservation d'organe, ou en situation palliative (échec des traitements locorégionaux et/ou métastases). Elle n'est pas utilisée en cas de tumeur de petite taille, opérable.

Les chimiothérapies réalisées dans le cadre de protocole de préservation d'organe s'adressent aux cas de tumeurs laryngées ou hypopharyngées localement avancées nécessitant une chirurgie mutilante avec ablation du larynx. Ce sont des chimiothérapies dites « néo-adjuvantes » ou « d'induction ».

En fonction de la réponse à la chimiothérapie, une chirurgie ou une radiothérapie est réalisée (figure N° 13).

Figure N° 13 : Protocole de préservation des tumeurs laryngées et hypopharyngées appliqué au niveau national et international.



Les agents anticancéreux utilisés dans le cadre de ces protocoles appartiennent à trois classes thérapeutiques (Faivre & Temam, 2004) :

- 1) les analogues du platine (Cisplatine, Carboplatine) ;
- 2) les anti-métabolites (5-fluoro-uracile) ;
- 3) les taxanes (Docetaxel, Paclitaxel).

La plupart des protocoles associent un sel de platine et du 5-fluoro-uracile. Le plus connu est le protocole Al-Sarraf qui associe trois cycles de 5 jours de Cisplatine - 5-fluoro-uracile. Cette chimiothérapie d'induction permet d'obtenir des taux de réponse objective de 51 à 80%, dont 20 à 50% de réponses cliniques complètes (Faivre & Temam, 2004).

En ce qui concerne le larynx, deux études randomisées ont comparé la chimiothérapie d'induction à la chirurgie d'emblée ; il s'agit de l'étude des Vétérans (The Department of Veteran Affairs laryngeal Cancer Study Group, 1991) et du GETTEC (Janot *et al.*, 2002).

L'étude des Vétérans comprenait 332 patients. 166 ont eu une laryngectomie totale d'emblée, et 166 ont reçu une chimiothérapie selon le schéma Al-Sarraf. 107 patients sur 166 du bras chimiothérapie ont bénéficié d'une radiothérapie. Parmi les 107 patients ayant eu un traitement conservateur, 11 ont rechuté et ont été laryngectomisés secondairement. Au total, sur les 166 patients du bras de chimiothérapie, le taux de préservation laryngé à deux ans a été de 66%. Les patients ayant été opéré d'emblée avaient une survie identique à 2 ans, de 68%. Cette étude a véritablement lancé le concept de préservation laryngée.

L'étude du GETTEC comportait 68 patients. La méthodologie était la même que l'étude précédente. Le taux de préservation laryngée était plus faible (42%). Malgré le faible effectif, une différence significative ( $p : 0.006$ ) à 2 ans de la survie globale et de la survie sans récurrence existait entre le groupe chimiothérapie (69%) par rapport au bras chirurgie (84%).

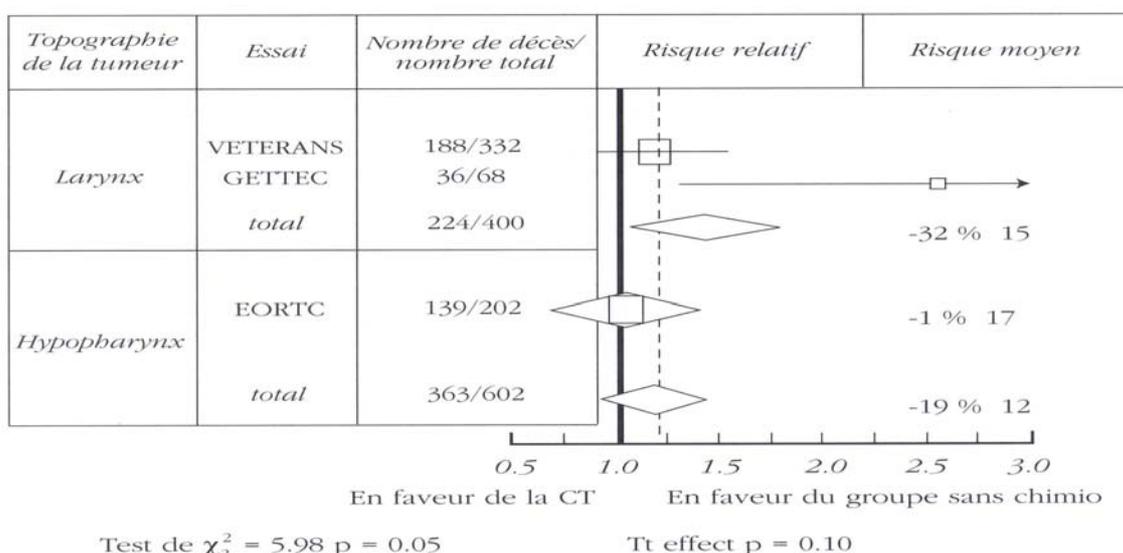
Pour les cancers de l'hypopharynx, la préservation laryngée s'est développée grâce à une étude de l'EORTC (Lefebvre *et al.*, 1996). Cette étude comportait 99 patients dans le bras chirurgie et 103 dans le bras chimiothérapie. Dans le bras chimiothérapie, le taux de préservation laryngée était de 63% à 3 ans. La survie globale était identique dans les deux groupes.

Une analyse rétrospective des résultats de l'étude du GETTEC sur les cancers de l'endolarynx a été faite pour tenter de comprendre les discordances de cette étude avec celle des Vétérans (Janot *et al.*, 2004). Il ressort de cette analyse que les patients inclus dans les deux études étaient notablement différents, avec un pourcentage plus important de grosses tumeurs (T3-T4) parmi les patients d'origine française, alors que 36 patients ayant une tumeur classée T2 ne justifiant donc pas une laryngectomie totale avait été inclus dans l'étude américaine.

Cette analyse montre qu'il est impossible, et peut être dangereux, d'extrapoler à la France les résultats des études américaines, sans une étude rigoureuse de la population traitée.

Une méta-analyse à partir de données actualisées des études des Vétérans, du GETTEC et de l'EORTC (Pignon *et al.*, 2000) a démontré que, pour le larynx où le pronostic est directement lié au contrôle local, la préservation laryngée n'est pas sans risque, puisque le risque de décès est accru de 32% dans le bras de préservation, rejoignant donc les conclusions de l'étude GETTEC. Pour l'hypopharynx, ce risque est inchangé (1%). Pour le larynx et l'hypopharynx réunis, le risque est accru de 19% dans le bras de préservation avec cette fois ci pas de différence significative par rapport au bras chirurgie (figure N°13).

Figure N° 14 : Résultats de la méta-analyse sur les essais de la préservation d'organe dans le cancer du larynx et de l'hypopharynx (Pignon *et al.*, 2000).



Aucun schéma de chimiothérapie n'est validé en situation palliative.

Aucune étude n'a pu prouver l'intérêt de faire une chimiothérapie dans cette indication en terme de survie des patients. Il est vraisemblable que chez certains patients, bons répondeurs, il existe un gain en qualité de vie, notamment en ce qui concerne la douleur par le biais de l'effet antalgique de la chimiothérapie. Encore faut-il pouvoir évaluer ce bénéfice et quantifier le rapport bénéfice/risque (toxicité liée à la chimiothérapie) ; aucune étude ne l'a jamais fait.

- Les traitements émergents

Ces cinq dernières années sont apparues des thérapeutiques dites « ciblées ».

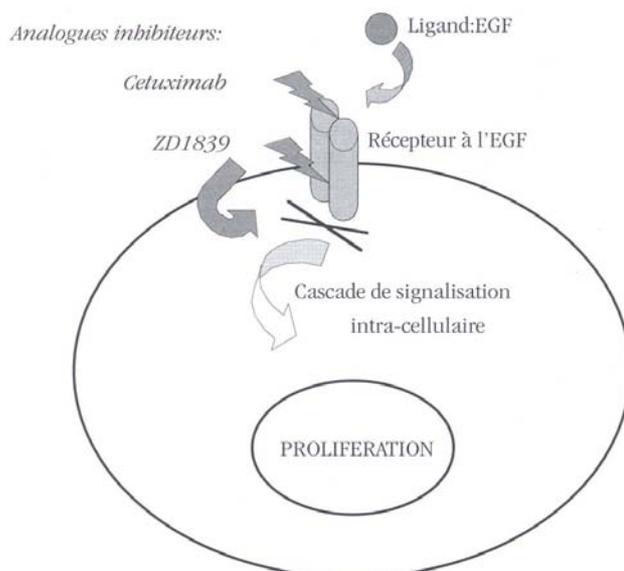
Parmi celles-ci des drogues dirigées contre la voie de l'EGF (Epidermal Growth Factor). Cette voie de signalisation participant à la prolifération tumorale est surexprimée dans plus de 80% des carcinomes épidermoïdes des VADS (Faivre & Temam, 2004).

Plusieurs analogues sont disponibles pour bloquer le récepteur à l'EGF ou EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) dans sa portion extra-cellulaire ou intra-cellulaire (Figure N° 15) :

- 1) Le Cetuximab (« Erbitux », C 225) est un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR. Plusieurs études de phases II ont montré son efficacité à plusieurs stades de la maladie. Son effet en association avec la chimiothérapie comportant du CDDP est en cours d'exploration dans de grandes études de phases III. Il a été également rapporté dans une étude randomisée de phase III ayant inclus 424 patients (Bonner et al., 2004 ; Bonner et al., 2006) que l'association du cetuximab à la radiothérapie dans les carcinomes épidermoïdes ORL localement avancés améliorerait significativement la survie globale sans aggraver la toxicité globale du traitement.
- 2) Le gefitinib ( Iressa ®, ZD1839) et l'erlotinib ( Tarceva ® , OSI-774), qui sont des peptides bloquant l'activité tyrosine kinase du récepteur, ont démontré une activité en monothérapie chez les patients métastatiques ou en récurrence (Caponigro, 2004).

Leur toxicité est par ailleurs faible par rapport aux chimiothérapies classiques.

Figure N° 15 : Modulation de la voie du récepteur à l'EGF par la chimiothérapie



## 7. Le pronostic

### - Pronostic global

Malgré les avancées thérapeutiques dans le domaine de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie, la survie globale des patients porteurs d'un carcinome épidermoïde des VADS ne s'est guère améliorée ces vingt dernières années.

Tous stades et localisations confondus, elle est comprise, à 5 ans, entre 45 et 50% en fonction des publications.

Trois facteurs principaux expliquent l'absence d'amélioration de la survie des patients pris en charge pour un cancer des VADS :

- 1) un taux élevé de rechutes loco-régionales ;
- 2) l'apparition d'un second cancer ;
- 3) le retard au diagnostic.

Concernant le second point, la fréquence des seconds cancers, dits métachrones, au niveau des VADS est élevée (3 à 5% / an) (Panosetti *et al*, 1989). Indiscutablement cet élément contribue au mauvais pronostic des cancers des VADS, car un traitement curatif des seconds cancers n'est pas toujours possible.

Le premier et le dernier point sont liés ; en effet, plus des deux tiers des tumeurs sont découvertes à un stade avancé (stades III- IV) (Vokes *et al.*, 1993), grevant les possibilités de traitements curatifs qu'il soit chirurgical et / ou radiothérapique, augmentant ainsi le risque de rechute loco-régionale.

- Les facteurs pronostiques

Déterminer des facteurs pronostiques pour les cancers épidermoïdes de la cavité buccale, du pharynx et du larynx, est un exercice difficile.

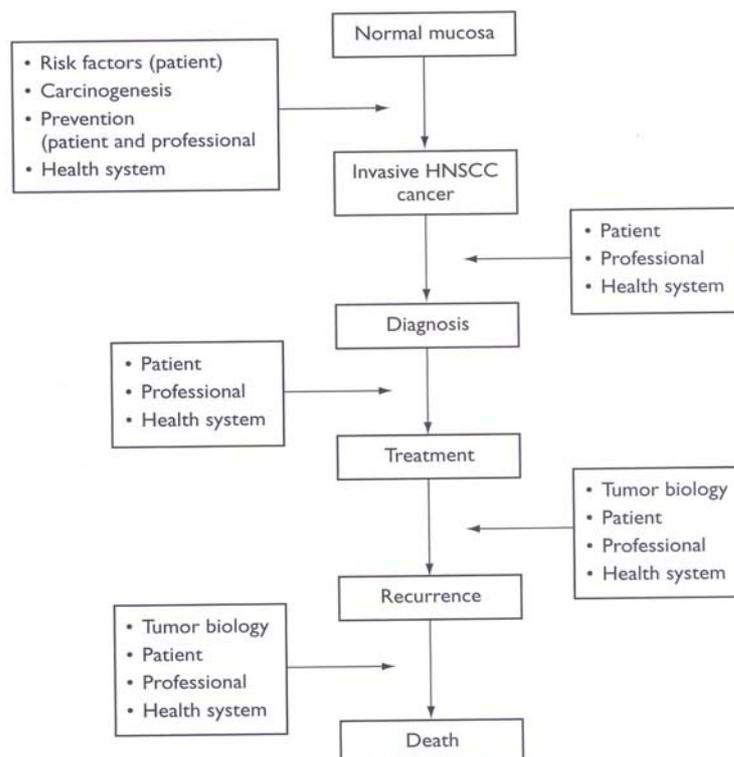
En effet, bien qu'ils s'intègrent dans une unité anatomique, histologique et étiologique, ces cancers sont beaucoup plus disparates qu'il n'y paraît.

On peut isoler trois groupes de facteurs pronostiques :

- 1) les facteurs liés à la tumeur ;
- 2) les facteurs liés au patient ;
- 3) les facteurs liés au traitement initial ;

La figure N° 16 résume ces différents facteurs et les différents moments où ils peuvent intervenir dans l'histoire naturelle d'un cancer épidermoïde des VADS.

Figure N° 16 : Histoire naturelle d'un cancer des VADS et les différents facteurs qui peuvent influencer sur l'évolution et le pronostic (d'après Kowalski *et al.*, 2006).



- Les facteurs liés à la tumeur

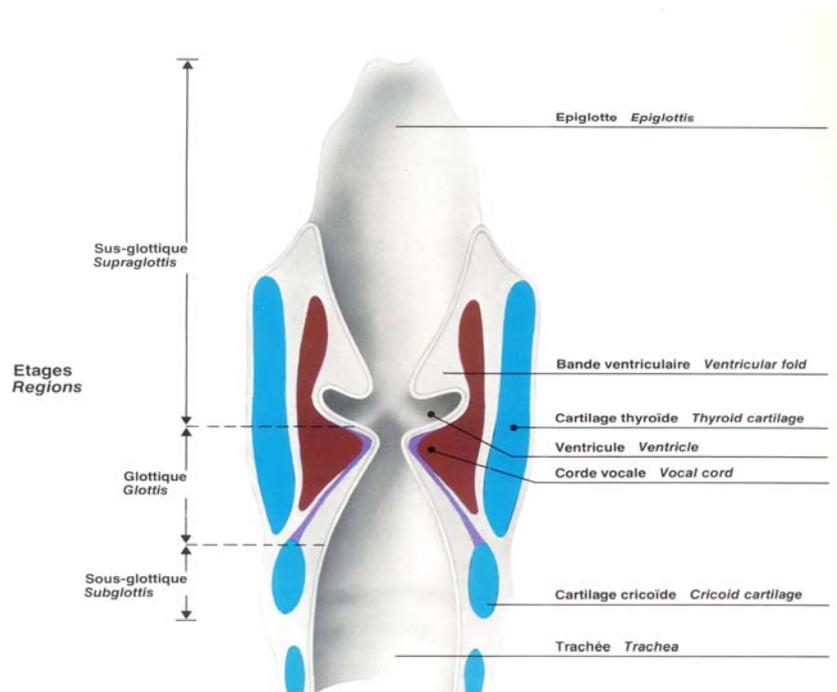
La survie est variable en fonction de la localisation tumorale. Elle est d'environ 60% pour les cancers du larynx, alors qu'elle est de 35% pour les cancers de la cavité buccale et de l'oropharynx et de 30 % pour l'hypopharynx (Baatenburg de Jong *et al.*, 2001 ).

Les chiffres rapportés sont des valeurs moyennes qui prennent en compte toutes les sous localisations anatomiques décrites pour chaque localisation ou région anatomique.

Néanmoins, pour une région anatomique donnée, les taux de survie sont variables en fonction de la sous localisation anatomique considérée.

L'analyse des taux de survie en fonction des sous localisations laryngées illustre parfaitement cette notion (Figure N°17) (Méric *et al.*, 2004).

Figure N° 17 : Taux de survie en fonction des sous localisations laryngées (d'après Méric *et al.*, 2004).



Localisation anatomique	% de survie à 5 ans
Région sus glottique (vestibule laryngé)	40
Plan glottique (cordes vocales)	70
Cancer limité à 1 corde vocale	90
Région sous glottique	30
<b>Total</b>	<b>58</b>

La figure N°17 souligne clairement le bon pronostic des cancers du plan glottique par rapport aux cancers sus et sous glottiques.

En analyse statistique multivariée, pour chaque localisation, la taille tumorale, l'envahissement ganglionnaire et la présence ou non de métastases sont des facteurs pronostiques indépendants (Baatenburg de Long *et al.*, 2001).

Néanmoins, quelque soit la localisation, le pronostic est inversement proportionnel au stade.

Sur le plan histopathologique, cinq facteurs pronostiques sont identifiés :

- 1) le volume tumoral ;
- 2) le degré de différenciation tumorale ;
- 3) le type histologique ;
- 4) la présence d'embolies vasculaires et/ou périnerveux ;
- 5) l'envahissement ganglionnaire.

Plus le volume tumoral est important, moins bon est le pronostic (Le Tourneau *et al.*, 2005).

Plus le degré de différenciation est élevé, meilleur est le pronostic (Temam & Janot, 2004a). Parmi les carcinomes épidermoïdes, le carcinome basaloïde squameux est de mauvais pronostic, car corrélé à un taux de métastases viscérales élevé (Soriano & Righini, 2005).

La présence d'embolies intra-tumorales est corrélée au degré d'envahissement ganglionnaire qui est lui-même un facteur de mauvais pronostic (Temam & Janot, 2004a).

Enfin plus les ganglions envahis sont bas situés dans le cou, plus le nombre de ganglions envahis augmente, moins bon est le pronostic car le risque de métastases viscérales augmentent parallèlement.

La présence d'une rupture capsulaire est également de mauvais pronostic, car corrélée à une augmentation du risque de rechute ganglionnaire et de métastases viscérales (Le Tourneau *et al.*, 2005).

A titre d'exemple, le tableau N°3 souligne, pour l'oropharynx, la valeur pronostique du statut N clinique et histologique (Méric *et al.*, 2004).

Tableau N°3 : Cancer de l'oropharynx. 3a/ Survie à 5 ans en fonction de la classification TNM et du stade. 3b/ Survie à 5ans en fonction du nombre de ganglions envahis et de la présence ou non d'une rupture capsulaire ganglionnaire (d'après Méric et al., 2004).

3a

TNM	Stade	Survie à 5 ans
T1 N0 M0	I	60-70%
T2 N0 M0	II	50%
T3 N0 M0, T1,2,3 N1 M0	II	20-30%
Tout T4, tout N2, 3, tout M1	IV	15-20%

3b

Nombre de N+	Survie à 5 ans	Sites ganglionnaires	Survie à 5 ans	Rupture capsulaire	Survie à 5 ans
1	75%	1	70%	Non	75%
2-4	55%	plusieurs	30%	Oui	47%
≥ 5	25%				

N+ : envahissement ganglionnaire histologique.

En résumé les principaux facteurs pronostiques liés à la tumeur sont : 1) la localisation ; 2) le stade ; 3) le type histologique ; 4) le degré de différenciation tumorale.

#### - Les facteurs liés au patient

Les données de la littérature concernant les valeurs pronostiques du sexe et de l'âge des patients sont contradictoires. Il ne semble pas se dégager de consensus concernant ces deux variables.

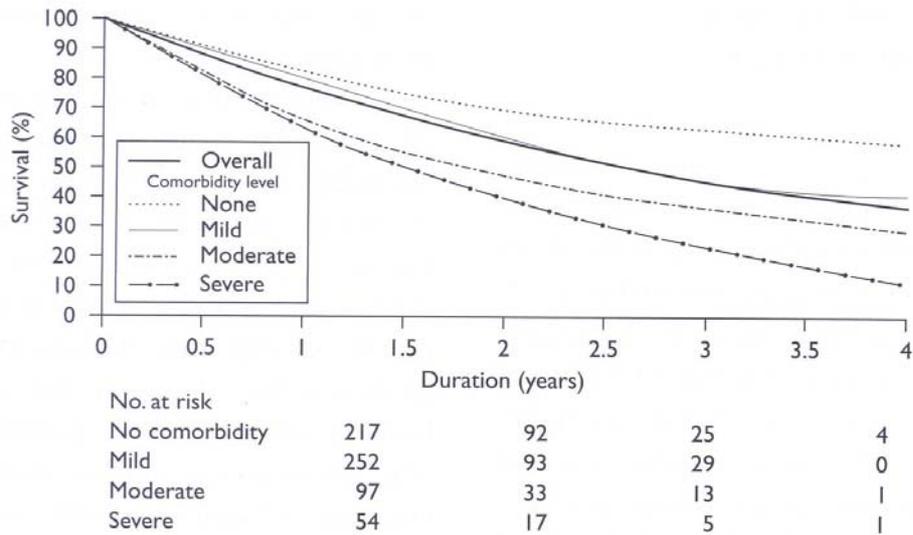
Par contre l'altération de l'état général des patients et l'existence de facteurs de co-morbidité (état nutritionnel, état cardio-respiratoire, immuno-dépression), sont des facteurs de mauvais pronostic, car ils conditionnent le choix et la tolérance des traitements et sont potentiellement une cause de décès (Temam & Janot, 2004a ; Chen *et al.*, 2001).

Piccirillo et Vlahiotis (Piccirillo & Vlahiotis, 2006) ont parfaitement démontré l'influence de ces facteurs, évalués grâce à un questionnaire de co-morbidité validé (Johnston *et al.*, 2001), le questionnaire ACE-27 (Adult Comorbidity Evaluation E-27) ; dans cette étude, parmi un groupe de 1201 patients traités pour un carcinome épidermoïde de la cavité buccale, de l'oropharynx et du larynx, ils ont pu démontrer que plus le score de morbidité était élevé, moins bonne était la survie globale dans le groupe de patients étudiés (figure N°18).

Enfin les conditions socio-économiques du patient peuvent également intervenir par le biais d'un retard à la consultation et, par ce biais, entraîner un retard au diagnostic ; elles peuvent

également intervenir après la prise en charge thérapeutique avec des conditions de suivi plus difficiles dans les milieux défavorisés (Kowalski *et al.*, 2006).

Figure N° 18 : Relation entre la survie globale et le score de co-morbidité (d'après Piccirillo et Vlahiotis, 2006).



#### - Les facteurs liés au traitement initial

En cas de traitement chirurgical, la qualité de l'exérèse (marges de sécurité par rapport aux berges tumorales, qualité des évidements ganglionnaires) est un facteur pronostique primordial (Smeele *et al.*, 2000). En cas de chimio et/ou radiothérapie, c'est la chimio et la radiosensibilité de la tumeur qui entrent en jeu, celles-ci impliquant des mécanismes moléculaires complexes (Temam & Janot, 2004a).

## **DONNEES DE LA LITTERATURE**

### **CHAPITRE II**

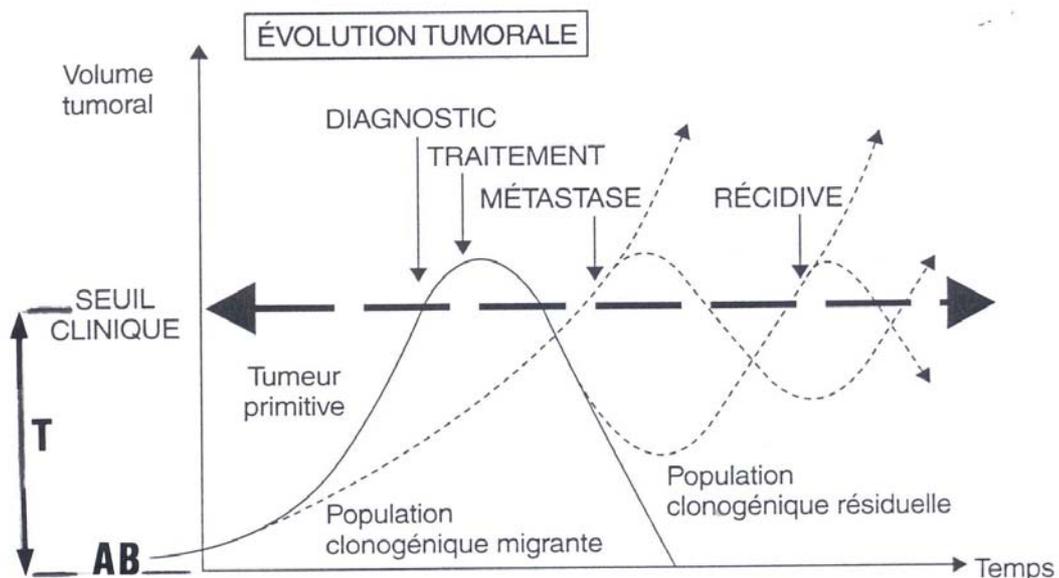
**Mécanismes biologiques (épigénétique exclue) impliqués dans la  
cancérogenèse des carcinomes des VADS**

## 1. Généralités

Les carcinomes malpighiens des VADS sont issus de clones cellulaires au sein desquels se sont accumulés progressivement des anomalies génétiques et épigénétiques (Califano *et al.* 1996, Forastiere *et al.*, 2001).

Le délai entre l'apparition de ces anomalies biologiques et le diagnostic clinique de la tumeur est difficile à évaluer, mais certainement de l'ordre de plusieurs années (Figure N° 19).

Figure N° 19 : Schéma théorique de l'évolution d'une tumeur maligne traitée (d'après Daly-Schweitzer, 1998). AB : altérations biologiques. T : temps écoulé entre l'apparition des altérations biologiques et le diagnostic clinique du cancer.



L'apparition des clones cellulaires malins résulte donc avant tout d'altérations du patrimoine génétique au sein des cellules qui les composent. Ces anomalies concernent essentiellement l'ADN nucléaire et à un degré moindre l'ADN mitochondrial.

Sous l'action de différents carcinogènes, majoritairement issus de la fumée de tabac et de l'alcool, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et/ou l'activation d'oncogènes est à la base de la cancérogenèse.

Des altérations génétiques dominantes sont à l'origine de la transformation d'un proto-oncogène en oncogène, ces gènes codant pour des protéines qui contrôlent activement la

prolifération cellulaire. L'altération d'un seul allèle est suffisante pour entraîner la modification de la fonction du gène.

A l'opposé, les gènes suppresseurs de tumeur sont dits récessifs ; ce sont, classiquement, des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. La perte de fonction de ces gènes implique la présence d'altération sur les deux allèles.

L'altération du fonctionnement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur crée, à terme, une rupture de l'homéostasie cellulaire, par déséquilibre entre l'activation et l'inhibition de la croissance cellulaire, à l'origine de la prolifération cellulaire incontrôlée qui caractérise les cellules cancéreuses.

La multiplicité des anomalies et la complexité des associations possibles reflètent la variabilité des évolutions possibles de la maladie.

La majorité de ces anomalies apparaissent à un stade précoce de la cancérogenèse. Elles peuvent être détectées au sein de lésions précancéreuses (dysplasies), mais également au sein d'une simple hyperplasie de la muqueuse normale exposée de façon chronique aux carcinogènes.

Califano et ses collaborateurs ont parfaitement démontré que les transformations histologiques successives qui marquent l'évolution d'une muqueuse normale au stade de cancer invasif s'accompagnent, en parallèle, d'une accumulation de modifications génétiques et épigénétiques (Figure N° 20).

Ce concept de cancérisation progressive pour les carcinomes des VADS a été établi à partir d'études faites au niveau de la cavité buccale mais également au niveau du larynx (Califano *et al.*, 1996 ; Califano *et al.*, 2000).

Cependant la séquence des événements n'est pas figée et il semble que ce soit l'accumulation des altérations plus que l'ordre dans lequel elles apparaissent qui détermine la progression tumorale.

Les anomalies génétiques concernent la structure même de l'ADN alors qu'en cas d'anomalies épigénétiques, cette structure est respectée.

Qu'elles soient génétiques ou épigénétiques, ces anomalies vont provoquer la modification de la fonction et/ou l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur (ARN messager) et donc la production de protéines anormales en quantité ou en qualité (Figure N°21).

Figure N° 20 : Aspects cliniques, histopathologiques et accumulation des anomalies moléculaires retrouvées aux différents stades de l'évolution d'une muqueuse normale au stade de cancer invasif au niveau de la cavité buccale (Selon Califano et al., 1996). P16, p53, pTEN (phosphatase and tensin homologue): gènes suppresseurs de tumeur / Cyclin D1 : pro-oncogène / LOH : perte d'hétérozygotie.

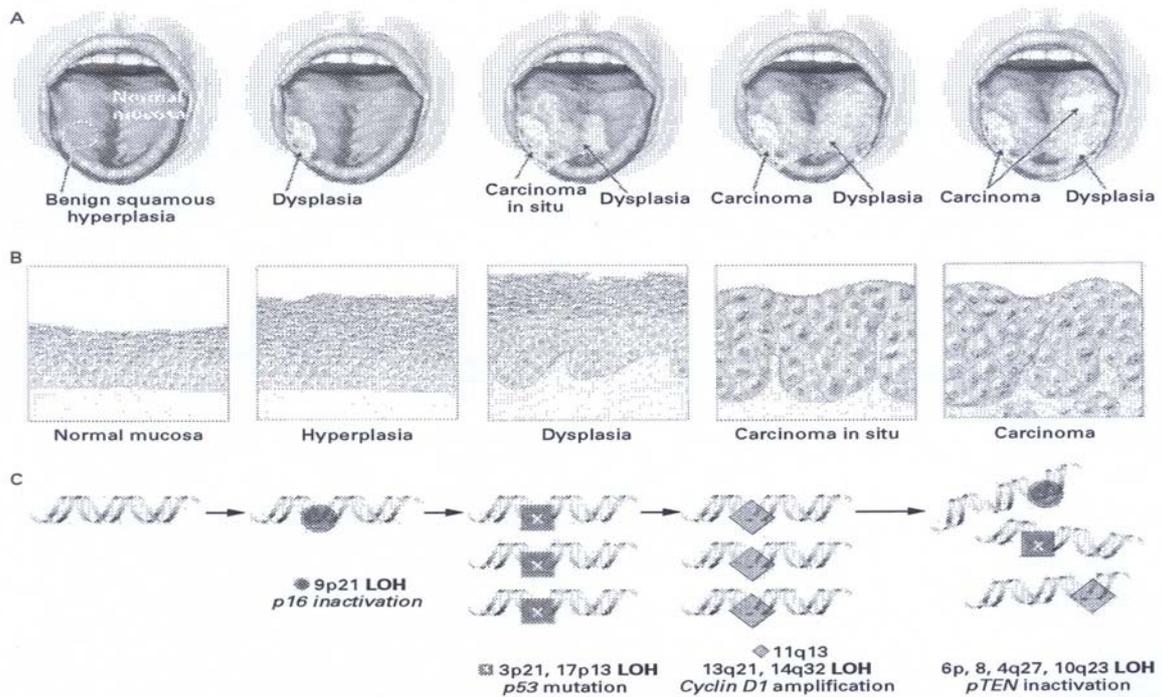
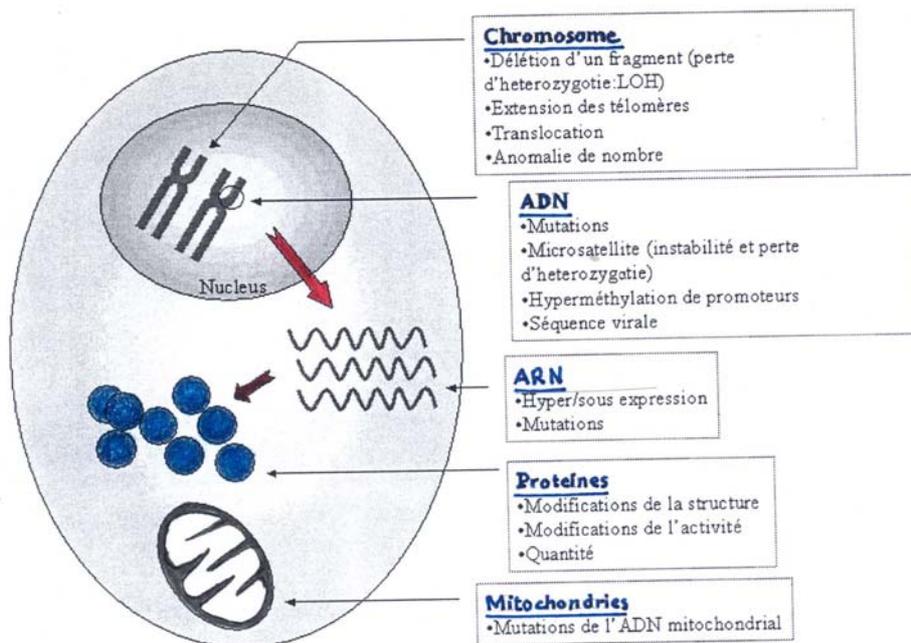


Figure N° 21 : Les différents types d'altérations moléculaires retrouvées dans les carcinomes des VADS (d'après thèse Temam, 2004).



## 2. Les altérations cytogénétiques

L'analyse caryotypique des cellules des cancers des VADS montre la présence de nombreuses altérations chromosomiques.

### - L'aneuploïdie

La modification du contenu nucléaire en ADN, ou aneuploïdie, est constante quelque soit le type de cancer ; elle est le signe d'une instabilité chromosomique.

Sudbo et ses collaborateurs retrouvent une corrélation entre le contenu en ADN de lésions leucoplasiques de la cavité buccale sans carcinome associé et la transformation de ces lésions en carcinome invasif ; en effet, avec un recul moyen de 103 mois, ces auteurs rapportent 3% des lésions diploïdes ayant évoluées vers un carcinome, contre 84% des lésions aneuploïdes (Sudbo *et al.*, 2001). Ce travail suggère que l'étude de la ploïdie peut prédire le risque de dégénérescence maligne des lésions prénéoplasiques, du moins pour la cavité buccale.

### - Les anomalies chromosomiques

Les anomalies chromosomiques identifiées sont des pertes (perte d'hétérozygotie, perte d'allèle ou délétion) soit des gains de fragments de chromosomes (extension des télomères). Les pertes et les gains de matériel chromosomique impliquent la grande majorité des bras de chromosomes, néanmoins, il existe des altérations récurrentes (Scully *et al.*, 2000).

Les pertes de fragments chromosomiques peuvent être la conséquence d'une fragilité chromosomique ou d'une agression engendrant des cassures et des remaniements de chromosomes. Ce dernier point explique que lorsque survient une mutation sur un des allèles d'un gène, comme les gènes suppresseurs de tumeur, l'autre allèle peut être inactivé par délétion.

L'étude de la perte d'hétérozygotie (LOH pour Loss Of Heterozygosity) est d'ailleurs un des moyens utilisés pour l'identification des gènes suppresseurs de tumeur (Field, 1996).

Les bras de chromosomes les plus souvent concernés par la perte d'un allèle dans les carcinomes des VADS sont les suivants : 3p, 5q, 6p, 8q, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 17p et 18q (Partridge *et al.*, 1999 ; Califano *et al.*, 2000 ; Jang *et al.*, 2001).

Les événements les plus précoces sont les pertes de matériel héréditaire sur les bras courts des chromosomes 9 (9p) et 3 (3p). La perte du 17p détermine le passage à la dysplasie. Enfin les anomalies des bras longs des chromosomes 13 (13q) et 11 (11q) précèdent les pertes du 8p, 6p et 18q qui signent le passage au stade de carcinome invasif (Figure N° 20).

Il est probable que la principale conséquence des pertes de matériel chromosomique soit l'altération de la fonction d'anti-oncogènes. Toutefois ce lien n'a été clairement établi que pour 3 d'entre eux.

Dans 70% des carcinomes des VADS, sont rapportées des délétions au niveau du bras court du chromosome 3 (3p) ; les études ont permis d'affiner les régions de perte aux bandes 3p13-3p21.1, 3p21.3-3p23 et 3p25 (Wu *et al.*, 1993). Dans ces régions, l'identification de gènes suppresseurs de tumeur a été entreprise. Ont été étudiés, le gène VHL (von Hippel Lindau), le récepteur de type II au TGF $\beta$  (TGF $\beta$ RII = Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor type II), le gène FHIT (Fragile histidine triad) et le gène hOGG1 (human 8- Oxo-Guanine DNA Glycosylase 1). A l'exception d'hOGG1 qui intervient dans la réparation de l'ADN, aucun des autres gènes ne semblent clairement impliqués dans la cancérogenèse des carcinomes des VADS (Blons *et al.*, 2003).

La délétion au niveau du locus 9p21 est avec les délétions au niveau 3p, la plus fréquente et la plus précoce des délétions identifiées pour les carcinomes des VADS (Forastiere *et al.*, 2001 ; Califano *et al.*, 1996). Elle se traduit par la perte d'activité du gène P16 (CDKN2a/INK4a), impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire.

La délétion au niveau 17p13 est elle aussi fréquente et intervient également précocement dans le processus de cancérogenèse. Ce locus correspond au gène TP53 qui code pour la protéine p53, dont l'autre mécanisme d'inactivation est la mutation. Son inactivation entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G1/S .

Dans plus de 70% des cas, les bras de chromosomes concernés par un gain de matériel (allongement télomérique), sont les bras longs des chromosomes 11 (11q13) et 3 (3q). Des gains de matériel ont aussi été décrits sur les bras longs des chromosomes 8q, 19q, 17q et sur le bras court du chromosome 19p dans environ 50% des cas (Bockmuhl *et al.*, 1998). Ces gains de matériel ne semblent pas intervenir directement dans la carcinogenèse des carcinomes des VADS à l'exception de la région 11q13 qui contient le locus du gène Cyclin D1 (CCND1).

Dans ce cas, le gain de matériel chromosomique entraîne l'activation de ce pro-oncogène avec surproduction de la protéine correspondante qui garde une structure normale et qui, par l'intermédiaire de cyclines dépendantes kinases (CDK4 et 6), phosphoryle le gène Rb permettant la progression du cycle cellulaire. Ce mécanisme d'activation a été confirmé par technique de fluorescence *in situ* (Lese *et al.*, 1995).

Un taux élevé d'anomalies chromosomiques serait en soit un facteur de mauvais pronostic (Li *et al.*, 1994).

Par ailleurs :

- Des délétions localisées sur les bras longs des chromosomes 10 et 18 seraient corrélées à un stade tumoral élevé et par voie de conséquence à un mauvais pronostic suggérant qu'un gène de progression tumorale puisse être localisé sur ces chromosomes (Blons *et al.*, 2002). Ce gène n'a toujours pas été identifié ;

- L'amplification de CCDN1 est un facteur indépendant de mauvais pronostic dans les carcinomes des VADS. En effet, le taux de récurrence est plus fréquent et la récurrence survient plus précocement chez les malades qui sur exprime CCND1 (Michalides *et al.*, 1995).

### **3. Modification de l'ADN mitochondrial (ADNmt)**

L'ADN mitochondrial est indépendant de l'ADN nucléaire. Il s'agit d'un petit fragment de 16 000 paires de bases présent en multiples exemplaires dans chaque mitochondrie. Il a récemment été mis en évidence que de nombreuses mutations étaient présentes au niveau de cet ADN et ce, pour de nombreux cancers, notamment les carcinomes des VADS (Fliss *et al.*, 2000). Ces mutations sont localisées au niveau d'une région nommée « loop » (=boucle) (Sanchez-Cespedes *et al.*, 2001). L'implication de ces mutations sur la cancérogenèse des carcinomes des VADS reste à définir.

### **4. Les anti-oncogènes et oncogènes**

Quatre principaux anti-oncogènes et oncogènes sont identifiés dans la cancérogenèse des cancers des VADS. Il s'agit de P27, P16, TP53 et CCDN1

- P 27

Le gène P27 est un gène suppresseur de tumeur qui code pour la protéine p27 (p27<sup>Kip 1</sup>), une Cycline Dépendante Kinase Inhibitrice (CDK-I) appartenant à la famille Cip/Kip qui comprend également p21<sup>Cip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>; sa fonction consiste à bloquer le cycle cellulaire en G1 en se liant au complexe cyclinE/cyclin-dépendant kinase-2 (CDK2) inhibant ainsi la phosphorylation de Rb (Mineta *et al.*, 1999 ; Kapranos *et al.*, 2001). P27 est activé en réponse à des signaux extra-cellulaires, dont le TGF- $\beta$ , mais aussi l'inhibition de contact et la privation sérique. Son inactivation favorise le passage de la phase G1 à la phase S. Il n'y a pas de mutations connues pour le gène P27 dans les carcinomes des VADS et il semble que ce soit des modifications post transcriptionnelles qui soient en cause dans l'inactivation de ce gène (Pruneri *et al.*, 1999).

#### - P16 (CDKN2a/INK4a)

Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur qui code pour une protéine de 156 acides aminés, p16, qui inhibe l'activité catalytique du complexe CDK 4-6 / Cycline D, responsable de la phosphorylation de la protéine Rb. En inhibant la phosphorylation de Rb, p16 intervient donc directement dans le cycle cellulaire en bloquant une des charnières essentielles du cycle cellulaire située à la jonction G1/S (Ai *et al.*, 2003).

3 mécanismes d'inactivation de P16 ont été identifiés :

- 1) la délétion homozygote ;
- 2) la mutation ;
- 2) la méthylation de la région promotrice du gène.

Ce dernier point sera détaillé dans le chapitre concernant l'étude des altérations épigénétiques dans les cancers des VADS. Dans une revue de la littérature englobant tous types de tumeur, selon Rocco et Sidransky (Rocco & Sidransky, 2001), P16 étaient inactivé dans 68% des cas ; cette inactivation était due à une délétion homozygote dans 27% des cas, une mutation dans 11% des cas et une méthylation de la région promotrice du gène dans 30% des cas. Son inactivation serait liée à un mauvais pronostic du fait d'un risque de récurrence tumorale et d'envahissement ganglionnaire important.

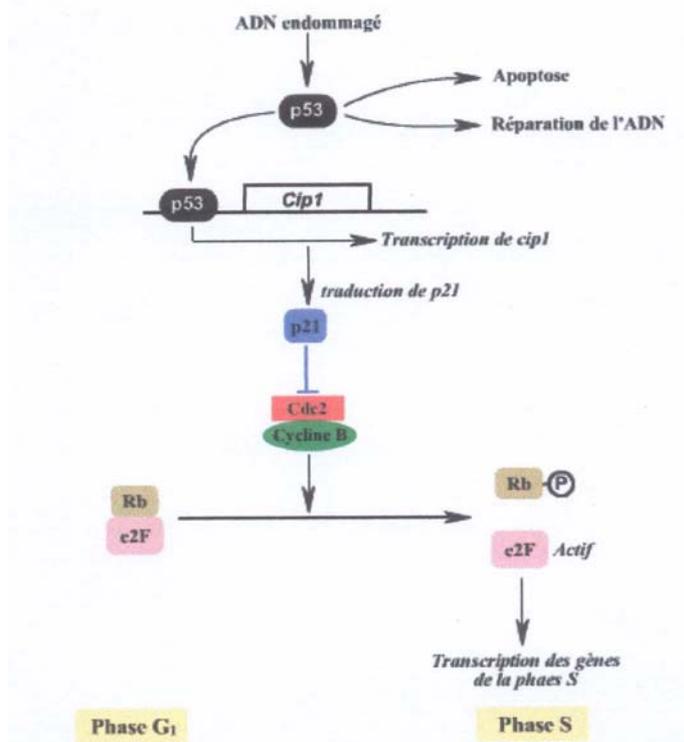
#### - TP53

La protéine p53 et son gène TP53 (situé en 17p13) ont été très étudiés dans les cancers d'une façon générale, en particulier dans les carcinomes épidermoïdes des VADS.

TP53 est un intervenant majeur dans la régulation de plusieurs voies de régulation de l'homéostasie cellulaire telles que la régulation du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et les mécanismes de réparation de l'ADN.

TP 53 est un gène suppresseur de tumeur ; cette appellation tient au fait qu'il est surexprimé au niveau de la cellule normale en cas d'altération de l'ADN chromosomique en provoquant, par l'intermédiaire de p53 (sous une forme phosphorylée), l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S ; cet arrêt intervient, entre autre, par le biais d'une trans-activation du gène Waf-1 (également dénommé Cip-1, Sid-1, P21), codant pour la protéine p21 (p21<sup>Cip1</sup>) qui inhibe un grand nombre d'enzymes du groupe des CDK indispensables au déroulement du cycle cellulaire (Figure N°22) (El-Deiry, 2003).

Figure N° 22 : Régulation du cycle cellulaire par p21<sup>Cip1</sup>, une CDK-I (Cycline Dépendante Kinase Inhibitrice) (d'après B. Arcangioli. [http://virologie.free.fr/11-cycle\\_cellulaire/cycle\\_cellulaire.htm](http://virologie.free.fr/11-cycle_cellulaire/cycle_cellulaire.htm)).



Le taux de p53 augmente lorsque l'ADN est endommagé. p53 peut alors conduire la cellule vers l'apoptose ou stimuler la réparation de l'ADN ou provoquer l'arrêt du cycle. L'arrêt en G<sub>1</sub> est en effet induit par p53 qui active la transcription du gène Cip-1 codant pour p21, inhibiteur des Cyclines Dépendantes Kinases

La surexpression de TP53 permet dans les cellules concernées de réparer les dommages causés à l'ADN.

Les altérations (cassures, mutations) peuvent être provoquées par différents agents comme les radiations ionisantes ou des substances chimiques contenues dans la fumées de tabac.

En cas de dommages trop importants, p53 engage la cellule vers la voie de l'apoptose, évitant ainsi la rentrée en cycle des cellules anormales et donc l'apparition de clones tumoraux. Cette voie implique la transcription d'autres gènes dont Bax qui est un gène de la famille Bcl2 ; ce gène peut induire directement l'apoptose en favorisant la libération du cytochrome c au niveau des mégapores des mitochondries (Figure N° 23).

La mutation est le principal mécanisme d'inactivation de TP53. Ce n'est pas le seul.

TP 53 est muté dans plus de 50% des cancers, tous types confondus.

Une mutation est notée dans 25% à 70% des carcinomes épidermoïdes des VADS, avec un chiffre moyen de 40% (Fan, 2001 ; Olivier *et al.*, 2002). Une multitude de mutations sont répertoriées, dont certaines, très précocement dans le processus de cancérogenèse.

Il n'existe pas à proprement dit de « hot-spot » de mutation ce qui oblige une recherche des altérations sur la totalité du gène ; cependant, les exons 4, 5, 6, 7 et 8 sont les plus fréquemment concernés.

Un lien de cause à effet a pu être établi entre les adduits du B( $\alpha$ )P-diol-époxyde, les nitrosamines et l'hydrogène peroxydé contenus dans la fumée de tabac et la survenue d'une mutation de TP53. Ces substances agissent directement au niveau de l'ADN au niveau des exons 4,5,6,7 et 8, plus particulièrement au niveau des Guanines (Denissenko *et al.*, 1996). Par ailleurs, une corrélation dose dépendante entre la consommation de tabac et la fréquence des mutations de TP53 a été constatée (Ahrendt *et al.*, 2000). Les carcinogènes contenus dans la fumée de tabac ne sont pas les seuls agents pouvant induire des mutations de TP53. Il a également été constaté des mutations au sein de carcinomes des VADS diagnostiqués chez les patients consommateurs de Betel, notamment dans les populations asiatiques.

Quelque soit l'agent causal des mutations, celles-ci sont souvent accompagnées d'une délétion du deuxième allèle (délétion en 17p). Néanmoins, il existe 5 à 10% de carcinomes des VADS pour lesquelles il n'existe pas de perte d'hétérozygotie du locus TP53, mais pour lesquelles il existe deux mutations différentes de TP53 sur chacun des allèles (Blons *et al.*, 2003).

Les études dans lesquelles un séquençage du gène a été réalisé montrent que dans plus de 50% des cas, les mutations prédisposent à l'existence d'une protéine p53 absente ou anormale .

La présence d'une protéine anormale est souvent liée à des modifications de ses caractéristiques physiques et/ou chimiques qui peuvent, entre autre, entraîner un allongement de sa durée de vie ; elle devient alors détectable en IHC au niveau du noyau.

L'analyse des mutations du gène TP53 étant difficilement applicable en routine, l'étude de p53 par IHC, du fait de sa relative simplicité, est un moyen indirect souvent utilisé pour étudier les mutations de TP53. La sensibilité et la spécificité de cette méthode varient en fonction des études. Ces variations sont dues en partie à la méthodologie, au nombre et aux types d'anticorps utilisés (Fan, 2001).

Enfin, comme nous l'avons vu, certaines mutations de TP53 peuvent être à l'origine d'une protéine tronquée, voir absente ; dans ces cas l'IHC est inopérante. C'est ainsi que la discordance entre les travaux d'analyse mutationnelle et d'IHC peut être au moins

partiellement expliquée par le fait que tous les mutants de p53 ne peuvent être identifiés par la deuxième méthode.

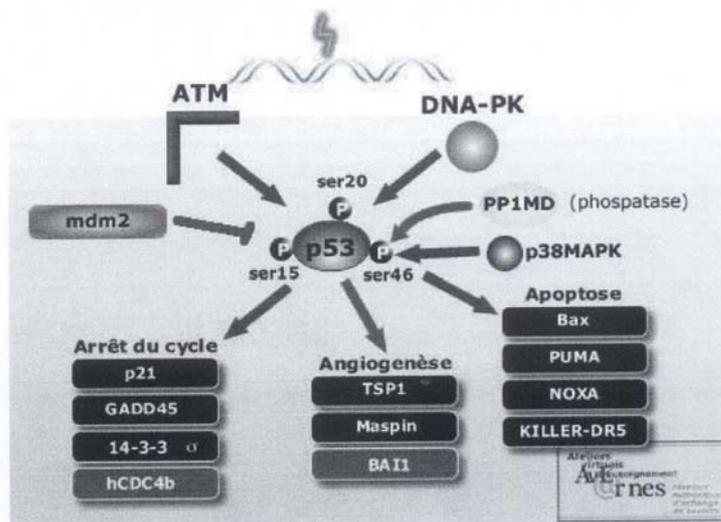
L'accumulation d'une protéine p53 anormale peut également provoquer la production d'anticorps détectables dans le sérum. Lors de notre étude (Lavieille & Righini, 1998), ces anticorps étaient détectés dans 44% des cas, sans qu'il y ait de corrélation entre une sérologie positive et la localisation, le stade tumoral, le degré de différenciation tumorale.

Enfin, rappelons que la détection de p53 en grande quantité par l'intermédiaire d'une étude IHC, ne signifie pas obligatoirement que TP53 est muté. En effet, p53 peut être stabilisée et inactivée par l'intermédiaire d'autres mécanismes en particulier la liaison avec les oncoprotéines E6 et E7 synthétisées par les virus de la famille HPV.

Il est maintenant bien établi que les mutations du gène TP53 et les altérations de la fonction de la protéine p53, sont des événements très précoces dans la cancérogenèse des carcinomes des VADS (Califano *et al.*, 1996 ; Califano *et al.*, 2000).

En revanche, la valeur pronostique des mutations de TP53 et la surexpression de p53 en IHC reste très controversée, avec des conclusions radicalement opposées en fonction des publications (Fan, 2001). Ce point sera rediscuté dans le chapitre des biomarqueurs dans les cancers des VADS.

Figure N° 23 : Quelques gènes dont la transcription est activée par p53 phosphorylée à la suite de dommages sur l'ADN. (d'après Yorghos Remvikos : les multiples facettes de p53. <http://www.avernes.fr/Oncologie/rubrique176> ).



p53 intervient dans la détection des dommages de l'ADN génomique, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, mais aussi dans la réparation et la régulation de toute forme de stress cellulaire. Son rôle permet d'activer (parfois d'inhiber) un très grand nombre de gènes, dont l'inventaire n'est pas fini. Quelques exemples caractéristiques sont fournis dans cette figure. Les deux inhibiteurs principaux de p53 sont également indiqués : l'interaction avec mdm2 est rendue impossible par la phosphorylation de la sérine N°15 ; la phosphatase PP1Md déphosphoryle la sérine N°46, en inactivant ainsi p53. De même figurent les trois kinases (p38 MAPK, DNA-PK, ATM) qui phosphorylent p53 suite à la détection de dommages (cassures par exemple) au niveau de l'ADN, rendant ainsi la protéine active.

- CCND1

CCND1 est un pro-oncogène qui est activé au cours du processus de cancérogenèse des VADS. Il est à noter que l'inactivation de P16 et l'activation de CCND1 apparaissent souvent associés suggérant une coopération de ces deux voies de régulation du cycle cellulaire (Okami et al., 1999). Cette coopération est donc un événement majeur dans la cancérogenèse des carcinomes des VADS.

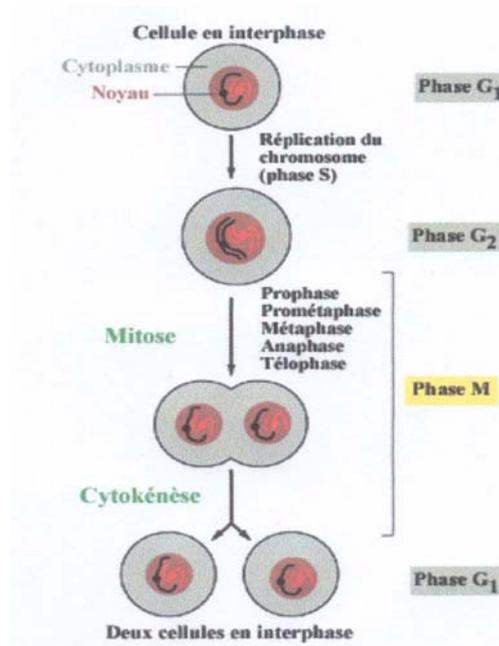
## 5 . Les anomalies cellulaires

### - Le contrôle du cycle cellulaire

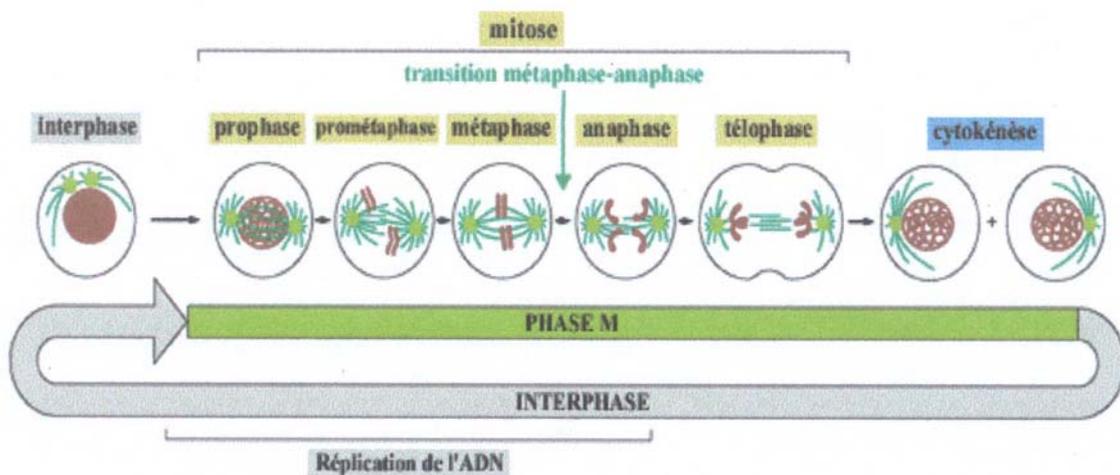
La figure N° 24 résume les principaux temps du cycle cellulaire.

Figure N° 24 : Cycle cellulaire (d'après B. Arcangioli. [http://virologie.free.fr/11-cycle\\_cellulaire/cycle\\_cellulaire.htm](http://virologie.free.fr/11-cycle_cellulaire/cycle_cellulaire.htm)).

A / vue d'ensemble



B / Décomposition de la mitose



C'est au cours de la progression en G1 que l'engagement dans le cycle cellulaire se précise. Le passage entre la phase G1 et la phase S est sous la dépendance d'une molécule vers laquelle converge l'ensemble des informations : la protéine Rb.

L'entrée en cycle dépend de l'état de phosphorylation de cette protéine qui est sous le contrôle de l'activité kinase d'hétérodimères de la famille cycline-CDK (cyclin/cyclin dependent-kinases).

Les cyclines sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire. Elles ont été appelées cyclines car leur concentration varie périodiquement au cours du cycle cellulaire.

Les cyclines se fixent sur les molécules de CDK, régulant l'activité des CDK en phosphorylant ces protéines. La phosphorylation des CDK est réversible (Figures N°25 et 26). La dégradation périodique des cyclines est un mécanisme important du contrôle du cycle cellulaire.

Le mécanisme de destruction des cyclines fait intervenir une « boîte de destruction » qui semble marquer la cycline pour la fixation de molécules d'ubiquitine (phénomène d'ubiquitination) (Figure N°27).

Les cyclines, comme les CDK, ont été conservées chez toutes les espèces au cours de l'évolution ; on dénombre actuellement 10 cyclines différentes chez l'homme.

Figure N° 25 : Vue générale de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines-CDK. (d'après B. Arcangioli. [http://virologie.free.fr/11-cycle\\_cellulaire/cycle\\_cellulaire.htm](http://virologie.free.fr/11-cycle_cellulaire/cycle_cellulaire.htm)).

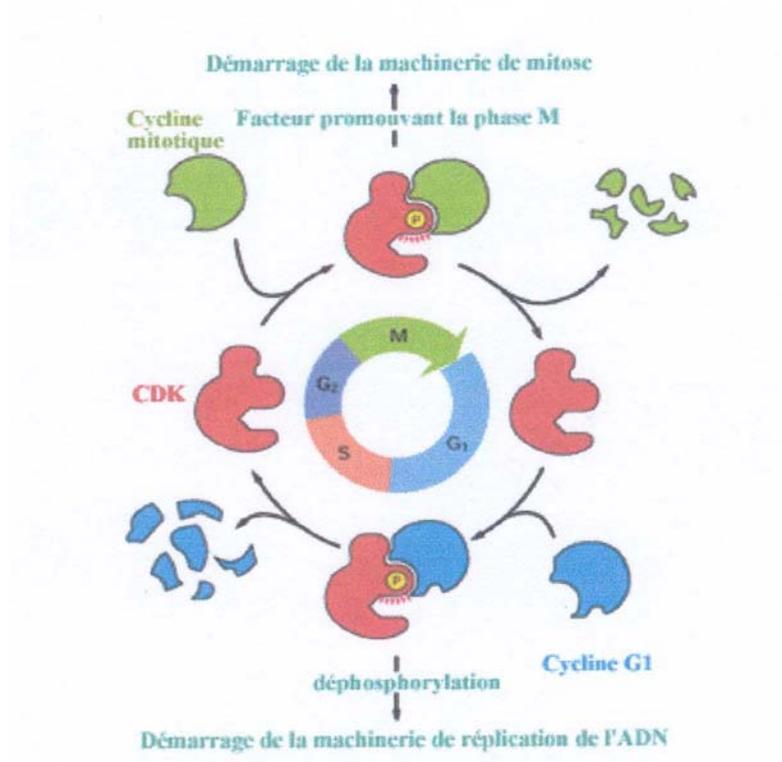


Figure N° 26 : Les principaux complexes cyclines-CDK dans le cycle cellulaire (d'après B. Arcangioli\_ [http://virologie.free.fr/11-cycle\\_cellulaire/cycle\\_cellulaire.htm](http://virologie.free.fr/11-cycle_cellulaire/cycle_cellulaire.htm)).

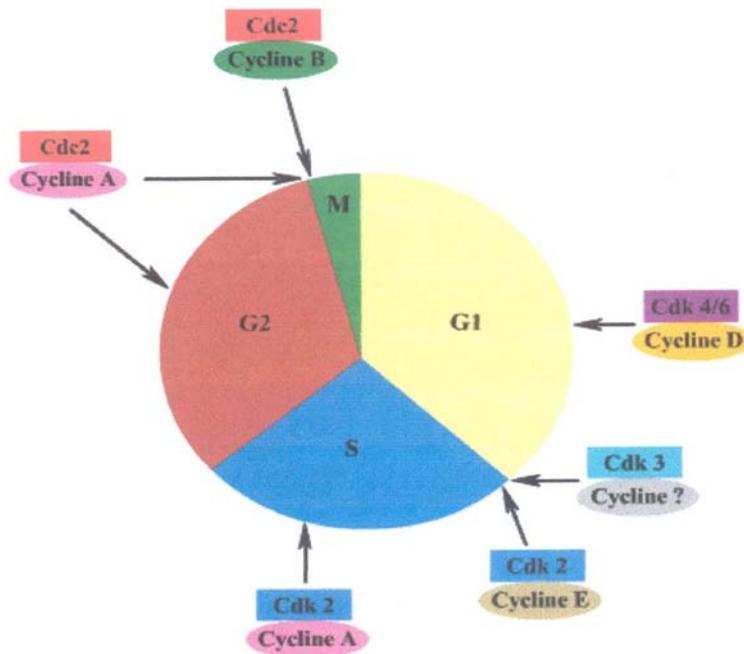
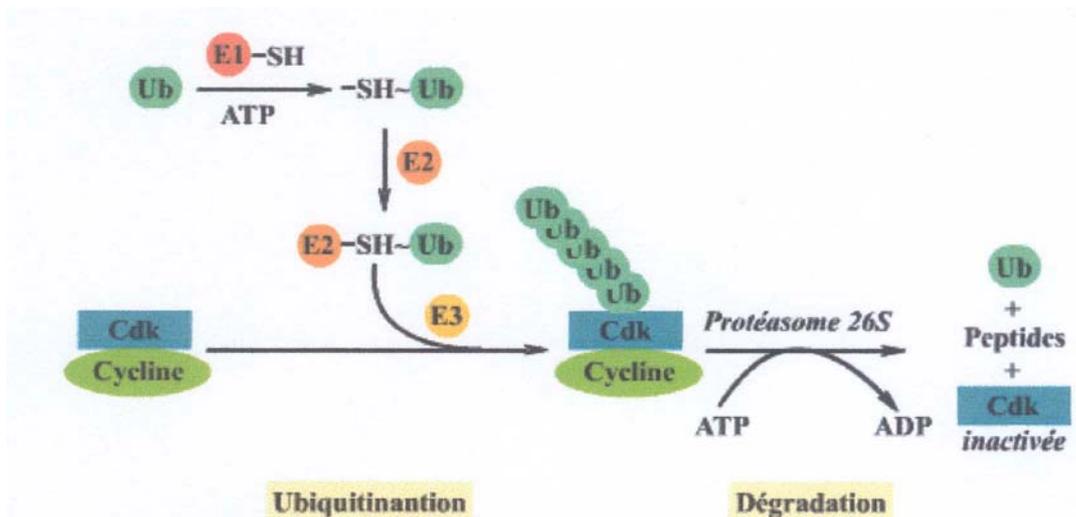


Figure N°27 : Les cyclines sont dégradées par protéolyse. Grâce aux enzymes E1, E2 et E3, les molécules d'ubiquitine se fixent au substrat. Celui-ci est alors reconnu par le protéasome 26S, ce qui entraîne la dégradation de la cycline et l'inactivation de la CDK (d'après B. Arcangioli. [http://virologie.free.fr/11-cycle\\_cellulaire/cycle\\_cellulaire.htm](http://virologie.free.fr/11-cycle_cellulaire/cycle_cellulaire.htm)).



La phosphorylation de Rb permet le relargage de facteurs transcriptionnels de la famille E2F qui lui sont liés (Complexe Rb/E2F), permettant ainsi le passage de la phase G1 à la phase S. L'activité des hétérodimères cycline-CDK est elle même régulée par l'existence d'inhibiteurs dont le rôle est de bloquer le cycle cellulaire. Il s'agit du principal mécanisme connu d'inhibition de Rb dans les carcinomes des VADS avec deux inhibiteurs identifiés : P27 et P16. En effet l'inactivation directe de la protéine Rb semble exceptionnelle. Bien que

des pertes d'hétérozygoties du locus Rb sur le bras long du chromosome 13 soient retrouvées dans plus de 50% des tumeurs, rares sont celles pour lesquelles une inactivation du gène a pu être démontrée (Yoo *et al.*, 1994).

#### - L'apoptose

L'apoptose est déclenchée par divers stimuli extra ou intracellulaires et orchestrée par plusieurs complexes protéiques schématiquement divisés en complexes « senseurs » et « effecteurs ». Une perturbation des voies pro-apoptotiques FAS ligand-FAS récepteur et TNF $\alpha$ -TNF récepteur a été démontrée par une résistance des cellules tumorales des carcinomes des VADS à l'apoptose médiée par ces facteurs, favorisant donc la prolifération cellulaire. A l'état normal, dans les deux cas, ces voies pro-apoptotiques induisent une phosphorylation de la Sérine 146-Ser de p21 (WAF1/CIP1) grâce à une phosphokinase (PKC delta). La sérine 146-Ser est située à proximité d'une cycline (Cy2) liant p21 à CDK2, une CDK impliquée dans l'apoptose. Sa phosphorylation favorise la dissociation de p21 et CDK2, permettant à CDK2 d'enclencher plusieurs mécanismes impliqués dans l'apoptose dont la condensation chromatinienne (Gatsman *et al.*, 1999 ; Lothaire *et al.*, 2006 ; Oh *et al.*, 2006).

Tous les signaux de déclenchement de l'apoptose convergent vers la mitochondrie en relarguant dans le cytoplasme, entre autre, du cytochrome C, lequel active la cascade des caspases, protéases dont le rôle est d'exécuter le programme de l'apoptose. Les protéines, membres de la famille Bcl-2 contrôlent le relargage mitochondrial du cytochrome C. Certaines ont une activité pro-apoptotique (Bax, Bak, Bib, Bim), d'autres anti-apoptotique (Bcl2, Bcl-XL, Bcl-W).

Un déséquilibre des espèces en présence pourra influencer le contrôle de l'apoptose. La surexpression de Bcl-2 ou une faible activité de Bax sont des facteurs clés de la cancérogenèse des carcinomes des VADS.

Par ailleurs la surexpression de Bcl-2 ou une faible expression de Bax sont des facteurs de résistance à la radiothérapie (Ito *et al.*, 1999).

#### - Facteurs de croissance, récepteurs et transduction du signal

Le passage d'une cellule de l'état quiescent à l'état de prolifération s'effectue sous l'influence de signaux d'origine extra cellulaire, mais aussi intra cellulaire, les cellules tumorales étant capables de générer leur propres signaux de prolifération ; c'est ainsi que de nombreux oncogènes, surexprimés dans les tumeurs, codent pour des facteurs de croissance solubles à l'origine de boucles d'autostimulation (Blons *et al.*, 2003).

Ces signaux sont transmis au noyau par l'intermédiaire de récepteurs membranaires auxquels se lient les facteurs de croissance (ligands), le couple ligand-récepteur enclenchant

une cascade d'événements cytosoliques dominée par l'activation successive de protéines kinases qui aboutissent au niveau du noyau à l'activation des facteurs de la transcription, à l'origine de la prolifération cellulaire.

Parmi les facteurs de croissance impliqués dans la cancérogenèse des carcinomes des VADS, citons les Fibroblast Growth Factor 3 et 4, FGF3 (INT2) et FGF4 (HSTF1) surexprimés suite à l'amplification de la région chromosomique 11q13 qui porte ces 2 gènes (Muller *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1999 ; Roh *et al.*, 2000). Les facteurs EGF (Epidermal Growth Factor) et TGF $\alpha$  (Tumor Growth factor  $\alpha$ ) sont eux aussi impliqués et ce, dès les stades précoces de la cancérogenèse (Grandis & Tweardy., 1993).

Parmi les récepteurs des facteurs de croissance, les récepteurs à l'EGF (EGFR), sont souvent surexprimés à la surface des cellules cancéreuses qui constituent les carcinomes des VADS, et la voie de transduction impliquant le couple EGF-EGFR joue un rôle majeur dans la prolifération de ce type de tumeur. L'importance de cette voie de signalisation dans la prolifération des cellules tumorales de cancers des VADS a conduit à envisager le récepteur EGFR comme cible de nouveaux médicaments anticancéreux. Deux types de molécules ont été conçues, un anticorps monoclonal (Erbix <sup>®</sup>, C225) qui reconnaît le récepteur et empêche son activation, et des inhibiteurs de l'activité enzymatique tyrosine kinase du récepteur (Iressa <sup>®</sup>, ZD 1839 ; Tarceva <sup>®</sup>, OSI-774). Ces nouveaux traitements ont été abordés dans le chapitre Traitements des VADS ; nous n'y reviendrons pas.

La transduction du signal jusqu'au noyau est particulièrement complexe. Trois voies principales ont été identifiées :

- 1) la voie Ras-Raf-MAP Kinases ;
- 2) la voie des phosphatidylinositol-3 kinases (PI-3 K)-PKB ;
- 3) la voie Jak/Stat-PKC (Mandelsohn, 2002).

Des modifications génétiques et moléculaires pour deux de ces trois voies ont pu être identifiées, pouvant expliquer une hyperactivité de ces voies de transduction sans surexpression de l'EGFR à la surface cellulaire.

La première concerne la cascade Ras-Raf-MAP Kinases. Un gain de fonction constitutif de Ras est observé dans 25% des cancers humains, cependant les altérations de ce proto-oncogène sont rares dans les carcinomes des VADS hormis dans les populations asiatiques (Inde et Taiwan) chez lesquelles il existe des mutations activatrices HRas et KRas (Kuo *et al.*, 1994).

Par ailleurs, il a été montré récemment que la cible des amplifications du bras long du chromosome 3 (3q) dans les carcinomes des VADS pouvait être le gène PIK3CA qui code pour la sous unité catalytique d'une PI-3 K (Redon *et al.*, 2001). Enfin, le gène suppresseur de tumeur PTEN localisé sur le bras long du chromosome 10 (10q), codant pour une

phospholipide-phosphatase impliquée dans la régulation négative de cette voie de signalisation, est souvent la cible de perte d'hétérozygotie, bien qu'aucune mutation n'ait été jusqu'alors identifiée.

Les anomalies chromosomiques identifiées au niveau 3q (gain) et 10q (perte) sont donc vraisemblablement impliquées de façon indirecte dans la cancérogenèse des carcinomes des VADS.

#### - Angiogenèse et facteurs angiogéniques

L'oxygène et les nutriments apportés par les vaisseaux sont indispensables à la survie des cellules (<http://www.esculapepro.com>). L'organogenèse et l'angiogenèse sont coordonnées au cours du développement de sorte que chaque cellule réside à moins de 100 µm d'un vaisseau capillaire. Tant que la taille de la tumeur est restreinte, les cellules tumorales peuvent se développer en puisant leurs ressources dans les vaisseaux existants, mais rapidement la croissance tumorale sera dépendante de la synthèse de nouveaux vaisseaux. A un certain stade de l'évolution tumorale, une sous population de cellules cancéreuses va acquérir un caractère angiogénique, c'est à dire que ces cellules vont devenir capables d'induire une angiogenèse au sein du tissu tumoral. Ce processus appelé néoangiogenèse résulte de l'expression, par les cellules tumorales, de facteurs qui induisent la différenciation endothéliale au sein du tissu tumoral.

Nombreux sont les facteurs proangiogéniques synthétisés par les cellules tumorales des carcinomes épidermoïdes des VADS, le plus connu et le plus étudié étant le Vascular Epithelial Growth Factor (VEGF) (Blons *et al.*, 2003). Il s'agit d'un facteur activateur peptidique, stimulant spécifiquement, *in vitro*, la prolifération des endothéliocytes.

Dans la plupart des études, la surexpression des facteurs proangiogéniques est associée à un mauvais pronostic (Teknos *et al.*, 2002).

### **6. Facteurs de risque génétique et carcinomes des VADS**

On parle de facteurs de risque génétique lorsqu'un individu est génétiquement prédisposé à la maladie cancéreuse ou plus susceptible de développer un cancer après exposition à un agent cancérogène.

Plusieurs études suggèrent l'existence d'une « susceptibilité » individuelle aux carcinomes des VADS (Scully *et al.*, 2000). La notion de sujets « prédisposés » à développer un carcinome des VADS repose, entre autre, sur le rapport des CDC (US Centers for Disease Control) stipulant que sur les 46 millions de fumeurs Américains, seulement 40 000 à 50 000 d'entre eux développent chaque année un carcinome des VADS, soit moins d'un sujet fumeur sur mille (Landis, 1998).

Le métabolisme des carcinogènes du tabac et les systèmes de réparation des lésions de l'ADN sont deux mécanismes dont on connaît des différences d'activité d'origine héréditaire, pouvant au moins partiellement, expliquer une variabilité de sensibilité des individus aux méfaits du tabac.

Néanmoins la notion de cancers des VADS familiaux n'est actuellement pas admise.

### **6a. Génétique et métabolisation des carcinogènes du tabac**

Au niveau de l'organisme, les carcinogènes du tabac sont métabolisés par des enzymes dont le rôle majeur est leur élimination. Certains des gènes codant pour ces enzymes ont un polymorphisme.

Pour un individu, hériter d'une enzyme à activité réduite peut conduire à une accumulation excessive de toxiques et à une diminution des capacités de détoxification. Des études épidémiologiques ont été menées afin d'identifier, parmi les polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes du tabac, ceux pouvant constituer des facteurs de risque pour les carcinomes des VADS.

Les glutathions-S-transferases (GST) forment une famille d'isoenzymes qui catalysent la conjugaison du glutathion sur des substrats électrophiles. Ce sont des enzymes qui ont un rôle majeur dans la détoxification de nombreux composés.

Dans la population caucasienne deux génotypes homozygotes nuls de GSTM1 et GSTT1 sont détectés chez respectivement 40 et 15% des sujets. Dans les deux cas, il s'agit d'une double délétion du gène avec comme conséquence une absence totale d'enzyme. L'association des deux génotypes homozygotes nuls de GSTM1 et GSTT1 semble augmenter le risque de carcinome des VADS (Cheng *et al.*, 1999).

Les cytochromes P450 forment une famille d'enzymes qui intervient également dans le métabolisme de nombreux toxiques. Parmi eux, rappelons le cytochrome P450 1A1 (=CYP1A1) qui métabolise le B( $\alpha$ )P en B( $\alpha$ )P-diol-époxyde.

Il est décrit chez certains sujets une hyperactivité du CYP1A1 associée à une augmentation des adduits du B( $\alpha$ )P sur l'ADN et une augmentation du risque de cancer du larynx et de la cavité buccale chez les fumeurs (Blons *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il a été montré que l'association d'une hyper activité du CYP1A1 et du génotype GSTM1 nul constitue un risque multiplicatif pour le cancer du poumon chez les patients fumeurs. Ceci n'a pas été démontré pour les carcinomes des VADS (Bartsch *et al.*, 2000).

## **6b. Génétique et réparation de l'ADN**

### - Généralités

De nombreux systèmes de réparation permettent le maintien de l'intégrité du génome et les altérations subies par la molécule d'ADN peuvent être réparées. Les carcinogènes du tabac étant à l'origine de dommages sur l'ADN, il est concevable qu'une variabilité des systèmes de réparation entraîne chez le fumeur une variabilité du risque de cancer.

Deux tests de sensibilité à des agents mutagènes ont été mis au point à partir de cultures de cellules (lymphocytes circulants) :

- 1) un test direct de réactivation cellulaire en utilisant un « gène reporter » altéré par le benzo( $\alpha$ )pyrène-diol-époxyde (BPDE) (Cheng *et al.*, 1998) ;
- 2) un test indirect qui évalue la sensibilité de la cellule aux mutagènes (Wang *et al.*, 1998), dans lequel sont comptabilisées les cassures au niveau de la chromatine après exposition à un cytotoxique (la Bléomycine) ou au BPDE.

Ces tests effectués sur des patients porteurs d'un carcinome des VADS et sur des patients témoins fumeurs (appariés sur la consommation de tabac) mais indemnes de cancer, démontrent qu'il existe un nombre de sujets ayant une sensibilité aux carcinogènes et un défaut de réparation de l'ADN significativement plus élevé dans le groupe des sujets porteurs d'un carcinome des VADS.

Les altérations des systèmes de réparation de l'ADN peuvent être constitutionnelles ou acquises.

### - Les altérations constitutionnelles

Des altérations constitutionnelles pour deux gènes spécifiques de la réparation de l'ADN sont documentés pour les carcinomes des VADS.

Il s'agit du gène XRCC1 et hMLH1. XRCC1 intervient dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. hMLH1 intervient dans la correction des discordances qu'il peut exister dans la séquence des nucléotides entre les deux brins d'ADN ; son dysfonctionnement favorise l'apparition d'instabilité microsatellites.

La présence de deux polymorphismes de XRCC1 (XRCC1 26304 CC et 28152 AA) ou la baisse d'expression constitutionnelle de hMLH1 sont associés à un risque accru de carcinomes des VADS (Wei *et al.*, 1998 ; Sturgis *et al.*, 1999).

### - Les altérations acquises

Il s'agit de modifications acquises lors de la cancérogenèse. Ces anomalies peuvent favoriser, en retour, l'accumulation progressive d'anomalies impliquées dans le développement du cancer. L'interactivité qui existe entre les mécanismes de la

cancérogénèse et les mécanismes susceptibles de les contrer crée les conditions propices au bouleversement complet de l'homéostasie cellulaire.

#### *Modifications des gènes hOGG1, MGMT et hMLH1*

Sous l'effet conjoint du tabac et de l'alcool vont s'accumuler au sein des cellules exposées, des radicaux libres, dont le Benzo ( $\alpha$ ) pyrène-diol-époxyde à l'origine de l'altération, par oxydation, des nucléotides constitutifs de l'ADN (Dizdaroglu, 1991). Une vingtaine d'altérations de ce type ont été répertoriées dans les carcinomes des VADS, dont la plus fréquente est la 8-oxo-Guanine (Fan, 2001). En cas d'absence de réparation de la 8-oxo-Guanine, celle-ci peut être remplacée par une Adénine favorisant la transversion G :C  $\rightarrow$  T : A ; ce type de mutation est une des mutations les plus fréquentes relevées au niveau de TP53 (Hollstein *et al.*, 1991). Le gène hOGG1 (human 8-oxo-Guanine DNA glycosylase 1) code pour une protéine capable de transformer la 8-oxo-Guanine en Guanine ; ce gène est localisé sur le bras court du chromosome 3 en 3p26.2, une région fréquemment délétée dans les carcinomes des VADS et ce, à un stade très précoce de la carcinogénèse (Fan, 2001) ; Il n'y a aucune mutation identifiée pour le gène hOGG1 (Blons *et al.*, 1999b ; Fan *et al.*, 2000) et donc, contrairement à ce qui est habituellement le cas lors de perte d'hétérozygotie, l'inactivation de l'allèle correspondant ne l'est pas par mutation. Des études complémentaires concernant les mécanismes d'inactivation d'hOGG1 dans les carcinomes des VADS sont donc nécessaires. Une des pistes de recherche est l'étude de la méthylation de la région promotrice de ce gène qui est riche en îlots CpG (Dhenaut *et al.*, 1999).

En somme, le gène hOGG1 peut être considéré comme un gène important dans les processus de réparation de l'ADN des carcinomes des VADS, mais également comme un gène protecteur de la muqueuse des VADS contre les effets des radicaux libres accumulés sous l'effet, entre autre, de l'intoxication éthylo-tabagique.

Un autre gène important dans la réparation de l'ADN est le O<sup>6</sup>- methylguanine DNA methyltransferase (MGMT). MGMT code pour une protéine capable de transformer l'O<sup>6</sup>-methyl (alkyl) Guanine, un des 13 nucléotides modifiés induits par les nitrosamines contenues dans la fumée de tabac, en Guanine. Si elle est non réparée, l'O<sup>6</sup>-methyl (alkyl) Guanine peut être remplacée par une Thymine favorisant la transition G:C  $\rightarrow$  T:A (Fan, 2001). Ce type de mutation ponctuelle, similaire à la transversion G:C en T:A, est fréquemment relevée au niveau de TP53 dans les carcinomes des VADS. Un des mécanismes principaux d'inactivation de MGMT est la méthylation de la région promotrice de ce gène. Ce point sera détaillé dans le chapitre concernant les anomalies épigénétiques des cancers des VADS.

Comme nous l'avons vu précédemment, hMLH1 est un gène important dans le contrôle de la stabilité du génome en empêchant l'apparition d'instabilités microsatellitaires. Les

mécanismes d'inactivation de ce gène dans les carcinomes des VADS sont encore mal définis. Il est probable que l'hyperméthylation de la région promotrice de ce gène soit un mécanisme important mais, comme nous le verrons dans le prochain chapitre, les résultats rapportés dans la littérature sont discordants.

#### *Les instabilités microsatellites*

Les microsatellites sont de petites séquences d'ADN nucléaire réparties aléatoirement dans le génome, préférentiellement dans des portions non codantes. Elles sont caractérisées par des répétitions de 2, 3 ou 4 nucléotides identiques (ex : dinucléotide (GA)<sub>5</sub> = GAGAGAGAGA ou tétranucléotide (AAAG)<sub>4</sub> = AAAGAAAGAAAGAAAG). Deux types d'altérations microsatellites ont été décrites :

- 1) l'instabilité ;
- 2) la perte d'hétérozygotie.

Les microsatellites sont, du fait de leur séquence répétitive, des structures particulièrement exposées aux erreurs de réplication. Ces erreurs de réplication, plus fréquentes dans les cellules tumorales du fait de l'altération du système de réparation de l'ADN, se traduisent par un nombre de répétition des nucléotides non conservé : soit plus élevé, soit plus faible par rapport à la séquence originale du microsatellite considéré.

Selon Perucho, ce mécanisme faciliterait une instabilité génomique globale, propice à l'apparition de mutations en particulier dans des régions où se situent des gènes impliqués dans la cancérogenèse, dont Bax, impliqué dans l'apoptose, et le gène codant pour le récepteur du TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor- $\beta$ ), facteur de régulation de la croissance cellulaire qui interagit avec P27, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Perucho, 1996).

Il semble que ces erreurs de réplifications apparaissent tardivement dans les carcinomes des VADS (El-Naggar et al., 1996). Leur fréquence oscille entre 15 et 25% (Arzimanoglou et al., 1998 ; Xu et al., 2001).

L'instabilité de microsatellites tri ou tétranucléotidiques rencontrée dans les carcinomes des VADS présente des caractéristiques très différentes de l'instabilité des mono et dinucléotides rencontrée dans les cancers colorectaux héréditaires non polyposiques (HNPCC ou syndrome de Lynch). Celles-ci sont liées à la présence d'une mutation constitutionnelle d'un gène codant pour une protéine du système de réparation de l'ADN (MMR pour Mismatch Repair), ce qui n'est pas le cas pour les carcinomes des VADS (Blons et al., 1999a ; Salahshor et al., 2001). Les mécanismes de survenue d'instabilité microsatellitaire (IMS) dans des cancers des VADS sont encore mal connus, même si le dysfonctionnement du gène hMLH1 semble impliqué.

## **DONNEES DE LA LITTERATURE**

### **CHAPITRE III**

**Altérations épigénétiques dans les carcinomes des VADS**

Dans un premier temps, nous étudierons la contribution de la méthylation de l'ADN à la carcinogenèse d'une façon générale, quelque soit le type de tumeur, puis nous nous focaliserons sur les carcinomes des VADS.

## 1. Définition

Les modifications épigénétiques regroupent l'ensemble des modifications transmises au cours des divisions cellulaires, modulant l'activité du génome, sans en affecter sa séquence nucléotidique (Bird, 2002).

## 2. Généralités

L'hyoacétylation et la méthylation des histones ainsi que la méthylation de l'ADN sont les trois principaux phénomènes épigénétiques recensés.

L'hyoacétylation des histones et la méthylation de l'ADN sont des événements intimement liés et interviennent dans le contrôle de l'expression génique.

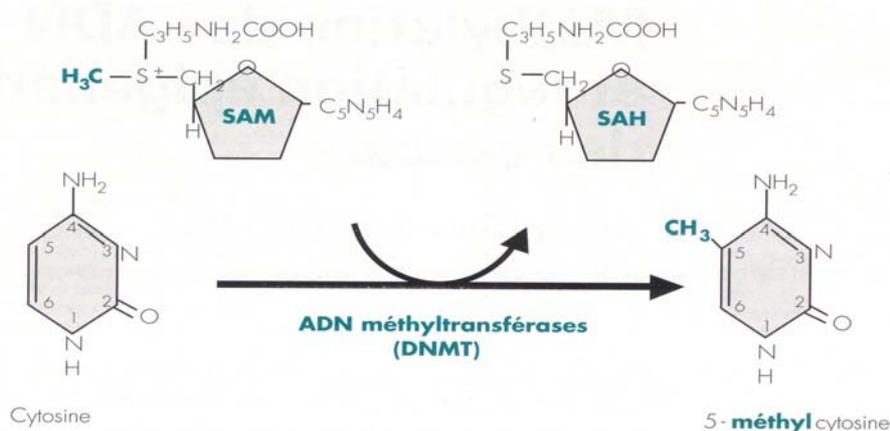
Dans le processus de cancérogenèse, les modifications génétiques et épigénétiques sont intriqués, non seulement au stade prénéoplasique, mais également au stade tumoral du plus précoce au plus tardif.

### 2a La méthylation, une empreinte sur l'ADN.

La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) à la place d'un atome d'hydrogène sur le carbone 5 des cytosines de l'ADN.

Cette modification chimique est assurée par des enzymes que sont les méthyltransférases ou DNMTs à partir d'un donneur de méthyl, la S-adénosyl-méthionine (SAM) (Figure N° 28) (Herman *et al.*, 2003).

Figure N° 28 : La réaction chimique de méthylation de l'ADN. Des enzymes (ADN méthyltransférases ou DNMT) assurent l'addition d'un groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) à partir d'un donneur, la S-adénosyl-méthionine (SAM). Les produits de la réaction sont une Cytosine méthylée et une molécule de S-adénosyl-homocystéine (SAH).



La réversibilité de cette réaction est sous la dépendance d'une déméthylase caractérisée à partir d'une lignée cellulaire de carcinome pulmonaire (Bhattacharya *et al.*, 1999).

Les groupements méthyl forment un revêtement moléculaire variable d'un segment d'ADN à l'autre, d'un type cellulaire à un autre, et confèrent un caractère unique et transmissible à l'ADN. La structure moléculaire de l'ADN a donc sa composante génétique, qui est la même dans toutes les cellules, et sa composante épigénétique variable suivant les types cellulaires.

Néanmoins, ces groupements methyl ne sont retrouvés que dans certaines espèces ; ils sont absents ou quasi absents dans les organismes simples comme les levures ou les drosophiles alors qu'ils sont fréquents dans le génome des mammifères et de l'homme (Herman *et al.*, 2003).

Dans le génome humain, ces méthylation ont lieu majoritairement au niveau de dinucléotides CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) (Bird, 2002).

Soixante à 90% des dinucléotides CpG sont méthylés et se localisent dans des régions de chromatine compactée ou hétérochromatine, inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. En revanche, les dinucléotides CpG non méthylés se regroupent en régions riches en CpG, appelées îlots CpG (Ng & Bird., 1999).

Un îlot CpG se définit comme une région comprise entre 0,5 et 4 kilobases ayant une teneur en GC supérieure à 50% et un rapport CpG sur GpC d'au moins 0,6 (Bird, 2002).

Des estimations placent le nombre total de ces îlots CpG entre 29 000 et 45 000 sur 1 à 2% du génome humain avec une répartition moyenne tous les 100 kilobases (Herman *et al.*, 2003).

Le nombre d'îlots CpG dans le génome humain est inférieur au nombre théorique obtenu par des modèles mathématiques ; ceci s'explique par la diminution des îlots occasionnée par le phénomène de méthylation. En effet lorsqu'une Cytosine est méthylée, celle-ci a tendance à perdre une amine, permettant la transformation de la Cytosine en Thymidine ; si cette transformation n'est pas réparée, cette mutation par transition devient définitive, diminuant *ipso facto* le nombre d'îlots CpG. Cette transformation est le plus fréquent des polymorphismes génétiques rencontrés dans la population humaine (Rideout *et al.*, 1990).

Dans une cellule normale, les îlots CpG sont non méthylés et la majorité d'entre eux se trouvent au niveau des régions promotrices des gènes, essentiellement de gènes n'ayant pas d'expression tissu-spécifique. On estime que plus de 50% des gènes du génome humain possèdent des îlots CpG dans leur région promotrice (Jone & Baylin., 2002).

Ces îlots CpG sont *a contrario* fortement méthylés dans les régions promotrices de gènes dont l'expression varie selon les tissus, la méthylation inhibant leur expression, l'absence de méthylation autorisant l'expression génique.

Il se dessine donc assez clairement un parallèle entre méthylation des îlots CpG et expression de certains gènes (Razin & Szyf, 1984).

De même, méthylation de l'ADN et structure de la chromatine semblent étroitement liées dans la régulation de l'expression génique.

## 2b Profils de méthylation et expression génique

- Mise en place et maintien de la méthylation

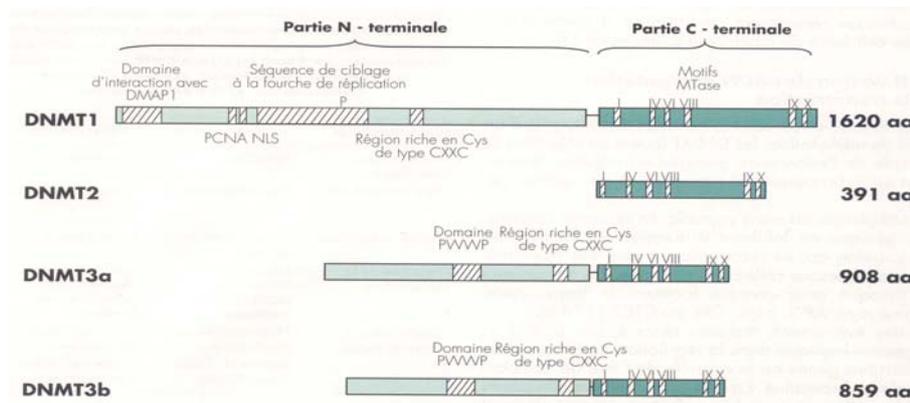
Si la séquence de l'ADN est la même dans tous les tissus, le génome n'est pas marqué de la même façon par la méthylation.

Trois processus interviennent dans la mise en place de cette diversité des motifs de méthylation :

- 1) après la fécondation, les profils de méthylation hérités des parents sont effacés pour la mise en place d'un nouveau schéma globale chez l'embryon : c'est la déméthylation globale ;
- 2) une fois les différents types cellulaires de l'embryon formés, de nouveaux profils de méthylation sont mis en place, c'est la méthylation *de novo* ;
- 3) enfin ces profils de méthylation sont fidèlement reproduits dans les cellules filles lors de la réplication, c'est la méthylation de maintenance.

La méthylation, qu'elle soit *de novo* ou de maintenance, est assurée par une famille d'enzymes, les DNMTs (Figure N° 29).

Figure N° 29 : Représentation schématique des différentes ADN méthyltransférases. Les DNMT présentent globalement une partie N-terminale d'interaction avec l'ADN et d'autres protéines et une partie C-terminale portant l'activité catalytique. La séquence NLS (nuclear localization signal) permet le ciblage au noyau, la localisation à la fourche de réplication se fait par la protéine PCNA (proliferating cellular nuclear antigen). On trouve une séquence d'association avec un co-répresseur transcriptionnel DNMAP1 (DNMT associated protein 1) et un domaine riche en cystéine- CxxC pour le recrutement des HDAC (histone déacétylases) ; I, II, IV, ... motifs de caractéristiques des DNMTs procaryotes et eucaryotes. (d'après Torrisani et al., 2003).



La DNMT1 est responsable de la maintenance des profils de méthylation à partir de l'ADN hémiméthylé durant la division cellulaire et de façon synchrone à la réplication de l'ADN (Bestor, 2000).

Plus courte, homologue dans sa partie C-terminale à la DNMT1, la DNMT2, bien que catalytiquement inactive, peut également se lier à l'ADN (Dong *et al.*, 2001). Sa fonction serait de méthyler les séquences rétrovirales intégrées.

Enfin, deux membres de la famille DNMT3 (DNMT3a et DNMT3b) sont, quant à elles, responsables de la méthylation *de novo* (Xie *et al.*, 1999).

La perte de groupements méthyl, ou déméthylation, est assurée par deux mécanismes distincts (Torrissani *et al.*, 2003) :

- 1) la déméthylation passive qui résulte de l'absence de méthylation de maintenance conduisant à la perte, au cours des divisions successives, du profil de méthylation. Son mécanisme n'est pas complètement élucidé ;
- 2) La déméthylation active sous l'influence de l'activité de la déméthylase.

Contrairement aux anomalies génétiques, la méthylation de l'ADN est donc un phénomène réversible.

#### - Méthylation de l'ADN et régulation de la transcription

Outre la mise en place et le maintien de l'intégrité d'un profil de méthylation, les DNMTs jouent un rôle dans le contrôle de l'expression génique en régulant directement ou indirectement la transcription de certains gènes.

La méthylation est ainsi capable de réprimer l'expression génique en inhibant la fixation de facteurs de transcription qui ne reconnaissent plus leur séquence consensus lorsque celle-ci est méthylée.

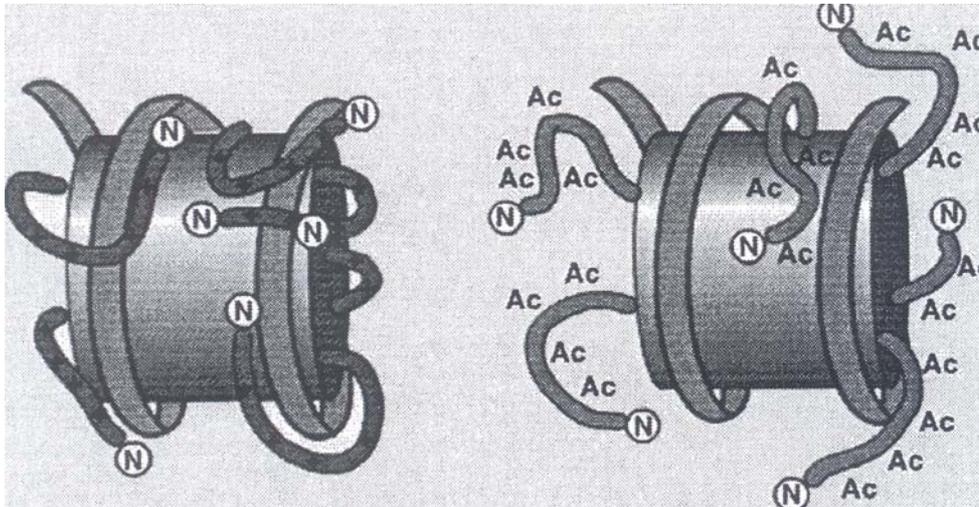
Un des événements majeurs associé aux DNMTs et largement impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes est le contrôle de l'état de compaction de la chromatine.

En effet, l'accessibilité des gènes par différents complexes de transcription dépend directement du niveau de compaction de la chromatine par le biais des protéines histones, soit en hétérochromatine (condensée), soit en euchromatine (moins dense).

Ces différences de compaction sont dues en grande partie aux modifications des histones, principalement à des variations de leur niveau d'acétylation sous la dépendance des

histones-acétylases (HAT) et histone-déacétylases (HDAC) (figure N° 30) (Vogelauer *et al.*, 2000 ; Shaw, 2006a).

Figure N° 30 : Aspect d'un nucléosome en fonction de l'acétylation des histones (d'après Shaw, 2006a). A gauche nucléosome régulier, compact, correspondant à une absence totale d'acétylation des histones ; à droite, nucléosome irrégulier, ouvert, correspondant à une acétylation des histones.



De fait, l'implication des DNMTs et donc de la méthylation de l'ADN dans la régulation de la transcription est intimement liée au recrutement potentiel, direct ou indirect, des HDAC (Figure N°31).

#### Répression directe

Dans ce cas de figure, les DNMTs, qui présentent une affinité pour l'ADN, sont capables de recruter directement, au sein des complexes protéiques, les HDAC. C'est le cas de la DNMT1 qui, associée aux protéines HDAC1 et 2, Rb et au facteur de transcription E2F, est capable de réprimer de façon ciblée l'activité de promoteur sous le contrôle du site consensus E2F (Robertson *et al.*, 2000). La DNMT3a, comme la DNMT1, peut réprimer la transcription grâce aux propriétés de compaction de la chromatine de HDAC1 et de ciblage d'un facteur de transcription RP58 (Fuks *et al.*, 2001).

#### Répression indirecte

C'est par l'intermédiaire de protéines qui vont reconnaître spécifiquement les cytosines méthylées sur l'ADN que va se faire le recrutement indirect des HDAC. Des protéines appartenant à la famille des MBD (Methyl CpG-Binding Domain protein) jouent le rôle d'adaptateur liant les cytosines méthylées de l'ADN à des complexes « histone déacétylase ». La famille des MBD comporte plusieurs membres, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4, dont la plupart peuvent réprimer la machinerie transcriptionnelle grâce à

l'intervention d'une activité HDAC, plusieurs complexes MBD-HDAC ayant été identifiés dans les cellules de mammifères (Wade, 2001) (Figure N° 32).

Figure N° 31 : Mécanismes de répression de la transcription (d'après Torrisani et al., 2003). La répression de la transcription peut être due à une absence de recrutement des complexes de transcription qui ne reconnaissent pas l'ADN méthylé par les DNMTs (A), au recrutement direct (B) ou indirect (C et D) des HDAC entraînant la compaction de la chromatine et l'impossibilité pour les complexes de transcription d'accéder aux promoteurs des gènes. Ac : acetyl ; M : methyl ; DNMT : méthyltransférase ; HDAC : histone déacétylase ; MBD : méthyl CpG-binding domain.

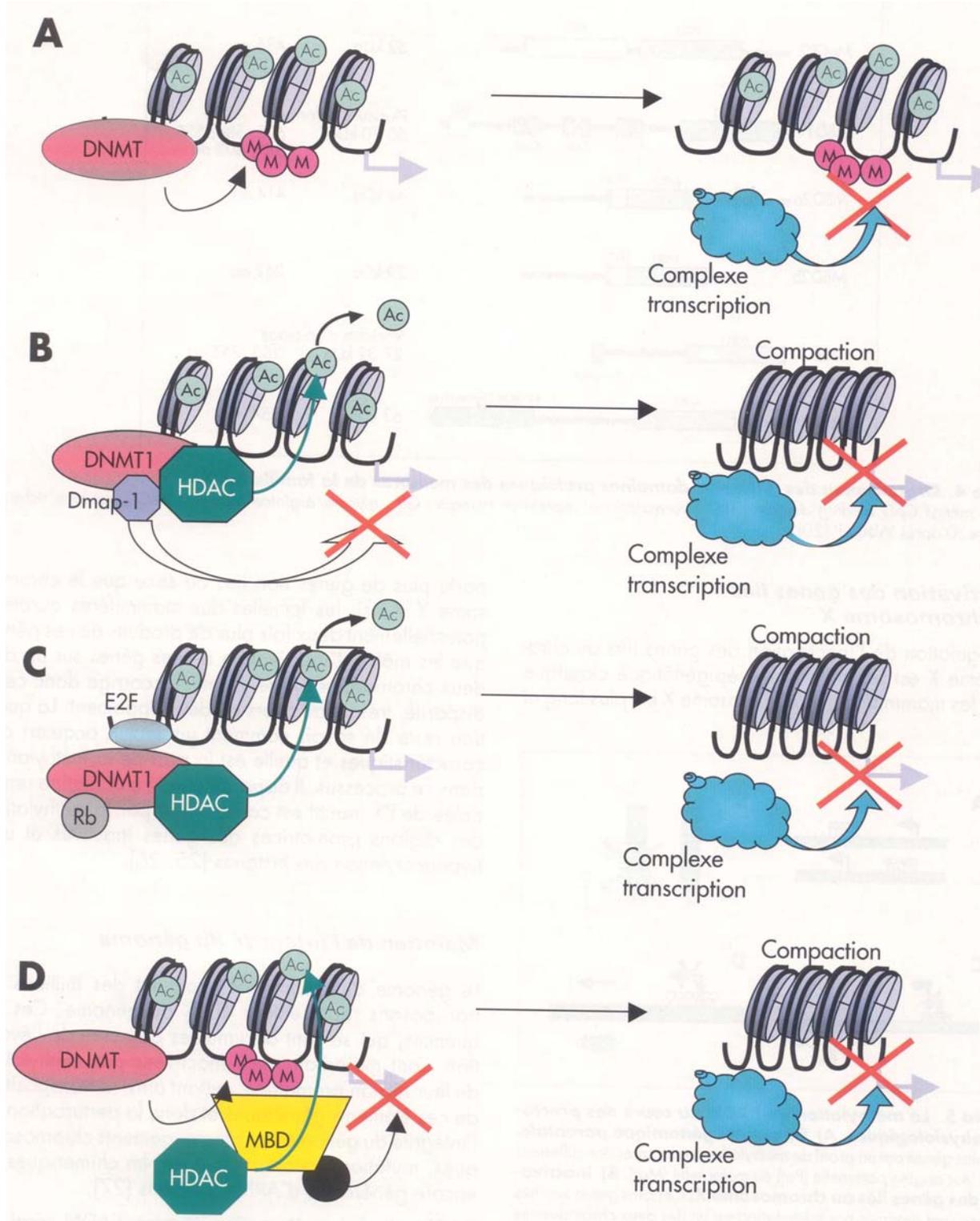
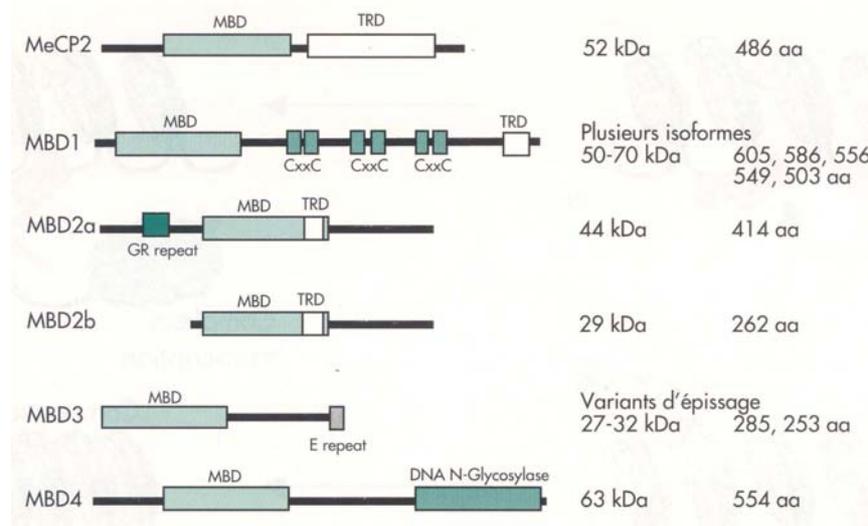


Figure N° 32 : Organisation des différents domaines protéiques des membres de la famille MBD. MBD : methyl CpG binding domain (d'après Wade, 2001). TRD : transcriptional repression domain ; GR : glycine / arginine repeat ; CXXC : domaine riche en cystéine.



### **2c Rôle fondamental de la méthylation de l'ADN dans la progression tumorale**

Lorsqu'on aborde la question de la méthylation et du cancer, deux événements majeurs et indépendants semblent étroitement liés et impliqués dans la cancérogenèse : l'hypométhylation globale et l'hyperméthylation localisée (Ehrlich, 2002 ; Robertson, 2001 ; Torrisani *et al.*, 2003) (figure N°33).

#### **- Hypométhylation globale**

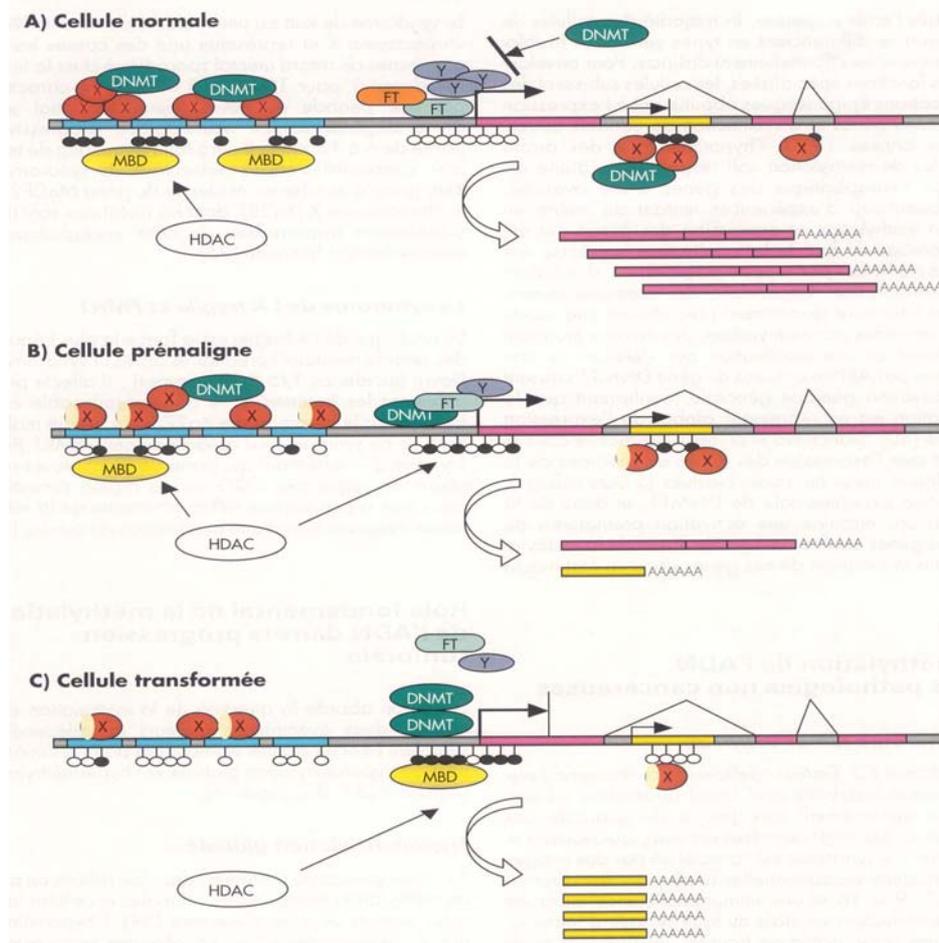
Feinberg et ses collaborateurs ont été les premiers à retrouver une hypométhylation globale du génome dans les cellules cancéreuses humaines, à partir de lésions préneoplasiques et de cancers du colon (Feinberg *et al.*, 1988). Ce phénomène a été considéré comme ayant peu d'intérêt dans la cancérogenèse, pendant près de 20 ans.

L'hypométhylation du génome de cellules cancéreuses se caractérise par une baisse de 20 à 60% de la teneur en 5-méthylcytosine par rapport à des cellules normales. Bien que les mécanismes responsables de cette hypométhylation ne soient pas clairement définis, les conséquences n'en sont pas moins établies, entraînant :

- 1) une activation d'éléments transposables (LINE, SINE et rétrovirus, normalement méthylés et réprimés), responsable d'une instabilité génomique (Herman *et al.*, 2003). Ceci a été démontré grâce à la déméthylation expérimentale du génome de souris invalidée pour le gène DNMT1 dont les cellules souches ré-expriment des éléments transposables (Walsh *et al.*, 1998).

- 2) Une augmentation des recombinaisons homologues responsables d'un taux plus élevé de mutations par réarrangements géniques, comme cela a été également observé chez les souris DNMT1  $-/-$  (Chen *et al.*, 1998).
- 3) L'activation d'oncogènes comme H-ras et c-myc dans les cancers gastriques (Fang *et al.*, 1996), du gène MAGE anormalement exprimé dans de nombreuses tumeurs ou encore des gènes LIM-HOX dans les leucémies myéloïdes chroniques, pS2 dans les cancers du sein, ODC (ornithine décarboxylase) dans les tumeurs lymphoïdes B (Torrisani *et al.*, 2003).

Figure N° 33 : L'hypométhylation globale et l'hyperméthylation régionale dans la transformation tumorale (d'après Torrisani *et al.*, 2003). Un segment d'ADN est représenté sur lequel on trouve un gène normalement actif (rose) avec des îlots CpG non méthylés (blanc). Les îlots CpG méthylés (gris) se retrouvent au niveau de séquences répétées (jaune) ou de gènes (bleu ciel) inactivés ; A) Cellule normale. un facteur X recrute les DNMTs et cible la méthylation sur les CpG des gènes inactifs (bleu et jaune) tandis qu'un facteur Y empêche la méthylation sur les gènes actifs (roses) soumis à l'activité des facteurs de transcription (FT). Le recrutement des HDAC par les MBD compacte la chromatine et rend les gènes inaccessibles. B) Cellule pré-maligne. Un défaut de méthylation apparaît dû à des mutations, délétions, défauts d'expression des protéines X et /ou Y. Le défaut de ciblage des DNMTs peut entraîner la méthylation anormale d'îlots CpG (hyperméthylation) associée à une perte de méthylation sur les CpG normalement méthylés (hypométhylation). C) Cellule transformée (maligne). Les divisions cellulaires accentuent ce défaut de méthylation entraînant l'inhibition de l'expression de certains gènes (normaux) au profits d'autres (anormaux) comme des séquences répétées.



En fin de compte, on peut retenir que l'hypométhylation globale du génome entraîne une instabilité génomique propice à un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire et l'émergence de clones cellulaires anormaux ; ceci a été démontré grâce à des modèles animaux murins, avec des lignées de souris chez qui a été maintenue pendant toute leur vie, de la naissance à l'âge adulte, une hypométhylation globale de leur génome et qui développent de façon anormalement élevée des tumeurs, en particulier des lymphomes thymiques (Gaudet *et al.*, 2003).

- Hyperméthylation et inactivation génique

Parallèlement à cette hypométhylation globale, se produit une hyperméthylation régionale au niveau des îlots CpG responsable, pour de nombreux cancers, de l'inactivation de certains gènes en particulier les gènes suppresseurs de tumeurs.

De façon générale, l'hyperméthylation de gènes dans les tumeurs est un phénomène fréquent. Toutefois, la fréquence de ces événements épigénétiques varie selon les types de tumeurs. On retrouve, par exemple, des fréquences élevées de méthylation des gènes suppresseurs de tumeurs dans des cancers tels que les tumeurs coliques, les gliomes et leucémies myéloïdes aiguës ; elles sont moins élevées dans les cancers du sein et du testicule (Torrisani *et al.*, 2003).

Par ailleurs les gènes impliqués diffèrent en fonction des cancers, avec pour chaque gène, une fréquence de méthylation différente en fonctions des tumeurs (figure N° 34).

Se basant sur cette dernière notion, et par analogie au terme « génotype », Esteller et ses collaborateurs (Esteller *et al.*, 2001), pensent qu'il est possible de définir un profil de méthylation, un « methylotype » ou « phénotype de méthylation » pour chaque type de cancer.

De plus, des anomalies de méthylation sont détectées non seulement au niveau des tumeurs, mais également dans les lésions précancéreuses, indiquant qu'il s'agit d'un événement précoce dans la cascade d'événements entraînant la dégénérescence tumorale. Ceci a été parfaitement démontré dans les cancers du poumon non à petites cellules (Belinsky, 2004)

Pendant très longtemps il a été admis que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur devaient être altérés simultanément, soit par une mutation, soit par une délétion, pour qu'il soit inactivé (Herman *et al.*, 2003). Hors il est actuellement admis qu'un gène peut perdre sa fonction en l'absence de toute modification génétique, suggérant un nouveau modèle d'inactivation des deux allèles, par le biais d'une hyperméthylation du promoteur de chaque allèle (Mompalmer & Bovenzi., 2000) (figure N°35).

Figure N° 34 : Profils de méthylation dans 15 types de cancers différents (d'après Esteller et al., 2001). Tous les cas représentés sont issus d'une analyse aléatoire de la méthylation des promoteurs des gènes étudiés, sans présélections en fonction de chaque type de tumeur. Les études ont été menées par des techniques de MSP (Methylation Specific PCR) complétées par des études de southern-blot et de séquençage. A : histogramme ; B : pourcentage de méthylation en fonction de chaque gène.

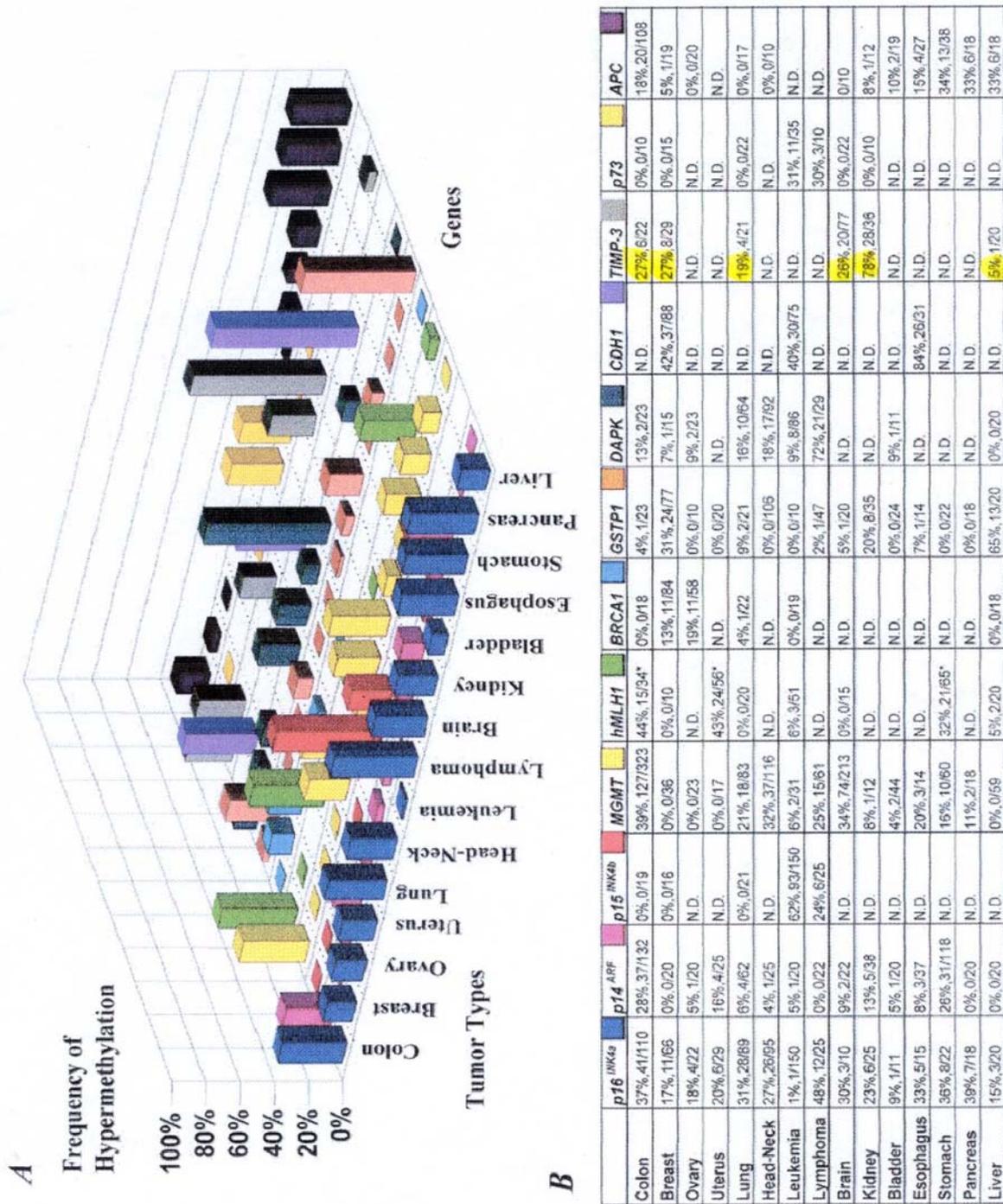
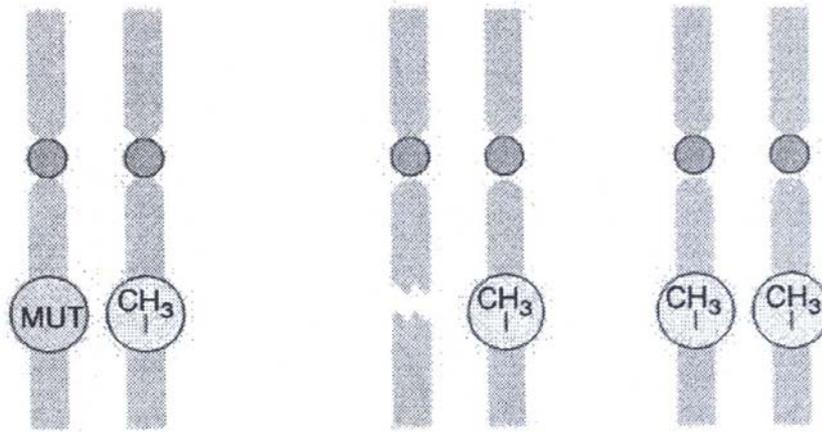


Figure N° 35 : Modèles d'inactivation des deux allèles d'un même gène impliquant des mécanismes génétiques (mutation, délétion) et épigénétiques (hyperméthylation) (d'après Momparler et al., 2000). MUT : mutation ; -CH<sub>3</sub> : méthylation ; √ : délétion.



#### - Hyperméthylation et mutations sur l'ADN

En marge de l'inactivation génique par hyperméthylation des promoteurs de certains gènes, se trouvent des phénomènes mutationnels intrinsèquement liés à la présence de groupements methyl sur l'ADN.

En effet, les 5-méthylcytosines peuvent générer des mutations, comme nous l'avons vu précédemment, par déamination spontanée engendrant une transition dans le code génétique d'une Cytosine vers une Thymine, mais aussi par (Torrisoni *et al.*, 2003) :

- 1) adsorption accrue des rayons UV ;
- 2) liaison accrue des carcinogènes comme ceux retrouvés dans la fumée de tabac.

#### **2d Méthodes d'analyse de la méthylation de l'ADN.**

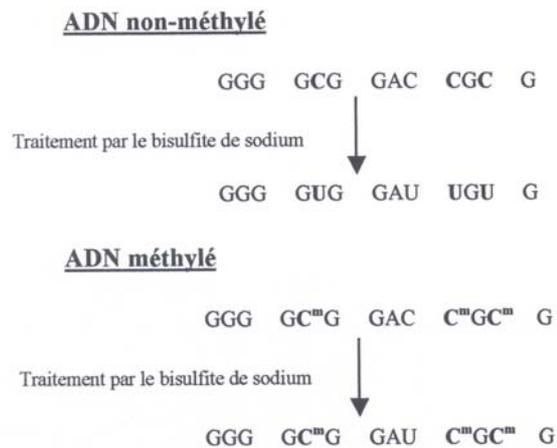
Comme nous l'avons vu précédemment, la méthylation des îlots CpG se produit précocement dans le processus de cancérogenèse. Elle conduit à l'inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs au sein d'une même tumeur.

Les allèles méthylés peuvent être détectés avec une grande sensibilité grâce à une technique, la MSP (Methylation Specific Polymerase chain reaction), mise au point à la fin des années quatre vingt dix (Herman *et al.*, 1996 ; Cottrell & Laird., 2003).

Cette technique nécessite un traitement de l'ADN extrait par le bisulfite de sodium qui agit sur les Cytosines non méthylées de l'ADN en les convertissant en Uracile par déamination. A l'inverse, les 5-méthylcytosines sont conservées.

La séquence d'ADN est donc modifiée différemment selon que les Cytosines sont méthylées ou non (Figure N° 36).

Figure N° 36 : Effet sur l'ADN du traitement par le bisulfite de sodium. Les cytosines non méthylées « C » sont transformées en uracile « U », alors que les Cytosines méthylées « C<sup>m</sup> » sont conservées.



Cette différence est ensuite visualisée après une amplification par Polymérase Chain Reaction (PCR).

Des amorces spécifiques sont utilisées pour chaque gène étudié ; les amorces M sont définies comme celles amplifiant la séquence d'intérêt lorsque les Cytosines des îlots CpG sont méthylées et les amorces U comme celles amplifiant la séquence d'intérêt lorsque les cytosines ne sont pas méthylées.

Le nombre de cycles d'amplification ne doit pas être excessif pour être certain d'amplifier le segment d'ADN d'intérêt (An et al., 2002).

La sensibilité de cette technique diffère en fonction des gènes étudiés .

Elle est d'environ 1 cellule cancéreuse pour 1000 cellules normales. Celle-ci est suffisante pour détecter des cellules cancéreuses au niveau de biopsies de petite taille, de liquides biologiques au contact de la tumeur qui contiennent des cellules exfoliées comme la salive, les sécrétions bronchiques (Lopes Bittencourt Rosas *et al.*, 2001 ; F de Fraipont *et al.* 2005), mais également au niveau de l'ADN circulant de patients porteurs de cancers des VADS, pulmonaires, hépatiques et colorectaux, avec une bonne corrélation entre les résultats obtenus au niveau de ces différents fluides biologiques et ceux obtenus à partir des prélèvements tissulaires (Laird , 2003 ; Patel *et al.*, 2003).

De plus il s'agit d'une technique spécifique puisque aucune méthylation n'est retrouvée au niveau des tissus normaux non exposés aux carcinogènes (Bird, 2002).

La détection par MSP présente donc plusieurs avantages :

- il s'agit d'une méthode simple, sensible et spécifique ;
- elle utilise de l'ADN, donc un matériel biologique robuste par rapport à d'autres comme l'ARN ;

- L'amplification PCR permet de travailler à partir de petites quantités d'ADN ;
- Elle permet l'analyse d'une grande quantité de gènes au sein de différents milieux (tissus, fluides biologiques).

Ce dernier point laisse entrevoir deux applications potentielles en clinique :

- les tumeurs présentant plusieurs gènes hyperméthylés, l'analyse de ces gènes conduit à une caractérisation tumorale plus exacte qu'avec l'étude d'un seul gène et peut donc indirectement contribuer à établir un pronostic ;
- l'analyse au niveau des fluides biologiques au contact de la tumeur et au niveau sanguin peut représenter un moyen de dépistage primaire des cancers ou de détection des rechutes.

La technique de MSP telle qu'elle vient d'être décrite est une méthode qualitative. Elle peut être quantitative en modifiant la technique de PCR grâce à l'utilisation d'amorces PCR marquées par des fluorochromes. Il s'agit de la MSP « Methylight » décrite par Eads (Eads et al., 2000). Tout comme la MSP « classique » décrite précédemment, il s'agit d'une méthode très sensible et spécifique.

D'autres techniques que la MSP peuvent être utilisées pour la détection de la méthylation de l'ADN ; nous en citerons deux :

- 1) la RE-PCR (methylation-sensitive Restriction Enzyme digestion Polymerase Chain Reaction) ; cette technique décrite par Singer-Sam en 1990 (Singer-Sam et al., 1990), ne nécessite pas de transformation chimique de l'ADN génomique. Elle utilise des enzymes de restriction qui fragmentent l'ADN, les cytosines méthylées « protégeant » le fragment d'ADN où elles se situent de l'action des enzymes de restriction. Les fragments d'ADN contenant les cytosines méthylées sont ensuite étudiés par technique de Southern blot ou PCR. Cette technique nécessite de grandes quantités d'ADN, sa sensibilité est moins bonne que la MSP, et la présence de faux positifs en cas de digestion enzymatique incomplète est possible (Eads et al., 2000 ; Ha & Califano., 2006). Il s'agit d'une méthode d'analyse qualitative.
- 2) la technique de pyroséquençage décrite par Colella et ses collaborateurs en 2003 (Colella et al., 2003) et utilisée par la suite par d'autres équipes (Dupont et al., 2004 ; Shaw et al., 2006b) ; cette méthode nécessite, comme la MSP, un traitement de l'ADN génomique au Bisulfite de Sodium ; elle est tout aussi sensible que la MSP et a comme principale avantage d'intégrer un contrôle de qualité du traitement bisulfite, ce que ne fait pas la MSP. Elle reste toutefois

moins utilisée que la MSP, car plus lourde à mettre en œuvre. Il s'agit d'une méthode d'analyse quantitative.

La MSP « classique » est la méthode d'analyse de la méthylation de l'ADN la plus utilisée dans la littérature.

La liste des gènes hyperméthylés associés aux tumeurs est en pleine expansion ; ceci est vrai quelque soit le type de cancer.

Dans le paragraphe suivant, une revue exhaustive de la littérature a permis d'établir la liste des gènes dont l'étude de la méthylation du promoteur par technique MSP, RE-PCR et pyroséquençage a été faite pour les cancers des VADS.

### 3. Epigénétiques et carcinomes des VADS

#### 3a Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau tumoral

Ce sont Herman et ses collaborateurs (Herman *et al.*, 1995) qui rapportèrent pour la première fois la méthylation du promoteur du gène P16 dans les carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale de l'oro - hypopharynx et du larynx. Depuis, de nombreux autres gènes ont été étudiés. Au total, nous avons pu en recenser 19. La liste de ces gènes est résumée dans le tableau N° 4.

Tableau N° 4 : liste des gènes étudiés dans les carcinomes des VADS avec leur dénomination abrégée et leur dénomination complète.

Gènes	
Abréviation	Dénomination complète
<b>P16</b>	= INK4A, = CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>MGMT</b>	O <sup>6</sup> -methylguanine DNA methyltransferase
<b>DAPK</b>	Death-associated protein kinase 1
<b>ECAD</b>	E-cadherin
<b>P14</b>	= ARF, androgen receptor factor
<b>P15</b>	= INK4B, CDKN2B, cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
<b>RASSF1A</b>	Ras effector homolog
<b>HMLH1</b>	Human homolog of bacterial Mut L
<b>Rarβ</b>	Retinoic acid receptor β
<b>APC</b>	Adenomatosis polyposis coli
<b>GSTP1</b>	Glutathione S-transferase π
<b>VHL</b>	Von Hippel-Lindau suppressor gene
<b>P73</b>	Tumor protein 73
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated gene
<b>DCC</b>	Cell-cell adhesion "Deleted in Colorectal Cancer"
<b>FHIT</b>	Fragile histidine triad
<b>DBC1</b>	Deleted in bladder cancer 1
<b>ABO</b>	ABO blood group
<b>P53</b>	TP53 gene

Certains ont été très souvent étudiés et ont fait l'objet de nombreuses publications. Il s'agit de P16, MGMT, DAPK et ECAD (tableau 5a). Pour ces gènes, seules les publications ultérieures à l'année 2000 ont été retenues.

D'autres ont été peu voir rarement étudiés avec, pour certains, une seule publication recensée (tableau 5b).

Les revues de la littérature ont été écartées de la liste des publications mentionnées dans ces différents tableaux ; en effet, ces travaux reprennent pour la plupart d'entre eux les publications dont nous avons fait mention.

Par ailleurs, les études rapportant les résultats de méthylation des différents gènes concernant les tumeurs du cavum ont été éliminées.

Enfin, pour les gènes pour lesquels plusieurs études ont été faites, seules celles comportant l'analyse d'au moins vingt échantillons tumoraux ont été retenues.

GSTP1 et VHL sont constamment retrouvés non méthylés quelque soit les publications.

Aucune méthylation n'a également été mise en évidence pour APC, mais ce gène n'a été étudié qu'une seule fois et dans un petit nombre d'échantillons.

Les gènes qui ont été les plus étudiés dans les carcinomes des VADS (P16, ECAD, MGMT et DAPK) font parti des gènes les plus fréquemment méthylés (26 - 50%).

L'ensemble des gènes répertoriés est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, l'adhésion cellulaire, l'angiogénèse, et la détoxification des carcinogènes. Il est donc intéressant de noter que l'ensemble des étapes du processus de cancérisation est concerné par la méthylation des gènes suppresseurs de tumeurs dans les tumeurs des VADS.

Toutefois, Il faut noter que pour un gène donné, le pourcentage de méthylation peut varier d'une façon importante en fonction de l'étude prise en compte.

Ceci s'explique vraisemblablement par des caractéristiques différentes des populations étudiées (origine ethnique, âge, exposition aux toxiques, modalités d'exposition à ces toxiques, localisations tumorales, stades tumoraux).

Tableau 5a : les gènes les plus étudiés

Gène			Références	Nb d'échantillons étudiés	Technique	Nb d'échantillons méthylés	% méthylation
Nom	Locus	Cible					
<b>P16</b>	9p21	Cycle cellulaire	Ai et al., 2003	100	MSP	27	27
			Nakahara et al., 2001	32	MSP	16	50
			Sanchez-Cespedes et al., 2000	50	MSP	14	28
			Ogi et al., 2002	96	RE-PCR	28	29
			Viswanathan et al., 2003	99	RE-PCR	23	23
			Hasegawa et al., 2002	80	MSP	26	32
			Yeh et al., 2003	48	MSP	20	41
			Lopes Bittencourt Rosas et al., 2001	30	MSP	14	30
			Huang et al., 2002	48	MSP	20	42
			Maruya et al., 2004	32	MSP	10	33
						<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>62 (30 – 100)</b>
<b>MGMT</b>	10q26	Réparation ADN (O <sup>6</sup> -methylguanine)	Viswanathan et al., 2003	99	RE-PCR	41	41
			Maruya et al., 2004	32	MSP	10	31
			Sanchez-Cespedes et al., 2000	50	MSP	12	24
			Lopes Bittencourt Rosas et al., 2001	30	MSP	7	23
			Zuo et al., 2004	93	MSP	19	20
			Kulkarni et al., 2004	60	MSP	31	52
						<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>61 (32 – 99)</b>
<b>DAPK</b>	19q34	apoptose	Sanchez-Cespedes et al., 2000	50	MSP	7	14
			Ogi et al., 2002	96	RE-PCR	7	7
			Hasegawa et al., 2002	80	MSP	19	24
			Lopes Bittencourt Rosas et al., 2001	30	MSP	10	33
			Maruya et al., 2004	32	MSP	6	19
			Fan et al., 2004	100	MSP	25	25
			Kulkarni et al., 2004	60	MSP	41	68
						<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>64 (30 – 100)</b>
<b>ECAD</b>	16q22	adhésion cellulaire	Kulkarni et al., 2004	60	MSP	40	67
			Yeh et al., 2003	48	MSP	41	85
			Maruya et al., 2004	32	MSP	10	31
			Hasegawa et al., 2002	80	MSP	29	36
			Viswanathan et al., 2003	99	RE-PCR	35	35
			Nakayama et al., 2001	23	MSP	18	78
			Chang et al., 2002b	100	RE-PCR	64	64
						<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>63 (23 – 100)</b>

Tableau 5b : les gènes les plus étudiés

Gène							
Nom	Locus	Cible	Références	Nb d'échantillons étudiés	Technique	Nb d'échantillons méthylés	% méthylation
<b>P14</b>	9p21	Cycle cellulaire	Ogi et al., 2002	96	RE-PCR	13	14
			Maruya et al., 2004	32	MSP	5	16
			Shintani et al., 2001	76	MSP	20	26
			<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>68 (32 –96)</b>		<b>13 (5 –20)</b>	<b>19 (14 – 26)</b>
<b>P15</b>	9p21	Cycle cellulaire	Ogi et al., 2002	96	RE-PCR	6	6
			Viswanathan et al., 2003	99	RE-PCR	23	23
			Yeh et al., 2003	48	MSP	13	27
			<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>81 (48 – 99)</b>		<b>14 (6 –23)</b>	<b>19 (6 –27)</b>
<b>RASSF1A</b>	3p21	Apoptose	Hasegawa et al., 2002	80	MSP	6	8
			Dong et al., 2003	46	MSP	7	15
			<b>Moyenne</b>	<b>68</b>		<b>7</b>	<b>11,5</b>
<b>hMLH1</b>	3p21	Réparation ADN	Viswanathan et al., 2003	99	RE-PCR	8	8
			Ogi et al., 2002	96	RE-PCR	0	0
			Fan et al., 2004	120	MSP	39	32
			<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>105 (96 –120)</b>		<b>16 (0 39)</b>	<b>13 (0 –32)</b>
<b>Rarβ</b>	3p24	Apoptose	Maruya et al., 2004	32	MSP	15	47
			Shaw et al., 2006b	79	pyroséquençage	58	73
			<b>Moyenne</b>	<b>56</b>		<b>36</b>	<b>60</b>
<b>APC</b>	5q21- q22	Adhésion cellulaire	Esteller et al., 2001	<b>10</b>	MSP	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>GSTP1</b>	11q13	Détoxification carcinogène	Fan et al., 2004	100	MSP	0	0
			Sanchez-Cespedes et al., 2000	41	MSP	0	0
			<b>Moyenne ( écart type)</b>	<b>70 (41 –100)</b>		<b>0</b>	<b>0</b>
<b>VHL</b>	3p 25-26	Gène suppresseur	Yeh et al., 2003	<b>48</b>	MSP	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>P73</b>	1p36	Angiogenèse et apoptose	Maruya et al., 2004	<b>32</b>	MSP	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>ATM</b>	11q22	Réparation ADN (toxiques, radiothérapie)	Ai et al., 2004	<b>100</b>	MSP	<b>25</b>	<b>25</b>
<b>DCC</b>	18q21	Adhésion cellulaire	Ogi et al., 2002	<b>96</b>	RE-PCR	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>FHIT</b>	3p14.2	Apoptose	Chang et al., 2002a	<b>29</b>	MSP	<b>8</b>	<b>27</b>
<b>DBC1</b>	9q32-33	Cycle cellulaire	Gao S et al., 2004a	<b>34</b>	MSP	<b>15</b>	<b>44</b>
<b>ABO</b>	9q34	Adhésion cellulaire	Gao S et al., 2004b	<b>30</b>	MSP	<b>10</b>	<b>33</b>
<b>P53</b>	17p13	Apoptose	Yeh et al., 2003	<b>48</b>	MSP	<b>2</b>	<b>4</b>

### **3b Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau des tissus sains, des tissus en périphérie d'une tumeur et au niveau de lésions dysplasiques**

Très peu d'études concernant l'analyse de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur au niveau de tissus sains, de tissus situés en périphérie d'une tumeur ou de lésions dysplasiques ont été publiées.

Nous avons pu en recenser 3 dont les résultats sont résumés dans le tableau N° 6.

Tableau N° 6 : Prévalence des méthylations de gènes suppresseurs de tumeurs au niveau de différents tissus non tumoraux.

Tissus	Références	P14 %	P16 %	DAPK %	MGMT %	ECAD %	RARβ %
Muqueuse saine *	Kulkarni et al.	-	0 (20)	0 (20)	0 (20)	-	-
Tissus en périphérie tumorale	Kulkarni et al.	-	50 (60)	36 (60)	27 (60)	-	-
	Maruya et al.	0 (32)	0 (32)	13 (32)	22 (32)	22 (32)	50 (32)
	Shaw et al.	-	27 (79)	-	-	56 (79)	71 (79)
dysplasie	Maruya et al.	33 (6)	33 (6)	0 (6)	17 (6)	0 (6)	67 (6)

\* : fragment de muqueuse prélevée chez des sujets volontaires sains, non éthylo-tabagiques.

Pour chaque gène sont indiqués le pourcentage de méthylation avec, entre parenthèse, le nombre d'échantillons analysés.

Dans tous les cas où du tissu a été prélevé en périphérie de la tumeur, il s'agissait d'un fragment de muqueuse macroscopiquement saine mais quelque soit l'étude, il n'a pas été précisé le résultat de l'analyse histologique de ce tissu. Dans l'étude de Kulkarni (Kulkarni *et al.*, 2004) et de Maruya (Maruya *et al.*, 2004) la distance à laquelle le prélèvement de muqueuse a été fait par rapport aux berges tumorales n'a pas été précisée. Dans l'étude de Shaw (Shaw *et al.*, 2006b), ce prélèvement a été fait à moins de 10 mm des berges tumorales.

### **3c Prévalence de la méthylation de l'ADN au niveau des liquides biologiques**

- Au niveau de la salive

L'origine de l'ADN analysé au niveau salivaire est sujet à discussion ; en effet, il peut s'agir d'ADN dissout dans la salive et libéré à partir de cellules tumorales apoptotiques, lysées au sein de la tumeur ; la seconde hypothèse est qu'il s'agit l'ADN contenu dans des cellules exfoliées à partir de la tumeur et mises en suspension dans la salive (Lopes Bittencourt Rosas *et al.*, 2001 ; Miyamoto *et al.*, 2005 ; Shaw, 2006a ; Ha & Califano., 2006). L'étude des méthylations au niveau salivaire a été faite chez des patients porteurs de lésions pré-néoplasiques et chez des patients porteurs de carcinomes invasifs.

#### *Pour les lésions pré-néoplasiques*

López et collaborateurs (López *et al.*, 2003) ont démontré qu'il était possible de détecter par MSP, au niveau de la salive, la méthylation de trois gènes suppresseurs de tumeur (P14, P16, MGMT) chez des patients porteurs d'une lésion pré-néoplasique de type leucoplasie au niveau de la cavité buccale. Dans cette étude, deux groupes de patients ont été analysés ; un premier groupe de 19 patients, fumeurs et/ou éthyliques, présentant une leucoplasie mais sans antécédent de carcinomes des VADS (groupe N°1) ; un second groupe de 15, également fumeurs et/ou éthyliques, mais ayant comme antécédent un ou plusieurs carcinomes des VADS traités (modalités de traitement non précisées) et en rémission de leur(s) cancer(s) (groupe N°2). 28 (82%) des 34 patients étudiés présentaient une méthylation d'au moins un des trois gènes étudiés dans les salives prélevées et ce, quelque soit la localisation anatomique de la zone de leucoplasie au niveau de la cavité buccale. Le nombre de méthylations était plus important, tout particulièrement pour P14, chez les patients de plus de 50 ans n'ayant pas stoppé leur intoxication ethylo-tabagique et ayant eu au moins un cancer des VADS traité préalablement. Par contre cette étude ne précisait pas si les patients ayant au moins une méthylation présente dans leur salive ont développé, au cours de leur suivi clinique, un carcinome invasif tout particulièrement dans le groupe de patients N°2.

#### *Pour les carcinomes épidermoïdes invasifs*

Lopes Bittencourt Rosas et collaborateurs (Lopes Bittencourt Rosas *et al.*, 2001) ont démontré qu'il était possible de détecter par MSP, au niveau de la salive, la méthylation du promoteur de trois gènes suppresseurs de tumeur : P16, MGMT et DAPK.

Dans cette étude comprenant 30 patients porteurs d'un carcinome épidermoïde de la cavité buccale, de l'oro hypopharynx et du larynx, non préalablement traités, chez qui un prélèvement de salive avait été fait au moment du diagnostic, parmi les 17 patients ayant une méthylation d'au moins un des trois gènes au niveau tumoral (17/30, 56%), 11 (11/17, 65%) avaient au moins une méthylation détectable au niveau salivaire. Cette détection était d'autant plus sensible que la tumeur était localisée au niveau de la cavité buccale (8/10, 80%).

Par ailleurs, aucune méthylation n'était retrouvée dans la salive en l'absence de méthylation du gène correspondant au niveau tumoral, soulignant la spécificité de la méthode utilisée.

Cette étude comportait un groupe témoin de 30 sujets sains (15 fumeurs et 15 non fumeurs) ; chez 1 sujet (3%) fumeur était mis en évidence la méthylation de 2 gènes (P16 et MGMT), l'explication donnée par les auteurs étant l'éventuelle présence d'un cancer occulte chez ce patient bien que l'examen clinique ait été normal et qu'il n'y ait pas eu de suivi clinique de ce patient précisé dans l'étude.

Les conclusions de ce travail étaient :

- 1) que l'étude de la méthylation de gènes suppresseurs au niveau salivaire était possible ;
- 2) qu'il s'agissait d'une méthode non invasive, sensible et spécifique ;
- 3) qu'elle pouvait être utilisée pour la détection primaire chez des patients à risque (fumeurs et/ou éthyliques) et la détection précoce des rechutes tumorales chez les patients préalablement traités pour un carcinome épidermoïde des VADS.

Toutefois aucune étude n'a été publiée à ce jour pour confirmer le dernier point de cette conclusion.

- Au niveau du sang (sérum, plasma)

La présence d'ADN circulant dans le sérum/plasma de patients porteurs d'un cancer a été rapportée pour la première fois début des années 80 (Shapiro *et al.*, 1983).

Cette présence d'ADN est retrouvée dans de nombreux types de cancers (Ziegler *et al.*, 2002).

D'après Jahr, l'ADN détecté provient vraisemblablement de cellules apoptotiques et de cellules tumorales nécrosées (Jahr *et al.*, 2001).

L'ADN est ainsi libéré dans les vaisseaux qui se situent au sein et qui entourent la tumeur et est ensuite relargué dans la circulation sanguine générale, où il peut être détecté et analysé.

A ce jour, deux études ont analysé la présence de méthylations dans le sérum et le plasma de patients porteurs d'un carcinome épidermoïdes des VADS. Les résultats de ces études sont résumés dans le tableau N° 7.

Tableau N° 7 : Détection et analyse de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur dans le sérum et le plasma de patients porteurs d'un carcinome épidermoïde des VADS.

Localisations tumorales	prélèvement	Gènes étudiés	Méthode d'analyse	Incidence (%) *	Sujets contrôles	références
CB, OP, HP, L	Sérum	P16, DAPK, MGMT	MSP	21/50 (42)	Non	Sanchez-Cespedes <i>et al.</i> , 2000
CB, OP, HP, L	Plasma	P15, p16	MSPq	13/20 (65)	Oui (4/24)	Wong <i>et al.</i> , 2003a

CB : cavité buccale ; OP : oropharynx ; HP : hypopharynx ; L : larynx. \* : nombre de prélèvements sanguins positifs ( $\geq 1$  méthylation détectée) par rapport au nombre de tumeurs méthylées ( $\geq 1$  méthylation détectée dans la tumeur).

Dans les deux études, le prélèvement sanguin a été fait au moment du diagnostic de la tumeur et avant tout traitement.

Dans l'étude de Sanchez-cespedes, la cohorte initiale comportait 95 patients. Dans 52 cas (55%), il existait au moins une méthylation présente dans la tumeur. Pour 50 des 52 patients ayant une tumeur méthylée, le sérum a été analysé en parallèle. Parmi les 21 patients ayant au moins un gène méthylé au niveau sérique, 5 (24%) ont développé des métastases à distance des VADS, contre 1 (3%) parmi les 29 n'ayant pas de méthylation décelable. Cette étude ne comportait pas de groupe contrôle.

L'étude de Wong comportait 73 patients. P16 et P15 étaient méthylés dans respectivement 49% et 60% des tumeurs analysées. Pour 20 patients, l'étude de la méthylation de P16 et P15 a été réalisée au niveau plasmatique ; une méthylation a été retrouvée dans 13 (65%) des plasmas analysés. L'évolution clinique des patients présentant une méthylation au niveau plasmatique n'a pas été précisée dans cette étude. 4 des 24 patients (17%) contrôles présentaient une méthylation du gène P16 et/ou p15 avec toutefois une différence significative entre ce groupe et le groupe des patients porteurs d'un cancer ( $p < 0.02$ ). Dans cette étude, la présence de méthylations chez les sujets témoins ne trouve pas d'explication claire.

Néanmoins l'étude de Wong souligne l'importance d'avoir une population témoin pour ne pas introduire de biais dans l'interprétation des résultats.

# **DONNEES DE LA LITTERATURE**

## **CHAPITRE IV**

**Biomarqueurs et cancers des VADS**

## 1. Définition d'un biomarqueur

Les cellules cancéreuses ont une capacité de prolifération illimitée, d'échappement au processus apoptotique, d'invasion cellulaire, de néo-angiogenèse et de dissémination métastatique.

L'ensemble des anomalies génétiques et épigénétiques impliqués dans ces différentes étapes de la cancérogenèse, et que nous venons de détailler, représentent des marqueurs moléculaires potentiels ou biomarqueurs pour les cancers des VADS.

Toutefois, certains critères fondamentaux doivent être respectés avant de confirmer l'intérêt clinique d'un biomarqueur et donc de passer du stade de la recherche pré clinique, au stade de l'application clinique quotidienne, c'est-à-dire utilisable pour les patients et par les cliniciens à une grande échelle.

Ces critères sont (Shin *et al.*, 1994 ; Hammond & Taube., 2002 ; Westra & Califano., 2004) :

- 1) La population étudiée doit :
  - correspondre à la population pour laquelle l'utilisation de ce biomarqueur a un intérêt clinique. Par exemple, dans le cadre d'une étude des carcinomes des VADS, les modalités d'exposition aux toxiques (tabac et/ ou alcool), les localisations tumorales, les stades cliniques des patients inclus doivent être représentatifs de la population à traiter ;
  - être traitée selon des protocoles thérapeutiques bien définis et validés par l'ensemble des cliniciens prenant en charge les cancers des VADS ;
- 2) Le biomarqueur doit pouvoir être détecté à des stades précoces du développement tumoral ;
- 3) Les étapes du recueil et de stockage des prélèvements, comme les techniques biologiques pour étudier le biomarqueur doivent être parfaitement codifiées.
- 4) Le biomarqueur doit pouvoir être mesuré de façon objective et reproductible à partir d'une quantité de matériel biologique la plus faible possible ;
- 5) La sensibilité de la technique d'étude du biomarqueur doit être bonne ;

- 6) Il ne doit pas y avoir de biais dans l'interprétation des résultats, ce qui contribue à déterminer la spécificité du marqueur. Pour cela, outre la cohorte de patients (population des cas), le marqueur doit être étudié dans deux autres populations (populations témoins) comparables en ce qui concerne l'origine ethnique, le sexe et l'âge des sujets :
- un groupe de sujets ayant une pathologie non cancéreuse (inflammatoire, infectieuse) des VADS ;
  - un groupe de sujets exposés aux mêmes carcinogènes que les patients porteurs d'un cancer des VADS, en l'occurrence le tabac et / ou l'alcool ;
- 7) Les informations obtenues avec le biomarqueur doivent être comparées, grâce à des analyses multivariées, aux connaissances cliniques et/ou biologiques déjà validées de la pathologie considérée. Pour cela un nombre suffisant de patients doit être étudié.

Il est cependant difficile qu'un biomarqueur puisse respecter l'ensemble de ces critères. Il sera d'autant plus fiable et utilisable en clinique s'il respecte le maximum des critères indiqués ci dessus.

## **2. Biomarqueurs et cancers des VADS**

### ***2a. Justification de l'identification de biomarqueurs fiables et utiles pour les cliniciens dans la prise en charge des cancers des VADS***

Malgré une surveillance clinique rapprochée et l'éducation des patients sur les signes fonctionnels d'alerte que représentent l'odynophagie, l'otalgie réflexe, la dysphonie, le diagnostic est fait à un stade tardif (stades III, IV) (Sjögren EV, 2006), et le nombre de rechutes de la maladie ou de second cancer reste élevé (<http://sforl.org> ; recommandations pour le suivi des patients pour un cancer des VADS).

Pour une localisation donnée, les cliniciens savent bien que deux patients ayant une tumeur avec un stade clinique identique traitée de la même façon, peuvent avoir une évolution et donc un pronostic radicalement opposé, l'un évoluant favorablement, l'autre non. La clinique seule est incapable d'établir un pronostic pour chaque patient.

Même si l'on obtient 80% de réponses objectives chez les patients traités par chimiothérapie, seuls 45% sont répondeurs complets, ce qui signifie que plus d'un patient sur deux n'est pas traité de façon optimale, sans compter la morbidité et la mortalité liées à ce type de traitement (Faivre & Teman., 2004).

Les critères histopathologiques pris isolément, paraissent insuffisants pour poser l'indication d'une radiothérapie post opératoire ; en cas de radiothérapie post opératoire, quel type de traitement doit être proposé au patient ? quels territoires traiter et à quelles doses ? faut il y associer une chimiothérapie ? la clinique et l'analyse histopathologique permettent de répondre partiellement à ces questions et des protocoles de traitement ont été établis (Bernier *et al.*, 2004) ; mais ils ne laissent pas de place, ou très peu, à la modulation du traitement en fonction de chaque patient.

Si l'on s'en tient aux seuls éléments que nous venons d'aborder dans ce paragraphe, et même si la liste n'est pas exhaustive, il apparaît que l'identification de biomarqueurs fiables et utiles au diagnostic, au suivi et au traitement des cancers des VADS constitue un axe de recherche indispensable pour améliorer le pronostic des patients.

### **2b. Intérêts des biomarqueurs dans les cancers des VADS**

L'identification d'un biomarqueur peut être utile dans les domaines :

- 1) diagnostique (dépistage précoce, suivi englobant le dépistage de la maladie résiduelle ou de la rechute) ;
- 2) pronostique ;
- 3) thérapeutique (prédiction de la réponse à un traitement, traitement ciblé).

#### **- dépistage et suivi des cancers des VADS**

Contrairement à d'autres cancers comme la prostate avec le dosage du PSA (Prostate Specific Antigen) (Otto & Koning., 2004), ou le cancer du colon avec le dosage de l'ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) (Meyerhardt & Mayer., 2003), il n'existe aucun biomarqueur pour le diagnostic et le suivi des cancers des VADS.

#### **- Pronostic des cancers des VADS**

De nombreux marqueurs biologiques corrélés au stade tumoral, au degré de différenciation tumorale, à l'envahissement ganglionnaire et à la présence de métastases viscérales sont identifiés dans la littérature ; les principaux sont résumés dans le tableau N° 8 (Lothaire *et al.*, 2005).

D'autres, comme l'aneuploïdie, signant une instabilité chromosomique, ou les anomalies chromosomiques semblent également corrélée à un mauvais pronostic (Rubio Bueno *et al.*, 1998).

Toutefois, très peu d'études ont pu démontrer l'impact réel de ces marqueurs biologiques sur le pronostic des patients.

Enfin, il existe deux facteurs majeurs limitant leur utilisation en pratique clinique :

- 1) Le fait que ces marqueurs soient étudiés la plupart du temps séparément, ne permet pas de connaître l'impact relatif de chaque marqueur ;
- 2) le faible nombre de patients inclus dans les séries cliniques, limite la puissance statistique des résultats obtenus.

En pratique, aucun de ces marqueurs n'est utilisable par le clinicien.

Tableau N° 8 : Principaux marqueurs biologiques ayant une valeur pronostique dans les cancers des VADS (d'après Lothaire et al., 2006 ; Bourhis et al., 1996). Dim. : diminution.

<b>Marqueurs impliqués dans la croissance, la prolifération tumorale et l'apoptose</b>			
	<b>Cible, fonction</b>	<b>altération</b>	<b>pronostic</b>
<b>EGFR</b> et son ligand TGF- $\alpha$ (Epidermoid Growth Factor Receptor) et son ligand <b>TGF-<math>\alpha</math></b> Transforming Growth factor)	prolifération cellulaire	sur expression	mauvais
<b>Cyclin D1</b>	pro oncogène	amplification	mauvais
<b>KI 67 (MIB-1) Antigen</b>	cycle cellulaire (G1, S, G2)	sur expression	mauvais
<b>Bcl-2</b>	anti apoptotique	sur expression	mauvais
<b>Fas (Apo-1/CD 95)</b> et son ligan <b>FasL (Fas Ligand)</b>	complexe pro apoptotique	dim. expression	mauvais
<b>Marqueurs impliqués dans la suppression tumorale</b>			
<b>p 27 (Kip 1)</b> cyclin-dependent kinase Inhibitor (CDI)	cycle cellulaire	dim. expression	mauvais
<b>TP53</b> <b>Ac anti TP53</b>	cycle cellulaire	mutation présence	mauvais mauvais
<b>Marqueurs impliqués dans l'angiogénèse tumorale</b>			
<b>VEGF</b> (Vascular Endothelial Growth factor)	angiogénèse tumorale	sur expression	mauvais
<b>Marqueurs impliqués dans l'agressivité et le potentiel métastatique des tumeurs</b>			
<b>MMPs (MMP 2, 8, 9)</b> (Matrix Metallo Proteinases)	conformation de la matrice extra-cellulaire	sur expression	mauvais

- Traitement des cancers des VADS

*Réponse à la chimiothérapie*

De nombreuses études ont été réalisées dans le but de rechercher des marqueurs biologiques prédictifs de la réponse à la chimiothérapie, notamment sur p53 et Bcl-2.

Osman et ses collaborateurs (Osman et al., 2002) ont démontré que le phénotype muté ou normal de p53 déterminé par immuno-histochimie en utilisant trois anticorps, n'était pas corrélé à la réponse à une chimiothérapie d'induction associant 5FU (5-fluoro-uracil) et du CDDP (Cisplatine).

Dans le cadre de notre DEA, nous avons obtenus des résultats similaires en utilisant cinq anticorps (CM1, Pab 1801, Pab 240, DO7 et D40). Ceux-ci seront détaillés dans le chapitre expérimentations et résultats.

En revanche, d'autres publications ont démontré que la présence de mutations détectées par séquençage automatisé au niveau du gène de TP53 était corrélée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie (Temam *et al.*, 2000). Les résultats de ce travail ont été confirmés par celle de Cabelguenne qui a montré que la présence d'une mutation de TP53 était un facteur indépendant de la taille tumorale et de l'envahissement ganglionnaire de non réponse au traitement (Cabelguenne *et al.*, 2000). En effet, dans cette étude les patients porteurs d'une mutation de TP53 avaient 4.9 fois plus de risque de ne pas répondre au traitement, la non réponse étant définie par une régression tumorale inférieure à 50% après 3 cures d'une chimiothérapie associant 5FU et CDDP.

Contrairement à l'analyse des mutations de TP53, l'étude de l'hyperexpression de p53 en IHC ne semble pas être un bon marqueur de chimiosensibilité des carcinomes des VADS. En effet, l'étude de l'hyperexpression de p53 en IHC ne reflète que partiellement la présence de certaines mutations de TP53, plus de 50% des mutations étant à l'origine d'une protéine tronquée ou absente, rendant sa détection en IHC impossible (Taylor *et al.*, 1999). La discordance entre les travaux d'analyse mutationnelle et d'immunohistochimie peut être au moins partiellement expliquée par le fait que tous les mutants ne peuvent être identifiés par la seconde méthode.

D'autres marqueurs, comme l'expression de bcl-2 ont été utilisés pour prédire la réponse à une chimiothérapie d'induction comportant du CDDP et du 5-FU pour le traitement des tumeurs localement avancées. Dans leur étude qui comportait 141 patients porteurs d'un carcinome épidermoïde des VADS de stades II à IV, Fouret et ses collaborateurs retrouvaient une surexpression de Bcl-2 en IHC dans 18% des cas (Fouret *et al.*, 2002). 24

des 25 patients qui sur exprimaient bcl-2 étaient des bons répondeurs à la chimiothérapie (5 FU- CDDP), alors que parmi les 114 patients qui n'exprimaient pas bcl-2, seulement 75 (66%) étaient des bons répondeurs ( $p < 0.001$ ). La sur expression de bcl-2 était en analyse statistique multivariée un facteur indépendant de bonne réponse à la chimiothérapie. Ce résultat est paradoxal étant donné les fonctions anti-apoptotiques de bcl-2 ; en effet, les travaux fondamentaux suggèrent que la sensibilité des cellules tumorales aux agents cytotoxiques est augmentée par l'activation des mécanismes pro-apoptotiques (Lowe & Lin, 2000).

Esteller et ses collaborateurs (Esteller et al., 2000) ont démontré que l'efficacité du traitement de première intention des gliomes par un agent alkylant, la Carmustine (BiCNU®, Gliadel ®) était dépendante de la fonctionnalité du gène MGMT, la réponse au traitement étant moins bonne en cas de méthylation de la région promotrice de ce gène.

Hors, comme nous l'avons vu précédemment, il s'avère que le pourcentage de méthylation de MGMT dans les gliomes est équivalent à celui retrouvé dans les cancers des VADS (30%).

La méthylation de MGMT peut donc potentiellement constituer un biomarqueur prédictif de réponse à une chimiothérapie comportant un agent alkylant, pour le traitement des cancers des VADS. Aucune étude n'a été entreprise dans ce domaine.

#### *Réponse à la radiothérapie*

Des études similaires concernant l'étude de p53 et la réponse à la radiothérapie ont été menées, notamment en ce qui concerne le risque de rechute locale et la survie des patients après ce type de traitement. Les résultats rapportés dans la littérature sont discordants (Gallo *et al.*, 1999 ; Saunders *et al.*, 1999).

Aucune des études mentionnées précédemment n'ont permis, pour l'instant, d'utiliser les marqueurs étudiés en pratique clinique courante.

D'ailleurs, sur le plan conceptuel, il paraît assez clair qu'aucun marqueur moléculaire ne peut individuellement prédire la réponse à un traitement ; en effet, la complexité des interactions entre les différents mécanismes impliqués dans la cancérogenèse des VADS qu'ils soient génétique ou épigénétique, ne peut être appréhendée par l'étude isolée de quelques éléments du « puzzle ».

### *Thérapeutiques ciblées*

Comme nous l'avons vu précédemment, la voie de signalisation EGF-EGFR est sur exprimée dans 80% des carcinomes épidermoïdes des VADS. La caractérisation de cette voie a permis le développement de nouvelles thérapeutiques qui bloquent soit le récepteur lui même (Erbix <sup>®</sup>) soit l'activité tyrosine kinase du récepteur (Iressa <sup>®</sup>, Traceva <sup>®</sup> ).

Cet exemple illustre parfaitement le transfert entre la connaissance d'un mécanisme biologique et le développement d'une nouvelle thérapeutique.

Au total, il apparaît que même si la recherche est active pour identifier des biomarqueurs utiles aux cliniciens pour la prise en charge des cancers des VADS, les résultats de celle ci restent décevants, en dehors des thérapeutiques ciblées qui sont des traitements émergents et dont les résultats demandent à être confirmés.

## **EXPERIMENTATIONS - RESULTATS**

## **1. Introduction**

Dans le cadre de nos recherches, nous nous sommes successivement intéressés aux altérations du gène TP53 et sa protéine (p53), puis aux altérations épigénétiques (méthylation de l'ADN) des cancers des VADS deux mécanismes qui, comme nous venons de le voir, sont fortement impliqués dans la cancérogenèse de ces tumeurs.

Dans tous nos travaux, l'objectif principal était d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs qui puissent avoir une implication dans le diagnostic, le suivi, le traitement et le pronostic de ces cancers.

Dans un premier temps nous présenterons succinctement les résultats que nous avons obtenus pour TP53 et sa protéine, puis nous exposerons l'étude que nous avons entreprise récemment au sujet des altérations épigénétiques.

## **2. TP53 et sa protéine p53**

Dans le cadre de notre DEA, nous avons étudié la protéine p53 codée par le gène TP53 celle-ci ayant, comme nous l'avons vu dans le chapitre II, un rôle essentiel dans la progression dans le cycle cellulaire par le biais du contrôle de l'apoptose.

Ce travail avait eu lieu au sein du groupe de recherche sur le cancer du poumon et des voies aériennes (Pr. Ch Brambilla) dont une des thématiques de recherche était d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs susceptibles d'avoir une valeur prédictive dans la réponse à la chimiothérapie des tumeurs des VADS avant traitement.

Le but de notre travail était d'étudier la relation phénotype p53 muté et réponse à la chimiothérapie.

Pour ce faire nous nous étions fixé comme objectifs :

- 1) d'étudier la protéine p53 par analyse immuno-histochimique (IHC en utilisant 4 anticorps monoclonaux, Pab 1801, Pab 240, DO7, D40 et un anticorps polyclonal, CM1) sur prélèvements tumoraux (fixés sur paraffine) réalisés chez des patients porteurs d'un carcinome épidermoïde avant traitement par chimiothérapie associant 2 cytotoxiques, le 5-Fluorouracil et le Cisplatine ;
- 2) d'étudier sur le plan statistique la relation entre le phénotype muté de p53 en IHC et la réponse à la chimiothérapie ;
- 3) de déterminer si le phénotype muté de p53 en IHC correspondait à une mutation du gène TP53 grâce à une amplification PCR du gène suivi d'une analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide , selon la technique de Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP).

Quarante et un cancers des VADS avaient été étudiés. Nous avons identifiés un phénotype muté de p53 dans 70,7% des cas, correspondant aux données de la littérature.

Une corrélation entre IHC positive et SSCP avait été retrouvée dans 63% des cas ce qui était inférieure aux résultats rapportés dans la littérature (80 -100% de corrélation).

Ce résultat pouvait être expliqué :

- par des conditions non optimales de SSCP
- par le fait que certaines mutations n'étaient pas détectables par SSCP (conformation tridimensionnelle de p53 non détectable).

Le séquençage du gène TP53 aurait permis de trancher entre ces deux cas de figure mais, pour des raisons techniques celui-ci n'avait pas été possible.

Enfin, nous n'avons pas retrouvé de corrélation statistique entre le phénotype muté de p53 et la réponse à la chimiothérapie. L'étude immuno-histochimique de P53 ne pouvait donc pas constituer un biomarqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie.

L'ensemble de ces résultats avaient été confirmés pour une cohorte plus importante de patients (n=74) et avait fait l'objet d'une publication dans la revue Oral Oncology (Lavielle & Righini, 1998) (Annexe 8).

Comme nous l'avons également vu dans le chapitre II, le phénotype muté de p53 est à l'origine de la production d'anticorps détectable au niveau de la circulation sanguine.

Dans notre travail publié dans Oral Oncology, nous avons détecté des Ac anti-p53 par méthode ELISA dans 44% des cas. La présence de ces anticorps n'était pas corrélée aux caractéristiques cliniques de la tumeur (localisation, statut T et N) ni à la réponse à la chimiothérapie.

En conclusion les Ac anti-p53 n'étaient pas un biomarqueur intéressant, au même titre de l'étude de l'IHC, pour prédire la réponse à la chimiothérapie chez les patients traités pour un carcinome des VADS.

Par ailleurs, la présence d'Ac n'étant pas corrélée aux caractéristiques cliniques des tumeurs, ils ne représentaient pas non plus un biomarqueur potentiel pour le suivi des patients.

Compte tenu des résultats décevants concernant l'étude de p53, nous avons opté pour l'arrêt de cette voie de recherche et orienté nos travaux vers l'étude des altérations épigénétiques des cancers des VADS.

### **3. Etude de la méthylation de l'ADN dans les carcinomes des VADS**

#### **3a – Objectifs**

Les objectifs de notre travail étaient :

- 1) de constituer une tumorothèque, une banque de salive et une sérothèque chez des patients pris en charge pour un carcinome épidermoïde de la cavité buccale, de l'oropharynx et du larynx ;
- 2) de mettre au point la méthode d'analyse par MSP des méthylations du plus grand nombre de gènes suppresseurs de tumeur possible, afin de définir un profil de méthylation ;
- 3) d'analyser ces gènes au niveau des tumeurs, de la salive et du sang ;
- 4) de corrélérer les résultats obtenus au niveau des tumeurs et des liquides biologiques, afin de déterminer si la salive et/ou le sang étaient susceptibles de représenter un biomarqueur potentiel pour le suivi des patients ;
- 5) de déterminer si la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur était un facteur pronostic potentiel pour les cancers des VADS.

#### **3b – Matériel et méthode**

- Type d'étude et critères d'inclusion des patients

Ce travail a été réalisé à partir de prélèvements biologiques (tissus et liquides) permettant de constituer une tumorothèque, une sérothèque et une banque de salive dans le cadre d'une étude prospective dénommée Biomarkscan-ORL.

Il s'agissait d'une étude mono-centrique réalisée au CHU de Grenoble.

L'étude a été réalisée dans le cadre d'un PHRC régional (inscrit sous le N° DGS2002/0247), étude sans bénéfice direct pour le patient, ayant reçu un avis favorable du CCPPRB en février 2002. Depuis son acceptation, deux amendements ont été nécessaires, un pour le prélèvement de salive au diagnostic et lors du suivi, un second pour les prélèvements de tissus référents.

Les premiers patients ont été inclus en juin 2003 ; les inclusions ne sont pas closes.

Les critères d'inclusion des patients étaient :

- 1) âge compris entre 18 et 75 ans ;
- 2) signature d'un consentement éclairé après lecture d'un formulaire d'information et explications données par un des chirurgiens du service ORL (Annexe 9) ;
- 3) présence d'une tumeur (carcinome malpighien) de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx, les tumeurs du cavum étant exclues ;
- 4) absence d'un cancer traité (en dehors des VADS et d'un carcinome basocellulaire de la peau) dans les 5 ans précédant l'inclusion ;
- 5) absence d'une grossesse en cours ;
- 6) absence d'une pathologie infectieuse transmissible (hépatites B et C, HIV) ;
- 7) acceptation d'un suivi de 5 ans.

Lors de l'inclusion, étaient notés dans le dossier médical :

- 1) les antécédents de cancer des VADS avec, en cas de première localisation traitée, la date et les modalités de traitement ;
- 2) la consommation de tabac (en paquet-années) et la consommation d'alcool (en grammes d'alcool pur ingérés par jour) ;
- 3) le statut TNM établi à partir des données de l'examen clinique, endoscopique et du bilan d'extension loco-régional et à distance (tomodensitométrie injectée de la cavité buccale, du pharyngo-larynx, du thorax et une échographie hépatique).

Parallèlement, deux populations témoins ont été constituées :

- 1) groupe 1 : patients, sans antécédents de cancer des VADS, ayant subi une amygdalectomie pour une pathologie non tumorale avec prélèvement d'un fragment de muqueuse au niveau du pilier amygdalien antérieur ou postérieur, permettant d'obtenir un fragment de muqueuse saine ;
- 2) groupe 2 : patients, sans antécédents de cancer des VADS, consultant dans le service ORL pour une pathologie non tumorale, chez qui un prélèvement de salive et de sang a été réalisé.

Dans les deux groupes, des patients exposés au tabac et/ou l'alcool ont été inclus.

Dans chaque groupe témoin, les patients ont été informés et ont signé un consentement au moment de l'inclusion (Annexe 10).

- Enregistrement des données cliniques et biologiques

La mise à jour des données cliniques a été faite par les chirurgiens du service ORL.

La mise à jour des données de la banque de tissus a été faite par une attachée de recherche clinique (ARC) du département d'anatomopathologie et de pathologie de la cellule.

La mise à jour des données concernant la sérothèque et les prélèvements salivaires a été faite par les techniciennes du Département de Biologie Intégrée (DBI), UF de cancérologie.

L'ensemble des données concernant les produits biologiques a été anonymisé.

- Constitution de la tumorothèque, sérothèque et de la banque de salive

#### A - Les prélèvements tissulaires

##### A-1 Prélèvements tumoraux au moment du diagnostic

Pour chaque patient, un fragment de tumeur a été prélevé.

Dans tous les cas ce prélèvement a été fait sous anesthésie générale, au bloc ORL :

- soit lors de la panendoscopie réalisée dans le cadre du bilan d'extension initial (prélèvement biopsique  $\geq 5 \text{ mm}^3$  dans une zone charnue, non nécrotique de la tumeur) ;
- soit lors de l'intervention chirurgicale lorsque le patient était opéré.

Dans tous les cas, un fragment de muqueuse macroscopiquement saine (tissu référent) a été prélevé à plus de 3 cm du site tumoral. Ce fragment était adressé au laboratoire dans un flacon séparé en précisant le site de prélèvement.

En cas de chirurgie avec présence d'une ou plusieurs adénopathies cervicales, une d'entre elles était prélevée et acheminée au laboratoire accompagnée d'une fiche de renseignement clinique (annexe 11).

Les prélèvements tumoraux, les tissus référents et les adénopathies étaient adressés à l'état frais au département d'anatomopathologie et de pathologie de la cellule, dans un délai n'excédant pas 10 minutes ; l'heure de départ et de réception des prélèvements étaient consignés pour chaque patient par l'anatomopathologiste réceptionnant les prélèvements.

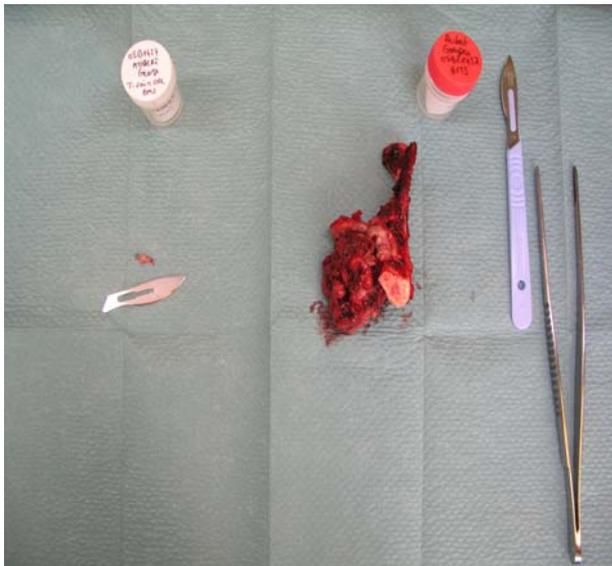
Au laboratoire :

- 1) le fragment de tissu référent était immédiatement congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sans analyse anatomopathologique préalable ;
- 2) Un des fragment biopsique ou un fragment tumoral prélevé dans une zone charnue, non nécrotique de la tumeur était également immédiatement congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sans analyse anatomopathologique préalable (figure N° 37) ;
- 3) En cas d'adénopathie, un examen histologique extemporané était réalisé ; si celui-ci confirmait la présence de cellules malignes au sein du ganglion, un fragment était congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En cas de fragment biopsique de volume réduit ou en cas de tumeur de petite taille ( $< 1\text{ cm}$ ) traitée chirurgicalement, l'anatomopathologiste se réservait le droit de ne pas congeler le fragment biopsique ou un fragment de la tumeur pour ne pas compromettre le diagnostic dans le premier cas, et l'analyse anatomopathologique définitive, en particulier l'étude de la qualité d'exérèse (marge de sécurité par rapport aux tissus sains environnants) dans le second cas.

Figure N° 37 : Matériel histologique reçu au laboratoire d'anatomopathologie. A/ A gauche, en regard de la lame de bistouri, le fragment de tissu référent qui sera placé dans le flacon avec un bouchon blanc ; a droite la pièce tumorale sur laquelle va être prélevé un fragment de tumeur dans une zone charnue, non nécrotique à l'aide d'une pince et d'un bistouri et qui sera mis dans le flacon avec un bouchon rouge. B/ les 2 flacons sont plongés dans de l'azote liquide avant que les prélèvements soient stockés dans la tumothèque.

**A**



**B**



## A-2 Prélèvements tumoraux au cours du suivi

En cas de lésion muqueuse suspecte lors du suivi clinique, une panendoscopie sous anesthésie générale avec prélèvements histologiques était réalisée. Les conditions de prélèvement, d'acheminement et de traitement des prélèvements étaient identiques à celles décrites précédemment.

## A-2 Prélèvements de tissus sains

Pour les prélèvements de muqueuse saine (groupe 1 des populations témoins), les conditions d'acheminement et le conditionnement au laboratoire étaient identiques à celles des tissus référents.

## B - Les prélèvements de liquides biologiques

### B-1 Au moment du diagnostic (patients porteurs d'une tumeur)

Les prélèvements ont été réalisés juste avant l'anesthésie générale des patients.

#### - Les salives :

5 à 10 ml de salive étaient prélevés dans un flacon stérile en demandant au patient de cracher après avoir fait des mouvements de machonnement pour favoriser la sécrétion salivaire.

En cas de besoin, notamment en cas de xérostomie, le patient se rinçait la bouche et pratiquait un gargarisme à l'aide de 10 ml de NaCl à 0,9% stérile pendant 3 minutes.

#### - Le sang :

7 ml de sang sur tube sec et 14 ml sur tube EDTA étaient prélevés par l'anesthésiste au moment de l'induction de l'anesthésie.

La salive et le sang étaient acheminés au Département de Biologie intégrée (DBI) dans l'unité fonctionnelle (UF) de cancérologie, accompagnés d'une fiche de liaison (Annexe N°11).

Au laboratoire :

- 1) les salives étaient traitées avec une solution de Hanks et 1% de DTT, puis centrifugées. Les cellules étaient ensuite dénombrées avec une cellule de Malassez en présence de bleu de Trypan, permettant de dénombrer le nombre de cellule

---

Xerostomie : quantité de salive insuffisante.

mortes (cytoplasme bleu) et vivantes (cytoplasme clair) ; les cellules étaient ensuite aliquotées (suspension de  $5.10^6$  cellules) et congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  (figure N° 38) ;

- 2) Le sang était centrifugé (tubes secs ou EDTA) à 3000g pendant 12 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants (sérum/ plasma) étaient ensuite prélevés et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

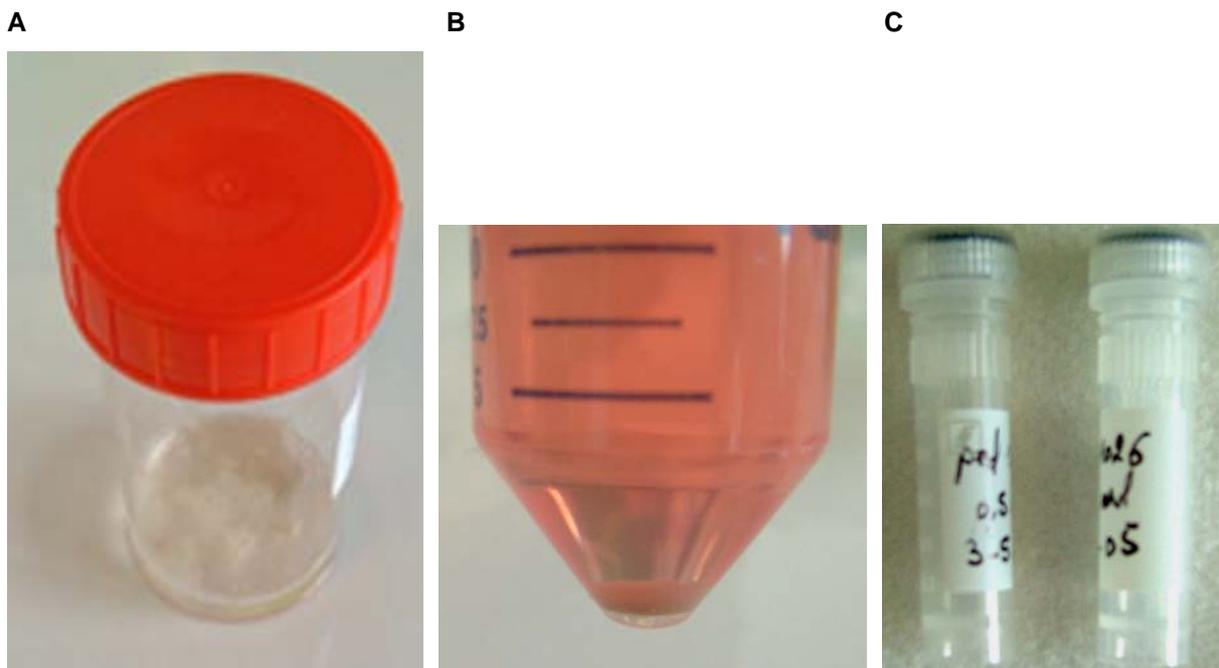
#### B-2 Lors du suivi (patients porteurs d'une tumeur)

Lors des consultations de suivi en ORL, des prélèvements de salive et de sang ont été faits régulièrement. Le premier prélèvement a été réalisé, en moyenne, à 14 mois après le diagnostic. Les prélèvements sanguins étaient acheminés immédiatement au laboratoire. En cas d'impossibilité de transport immédiat, les salives pouvaient être conservées moins de 24 heures à  $+4^{\circ}\text{C}$  dans le service ORL avant d'être acheminées au laboratoire.

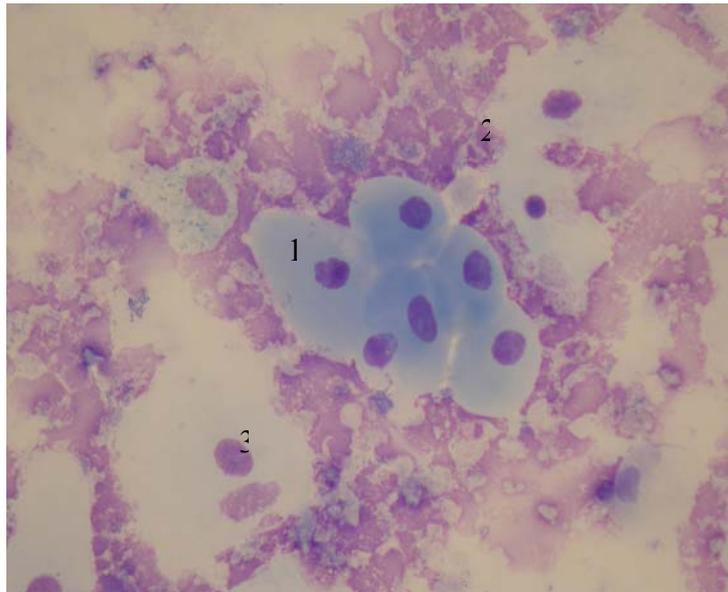
#### B-3 Lors du suivi (patients porteurs d'une tumeur)

Pour les prélèvements de salive et de sang (groupe 2 des populations témoins), les conditions d'acheminement et le conditionnement au laboratoire étaient identiques à celles des tissus référents.

Figure N° 38 : Traitement des prélèvements salivaires au laboratoire. A/ Flacon contenant la salive à son arrivée au laboratoire. B/ culot cellulaire obtenu à partir des cellules exfoliées dans la salive après traitement avec solution de Hanks et 1% de DTT. C/ culot cellulaire aliquoté avant d'être congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . D/ aspect des cellules récoltées après extraction de la salive et après coloration au MGG (= May Grünwald Giemsa) (x 60).



D



1) cellules épithéliales exfoliées ; 2) débris cellulaires ; 3) noyau isolé.

### - Les gènes analysés et méthode d'analyse

#### A - Les gènes étudiés

Nous avons analysé 16 gènes. Leur dénomination complète, leur locus et leur cible sont résumés dans le tableau N° 9.

Tableau N° 9 : récapitulatif des gènes étudiés.

gène	Locus	cible
<b>Rarβ</b> (Retinoic acid receptor β)	3p24	Apoptose
<b>TIMP3</b> (Tissue Inhibitor of Metalloproetinas-3)	22q	Adhésion cellulaire
<b>ECAD</b> (E-cadherin)	16q22	Adhésion cellulaire
<b>P16</b> (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	9p21	Cycle cellulaire
<b>MGMT</b> (O <sup>6</sup> -methylguanine DNA methyltransferase)	10q26	Réparation ADN (O <sup>6</sup> -methylguanine)
<b>DAPK</b> (Death-associated protein kinase 1)	19q34	Apoptose
<b>DCC</b> (Cell-cell adhesion "Deleted in Colorectal Cancer")	18q21	Adhésion cellulaire
<b>RASSF1A</b> ( Ras effector homologue)	3p21	Apoptose
<b>P15</b> ( cyclin-dependent kinase inhibitor 2B)	9p21	Cycle cellulaire
<b>P14</b> (Androgen receptor factor)	9p21	Cycle cellulaire
<b>APC</b> (Adenomatosis polyposis coli)	5q21-q22	Adhésion cellulaire
<b>FHIT</b> (Fragile histidine triad)	3p14.2	Apoptose
<b>HMLH1</b> ( Human homolog of bacterial Mut L)	3p21	Réparation de l'ADN (discordances nucléotides / brin)
<b>ATM</b> (Ataxia telangiectasia mutated gene)	11q22	Réparation ADN (toxiques, radiothérapie)
<b>THBS1</b> (Thrombospondin 1)	15q15	Angiogénèse
<b>CASP8</b> (Caspase 8)	2q33-q34	Apoptose

## B – Méthode d'analyse

### B-1 Les prélèvements tissulaires

Dix coupes de 15  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à partir des prélèvements tissulaires cryopréservés (tumeurs et tissus référents).

Qu'il s'agisse d'une tumeur ou d'un tissu référent, une première coupe du tissu a été réalisée et colorée à l'éosine pour vérifier :

- 1) dans le cas d'une tumeur, que la quantité de matériel tumoral était suffisant ( $> 70\%$ ) ;
- 2) dans le cas d'un tissu référent, qu'il s'agissait bien d'un fragment de muqueuse saine (sans hyperplasie, dysplasie, îlot tumoral).

### B-2 Les prélèvements salivaires

Un ou plusieurs des culots cellulaires aliquotés ont été utilisés pour les analyses au niveau de la salive.

### B-3 Extraction et quantification de l'ADN

#### *- Extraction et quantification de l'ADN*

L'ADN des coupes cryopréservées et des cellules récupérées à partir de la salive a été extrait avec le kit « DNA Mini Kit QIAmp » (Qiagen ®, France). La totalité du matériel était repris dans 180  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse ATL et digéré par 20 à 40  $\mu\text{l}$  de protéinase K dans un bain-marie à 56°C jusqu'à digestion complète. Après inactivation de la protéinase K (incubation à 70°C pendant 10 minutes), l'ADN était purifié par centrifugation sur résine échangeuse d'anions suivant les recommandations du kit.

La concentration d'ADN était ensuite déterminée par spectrophotométrie, en mesurant l'absorption de l'éluât à 260 nm ( $A_{260}$ ), sachant que l'  $A_{260}$  d'une solution d'ADN de 50  $\mu\text{g/ml}$  est égale à 1. L'absorption à 280 nm ( $A_{280}$ ) était également mesurée afin d'évaluer la pureté de l'ADN (évaluation de la contamination protéique de l'échantillon) ; un échantillon était considéré comme pur si le ratio  $A_{260}/A_{280}$  était supérieur ou égal à 1.8.

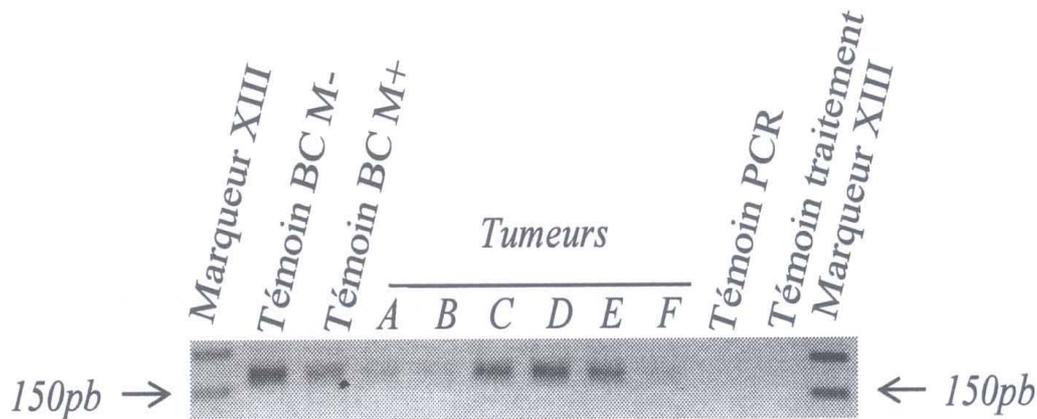
#### *- Methylation-specific PCR (MSP)*

##### *Modification de l'ADN par le bisulfite de sodium*

Nous avons utilisé le kit « CpGenome™ DNA modification kit » (Q.Biogene ®, France). 1  $\mu\text{g}$  d'ADN était dilué dans 550  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant 10 mM d'hydroquinone et 3M de bisulfite de sodium (pH : 5.0). Le mélange était ensuite mis dans un incubateur à 50°C pendant 16 heures.

Après purification sur une résine échangeuse d'anions, l'ADN était repris dans 35  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10mM – EDTA 0.1 mM, pH 7.5), utilisé immédiatement pour l'amplification PCR ou stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  en attendant son utilisation. Avant l'analyse des gènes d'intérêt, une amplification du gène MyoD1 (situé dans une partie du génome dépourvue d'îlots CpG) était réalisée afin de s'assurer de la présence d'ADN après traitement au bisulfite de sodium (figure N° 39).

Figure N°39 : Résultats de la PCR MYOD effectuée sur une série de tumeurs.



BC (Buffy-coat) = témoin, M- (non méthylé), M+ (méthylé). MYOD : 152 pb  
 Témoin PCR et traitement = H<sub>2</sub>O utilisée comme témoin d'absence de contamination lors du traitement.

#### *Amplification de l'ADN traité par PCR*

La réaction PCR a été réalisée dans un volume total de 25  $\mu$ l contenant 2  $\mu$ l d'ADN traité, 23  $\mu$ l de tampon contenant 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M de dNTPs, 0.4  $\mu$ M de chaque amorce, 1 unité de FastStart Taq DNA polymérase (Roche ®) et 0 à 5% de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'amplification PCR a été faite dans un T3 thermocycler (Biometra ®). Les conditions PCR étaient les suivantes : dénaturation initiale à 95°C, 30 secondes à la température d'hybridation spécifique pour chaque gène (tableau N°10), 30 secondes à 72°C pour l'élongation suivie d'une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. De l'ADN provenant de lymphocytes circulants prélevés chez des donneurs sains a été utilisé comme contrôle positif pour l'ADN non méthylé (=BCM, Buffy Coat non méthylé) et, après traitement *in vitro* par la Sss1 méthyltransferase (New England Biolabs ®), comme contrôle positif pour l'ADN méthylé (=BCM+, Buffy Coat méthylé). Un contrôle négatif (H<sub>2</sub>O) a été réalisé pour chaque PCR afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Le volume total de la réaction PCR, additionné de 5  $\mu$ l de bleu de dépôt (50% d'H<sub>2</sub>O et 50% de glycérol et bleu de bromophénol), était ensuite déposé sur gel d'agarose à 3%. Après électrophorèse et immersion de quelques minutes dans un bain de bromure d'éthidium (BET, 1  $\mu$ g / ml), le gel était lu sous lampe à UV (caméra Gel doc ®) et interprété grâce au logiciel Quantity One (BIORAD ®).

Tableau N°10 : Séquences des amorces utilisées pour les PCR, taille du segment amplifié et température d'hybridation. \* : rajout de DMSO dans le milieu de PCR.

gènes	Amorces sens (5'-3')	Amorces antisens (5'-3')	Taille (pb)	Température d'hybridation (°C)
<b>MyoD1</b>	TGATTAATTTAGATTGGGTTTAGAGAAGGA	CCAACCTCCAAATCCCCTCTCTAT	152	60
<b>Rar<math>\beta</math> M</b>	TCGAGAACGCGAGCGATTTCG	GACCAATCCAACCGAAACGA	146	59
<b>Rar<math>\beta</math> U</b>	TTGAGAATGTGAGTGATTTGA	AACCAATCCAACCAAAACAA	146	59
<b>TIMP3 M</b>	GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	CTCTCCAAAATTACCGTACGCG	116	59
<b>TIMP3 U</b>	TGTGTTGGAGGTTAAGGTTGTTTT	ACTCTCCAAAATTACCATACACACC	122	59
<b>ECAD M</b>	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	173	60
<b>ECAD U</b>	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTG	CACAACCAATCAACAACACA	173	56
<b>P16 M</b>	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACC GCGACCGTAA	151	65
<b>P16 U</b>	CGTTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CCCAACCCCAAAACCACAACCATAA	151	60
<b>MGMT M</b>	TTTCGAACGTTTCGTAGGTTTTCGC	GCACTCTCCGAAAACGAAACG	81	55
<b>MGMT U</b>	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTGT	AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA	93	55
<b>DAPK M</b>	CGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	98	60
<b>DAPK U</b>	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAACACCAA	106	60
<b>DCC M</b>	CGTGTTCGCGATTTTTGGTTTC	ACCGATTACTTAAAAATACGCG	145	60
<b>DCC U</b>	GTTGTTGTTGTTTGTGATTTTTGGTTTT	CCACTTACCAATTACTTAAAAATACACA	134	60
<b>RASSF1A M</b>	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGCGAACTAAAAACGA	93	60
<b>RASSF1A U</b>	TTTGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCCACTAAAAACAA	105	60
<b>P15 M</b>	GCGTTCGTATTTTGCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	148	60
<b>P15 U</b>	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	CCATACAATAACCAACAACCAA	154	60
<b>P14 M</b>	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	AAAACCTCACTCGCGACGA	122	60
<b>P14 U</b>	TTTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT	CACAAAACCTCACTCACAACAA	132	60
<b>APC M</b>	GAACCAAAACGCTCCCCAT	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATAT	74	65
<b>APC U</b>	AAACCAAAACACTCCCCATT	AGTTATATGTTGGTTATGTGTGTTTAT	76	60
<b>FHIT M</b>	TTGGGGCGCGGTTTGGGTTTTTACGC	CGTAAACGACGCCGACCCCACTA	74	64
<b>FHIT U</b>	TTGGGGTGTGGGTTTGGGTTTTTATG	CATAAACAACCAACCCCACTA	74	64
<b>HMLH1 M</b>	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCCG	CCTCATCGTAACTACCCGCG	114	63
<b>HMLH1 U</b>	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	120	60
<b>ATM M</b>	GGAGTTCGAGTCGAAGGGC	AACTACCTACTCCCACTTCCAA	239	59
<b>ATM U</b>	GTTTTGGAGTTTGTGTTGAAG	AACTACCTACTCCCACTTCCAA	246	56
<b>THBS1 M</b>	TGCGAGCGTTTTTTAAATGC	TAAACTCGCAAACCAACTCG	74	58
<b>THBS1 U</b>	GTTTGGTTGTTGTTTATTGGTTG	CCTAAACTCACAACCAACTCA	115	60
<b>CASP8 M</b>	TAGGGGATTCGAGATTGCCA	GTATATCTACATTGAAACGA	321	58
<b>CASP8 U</b>	TAGGGGGATTTGGAGATTGTGA	CCATATATATCTACATTCAAACAA	321	50

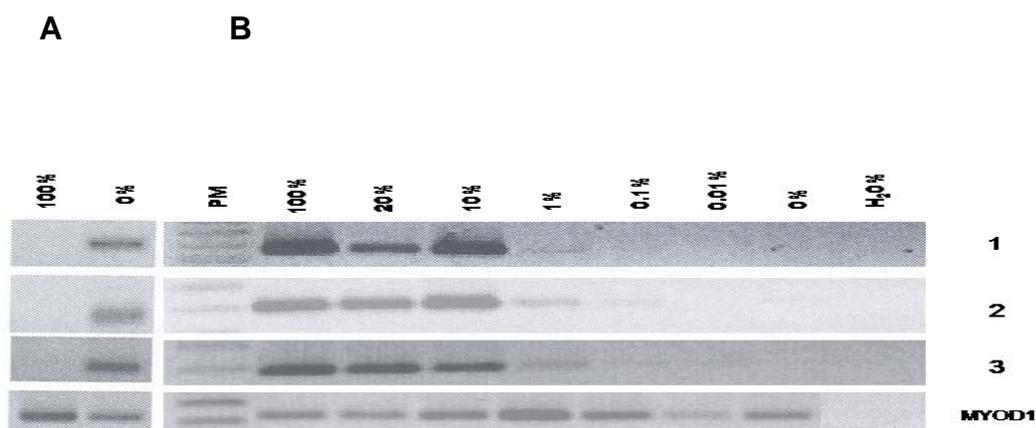
### Sensibilité de la MSP

La sensibilité de la MSP a été déterminée pour les 16 gènes, grâce à une série de dilution ADN méthylé / ADN non méthylé (Tableau N° 11). La sensibilité était comprise entre 1% et 0.01%, en fonction des gènes (Figure N° 40).

Tableau N° 11 : Détermination de la sensibilité de la MSP (gamme de dilution). A partir d'une solution de BCM- à 0.02 µg d'ADN par µl, et d'une solution de BCM+ à 0.01µg d'ADN par µl, une série de dilution est réalisée. Une dilution en cascade est réalisée à partir du tube 3.

Tubes	ADN méthylé en %	µl de BCM-	µl de BCM+	µl d'eau stérile
1	100	0	100	0
2	20	40	20	40
3	10	45	10	45
4	1	50	10 (du tube 3)	40
5	0.1	50	10 (du tube 4)	40
6	0.01	50	10 du tube 5)	40
7	0	50	0	50

Figure N° 40 : Spécificité et sensibilité de la MSP en fonction des gènes étudiés. PM : marqueur de poids moléculaire ; H<sub>2</sub>O : contrôle négatif ; (A) : amplification PCR avec des amorces spécifiques du DNA non méthylé ; (B) : amplification PCR avec des amorces spécifiques du DNA méthylé. Le pourcentages indiquent la fraction d'ADN méthylé détecté dans 1 µg de solution d'ADN (0% : ADN contrôle non méthylé ; 100% : ADN contrôle méthylé) ; PCR MyoD1 : contrôle de la présence d'ADN après traitement au bisulfite de sodium.



1 : gènes P16, MGMT, FHIT, APC, RASSF1A, HMLH1, CASP8, THBS1, DCC, ATM ; 2 : P14, DAPK, EACD, RARβ, TIMP3 ; 3 : P15.

### 3c – Résultats

- Nombre de patients inclus

En date du 1<sup>er</sup> septembre 2006, 270 patients porteur d'un carcinome épidermoïde de la cavité buccale, de l'oro-hypopharynx et du larynx ont été inclus.

Un fragment de muqueuse saine a été prélevé chez 10 patients ayant subi une amygdalectomie (7 fumeurs et 3 non fumeurs).

Un prélèvement de salive et de sang a été réalisé chez 30 patients (15 fumeurs et 15 non fumeurs) ne présentant pas de lésion tumorale au niveau des voies aéro-digestives supérieures

- Nombre d'échantillons méthylés au niveau tumoral

Le tableau N°12 résume le nombre et le pourcentage d'échantillons méthylés pour chaque gène au niveau tumoral.

Tableau N° 12 : Pourcentage d'échantillons méthylés en fonction des gènes, au niveau tumoral.

<b>gènes</b>	<b>Nombre d'échantillons analysés</b>	<b>Nombre d'échantillons méthylés</b>	<b>%</b>
<b>Rarβ</b>	90	52	58
<b>TIMP3</b>	90	41	46
<b>ECAD</b>	90	32	36
<b>P16</b>	90	26	29
<b>MGMT</b>	90	26	29
<b>DAPK</b>	90	24	27
<b>DCC</b>	50	22	24
<b>RASSF1A</b>	90	18	20
<b>P15</b>	90	16	18
<b>P14</b>	90	10	11
<b>APC</b>	90	10	11
<b>FHIT</b>	90	9	10
<b>hMLH1</b>	90	2	2
<b>ATM</b>	50	0	0
<b>THBS1</b>	50	0	0
<b>CASP8</b>	50	0	0

- Nombre d'échantillons méthylés au niveau salivaire

Le tableau N°13 résume le nombre et le pourcentage d'échantillons méthylés pour chaque gène au niveau des salives prélevées au moment du diagnostic.

Tableau N° 13 : Pourcentage d'échantillons méthylés en fonction des gènes, au niveau des salives prélevées au moment du diagnostic.

<b>gènes</b>	<b>Nombre d'échantillons analysés</b>	<b>Nombre d'échantillons méthylés</b>	<b>%</b>
<b>Rarβ</b>	60	50	83
<b>TIMP3</b>	60	17	28
<b>ECAD</b>	60	12	20
<b>P16</b>	60	16	27
<b>MGMT</b>	60	13	22
<b>DAPK</b>	60	9	15
<b>DCC</b>	EC	EC	EC
<b>RASSF1A</b>	60	10	17
<b>P15</b>	60	7	12
<b>P14</b>	60	2	3
<b>APC</b>	60	4	7
<b>FHIT</b>	60	2	3
<b>hMLH1</b>	60	0	0
<b>ATM</b>	NF	-	-
<b>THBS1</b>	NF	-	-
<b>CASP8</b>	NF	-	-

EC : analyses en cours ; NF : analyses non faites.

N'ayant pas retrouvé de méthylations pour les gènes ATM, THBS1 et CASP8, leur analyse au niveau salivaire n'a pas été faite.

Nous avons obtenus des résultats discordants entre les salives et les tumeurs pour le gène RARβ ; l'analyse détaillée des résultats concernant ce gène est rapportée dans un prochain paragraphe.

- Caractérisation d'un méthylotype et intérêt de cette recherche dans la salive pour le suivi des patients

Dans ce travail, nous avons analysés 11 gènes (TIMP3, RASSF1A, P16, MGMT, DAPK, ECAD, P14, P15, APC, FHIT, hMLH1) dans une population 90 patients. L'ensemble des données utilisées pour ce travail sont répertoriées dans l'annexe 12.

Les différents sous groupes de patients étudiés sont résumés dans la figure 1 de l'article annexé.

DCC n'ayant été étudié que pour une partie des patients, et compte tenu des résultats obtenus pour RARβ, ces deux gènes ont été exclus de cette étude. Quant aux gènes ATM, THBS1 et CASP8, aucune méthylation n'ayant été retrouvée, ils ont également été exclus.

Nous avons pu définir un profil de méthylation (ou méthylotype) correspondant aux 6 gènes les plus fréquemment méthylés.

En effet, parmi les 69 patients (77%) ayant au moins une méthylation au sein de leur tumeur, tous avaient au moins un gène méthylés parmi les gènes suivants : TIMP3, ECAD, P16, MGMT, DAPK, RASSF1A.

L'analyse de ces 6 gènes au niveau d'un fragment de muqueuse saine prélevée à distance (> 3 cm) des berges tumorales (= tissus référents) a retrouvé une méthylation dans 3 cas (TIMP3, 2 cas ; DAPK, 1 cas) avec une différence statistiquement significative ( $p < 0.001$ ) entre le pourcentage de méthylation retrouvé pour les tumeurs et les tissus référents et ce, pour chacun des 6 gènes.

Aucune méthylation pour les 11 gènes étudiés n'a été retrouvée au niveau de 30 salives témoins (15 fumeurs, 15 non fumeurs).

Nous avons pu également démontrer qu'il existait une très bonne corrélation entre les résultats obtenus au niveau tumoral et ceux obtenus au sein des salives prélevées au moment du diagnostic, la radiothérapie n'interférant pas avec les résultats obtenus.

Ceci nous a permis de confirmer que l'étude de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur dans la salive était possible, qu'elle était le reflet des altérations épigénétiques au sein des tumeurs correspondantes, et pouvait donc représenter un moyen de surveillance pour les patients.

Notre hypothèse a été confortée grâce aux résultats obtenus pour 22 patients suivis après traitement.

Parmi ces patients qui avaient tous été traités par chirurgie et radiothérapie, outre un examen clinique toutes les 8 semaines, des prélèvements de salives réguliers ont été faits avec analyse de la méthylation des 6 gènes définissant le méthylotype.

Pour 16 patients, aucune méthylation n'a été retrouvée. Un seul a rechuté ; tous les autres sont en vie, en rémission locale et générale.

Pour les 6 autres, une ou plusieurs méthylations persistaient ou sont réapparues lors du suivi. Cinq ont présenté une rechute locale découverte à un stade très précoce, permettant une chirurgie de rattrapage, non mutilante et curative. Pour le sixième cas, aucune méthylation après traitement n'a été mise en évidence, mais il s'agissait d'une tumeur particulièrement agressive et évolutive, dont la rechute a été diagnostiquée d'emblée à un stade localement évolué (> 3 cm) et ayant entraîné le décès du patient en moins de 3 mois.

L'étude de la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur au sein de la salive représente donc un biomarqueur potentiel pour le dépistage précoce des rechutes tumorales chez des patients traités pour un cancer des VADS.

Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée intitulée « Correlation between promoter gene methylation in head and neck tumors and saliva : a potential marker to monitor HNSCC recurrence » (Righini C et al. Proc IFHNOS 2006 ; 224 : P-259) au 3<sup>rd</sup> World Congress of International Federation of head and Neck oncologic societies (IFHNOS).

Prague, 27 juin – 1er juillet 2006.

P-259

## Correlation between promoter gene methylation in head and neck tumors and saliva: A potential marker to monitor HNSCC recurrence

Righini C, De Frepont F, Faure C, Thibout Y, Brambilla E, Favrot M, Reyt E

University Hospital, BP 217, Grenoble, France

### Purpose of the study:

Firstly to define the incidence of gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its correlation with clinical and histological characteristics; secondly, to evaluate the correlation between methylation profile observed in tumors and paired saliva samples and the potential of methylation detection in saliva to monitor disease recurrence.

### Experimental design:

Aberrant promoter methylation of 11 tumor suppressor genes (p14, p15, p16, APC, MGMT, DAPK, ECAD, RASSF1A, FHIT, TIMP3, hMLH1) was analysed by methylation-specific PCR on 90 primary HNSCC and 60 paired saliva samples. The methylation pattern was also analyzed in non tumoral tissue for 30 patients, and saliva from 30 healthy individuals and from 10 patients of the series, followed several months after tumor resection.

### Results:

Aberrant methylation of at least one of the 11 genes studied was detected in 69 out of 90 tumors and in 47 out of 60 saliva samples. The six most frequently methylated genes in tumors (first or second tumors) and saliva were TIMP3, MGMT, p16, ECAD, DAPK, RASSF1A, with a very good correlation (96%) between tumors and paired saliva samples. In patients followed after treatment, DNA methylations detected in saliva were associated with tumor recurrence

### Conclusions:

Pattern of methylation in HNSCC and paired saliva samples can be defined by the analysis of 6 genes that are potential markers to monitor HNSCC recurrence.

Il a également été soumis pour publication à la revue « Clinical Cancer Research » sous l'intitulé « Tumor specific methylation in saliva : a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence » Righini C.A. et al.

# TUMOR SPECIFIC METHYLATION IN SALIVA: A PROMISING BIOMARKER FOR EARLY DETECTION OF HEAD AND NECK CANCER RECURRENCE

Running head: HNSCC specific methylation in saliva as relapse biomarker.

**Key words:** HNSCC, saliva, tumor suppressor gene methylation, recurrence, detection.

Christian Adrien Righini <sup>1-2-3</sup>, Florence de Fraipont <sup>1-2</sup>, Jean-François Timsit <sup>1</sup>, Claire Faure <sup>4</sup>, Elisabeth Brambilla <sup>1-4</sup>, Emile Reyt <sup>3</sup>, Marie-Christine Favrot <sup>1-2\*</sup>.

1- INSERM/Université Joseph Fourier U 578, Institut A. Bonniot, 38700 La Tronche, France.

2- Centre d'Innovation en Biologie, 3- Service d'ORL et de Chirurgie cervico-faciale, 4- Département d'anatomopathologie et de pathologie de la cellule : Centre Hospitalier Universitaire, 38043 Grenoble, France.

\* Corresponding author: Marie-Christine Favrot.

Centre d'Innovation en Biologie, Pavillon B, centre Hospitalo-Universitaire, 38043 Grenoble cedex 09, France.

Phone: +33-4/76/76/54/84. Fax: +33-4/76/76/56/64. E-mail: [MCFavrot@chu-grenoble.fr](mailto:MCFavrot@chu-grenoble.fr)

**Reprint requests can be sent to:**

*Marie-Christine Favrot.*

*Centre d'Innovation en Biologie, Pavillon B, centre Hospitalo-Universitaire, 38043 Grenoble cedex 09, France.*

*E-mail: [MCFavrot@chu-grenoble.fr](mailto:MCFavrot@chu-grenoble.fr)*

**Research support:** this work was supported by the Clinical Research Direction of Grenoble University Hospital.

**Authors' disclosures of potential conflicts of interest:** the authors indicated no potential conflicts of interest.

## **Abstract**

**Purpose:** Our goal was to define tumor and saliva genes methylation profil of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and to evaluate its prognostic significance and its biomarker potential for early detection of relapse.

**Experimental design:** We prospectively analyzed 11 genes by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) on primary tumors, histologically normal adjacent mucosa, and saliva from 90 French patients at diagnosis and during follow-up as well as on 30 saliva specimens from control matched patients with non malignant HN pathology. Five additional genes were analysed on 50 tumors of the series.

**Results:** Methylation of TIMP3, ECAD, P16, MGMT, DAPK, and RASSF1 were the most frequently observed, in tumors and paired saliva samples analyzed at diagnosis, with an excellent agreement between both samples. At least one of these 6 genes was methylated in more than 75% of the samples without additional positive samples when other genes were analyzed. Methylation profile was similar in newly and second primary cancers. Aberrant methylation was not associated with a worse prognosis. Ninety per cent of normal adjacent mucosa and all control saliva samples were negative. Twenty two patients were followed after treatment; abnormal methylation was detectable in 5 patients saliva, few months before clinical and FDG-PET signs of relapse, allowing curable surgery. Saliva samples were negative for the 17 other patients; 16 were in remission and only 1 relapsed.

**Conclusion:** Gene methylation in saliva is a promising biomarker for HNSCC patients follow up and early detection of still curable relapses.

## **Introduction**

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) affects each year approximately 780 000 new patients worldwide and over 15 000 patients in France (1, 2). Despite advances in therapy, its prognosis has not improved markedly over the past 20 years (3), essentially because of late diagnosis and frequent locoregional recurrences, without successful salvage therapy if the tumor is large. Early diagnosis of HNSCC might improve its prognosis, but is hindered in patients who often delay seeking medical attention for a variety of reasons linked to tobacco and alcohol intake. Early detection of recurrence is also vital, and effective surveillance is usually easier in patients who have already been managed adequately. HNSCC detection is currently based on expert clinical examination of the Upper Aero Digestive Tract (UADT) and histological analysis of suspicious areas but it may be undetectable in hidden sites, such as crypts of the tongue base or tonsils (4).

*De novo* methylation of CpG island within suppressor gene promoters is a well-characterized epigenetic abnormality in cancer that causes gene inactivation (5, 6). Several genes are known to be frequently methylated in HNSCCs (7, 8); they are involved in cell cycle control (p14, p15, p16), DNA damage repair (MGMT, hMLH1, ATM), apoptosis (DAPK, RASSF1A, RAR ), and tumor cell invasion (ECAD, DCC). Some others genes i.e. APC, FHIT, and TIMP3 have rarely or never been analyzed in HNSCC but are frequently methylated in non small cell lung cancer, a tumor also linked to tobacco smoking (7, 9-12).

Gene methylation is detectable in a very few malignant cells collected in body cavity fluids at direct contact with the tumor (12, 13); therefore, saliva analysis holds great promise for early detection of primary HNSCC cancer and local recurrence (14). However, gene methylation analysis might be impaired, firstly because no single epigenetic signature accounting for all HNSCCs have been identified, secondly because gene methylation might be, as other molecular abnormalities, observed at all stages of the transformation, years before clinical manifestations of HNSCC (7, 9), leading to false positive results in saliva from subjects exposed to risk factors.

The purpose of this study was firstly to define a genes methylation profil in HNSCC tumors and saliva analysed at diagnosis and during patients follow up; secondly to evaluate its prognosis significance as well as its value as biomarker for early detection of recurrence.

## **Materials and methods**

### *Study design*

Between 2003 and 2005, 120 patients of less than 75 years-old with a primary non metastatic HNSCC of the oral cavity, pharynx, and larynx were included, after they gave informed consent, in a monocentric prospective study; this study was designed as recommended by Mc Shane (15), and approved by Grenoble University Hospital Ethical Committee. Thirty patients were excluded because the tumors contained less than 70% malignant cells (figure 1).

Diagnostic staging included tobacco-alcohol addiction and demographic characteristics recording, physical examination by a head and neck surgeon (HNS), endoscopy of the UADT, cervico-thoracic CT-scan, and liver ultrasound. Tumor staging and histology were defined according to the UICC and WHO-1991 classifications (16, 17). Patients were treated by surgery and/or radiotherapy and followed with regular physical examinations, saliva samples, and FDG-PET (2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F] fluoro-D-glucose detected by positron emission tomography).

### *Sample collection*

Tumor samples and histologically normal adjacent mucosa were obtained during surgery (n= 53) or by biopsy during initial endoscopy (n= 37), frozen in liquid nitrogen, and stored at – 80°C. DNA was extracted from 10 µm sections that contained more than 70% infiltration by SCC as quantified by 2 pathologists, on the first Giemsa stained section.

Paired saliva samples were collected just before surgery or biopsy and during post-treatment staging, after 3 minutes of swishing and gargling with a 25 ml sterile NaCl solution at 0.9%. Samples were treated in Hank's solution with 1% DTT, centrifuged and cell pellets were frozen at – 80°C before analysis. Saliva was also collected from 30 control patients (20 males), received in the Head and Neck Department, after a HNS had confirmed the absence of clinically detectable mucosal or malignant lesion.

### *DNA extraction*

Genomic DNA, from tumor and exfoliated cells in saliva, was digested with proteinase-K and extracted with QIAmp tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations.

### *Methylation-Specific PCR (MSP)*

Methylation analysis was performed on tumors, normal adjacent mucosa, and saliva after bisulfite DNA conversion with CpGenome DNA modification kit (Qbiogene); DNA was

amplified with Fast Start DNA polymerase (Roche) using specific primers for the methylated or unmethylated sequences of the genes (table 1) (18). MyoD amplification, with primers selected in an unmethylated region, served as DNA quantity control after bisulfite treatment. DNA from peripheral blood lymphocytes, treated or not with Sss1 methyltransferase (New England Biolabs) was used as a positive and negative control. PCR products were analyzed by 3% agarose gel electrophoresis. The MSP allows detecting reproducibly 0.01% to 1 % of methylated DNA in samples (12).

### ***Statistical analyses.***

Associations between gene promoter hypermethylation and tumor and patients' characteristics were analyzed through the use of the Mann Withney or Fisher exact test as appropriate.

Kappa coefficients between saliva and tumor samples were calculated.

Variables associated with relapse or death were tested using Kaplan-Meier estimates and compared using a logrank test. A multivariate Cox's model was used to determine independent predictors of relapse or death, and in particular to test the association between gene promoter hypermethylation and prognosis. We used a two-sided test and a p value of less than 0.05 denoting statistical significance. SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Medcalc 8.8.1.0 (Medcalc, Ghent, Belgium) softwares were used.

### ***Results***

#### ***Prevalence of aberrant methylation in tumors and in histological normal adjacent mucosa***

Ninety HNSCC patients were included (median age: 57 years; range: 33-74). With the exception of 5 patients who had no tobacco and/or alcohol addiction, in the other ones, average tobacco and alcohol consumption was of 40 pack-years (range: 20-80) and 120g/24h (range: 50-160). Methylation of eleven genes were analysed and percentage of methylation for each specific gene is shown on table 2. Sixty nine patients had newly diagnosed primary tumors and 22 ones had a second primary HNSCC, the first tumor being treated with surgery and radiotherapy; the profiles of methylation were similar in the 2 cohorts and in the remainder of the study, analysis was done on the whole series of patients. Overall, 69 (77%) of the tumors were positive, ie: they had at least one methylated gene. The six most frequently methylated genes were TIMP3 (46%), ECAD (36%), MGMT (29%), p16 (29%), DAPK (27%), RASSF1A (20%); furthermore, in positive tumors, one of these 6 genes was always positive and analysis of the 5 other genes ie: p14, p15, FHIT, hMLH1, APC did not increase the number of positive tumors.

Specificity of those 6 genes methylation for the tumoral process was evaluated by the analysis of 30 histologically normal mucosa samples, harvested over 3 cm away from the tumor. Methylation of the 6 genes was significantly different between tumors and normal mucosa ( $p < 0.001$ ); indeed only 3 mucosa samples, taken in patients with the most advanced tumors, were methylated with TIMP3 positivity in 2 mucosa and DAPK in one.

In attempt to increase the percentage of positive tumor samples, 5 other genes were analysed but the analysis was stopped. Indeed ATM, CASP8 and THSP1 genes were not methylated on the fifty first tumors analysed; methylation of DCC was observed in 24% of the tumors but was always associated with methylation of one of the 6 genes described above. Finally, methylation of RAR $\beta$  was positive on 56% tumor samples but the abnormality was also observed on 20% normal mucosa and on control saliva samples as shown below.

#### ***Correlation between aberrant methylation, patients' characteristics and prognosis.***

Patients' characteristics (age, sex, tumor location, stage of the disease, histological grade and classification) according to the presence or absence of a gene methylation in the tumor are shown on table 3; the presence of gene methylation was more frequent in high clinical T and N stages. The median follow-up was of 564 days and the risk of relapse or death (Kaplan-Meier estimate) was of 73 %  $\pm$  5 % at 1 year and 52  $\pm$  6% after 2 years. As expected, known risk factors of relapse or death were present on the multivariate Cox's model (i.e. clinical stage : I or II vs III or IV, histologic grade : 1 vs 2 and 3, previous history of HNSCC) (data not shown), but the presence or absence of gene methylation in the tumor was not associated with a worse prognosis ( $p=0.6$ , Logrank test); the absence of correlation between methylation status and prognosis was confirmed when the final model was forced (Hazard ratio: 0.5922, 95% CI [1.26- 0.54],  $p=0.28$ ).

The comparison between each of the six most frequently methylated genes defined above, and patients characteristics only revealed that RASSF1A methylation was more frequent in poorly differentiated tumors ( $p=0.019$ ) and in those with lymph node metastases ( $p=0.048$ ).

#### ***Prevalence of aberrant methylation in saliva collected at diagnosis in HNSCC patients and in control patients***

Saliva samples, obtained in 60 patients, were analyzed and the concordance with paired tumors was measured by the kappa coefficient (table 4). Representative examples of MSP in tumors and paired saliva are available online (figure 2). As in tumors, TIMP3, ECAD, P16,

MGMT, DAPK, and RASSF1A were the most frequently methylated genes in saliva and their analysis was sufficient to define the 47 positive samples. There was no false positive result in saliva screening i.e. aberrant methylation in saliva was always observed with aberrant methylation in the tumor; only 2 saliva samples were negative despite positivity of the paired tumors. The kappa coefficient between tumors and saliva for at least one aberrant methylation was 0.833 (95% CI 0.66-1.01).

The percentage of positive saliva samples in saliva and tumor for each specific gene is given in table 4. In 24 of the 47 positive saliva, the methylation profile (ie: positive genes) was fully identical in tumor and paired saliva. For the 23 others, when a specific gene was methylated in saliva, it was always methylated in paired tumor but some specific genes methylated in tumor were not methylated in the corresponding saliva. This is reflected by the Kappa coefficient between saliva and tumors, for each gene, that was excellent except for ECAD (11/23 false negative saliva) and TIMP3 (13/30 false negative). The kappa coefficient between tumors and saliva was excellent (kappa=1) when the tumors were located in the oral cavity and it was not different in newly diagnosed HNSCC (Kappa = 0.762, 95%CI: 0.51-1.01) and in second primary cancer (Kappa=1, no discordant pairs).

Methylation of the 11 genes was undetectable in saliva samples collected in 30 control patients (median age: 45 years, range: 31-50), although 15 had tobacco/alcohol addiction (average number of pack-years: 35, range: 20-60 and absolute alcohol absorption: 100g/24h, range: 60-130). Thus, the methylation process was specific to the head and neck malignant process. In contrast, RAR  $\beta$  gene was methylated in 7 of the 30 control salivas.

### ***Detection of gene methylation in saliva collected during patients follow-up and relapse diagnosis***

Among the 60 patients in whom saliva was analyzed at diagnosis, 11 had no detectable methylation in the tumor or in saliva and 10 others refused further investigations; 3 patients died of intercurrent disease and 14 relapsed before the first complete staging (figure 1). Therefore, 22 patients were followed after diagnosis and treatment (median: 25 months; range: 19-31) with physical examination every 8 weeks and a first complete staging at 14 months post-diagnosis (range: 8-20 months) including physical examination, saliva sampling, and FDG-PET; then, subsequent staging included physical examination and saliva sampling every 2 to 6 months. Patients median follow-up was not significantly different whether they relapsed or were disease free (data not shown).

Methylation of TIMP3, ECAD, P16, MGMT, DAPK, and RASSF1A genes was analyzed in saliva samples collected during follow-ups (table 5). Four patients (N° 1-4) had a positive saliva at first post-diagnosis staging but the FDG-PET was negative; all 4 patients relapsed within 2 to 14 months.

Eighteen patients had negative saliva at first post-diagnosis staging; sixteen (N° 7-22) were still disease-free with a negative FDG-PET at last examination (median: 22 months; range: 18-29); in the seventeen patient (N°5), saliva became positive at 21 months staging but FDG-PET was negative; he relapsed one month later. Patient N°6 was the only false negative of this cohort: saliva was negative at first staging but the FDG PET was positive; he relapsed one month later and died at 20 months of a very rapidly growing tumor.

In patients N°1 to 5, methylation detection and subsequent careful clinical follow-up allowed to diagnose relapse when the tumor was still small (diameter within 5 to 10 mm) and surgically curable; furthermore, saliva were normalized after the second surgery. In those 5 patients, methylated genes, detected in saliva before relapse, were already abnormal in samples analyzed at diagnosis.

## **Discussion**

Based on the analysis of a first set of 11 genes and then of 5 others, we have defined a 6 genes methylation panel (i.e. TIMP3, ECAD, p16, MGMT, DAPK and RASSF1A) that allows to detect aberrant methylation in more than 75% of primary HNSCC. Aberrant methylation of those 6 genes in exfoliated malignant cells of the saliva reflects tumor status, as previously suggested for other molecular abnormalities (4, 33) and is highly specific of the malignant process. Moreover, in our series, HNSCC recurrence was always associated with the persistence or reappearance of an aberrant methylation of one of these 6 genes in saliva analysed during post treatment follow up.

Methylations of ECAD, p16, MGMT, DAPK, and RASSF1A are among the most frequently reported epigenetic alterations in HNSCC (7, 14, 29, 34, 35) but TIMP3 methylation had never been described in this pathology, although it is a frequent alteration in many human tumors including non small cell lung cancers (9, 36). TIMP3 encodes for a metalloproteinase inhibitor that suppresses tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis (36, 37); it is located on chromosome arm 22q, a region where losses of heterozygosity have never been described in HNSCC although they are frequent in other chromosomal regions (38-40). Therefore, methylation might be an important mechanism to silent TIMP3 in HNSCC;

additional mechanisms, such as miRNA, might be involved and are currently investigated. Recently, methylation of several other genes has been described in HNSCC and a panel of 4 genes, including only 3 of our series i.e. ECAD, P16, and MGMT have been shown to allow methylation detection in 86.7% of HNSCC from Indian patients (41). Variability in epigenetic abnormalities between tumor series might be linked to race and/or risk factors. In our series, patients were French and Caucasians with a great proportion of oropharynx and hypopharynx localizations in relation to tobacco/alcohol consumption (2) and were representative of the cohorts of HNSCC patients treated in France.

Methylation of these 6 genes was never observed in saliva from patients with non malignant head and neck disease, including those with alcohol and/or tobacco consumption, and in only 10% of histologically normal mucosa samples taken in the vicinity of the largest tumors; a results suggesting that methylation of these 6 genes is a late event during transformation of the oral mucosa in HNSCC.

In our series, we have observed only one correlation between HNSCC characteristics and methylation status of a specific gene ie: RASSF1 methylation was more frequent in poorly differentiated tumors or in those with lymph node metastasis. Although several publications (14, 30, 42) suggested that methylation of a specific gene or a combination of genes might correlate to tumor characteristics and/or prognosis, patients cohorts were usually small; therefore, there is not yet consensus on an emerging methylation genes panel that may facilitate prognostic profiling of tumors, in particular for HNSCC. Moreover, we did not observed any correlation between the presence of genes methylation in the tumors (or saliva: data not shown) and prognosis. It was very convincingly shown that the number of methylated genes in individual samples correlated to survival in T cell acute leukaemia (43) but it was only suggested in a small retrospective study of 51 HNSCC (44).

Several studies have suggested the potential diagnosis value of new salivary biomarkers that distinguished between saliva from normal and HNSCC patients, such as salivary transcriptome, mutation of p53 and microsatellite analysis (4, 33, 45). None of those markers have yet been evaluated for early detection of primary or relapsing HNSCC. In this prospective study, we have shown that methylation analysis of a panel of 6 genes in saliva of HNSCC patients followed after initial treatment, allowed to detect abnormality few months before clinical relapse; then, careful follow-up of patients with positive saliva allowed diagnosing tumors when they were still very small and thereby surgically curable. Based on our results, we cannot concluded whether or not this aberrant methylation had persisted since diagnosis or had reappeared after treatment; normalisation of the saliva after the second

surgery in patients who had relapsed, suggested that the second hypothesis is frequent. This point will be investigated because if some patients have persistent abnormalities in the saliva, just after treatment, they could be followed more carefully or treated more aggressively. The only false negative analysis of our series was observed in a very rapidly growing tumor that has led to death in 3 months and there was no false positive. Methylation detection in saliva better predicted relapse than FDG-TEP, a technique used to assess HNSCC response to therapy and relapse (46). Furthermore, methylation profiles of second primary and newly diagnosed tumors were similar, a result that reinforces its potential usefulness in post-treatment surveillance. The 14 months time point for first saliva collection after treatment was chosen firstly because, in our clinical practice, all patients have a first staging between 12 and 15 months; secondly because the full treatment requires 5 months and a wait and watch period allows to observe patients who progress within the few months following treatment. Methylation-specific PCR had sufficient sensitivity and specificity to detect HNSCC exfoliated cells in saliva, few months before clinical relapse. Quantitative real time PCR, as used in some studies (47), might improve the level of detection but it remains to be proved that it will not increase false positives. Therefore we will continue the study to confirm the results with the same design.

In conclusion, we have defined, in a French cohort of HNSCC patients, a minimal gene methylation panel that is specific of the tumoral process and sensitive enough to detect malignant exfoliated cells in saliva, few months before clinical diagnosis of relapse; those results open new perspectives in HNSCC management. Another application would certainly be early detection of HNSCC in high-risk subjects with tobacco and alcohol consumption, with some limitations due to the poor compliance of this population.

### **Acknowledgements**

We thank N. Martel, V. Konik-Mathevet, M. Samuel, O. Vermulen, S. Veyrenc for technical assistance.

The authors gratefully acknowledge Alexandre Karkas for manuscript reading.

### **References**

1. Lemaire F, Million R, Young J, et al. Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer* 2003;89:1940-9.

2. Marandas P, Marandas N. Situation actuelle des cancers des voies aéro-digestives supérieures en France et données épidémiologiques. In: Masson, editors. *Cancers des voies aéro-digestives supérieures. Données actuelles*. Paris; 2004. p. 3-20.
3. Forastiere A, Koch W, Trotti A, et al. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345:1890-900.
4. Spafford M, Koch WM, Reed AL, et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 2001;7:607-12.
5. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;49:2042-54
6. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature* 2002;3:415-28.
7. Fan CY. Epigenetic alterations in head and neck cancer: prevalence, clinical significance, and implications. *Curr Oncol Rep* 2004;6:152-61.
8. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35:101-8.
9. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-29.
10. Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, et al. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002;21:5450-61.
11. Kim H, Kwon YM, Kim JS, et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:2363-70.
12. de Fraipont F, Moro-Sibilot D, Michelland S, et al. Promoter methylation of genes in bronchial lavages: a marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005;50:199-209.

13. Hu YC, Sidransky D, Ahrent SA. Molecular detection approaches for smoking associated tumors. *Oncogene* 2002;21:7289-97.
14. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-methyltransferase, and Death-Associated Protein Kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:939-42.
15. Mc Shane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 2005;23:9067-72.
16. Lefebvre JL, Lartigau E, Kara A, et al. TNM classification oral cavity, oropharynx and larynx. In : Gospodarowicz MK, Hensen DE, Hutter RVP, Sullivan BO, Sobin LH, and Wittekind C, editors. *Prognostic factors in cancer*. New York: Wiley-Liss; 2001. p.159-61.
17. Shanmugaratnam K, Sobin LH. Adenosquamous carcinoma. In *Histological typing of tumours of the upper respiratory tract and ear*. World Health Organization, International Histological Classification of Tumours, editors. Berlin: Springer-Verlag; 1991. p 38.
18. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-26.
19. Kawakami K, Brabender J, Lord RV, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1805-11.
20. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-55.

21. Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugan G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-Cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003;105:41-46.
22. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, et al. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-9.
23. Wong IH, Chan J, Wong J, Tam PK. Ubiquitous aberrant RASSF1A promoter methylation in childhood neoplasia. *Clin Cancer Res* 2004;10:994-1002.
24. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra, et al. A 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:3581-5.
25. Liu K, Zuo C, Luo QK, et al. Promoter hypermethylation and inactivation of hMLH1, a DNA mismatch repair gene, in head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2003;12:50-6.
26. Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:371-5.
27. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3410-8.
28. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996;10:940-54.
29. Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3164-71.

30. Ai L, Vo QN, Zuo C, et al. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:150-6.
31. Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP. Methylation and silencing of the thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 1999;18:3284-89.
32. Wong TS, Tang KC, Kwong DLW, et al. Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol* 2003;22:869-74.
33. Boyle JO, Mao L, Brenman JA, et al. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 1994;168:429-32.
34. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter methylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:892-95.
35. Hasegawa M, Nelson NH, Peters E, et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002;21:4231-36.
36. Bachman KE, Herrman JG, Corn PG, et al. Methylation-associated silencing of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999;59:798-802.
37. Qi JH, Ebrahim Q, Moore N, et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nature Med* 2003;4:407-15.
38. Califano J, Westra WH, Meininger G, et al. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000;6:347-52.
39. Jang SJ, Chiba I, Hirai A, et al. Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related? *Oncogene* 2001;20:2235-42.

40. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, et al. The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *Br J Cancer* 1999;79:1821-27.
41. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004;40:145-53.
42. Zuo C, Ai L, Ratliff P, et al. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:967-75.
43. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:7043-9.
44. Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* 2005;26:12-7.
45. Li Y, St John MAR, Zhou X, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004;10:8442-50.
46. Lapela M, Eigtved A, Jyrkkiö, et al. Experience in qualitative and quantitative FDG PET in follow-up of patients with suspected recurrence from head and neck cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:858-67.
47. Smiraglia DJ, Smith LT, Lang JC, et al. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Med Genet* 2003;40:25-33.

**Table 1:** Primers for MSP.

Gene		Primer sense (5'-3')	Primer antisense (5'-3')	Hybridation Temperature	Product size (bp)	References
MyoD*		TGATTAATTTAGATTGGGTTTAGAGAAGGA	CCAACTCCAAATCCCCTCTCTAT	60°C	152	(19)
p14 ARF	M	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	AAAACCCCTCACTCGCGACGA	60° C	122	(20)
p14	U	TTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT	CACAAAAACCCCTCACTACAACAA	60° C	132	
p15 INK4b	M	GCGTTCGTATTTTTCGGTT	CGTACAATAACCGAACGACCGA	60° C	148	(21)
p15	U	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	CCATACAATAACCAAACAACCAA	60° C	154	
p16 INK4a	M**	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65°C	151	(18)
p16	U *	GGTTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CCCAACCCCAAACCACAACCATAA	60°C	151	
DAPK	M *	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	60°C	98	(22)
DAPK	U *	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	60°C	106	
RASSF1A	M	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	AACCCCGCGAACTAAAAACGA	60° C	93	(23)
RASSF1A	U	TTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	CAAACCCCAAACTAAAAACAA	60° C	105	
FHIT	M	TTGGGGCGCGGGTTTGGGTTTTTACGC	CGTAAACGACGCCGACCCACTA	64°C	74	
FHIT	U	TTGGGGTGTGGGTTTGGGTTTTATG	CATAACAACACCAACCCACTA	64°C	74	(24)
MGMT	M	TTTCGAACGTTTCGTAGGTTTTCGC	GCACTCTCCGAAAACGAAACG	55°C	81	(22)
MGMT	U	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGTTTTTGT	AACTCCACTCTTCCAAAAACAAAACA	55°C	93	
hMLH1	M	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCCG	CCTCATCGTAACTACCCGCG	63° C	114	(25)
hMLH1	U	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	60° C	120	
ECAD	M	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	60° C	173	(21)
ECAD	U *	TAATTTTAGGTTAGAGGGTATTG	CACAACCAATCAACAACACA	56° C	173	
APC	M	GAACCAAAACGCTCCCAT	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATAT	65°C	74	(26)
APC	U	AAACCAAAACACTCCCATTC	AGTTATATGTTGGTTATGTGTGTTTAT	60°C	76	
TIMP3	M	GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	CTCTCCAAAATTACCGTACGCG	59° C	116	(27)
TIMP3	U *	TGTGTTGGAGGTTAAGGTTGTTTT	ACTCTCCAAAATTACCATAACACACC	59° C	122	
RAR β	M	TCGAGACGCGAGCGATTTCG	GACCAATCCAACCGAAACGA	59°C	146	(28)
RAR β	U	TTGAGAATGTGAGTGATTGA	AACCAATCCAACCAAAACAA	59°C	146	
DCC	M	CGTGTTCGCGATTTTGGTTTC	ACCGATTACTTAAAAATACGCG	60	145	(29)
DCC	U	GTTGTGTTGTTGTGATTTTGGTTTT	CCACTTACCAATTACTTAAAAATACACA	60	134	
ATM	M	GGAGTTCGAGTCGAAGGGC	CTACCTACTCCCGCTCCGA	59°C	239	(30)
ATM	U	GTTTGGAGTTTGAAGGGT	AACTACCTACTCCCACTTCCAA	56°C	246	
THS1	M	TGCGAGCGTTTTTTAAATGC	TAAACTCGCAAACCAACTCG	58	74	(31)
THS1	U	GTTTGGTTGTTGTTATTGGTTG	CCTAAACTCACAACCAACTCA	60	145	
CASP8	M	TAGGGGATTCGGAGATTGCGA	CGTATATCTACATTGAAACGA	58°C	322	(32)
CASP8	U	TAGGGGATTTGGAGATTGTGA	CCATATATATCTACATTCAAACAA	50°C	321	

U : unmethylated ; M : methylated ; \* : DMSO requirement. MyoD\* : myogenic differentiation ; MyoD amplification, with primers selected in an unmethylated region, served as DNA quantity control after bisulfite treatment.

DAPK: death-associated protein kinase 1; RASSF1A : Rass association domain family 1A; FHIT : fragile histidine triad; MGMT: O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase;

hMLH1 : the human homologue of bacterial MutL; ECAD: E-cadherin; APC : adenomatosis polyposis coli; TIMP3 : tissue inhibitor metalloproteinase-3.

**Table 2 :**

Variables		Number of patients (%)	No methylation (%)	Hypermethylation (%)	p Value
Patients	Total	<b>90 (100)</b>	<b>21 (23)</b>	<b>69 (77)</b>	-
	Age	<b>57±12</b>	<b>57,5 ±13</b>	<b>57 ±10</b>	<b>0.8</b>
	Males	<b>77</b>	<b>18 (88)</b>	<b>59 (75)</b>	<b>0.7</b>
	Females	<b>13</b>	<b>3 (12)</b>	<b>10 (25)</b>	
Addictions					
	Tobacco use <sup>a</sup> (current or former)	<b>84</b>	<b>20 (95)</b>	<b>64 (90)</b>	<b>1</b>
	Alcohol use <sup>a</sup> (current or former)	<b>64</b>	<b>13 (75)</b>	<b>51 (68)</b>	<b>0.28</b>
Second primary cancer *		<b>22 (31)</b>	<b>8 (38)</b>	<b>14 (20.6)</b>	<b>0.14</b>
Tumor location					
	Oral cavity	<b>25</b>	<b>4 (19)</b>	<b>21 (30)</b>	<b>0.3</b>
	Oropharynx	<b>32</b>	<b>9 (43)</b>	<b>23 (34)</b>	
	Hypopharynx	<b>17</b>	<b>6 (27.5)</b>	<b>11 (16)</b>	
	Larynx	<b>16</b>	<b>2 (8.5)</b>	<b>14 (20)</b>	
T stage <sup>b</sup>					
	1	<b>8</b>	<b>3 (14.3)</b>	<b>5 (7.2)</b>	<b>0.06 <sup>f</sup></b>
	2	<b>32</b>	<b>8 (38.1)</b>	<b>24 (34.8)</b>	
	3	<b>22</b>	<b>8 (38.1)</b>	<b>14 (20.3)</b>	
	4	<b>28</b>	<b>2 (9.5)</b>	<b>26 (37.7)</b>	
N stage <sup>b</sup>					
	N0	<b>58</b>	<b>18 (86)</b>	<b>40 (58)</b>	<b>0.02</b>
	> N0	<b>32</b>	<b>3 (14)</b>	<b>29 (42)</b>	
Clinical stage <sup>c</sup>					
	I	<b>7</b>	<b>3 (14.3)</b>	<b>4 (5.8)</b>	<b>0.03 <sup>f</sup></b>
	II	<b>22</b>	<b>6 (28.6)</b>	<b>16 (23.2)</b>	
	III	<b>21</b>	<b>8 (38.1)</b>	<b>13 (18.8)</b>	
	IV	<b>40</b>	<b>4 (19)</b>	<b>36 (52.2)</b>	
Histologic grade <sup>d</sup>					
	1	<b>61</b>	<b>14 (66.7)</b>	<b>47 (68.1)</b>	<b>0.94 <sup>f</sup></b>
	2	<b>16</b>	<b>4 (19)</b>	<b>12 (17.4)</b>	
	3	<b>13</b>	<b>3 (14.3)</b>	<b>10 (14.5)</b>	
Histological classification <sup>e</sup>					
	Verrucous carcinoma	<b>85</b>	<b>19 (90)</b>	<b>66 (86)</b>	<b>0.7</b>
	Basaloid SCC	<b>5</b>	<b>2 (10)</b>	<b>3 (14)</b>	

a : Current smokers (n=71) former smokers (n=13) ; alcohol current use (n=59) alcohol former use (n=4); \*: patients received radiotherapy before samples; b : Tumor and lymph node stages were determined by clinical and radiological examination; c : Clinical stage was determined by combining T and N stage, T = tumor, N= lymph node; d : UICC classification, 1 = well differentiated, 2 = moderately differentiated, 3 = poorly differentiated; e : According to the WHO classification (17); f: Cochran – Armitage trend test. Results for methylation are presented as mean  $\pm$  SD for quantitative variables and as n (%) for qualitative ones.

**Table 3 :** Methylation profile in the general population and the two subgroups of newly and second primary HNSCC.

	positive samples *	% of methylated samples										
		TIMP3	ECAD	MGMT	p16	DAPK	RASSF1A	p15	p14	APC	FHIT	hMLH1
General population (n = 90)	69 (77%) **	46	36	29	29	27	20	18	11	11	10	2
newly primary cancers (n = 68)	54 (79%) **	47	38	31	29	29	20	19	12	12	10	1.5
second primary cancers (n = 22)	15 (64%) **	41	27	23	27	18	18	14	9	9	9	4

\* positive samples contained at least one methylated gene ; \*\* the median number of methylated genes per sample was  $2\pm 1.6$  in the global population, of  $2.7\pm 1.9$  in newly diagnosed cancers and  $1.5\pm 1.8$  in second primary cancers.

**Table 4:** Gene promoter hypermethylation in 60 tumors and paired saliva samples at diagnosis.

	Number of positive samples (%)		Kappa coefficient <sup>a</sup>
	tumor	saliva	
At least one methylated gene	49 (82%)	47 (78%)	0.833 (0.66-1.01)
TIMP3	30 (50%)	17 (28%)	0.56 (0.38-0.75)
ECAD	23 (38%)	12 (20%)	0.57 (0.37-0.78)
p16	20 (33%)	16 (27%)	0.8 (0.64-0.96)
MGMT	16 (27%)	13 (22%)	0.86 (0.73-1.01)
DAPK	14 (23%)	9 (15%)	0.7 (0.49-0.92)
RASSF1A	14 (23%)	10 (17%)	0.8 (0.62-0.98)
p15	10 (17%)	7 (12%)	0.79 (0.57-1.01)
p14	6 (10%)	2 ( 3%)	0.47 (0.05-0.89)
APC	6 (10%)	4 ( 7%)	0.78 (0.49-1.07)
FHIT	5 ( 8%)	2 ( 3%)	0.47 (0.05-0.84)
hMLH1	1 ( 1.5%)	0 ( 0%)	--

Kappa coefficient indicates the overall agreement between aberrant methylation from tumors and saliva.

**Table 5:** Detection of gene methylation in saliva collected during follow-up of patients who have relapsed

Patients (n°)	Methylation status at diagnosis		Méthylation status during follow-up (months post-diagnosis)	Relapse (months post-diagnosis)
	Tumor	Saliva		
1	TIMP3, ECAD, MGMT, p16	TIMP3, ECAD, MGMT, p16	MGMT, p16 (14 months)	Yes (16 months)
2	RASSF1A, TIMP3, DAPK	RASSF1A	RASSF1A (16 months)	Yes (30 months)
3	RASSF1A, p16	RASSF1A, p16	p16 (10 months)	Yes (17 months)
4	p16, MGMT, RASSF1A	p16, MGMT	MGMT (20)	Yes (28 months)
5	p16	p16	no methylation (14 months) no methylation (17 months) p16 (21 months)	Yes (22 months)
6	RASSF1A, MGMT	RASSF1A	no methylation (16 months)	Yes (17 months) Death (20months)
7 -22	positive	positive	no methylation	No

## Figures

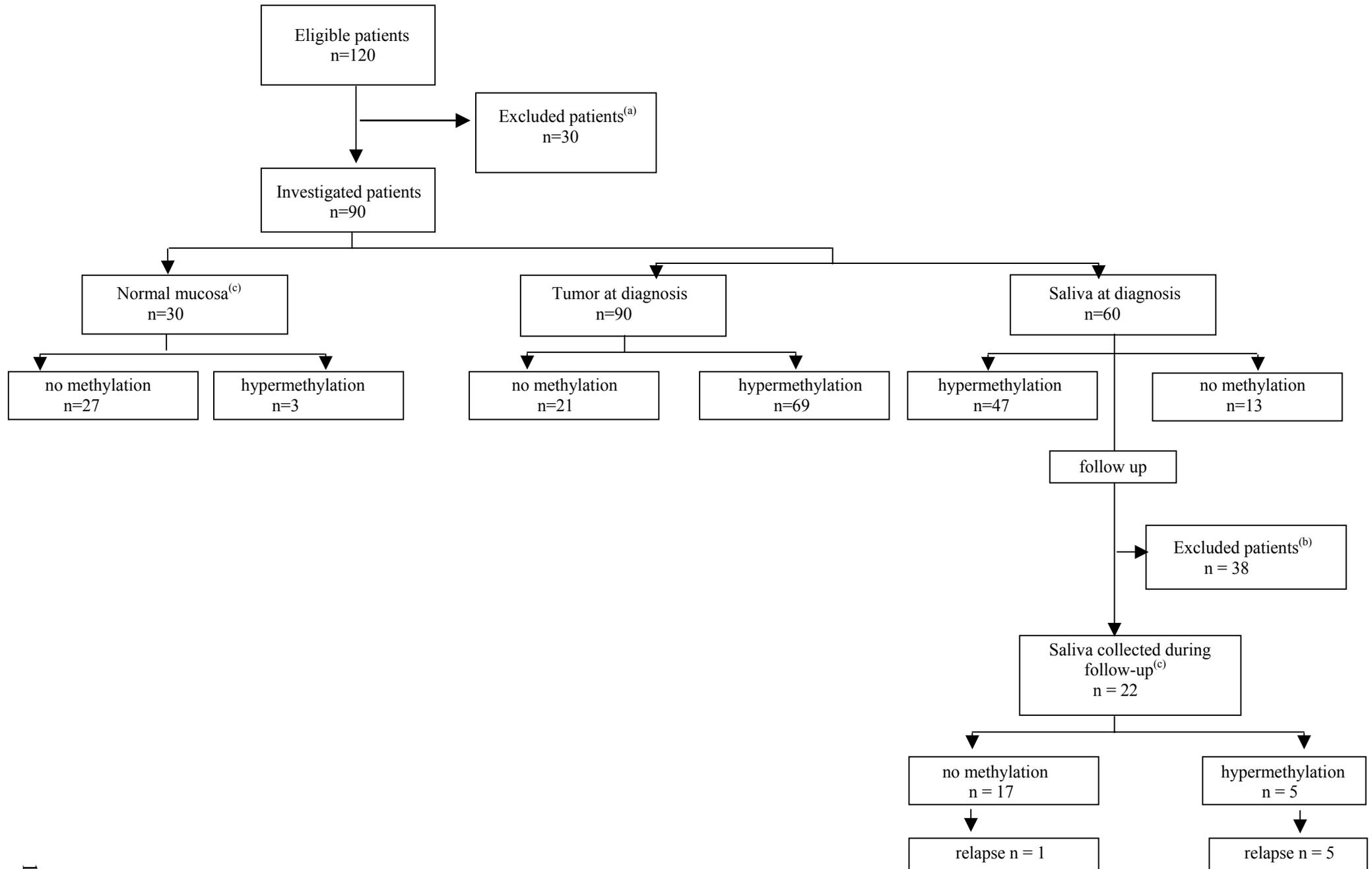
**Figure 1: Flow chart illustrating the progress of subjects through the prospective study.**

(a) patients were excluded because their tumor contained less than 70% malignant cells; (b) patients were excluded because they refused further investigation, died of intercurrent disease, relapsed during the first year after treatment, or because there was no methylation in the tumor at diagnosis; (c) only the 6-gene methylation panel was analyzed.

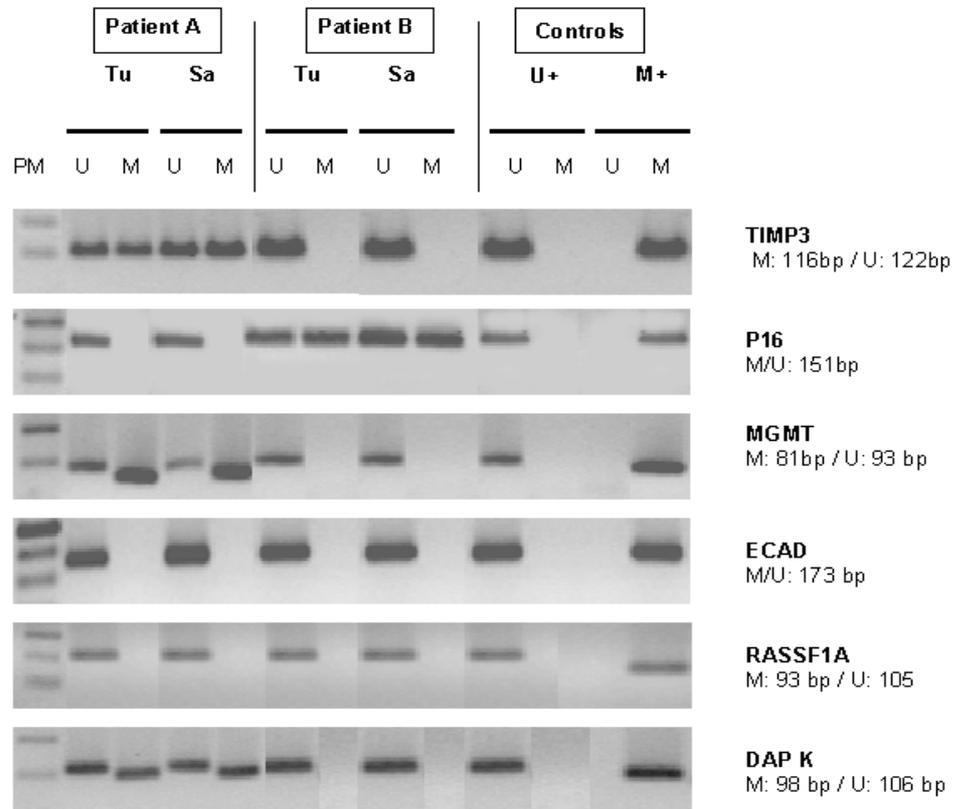
**Figure 2 : Gene promoter hypermethylation in tumors and saliva from patients with a HNSCC.**

Representative examples of MSP in tumors (Tu) and saliva (Sa) for 6 genes; U and M correspond respectively to the unmethylated and methylated reactions. Also shown: positive methylated (M+) and unmethylated (U+) controls (DNA from peripheral blood lymphocytes), molecular weight (PM) on left, size of each PCR product (on right).

Figure 1



**Figure 2**

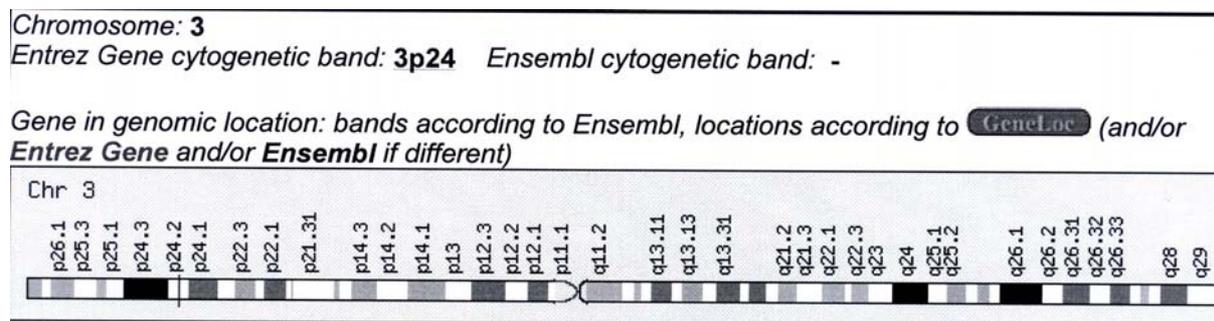


- Etude du gène Rar $\beta$

Le gène Rar $\beta$  (retinoic acid receptor  $\beta$ ) est situé au niveau du bras court du chromosome N°3) (Figure N° 41).

Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le phénomène d'apoptose. Contrairement au cancer du poumon non à petite cellule, il existe peu d'études ayant analysé la méthylation du promoteur de ce gène dans les cancers des VADS.

Figure N°41 : Cartographie du chromosome N°3. La localisation du gène Rar $\beta$  est matérialisée par un trait vertical en 3p24.2. (cartographie des chromosomes de l'Institut Weizmann).



GeneLoc gene densities for chromosome 3

GeneLoc location for GC03P025444: (about GC identifiers)

Start: **25,444,758** bp from pter

End: **25,614,424** bp from pter

Size: **169,666** bases

Orientation: **plus** strand

RefSeq genomic assemblies:

NC\_000003.9 NT\_022517.17 NT\_086636.1

Genomic View:

UCSC Golden Path with GeneCards custom track

Dans le cadre de notre travail, nous avons étudié la méthylation de ce gène au niveau tumoral (n=90), dans les tissus référents des patients ayant une tumeur des VADS (n=30), au niveau de tissus sains non exposés au tabac/alcool de patients n'ayant pas de tumeur des VADS (n=8, 4 fumeurs et 4 non fumeurs) (tissus sains, groupe témoin N°1), au niveau des salives prélevées au moment du diagnostic des patients ayant une tumeur des VADS (n= 60) et chez des patients n'ayant pas de tumeur des VADS (N = 30) (salives témoins, groupe témoin N°2).

Au niveau tumoral, Rar $\beta$  était méthylé dans 58% des cas, ce qui représente le plus fort pourcentage de méthylation parmi les gènes que nous avons étudiés.

Au niveau des tissus sains référents, nous avons retrouvé une méthylation dans 50% des cas, sans qu'il y ai une différence statistiquement significative entre le pourcentage de méthylation au niveau tumoral et au niveau des tissus référents et ce, indépendamment de la localisation tumorale initiale (tableau N°14).

Dans 7 cas (23%), une méthylation était retrouvée au niveau du tissu référent, alors qu'elle n'était pas présente au niveau tumoral.

Tableau N°14 : Méthylation du gène Rar $\beta$  au niveau tumoral et au niveau du tissu référent correspondant. CB : cavité buccale ; OROP : oropharynx ; L : larynx ; HYPO : hypopharynx ; + : méthylation présente ; - : méthylation absente.

Patient	localisation	TNM	Identification des blocs histologiques	tumeurs	Tissus référents
1	CB	T2 N0 M0	3659	+	+
2	OROP	T1 N0 M0	981	+	+
3	CB	T2 N0 M0	780	+	+
4	CB	T4 N2c M0	1400	+	-
5	OROP	T3 N1 M0	1230	-	+
6	CB	T4 N2c M0	3629	-	+
7	CB	T2 N0 M0	1645	-	-
8	CB	T3 N0 M0	1352	+	-
9	CB	T2 N2B M0	4313	-	+
10	OROP	T4 N2B M0	3652	+	-
11	OROP	T1 N0 M0	9	+	+
12	CB	T2 N0 M0	3850	-	+
13	OROP	T2 N0 M0	3391	+	+
14	L	T3 N0 M0	1375	+	+
15	HYPO	T4 N2C M0	1616	-	-
16	CB	T3 N2C M0	3633	-	+
17	CB	T2 N0 M0	1709	-	+
18	CB	T2 N0 M0	906	+	-
19	HYPO	T4 N0 M0	2344	-	-
20	HYPO	T1 N0 M0	2882	-	-
21	CB	T3 N0 M0	3001	+	-
22	HYPO	T2 N0 M0	705	-	-
23	CB	T4 N2B M0	360	-	+
24	L	T4 N1M0	2029	+	-
25	CB	T4 N0 M0	225	+	+
26	HYPO	T3 N0 M0	2962	+	-
27	L	T4 N0 M0	84	+	-
28	CB	T3 N2C M0	2620	+	-
29	OROP	T2 N0 M0	288	+	-
30	L	T3 N1 M0	1896	+	+

Parmi les 8 tissus sains que nous avons analysés, Rar $\beta$  était méthylé dans un cas (12.5%). Il s'agissait d'un patient fumeur.

Une méthylation de Rar $\beta$  a été retrouvée dans 50 salives (83%) prélevées au moment du diagnostic chez les patients porteurs d'une tumeur des VADS.

Par ailleurs, dans 11 cas, une méthylation était retrouvée dans la salive, alors que celle-ci n'existait pas dans la tumeur correspondante, soit un taux de faux positifs de 18%.

Enfin une méthylation a été retrouvée dans 19 (63%) salive témoins, avec un pourcentage significativement plus élevé parmi les patients fumeurs (68% versus 32%,  $p=0.02$  test exact de Fisher).

Il ressort de nos résultats que :

- 1) la méthylation du gène Rar $\beta$  n'est pas spécifique du tissu tumoral contrairement aux autres gènes que nous avons analysés ;
- 2) l'étude de la méthylation de ce gène dans la salive n'est pas un biomarqueur fiable, puisque nous avons retrouvé 18% de faux positifs ;
- 3) il semble qu'il y ait une corrélation entre méthylation du gène Rar $\beta$  et l'intoxication tabagique.

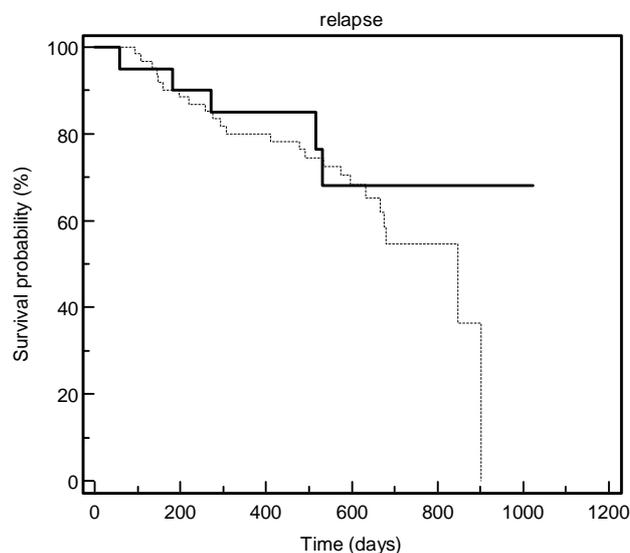
- Valeur pronostique des méthylations au niveau tumoral

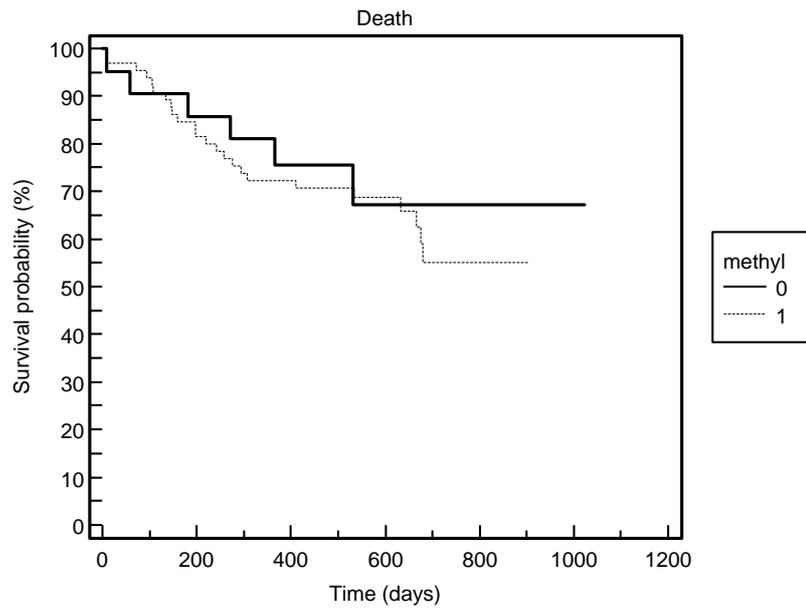
La médiane de suivi calculée à partir de la cohorte des 90 patients qui nous a permis de définir un méthylotype était de 564 jours.

le risque de rechute locale ou de décès était de  $73\% \pm 5\%$  à un an et  $52\% \pm 6\%$  à 2 ans.

La présence d'au moins un gène méthylé au niveau tumoral n'était pas corrélée un risque de rechute locale et / ou un mauvais pronostic en analyse uni ou multivariée (modèle de Cox,  $p = 0.6$ , Logrank test) (Figure N°42).

Figure N° 42 : Probabilité de rechute locale et de décès en fonction de la présence ou non d'au moins un gène méthylé au niveau tumoral.

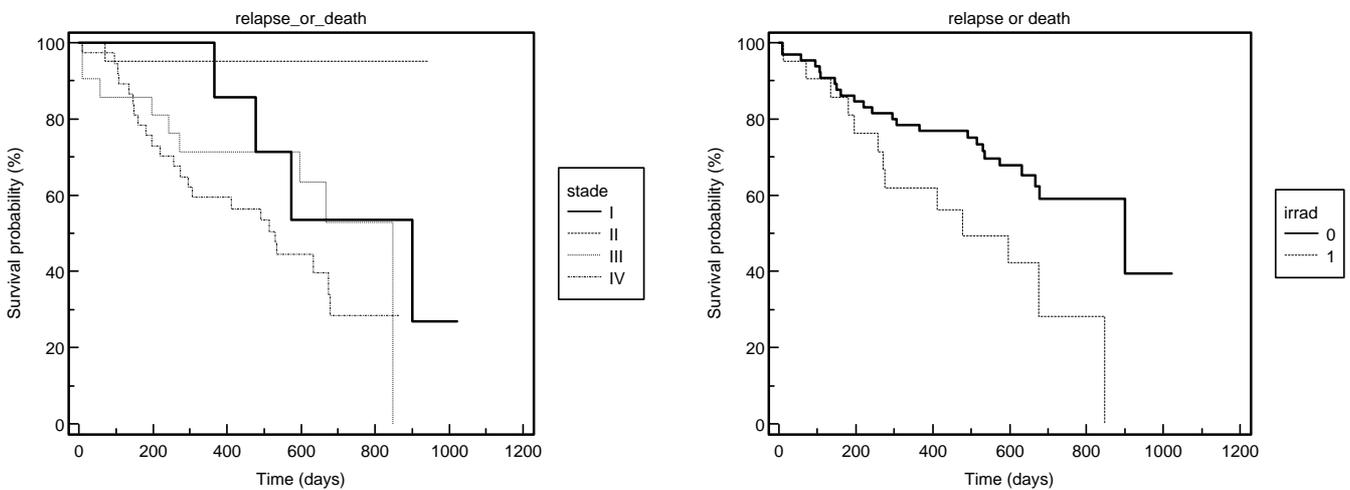




Compte tenu de ces résultats, nous n'avons pas analysé la survie des patients en fonction de chaque gène.

Par contre, en analyse statistique multivariée (modèle de Cox), trois facteurs cliniques à savoir les antécédents de radiothérapie, le stade tumoral et la différenciation tumorale était corrélés à un mauvais pronostic. A titre d'illustration les courbes de survie pour le stade et les antécédents d'irradiation sont rapportées dans la Figure N° 43.

Figure N° 43 : Survie des patients en fonction des antécédents de radiothérapie et du stade tumoral.



- Etudes des méthylations au niveau sanguin

Nous avons retrouvé des taux élevés d'ADN circulant dans le plasma de 5 patients porteurs d'un carcinome épidermoïde des VADS, avec un chiffre moyen de 180 ng / ml, par rapport à 5 patients témoins indemnes de cancer, avec un chiffre moyen de 10 ng / ml.

Par contre, nous n'avons pas réussi à mettre au point la MSP pour l'étude de la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur au niveau plasmatique.

## **DISCUSSION**

Comprendre comment les gènes sont exprimés dans un type cellulaire particulier reste l'une des questions fondamentales de la biologie.

Pour appréhender les bases moléculaires de la régulation de l'expression des gènes, il est essentiel de comprendre à la fois comment ceux-ci sont activés et réprimés.

Parmi les mécanismes de verrouillage de l'expression génique, la méthylation de l'ADN apparaît de plus en plus comme un niveau de contrôle important.

La méthylation de l'ADN a été perçue pendant de longues années par la communauté scientifique comme un épiphénomène biologique.

Cependant, les progrès considérables réalisés au cours des dernières années ont permis au contraire de démontrer le rôle essentiel joué par la méthylation au cours de plusieurs processus biologiques dont l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, qui conduit à un processus de tumorigénèse comparable à celui induit par les modifications génétiques.

Actuellement, il apparaît que la méthylation de l'ADN joue un rôle important au cours de la cancérogénèse par le biais de la répression de la transcription.

La caractérisation des méthyltransférases de l'ADN (DNMTs) et de leur partenaires protéiques, dont les histones déacétylases (HDAC), a permis de lever une partie du voile sur les mécanismes par lesquels la méthylation réprime la transcription.

La question actuelle n'est donc plus de savoir si la méthylation est un processus biologique important mais d'identifier, pour chaque type de tumeur, quels sont les gènes qui sont inactivés.

Comme nous l'avons vu précédemment, les gènes impliqués sont extrêmement variables en fonction du type de tumeur auquel on s'intéresse.

Dans les cancers des VADS, la méthylation implique de nombreux gènes impliqués dans quatre phénomènes biologiques : la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'apoptose, l'adhésion cellulaire.

L'implication de ces altérations en terme de pronostic pour les cancers des VADS est importante à déterminer.

La détection de méthylations est également possible au niveau des liquides biologiques tels que la salive et le sang.

Toutefois il est important de préciser si l'étude de la méthylation dans la salive et/ou le sang peut avoir des retombées pour le dépistage des cancers dans une population à risque et le suivi des patients traités, avec le dépistage précoce des rechutes tumorales.

Enfin, étant donné de caractère réversible de la méthylation, de nouvelles perspectives vers une thérapie épigénétique du cancer s'offrent aux cliniciens.

Il semble donc important de voir s'il existe des applications potentielles de ces nouvelles thérapies pour les cancers des VADS.

### **Prévalence des méthylations dans les cancers des VADS**

---

Il ressort de l'analyse de la littérature, que la fréquence des anomalies liées à une méthylation d'un gène dans les tumeurs des VADS, varie suivant les gènes mais aussi d'une étude à l'autre.

Pour certains gènes, le nombre d'études et/ou d'échantillons analysés est trop faible pour permettre d'estimer la prévalence de la méthylation dans les cancers des VADS.

Quatre gènes sont fréquemment méthylés; ce sont aussi les plus étudiés :

- P16, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire est méthylé dans 33 % (27 – 50) des échantillons ;
- ECAD impliqué dans les phénomènes d'adhésion cellulaire et de métastases, est méthylé dans 56% (31 – 85) des tumeurs ;
- MGMT, un agent de détoxification des adduits de l'ADN, est méthylé dans 32% (20 – 52) des échantillons ;
- DAPK, impliqué dans l'apoptose, est méthylé dans 27% (7 – 68) des tumeurs.

Dans notre travail, les pourcentages de méthylations pour ces 4 gènes sont tout à fait conformes à ceux de la littérature.

Quatre autres gènes, P14 et P15 impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, RASSF1A impliqué dans l'apoptose, et hMHL1 impliqué dans la réparation de l'ADN, sont méthylés, respectivement, dans 19% (14 – 26), 19% (6 – 27), 11,5% (8 – 15) et 13% (0 – 32) des

échantillons tumoraux, mais avec de grandes variations suivant les séries, en particulier pour hMHL1.

Notre travail confirme les résultats de la littérature pour les 3 premiers gènes mais nous ne trouvons que 2% de méthylation pour hMHL1, sans que nous puissions l'expliquer.

Rar $\beta$  est fréquemment méthylés dans les cancers des VADS, aux environs de 60% des échantillons analysés, mais également au niveau des lésions pré-néoplasiques (dysplasies, 67%) (Maruya *et al.*, 2004) et des tissus sains (60%, chiffre moyen) situés en périphérie d'un cancer (Maruya *et al.*, 2004 ; Shaw *et al.*, 2006b).

Dans notre série il s'agit du gène le plus fréquemment méthylé (58%) et le pourcentage de méthylation que nous avons retrouvés au niveau des prélèvements de muqueuse située à distance de la tumeur (tissus référents) est également élevé (50%).

Maruya (Maruya *et al.*, 2004) et Shaw (Shaw *et al.*, 2006b) considèrent que le pourcentage élevé de méthylation de Rar $\beta$  dans les tissus en périphérie d'une tumeur traduit la précocité de l'apparition de cette altération dans la cancérogenèse des cancers des VADS, en se basant sur le principe de cancérisation progressive ou « field cancerization » qui caractérise ce type de cancer (Califano *et al.*, 1996).

Néanmoins il apparaît assez nettement que la méthylation du gène Rar $\beta$  est non spécifique des tissus tumoraux.

Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus au niveau des fragments de muqueuse (tissus sains) prélevés chez des patients indemne de cancer et les salives des sujets témoins semblent indiquer une relation entre la méthylation de ce gène et le tabagisme, ce qui n'est pas le cas pour les autres gènes étudiés.

Neuf autres gènes (APC, P73, ATM, DCC, FHIT, DBC1, ABO, P53, VHL) ont été plus rarement analysés et nécessitent des études complémentaires pour confirmer leur intérêt dans les cancers des VADS.

Nous avons analysés 4 de ces gènes avec des résultats conformes à ceux de la littérature pour APC (11%) et DCC (24%), mais des résultats discordants pour ATM et FHIT.

Hors mis notre série, APC n'avait été analysé que dans une seule étude (Esteller *et al.*, 2001), sur un faible nombre d'échantillons (n=10) et avait retrouvé un pourcentage de méthylation de 10%. Il semble donc que la méthylation de ce gène ait une implication limitée dans la cancérogenèse des cancers des VADS et que son étude ait peut d'intérêt.

Par contre il semble opportun de compléter les résultats obtenus pour le gène DCC qui n'a été étudié que pour une partie des patients inclus dans notre étude, mais dont le pourcentage de méthylation semble élevé.

De plus, il paraît judicieux d'étudier la méthylation d'autres gènes tels que DBC1, ABO, cyclin A1, CYGB, STAT1 et LHX6 récemment décrits dans la littérature (Shaw 2006b ; Xi, 2006 ; Estécio, sous presse), comme fréquemment méthylés dans les cancers des VADS, le but étant d'arriver à ce que la totalité des tumeurs étudiées ait au moins un gène méthylé.

Par ailleurs, GSTP1 que nous n'avons pas étudié, est constamment non méthylés dans les cancers des VADS.

Dans notre travail les gènes THBS1 et CASP8 n'étaient méthylés dans aucun des échantillons analysés ; ce résultat est cohérent avec ceux rapportés dans la littérature puisque la méthylation de ces 2 gènes n'a été rapporté que pour les carcinomes de type UCNT du cavum (Wong *et al.*, 2003b).

Enfin nous avons étudié le gène TIMP3 codant pour un inhibiteur des métalloprotéases et impliqué dans l'adhésion cellulaire, les phénomènes de métastases et d'angiogénèse. Ce gène, qui n'avait jamais été étudié dans les cancers des VADS est méthylé dans de nombreux cancers dont les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules liés à l'intoxication tabagique (Esteller *et al.*, 2001).

TIMP3 est situé au niveau du bras long du chromosome 22 (Jones & Baylin, 2002) où les pertes d'hétérozygotie sont fréquentes dans le cancer du poumon mais n'ont jamais été décrites dans les cancers des VADS (Califano *et al.*, 2000), suggérant que la méthylation du promoteur de TIMP3 est un mécanisme important d'inactivation de ce gène dans le cancer des VADS.

L'absence de perte d'allèle dans la région où se situe TIMP3 signifie qu'au moins deux mécanismes peuvent être impliqués dans l'inactivation de ce gène : soit l'association méthylation-mutation, soit la méthylation des deux allèles. Le dernier mode d'inactivation, bien que rare, ayant été décrit pour d'autres gènes (Shaw, 2006a).

Les résultats que nous avons obtenus sont intéressants, mais il faudra dans l'avenir augmenter le nombre d'échantillons analysés pour augmenter la puissance statistique des résultats obtenus.

Pour cela nous envisageons d'établir des collaborations avec d'autres centres Hospitalo-Universitaires et Centres anti-cancéreux dans le cadre d'un PHRC national.

## Etude comparative cancers des VADS – Cancers du poumon

En comparant les pourcentages de méthylation de certains des gènes étudiés dans les cancers des VADS et qui ont également été étudiés dans les carcinomes malpighiens pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) (tableau N°15), nous pouvons constater qu'il y a une différence notable entre ces deux types de cancers, bien qu'ils aient en commun le tabac comme carcinogène principal.

Les résultats obtenus à partir des prélèvements biologiques tels que les lavages bronchiolo-alvéolaires n'ont pas été pris en compte ; de même, les résultats obtenus pour les carcinomes pulmonaires à petites cellules n'ont pas été comptabilisés, compte tenu d'une épidémiologie et d'un pronostic différents des carcinomes non à petites cellules.

Ceci illustre parfaitement l'hypothèse soulevée par Esteller et ses collaborateurs (Esteller *et al.*, 2001), qui est que chaque type de cancer a un profil de méthylation ou « methylotype » et ce, indépendamment du ou des carcinogènes impliqués dans leur cancérogenèse.

Tableau N° 15 : comparaison des profils de méthylation entre les cancers des VADS et les cancers malpighiens non à petite cellule du poumon.

Gene	VADS *			NSCLC **		
	Echantillons méthylés (n=)	Echantillons analysés (n=)	Proportion (%)	Echantillons méthylés (n=)	Echantillons analysés (n=)	Proportion (%)
P16	198	615	33	334	945 <sup>a, b, c, d</sup>	35
P15	42	243	19	0	63 <sup>a</sup>	0
P14	38	204	19	13	295 <sup>a</sup>	4
MGMT	120	364	32	122	513 <sup>a, b, c, d</sup>	25
DAPK	115	448	27	173	613 <sup>a, b, c</sup>	28
ECAD	173	342	56	107	19 <sup>a</sup>	18
RASSF1A	13	126	11.5	80	230 <sup>a, d</sup>	35
hMLH1	47	315	13	3	20 <sup>a</sup>	0
Rarβ	73	111	60	182	218 <sup>a, c, d</sup>	39
APC	0	10	0	230	311 <sup>a, b, d</sup>	74
GSTP1	0	141	0	14	174 <sup>a, d</sup>	8

\* : chiffres extraits des tableaux 6a et 6b.

\*\* : chiffres extraits des données de Tsou (Tsou *et al.*, 2002) (a), de de Fraipont (de Fraipont *et al.*, 2005) (b), Chan (chan *et al.*, 2002) (c) et Topaloglu (Topaloglu *et al.*, 2004) (d).

## **Etude de la corrélation méthylation – perte de fonction du gène**

---

Très peu d'études ont analysés la corrélation méthylation de la région promotrice d'un gène / perte de fonction du gène.

Un des moyens d'inactivation d'un gène est l'inhibition de sa transcription. Il semble que ce mécanisme soit le principal impliqué en cas de méthylation de la région promotrice d'un gène ; toutefois il est possible que se ne soit pas le seul.

Parmi les moyens que nous avons à disposition pour étudier la protéine d'une gène, l'immuno-histochimie est un des moyens les plus utilisés.

Une fois l'ensemble des gènes d'intérêt analysés, nous envisageons d'analyser par IHC la protéine des gènes les plus fréquemment méthylés. cette étude nous permettra de mieux appréhender la relation « méthylation d'un gène- perte de fonction » par le biais de la perte d'expression protéique.

Toutefois nous risquons d'être confrontés à un problème de sensibilité entre les deux méthodes d'analyse, l'immuno-histochimie étant une méthode moins sensible que la MSP.

## **Existe-t-il un profil de méthylation spécifique des tumeurs des VADS ?**

---

Comme nous venons de le voir, l'incidence des méthylations de chacun des gènes varie entre les différentes études.

Ces variations peuvent être expliquées :

- par la faible taille de certaines cohortes ;
- des différences de méthodes d'analyse ;
- des différences dans les populations étudiées (origine ethnique, âge) ;
- des différences dans les localisations tumorales ;
- des différences dans les expositions aux agents carcinogènes (tabac, alcool, bétel, infection éventuelle au virus HPV ...).

Pour illustrer le dernier point, Chang et ses collaborateurs (Chang *et al.*, 2002a) trouvent un pourcentage élevé de méthylation pour FHIT (27%), alors que dans notre étude ce gène est faiblement méthylé (10%). Hors, dans l'étude de Chang le carcinogène impliqué est le bétel alors que dans notre population les carcinogènes sont le tabac et l'alcool. Aucune autre étude n'a analysé le gène FHIT.

Comme pour les anomalies génétiques, il n'existe pas d'anomalie épigénétique unique et présente dans toutes les tumeurs des VADS.

Pour une exploitation de ces anomalies à but diagnostique, la sensibilité du test dépendra de l'incidence de l'anomalie dans ce type de tumeurs.

Cette incidence est relativement faible pour chaque gène, nécessitant de définir un profil de méthylation pour les cancers des VADS et d'étudier un ensemble de gènes potentiellement anormaux, ce qui nécessite d'étudier un grand nombre de gène (Ha *et al.*, 2006).

Ainsi, Ogi et ses collaborateurs (Ogi *et al.*, 2002) ont montré que l'analyse de 12 gènes permettait de détecter une anomalie d'au moins 1 d'entre eux chez 65% des patients, d'origine japonaise, porteurs d'un cancer des VADS.

De même, Viswanathan et ses collaborateurs (Viswanathan *et al.*, 2003) ont sélectionné, pour une population indienne, 5 gènes qui leur permettaient de mettre en évidence une méthylation d'au moins un d'entre eux dans 75% des échantillons de cancer des VADS.

Dans notre série de 90 malades caucasiens, nous avons montré que l'analyse de 6 gènes (ECAD, P16, TIMP3, MGMT, DAPK et RASSF1) permettait de mettre en évidence au moins un gène méthylé dans 75% des tumeurs des VADS analysées.

La méthylation des gènes suppresseurs de tumeur peut être un évènement précoce au cours de la transformation de l'épithélium des voies aériennes supérieures et devancer de plusieurs années les manifestations cliniques de cancer chez des sujets exposés au tabac ou à l'alcool.

Par contre il semble qu'aucune méthylation ne soit retrouvée au niveau des fragments de muqueuse saine des VADS non exposés au tabac et à l'alcool comme en atteste l'étude de Kulkarni dans laquelle 3 (P16, DAPK, MGMT) des 4 gènes les plus fréquemment méthylés dans les carcinomes des VADS n'étaient jamais méthylés parmi les 20 prélèvements analysés (Kulkarni *et al.*, 2004). Dans notre travail, ces 3 gènes ont été également étudiés dans 4 fragments de muqueuse non exposés au tabac et à l'alcool, avec des résultats identiques.

Si l'on exclue le gène Rar $\beta$  pour les raisons que nous avons évoquées dans le paragraphe précédent, il semble que la méthylation des gènes P14, P16 et MGMT soient fréquentes (respectivement 33%, 33% et 17%) au sein des dysplasies (Marya *et al.*, 2004).

Il est donc nécessaire, si l'on veut exploiter les méthylations de gènes suppresseur de tumeur pour faire un diagnostic précoce de cancer des VADS, d'évaluer leur spécificité pour

le processus tumoral et/ou le délai entre l'apparition des anomalies épigénétiques et celle d'un cancer.

Trois équipes ont analysé les tissus normaux adjacents à la tumeur avec des résultats divergents : une incidence élevée des méthylations de p16, DAPK et MGMT dans ces tissus normaux pour Kulkarni (Kulkarni *et al.*, 2004) et nulle ou faible pour Maruya (Maruya *et al.*, 2004) et Shaw (Shaw *et al.*, 2006b).

Dans notre série nous avons, chez 30 malades, analysé la tumeur et un fragment de muqueuse histologiquement normale prélevée à plus de 3 centimètres de la tumeur et mis en évidence une méthylation que dans 3 muqueuses normales (TIMP3, 2 cas ; DAPK, 1 cas) prélevées chez les malades ayant les tumeurs les plus évoluées.

Les discordances entre ces études sont probablement liées à la définition de la normalité du tissu (clinique ou histologique) et à la distance entre la zone de prélèvement de ce tissu et les marges de la tumeur.

### **La détection des anomalies épigénétiques dans les fluides biologiques (salive et sang) prélevés chez les malades porteurs d'un cancer des VADS est elle possible et fiable ?**

---

#### La salive

La présence d'anomalies génétiques ou épigénétiques à tout d'abord été identifiée au niveau de liquides biologiques au contact d'une tumeur tels que l'urine pour les cancers de la vessie (Mao *et al.*, 1996) et les sécrétions bronchiques pour les cancers broncho-pulmonaires (Ahrendt *et al.*, 1999).

En ce qui concerne les cancers des VADS, la salive contient des cellules malignes exfoliées, mais leur identification parmi les cellules épithéliales normales contenues également dans la salive est extrêmement difficile.

L'analyse cytologique microscopique des cellules malignes contenues dans la salive est une technique qui demande beaucoup de temps, un cytologiste très expérimentée et dont la sensibilité et la spécificité sont mauvaises.

Cette technique a été très utilisée dans les soixante-dix, mais a été ensuite définitivement abandonné pour le dépistage et le diagnostic des rechutes des cancers des VADS (Shklar *et al.*, 1970).

A titre indicatif nous avons réalisé, avec l'aide d'un cytologiste, un examen cytologique de la salive de 10 patients porteurs d'un cancer des VADS. Il résulte de cet examen qu'il existe :

- une quantité importante de cellules exfoliées dont une majorité de cellule de type épithéliale en provenance de la couche cornée de l'épithélium ;
- de nombreux débris cellulaires ;
- des bactéries en quantité plus ou moins importante en fonction de l'état de surinfection de la tumeur.

Néanmoins, dans aucun cas, il nous a été possible d'identifier une cellule maligne (taille du noyau, sa régularité, homogénéité chromatinienne ; aspect du cytoplasme ; rapport nucléocytoplasmique).

L'identification des cellules malignes parmi les cellules exfoliées contenues dans la salive de patients porteurs d'un cancer de la cavité buccale par l'identification d'instabilités microsatellites a été proposée par Spafford et ses collaborateurs, à propos d'une série de 40 cas (Spafford et al., 2001). Les conclusions de cette étude étaient qu'il s'agissait d'une méthode sensible (96%) et spécifique (100%) et qu'elle pouvait être proposée pour le dépistage et le suivi des cancers de la cavité buccale. Néanmoins compte tenu de la complexité de la technique, aucune étude n'est venue confirmer cette hypothèse.

Très peu d'études ont analysé la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur chez des patients porteurs de lésions dysplasiques et / ou d'un carcinome invasif des VADS.

López et ses collaborateurs (López *et al.*, 2003) ont démontré qu'il était possible de détecter par MSP, au niveau de la salive, la méthylation de trois gènes suppresseurs de tumeur (P14, P16, MGMT) chez des patients porteurs d'une lésion pré-néoplasique de type leucoplasie au niveau de la cavité buccale. Dans cette étude, deux groupes de patients ont été analysés :

- un groupe de patients fumeurs et /ou éthyliques, présentant une leucoplasie mais sans antécédents de carcinomes des VADS (groupe N°1) ;
- un second groupe également fumeurs et/ou éthyliques, mais ayant comme antécédent un ou plusieurs carcinomes des VADS traités (groupe N°2).

Vingt-huit (82%) des 34 patients étudiés présentaient une méthylation d'au moins un des trois gènes étudiés dans les salives prélevées et ce, quelque soit la localisation anatomique de la zone de leucoplasie au niveau de la cavité buccale. Le nombre de méthylations étaient plus importantes, tout particulièrement pour P14, chez les patients n'ayant pas stoppé leur

intoxication ethylo-tabagique et ayant eu au moins un cancer des VADS traité préalablement. Par contre cette étude ne précisait pas si les patients ayant au moins une méthylation présente dans leur salive ont développé, au cours de leur suivi clinique, un carcinome invasif tout particulièrement dans le groupe de patients N°2.

Une seule étude a étudié la méthylation de 3 gènes suppresseurs de tumeur (P16, MGMT, DAPK) par MSP chez 30 patients porteurs d'un cancer de la cavité buccale de l'oropharynx et du larynx, non préalablement traité (Lopes Bittencourt Rosas *et al.*, 2001). Dans 65% des cas la méthylation d'au moins gène était retrouvée dans la salive.

Aucun cas de faux positifs n'a été mis en évidence, c'est à dire que chaque fois qu'une méthylation était retrouvée dans la salive, celle-ci était détectable dans la tumeur.

La sensibilité de l'examen était d'autant meilleure (80%) que la tumeur était située dans la cavité buccale.

Les conclusions de cette étude étaient :

- que l'étude de la méthylation de gènes suppresseurs de tumeur dans la salive était possible ;
- qu'il s'agissait d'une méthode sensible et spécifique ;
- qu'il s'agissait d'une méthode potentiellement utile pour le dépistage soit d'une tumeur dans une population à risque soit d'une rechute tumorale après traitement.

Aucune étude n'est venue confirmer le dernier point de cette conclusion.

Notre travail conforte ces résultats avec toutefois une sensibilité supérieure (96%) et une spécificité équivalente de 100%. Toutefois, nous avons pu démontrer par rapport à l'étude de Lopes Bittencourt Rosas que la radiothérapie ne modifiait pas les résultats obtenus au niveau de la salive.

Que ce soit dans l'étude de Lopes Bittencourt Rosas ou la notre, dans les 2 cas la salive était recueillie après que le patient ait fait un rinçage de la cavité buccale et un gargarisme de l'arrière gorge avec du sérum physiologique.

Avec cette méthode, on peut facilement concevoir que la « collecte » des cellules exfoliées au niveau de l'hypopharynx et du larynx est plus difficile qu'au niveau de la cavité buccale ou de l'oropharynx, uniquement pour des raisons anatomiques.

Dans une étude ayant inclus 30 patients porteurs d'un carcinome de l'oropharynx du vestibule laryngé et de l'hypopharynx découverts à un stade précoce (stades I - II), Temam et ses collaborateurs (Temam *et al.*, 2005) ont analysé la méthylation du gène P16 au niveau tumorale et au niveau de la salive recueillie grâce à une petite éponge contenue dans une

capsule reliée à un fil et ingérée par le patient. Après dissolution de la capsule au niveau oesophagien l'éponge était lentement remontée grâce au fil, permettant ainsi de récolter la salive au contact de l'oro-hypopharynx et la région vestibulaire du larynx (ou sus-glottique). Dans tous les cas le prélèvement par brossage a été réalisé avant le prélèvement biopsique. Parmi les 14 patients présentant une méthylation du gène P16 au niveau tumoral, dans 8 cas (57%) cette méthylation a été retrouvée au niveau de la salive recueillie. Parmi ces 8 patients, 2 avaient une tumeur de l'hypopharynx, 1 du larynx et 5 de l'oropharynx. En ne prenant en compte que les tumeurs pharyngo-laryngées avec une méthylation du gène P16 (n=6), une méthylation a été retrouvée dans la salive dans 3 cas (50%).

Dans notre étude, la présence d'au moins un gène méthylé dans la salive était retrouvée dans 35% des localisations laryngées et 40% des localisations hypopharyngées.

La méthode proposée par Temam et ses collaborateurs paraît donc plus performante que la méthode que nous avons utilisée en ce qui concerne les localisations sus-glottique du larynx et de l'hypopharynx, ce d'autant qu'elle permet de détecter des lésions à un stade précoce.

### Le sang

Les méthylations de gènes suppresseurs, comme les anomalies génétiques, peuvent être aussi recherchées dans l'ADN tumoral circulant présent dans le plasma ou le sérum de malades porteurs d'un cancer des VADS.

Dans l'étude de Sanchez-cespedes (Sanchez-cespedes *et al.*, 2000) comprenant 95 patients, 52 des malades présentaient une méthylation des gènes P16, MGMT ou DAPK dans la tumeur prélevée au diagnostic. Pour 50 de ces patients, le sérum a été analysé en parallèle et dans 21 cas (42%) une méthylation d'au moins un gène a été retrouvée.

De même, Wong et ses collaborateurs (Wong *et al.*, 2003a) ont analysé chez 20 patients, au moment du diagnostic, la méthylation de P15 et P16 au niveau tumoral et plasmatique et ont retrouvé une méthylation d'un des 2 gènes dans 65% des échantillons sanguins.

Dans notre travail nous n'avons pas réussi à mettre au point la MSP pour détecter la présence de méthylations au niveau sanguin. Il existe trois explications possibles à cela :

- compte tenu des faibles quantités d'ADN retrouvées au niveau sanguin, une partie de cet ADN a pu être perdue lors du traitement bisulfite ;

- l'ADN que nous avons analysé était trop fragmenté pour que les amorces PCR puissent s'enclaver et amplifier le segment voulu ;
- les fragments d'ADN correspondant aux gènes analysés n'étaient pas présents dans l'ADN circulant.

Les deux dernières hypothèses semblent les plus plausibles car, même si ce ne l'était pas vrai dans tous les cas, le contrôle de la présence d'ADN après traitement bisulfite par amplification du gène MYOD était positif.

### **La recherche de méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs a-t-elle un intérêt dans la prise en charge des cancers des voies aériennes supérieures ?**

---

Cette partie de la discussion a fait l'objet d'un article soumis pour publication à la revue « *Bulletin du cancer* » sous l'intitulé « La méthylation des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures: Quelle signification clinique ? »

Il est possible d'envisager des applications cliniques, à la recherche de méthylation de gènes suppresseurs de tumeur, car les méthodes d'analyse sont robustes, relativement spécifiques et sensibles pour permettre l'analyse de liquides biologiques à condition d'avoir défini un profil de méthylation caractéristique de la population étudiée.

Une application évidente est le diagnostic précoce de la tumeur primitive chez des sujets à risque ou celui de la rechute.

Le profil de méthylation observé dans la tumeur pourrait aussi avoir une valeur pronostique ou permettre de préciser le diagnostic lorsque l'examen histologique est difficile.

Enfin, on peut espérer que la détermination de ces anomalies sera à l'origine de progrès thérapeutiques.

#### Le diagnostic précoce

Le diagnostic précoce ou le dépistage des cancers des voies aériennes supérieures, est difficile chez des patients qui refusent une prise en charge médicale pour de nombreuses raisons dont l'intoxication éthylo-tabagique et un contexte socio-économique défavorisé ne facilitant pas l'accès au soins.

Par ailleurs, l'examen clinique accompagné ou non d'un examen endoscopique sous anesthésie locale à la consultation, n'a pas fait la preuve d'une réelle efficacité dans ce

domaine (Spafford *et al.*, 2001). Ceci tient en partie au fait que certaines lésions sont situées dans des régions anatomiques difficiles d'accès, cryptes amygdaliennes et basi-linguales, certaines zones du larynx comme les ventricules laryngés ou la sous-glotte, le fond des sinus piriformes inaccessibles à la vue même avec un endoscope.

L'étude de Lopes Bittencourt Rosas (Lopes Bittencourt Rosas *et al.*, 2001) et notre étude suggèrent que la recherche systématique et régulière de méthylation de gènes suppresseurs de tumeur dans la salive peut permettre un diagnostic précoce des tumeurs primitives, mais jamais aucune étude prospective ne l'a fait.

Ce point fait partie de nos objectifs de travail futurs. Ce projet ne pourra voir le jour que dans le cadre d'une étude multicentrique pour inclure suffisamment de patients. Il devra également s'inscrire dans le temps car, comme nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, le délai entre l'apparition d'une anomalie biologique et celle du cancer peut demander plusieurs années.

Il est encore trop tôt pour dire si la recherche de méthylations au niveau sanguin représente également un intérêt, car aucune donnée n'est disponible à ce sujet.

Il est plus simple de surveiller des malades et d'envisager des méthodes de diagnostic précoce des rechutes lorsque ces malades ont déjà été pris en charge pour le traitement de la tumeur primitive.

Nous avons pour la première fois, chez 22 patients traités par chirurgie et radiothérapie et suivis prospectivement, analysés régulièrement des prélèvements de salive et recherchés la méthylation d'un ou plusieurs gènes qui étaient méthylés dans la tumeur primitive. Nous avons noté la persistance ou la ré-apparitions de la méthylation d'un ou plusieurs gènes dans la salive après traitement, chez 5 patients alors que l'examen clinique et par FDG-TEP étaient négatifs ; tous ont rechuté quelques mois après l'examen de salive anormal ; la détection, à un stade très précoce, a permis une chirurgie curatrice dans tous les cas.

Les examens de salive sont demeurés négatifs chez les 17 autres patients ; 16 sont en rémission et 1 seul a rechuté avec une tumeur d'évolution extrêmement rapide en quelques mois.

L'étude des méthylations de gènes suppresseurs de tumeur dans la salive représente donc bien un moyen de surveillance potentiel en complément de la surveillance clinique, même en cas de radiothérapie, des patients traités pour un carcinome des VADS.

### Le pronostic

Très peu d'études suggèrent que la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers des VADS est corrélée au pronostic.

Ainsi Zuo (Zuo et al., 2004), Ai (Ai et al., 2004) et Chang (Chang *et al.*, 2006) ont démontrés respectivement que la méthylation du promoteur des gènes MGMT, ATM et ECAD était corrélée à une diminution de la survie des patients présentant cette modification épigénétique.

Il faut toutefois prendre en compte que la méthodologie statistique utilisée dans ces différentes études n'est pas strictement comparable ; en effet Zuo et Ai ont réalisé une étude statistique multivariée, ce qui n'est pas le cas de Chang. Par conséquent, seules les études de Zuo et de Ai doivent être prises en considération.

Dans notre série, en analyse multivariée mais avec un suivi médian de 564 jours seulement, la présence d'un ou plusieurs gènes méthylés dans les tumeurs analysées n'était pas corrélée au pronostic.

Compte tenu de ce premier résultat, nous n'avons pas analysé la survie des patients en fonction de chaque gène. Néanmoins, il n'est pas exclu que la méthylation du gène RASSF1A pour laquelle nous avons retrouvé une corrélation statistiquement significative avec le degré de différenciation tumorale et l'envahissement ganglionnaire puisse être corrélé avec un mauvais pronostic.

A ce jour, il paraît donc difficile d'affirmer que l'étude de la méthylation de l'ADN tumoral représente un facteur pronostic indépendant des facteurs cliniques tels que :

- la localisation tumorale ;
- le stade tumoral ;
- les facteurs histopathologiques (degré de différenciation, présence d'embolies intra-tumorales, présence de ganglions envahis avec ou sans rupture capsulaire).

### L'analyse épigénétique comme aide à l'examen anatomo-pathologique

Le profil de méthylation varie avec chaque type histologique, même lorsque les carcinogènes impliqués sont les mêmes (Esteller *et al.*, 2001 ; Fan, 2004).

Ainsi, comme nous l'avons décrit précédemment, les profils de méthylation observés dans les cancers des voies aériennes supérieures et dans les cancers du poumon sont différents.

Devant l'association d'un carcinome des voies aériennes et d'un carcinome du poumon chez un patient fumeur, 2 diagnostics peuvent être évoqués :

- l'association de 2 cancers primitifs ;
- un cancer primitif des VADS et une métastase pulmonaire.

Ces 2 situations cliniques demandent des prises en charge différentes.

Hors, même si l'examen histologique reste l'examen de référence pour le diagnostic et la classification des tumeurs, l'analyse histomorphométrique dans cette situation est incapable de faire la distinction entre les 2 hypothèses évoquées.

L'étude du profil de méthylation, au même titre que l'étude des altérations génétiques, peut représenter une aide à une meilleure caractérisation tumorale.

Une autre application potentielle est le contrôle de la qualité des berges de la tumeur pendant la chirurgie. Elle repose, aujourd'hui, sur un examen histologique extemporané.

Dans une étude de faisabilité, Goldenberg et collaborateurs (Goldenberg *et al.*, 2004) ont pu démontrer qu'il était possible de réaliser, le temps d'une intervention chirurgicale de 5 heures, la recherche de méthylations de gènes au niveau des tissus en périphérie de la tumeur. Ce délai correspond au temps moyen d'une intervention chirurgicale carcinologique avec exérèse de la tumeur, des ganglions cervicaux et de la reconstruction de la perte de substance.

L'étude des méthylations est faite grâce à une technique de MSP quantitative (QMSP : quantitative methylation-specific polymérase chain reaction type « methylight ») et en réduisant le temps du traitement bisulfite à 1 heure. Cette technique nécessite de déterminer quels sont les gènes méthylés au sein de la tumeur grâce à une biopsie réalisée quelques jours avant la résection tumorale. Ce ne sont que les gènes méthylés au sein de la tumeur qui sont ensuite étudiés en per opératoire.

En l'occurrence, parmi une cohorte de 13 patients présentant un carcinome épidermoïde de la cavité buccale et de l'oropharynx, 6 (46%) présentaient une méthylation du gène P16 et MGMT.

En per opératoire, dans 3 cas la méthylation d'au moins un gène était présente au niveau des tissus prélevés en périphérie (marges de sécurité) alors que l'analyse histologique de ces tissus était normale, permettant au chirurgien de compléter la résection chirurgicale.

A ce jour, le travail de Goldenberg constitue la seule étude de faisabilité de cette technique, mais aucune étude clinique n'est venue confirmer l'intérêt de celle-ci en terme de qualité

d'exérèse tumorale, et donc indirectement la diminution du taux de rechute locale après traitement chirurgical.

### Les Innovations thérapeutiques

#### *Sélections des patients candidats à une radiothérapie post opératoire*

Un autre intérêt potentiel de l'étude des altérations épigénétiques au sein des tissus en périphérie de la tumeur, et de sélectionner les patients susceptibles d'être traités par une radiothérapie post opératoire.

En effet, Temam et ses collaborateurs (Temam *et al.*, 2004b) ont démontré l'intérêt de l'étude d'altérations génétiques (5 marqueurs d'instabilité microsatellitaire : UT 5085, L17686, D9S753, ACTBP2, CSF1R) au sein de la tumeur et des tissus péri tumoraux pour poser l'indication d'une radiothérapie post opératoire.

Dans cette étude, les auteurs ont pu démontrer que parmi un groupe de 54 patients ayant des marges de résection histologiquement saines  $\geq 5$  mm, 26 (48%) tumeurs étaient positives pour les marqueurs UT5085 et L17686, les autres marqueurs étant demeurés négatifs.

Parmi les tumeurs positives, 7 (27%) présentaient les mêmes anomalies au niveau des tissus sains péri tumoraux ; parmi ces 7 patients, 5 (71%) ont présenté une rechute locale. Les auteurs en ont donc conclu que, malgré des marges de sécurité histologiquement saines, les patients présentant des anomalies génétiques au sein des tissus péri tumoraux devaient bénéficier d'une radiothérapie post opératoire, et ce malgré une analyse histologique rassurante.

Ce type d'étude paraît tout à fait transposable dans le domaine de l'épigénétique, en étudiant la méthylation d'un panel de gènes par MSP.

#### *Les agents déméthylants*

La méthylation de l'ADN à susciter un grand intérêt pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux et ce, pour quatre raisons essentielles :

- les gènes concernés sont impliqués dans tous les stades du développement tumoral ;
- le rétablissement de la fonction d'un gène en empêchant ou en levant la méthylation de sa région promotrice est plus aisée qu'en cas d'inactivation génétique (mutation, délétion) ;

- la méthylation de l'ADN est potentiellement réversible grâce à des molécules pharmaceutiques ;
- dans les cellules normales, la régulation des gènes n'est pas dépendante de la méthylation de leur région promotrice, ce qui fait que l'administration d'inhibiteurs de la méthylation est potentiellement moins toxique que les agents anticancéreux conventionnels.

Comme nous l'avons dans la première partie de cette thèse, contrairement aux anomalies génétiques, les anomalies épigénétiques sont réversibles.

Ceci offre des possibilités thérapeutiques au stade de tumeurs établies mais surtout des possibilités de chimio-prévention chez des sujets exposés à des facteurs de risque.

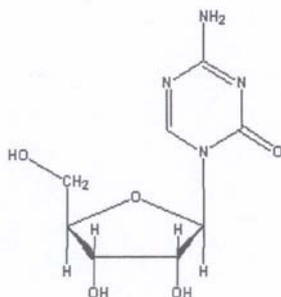
Il existe deux classes d'agents déméthylants : les inhibiteurs de la DNMT1 et des HDAC.

La méthylation de l'ADN peut être bloquée par un inhibiteur de la DNMT1, la 5-az-2'déoxycytidine (5-aza-CdR, commercialisée sous le nom Décitabine ®), qui est métabolisée dans l'organismes en 5-azacytidine qui est ensuite intégrée à l'ADN lors de la réplication (Figure N°44).

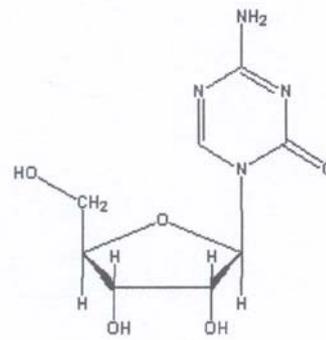
Une fois incorporée au niveau de l'ADN de la cellule tumorale, la Décitabine ® forme un complexe covalent stable avec la DNMT1, la rendant ainsi indisponible, empêchant donc la méthylation de l'ADN (figure N°45).

Figure N° 44 : Molécules de 5-azacytidine et de son précurseur, la 5-aza-CdR (d'après Yoo & Jones, 2006).

5-azacytidine

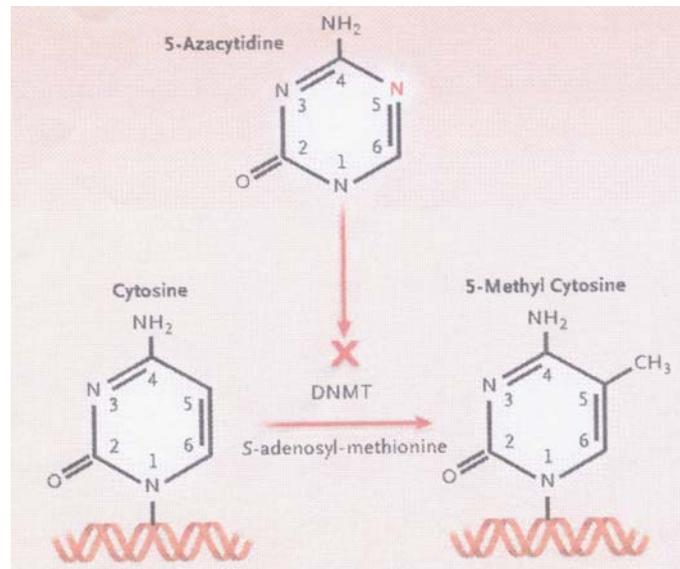


5-aza-CdR



H

Figure N° 45 : Méthylation de la Cytosine grâce aux DNMTs et inhibition de la réaction par la 5-azacytidine (d'après Herman et al., 2003).



La Décitabine<sup>®</sup> a été utilisée dans les essais thérapeutiques de phase III pour le traitement des cancers hématologiques, du col utérin et les cancers broncho-pulmonaires non à petite cellules (Yoo & Jones, 2006).

Actuellement, ce produit n'est pas utilisé dans le traitement des cancers des VADS.

Des études *in vitro* ont démontré une sensibilité accrue aux sels de Platine après réactivation du gène hMLH1 par administration de Décitabine<sup>®</sup> (Steathdee & Brown, 2002). L'association de ces drogues paraît avoir un intérêt limité dans le traitement des cancers des VADS compte tenu du faible pourcentage de méthylation de hMLH1.

A côté de la Décitabine<sup>®</sup> qui cible la DNMT1, d'autres molécules ciblent les histones déacétylases (HDAC) ; ce sont les inhibiteurs des déacétylases (HDACis).

Plusieurs HDACis ont été identifiés (Somech *et al.*, 2004) ; il s'agit :

- de l'acide butyrique ;
- des acides gras à courte chaîne, dont la Trichostatine A ;
- les tétrapeptides cycliques, dont la Trapoxine ;
- les benzamides.

La Trichostaine A et la Trapoxine ont montré une certaine efficacité en combinaison avec des cytotoxiques classiques dans les maladies hématologiques, mais aucun essai n'a été mené dans les cancers des VADS.

Les résultats que nous venons de mentionner orientent vers une utilisation des inhibiteurs de la DNMT1 et des HDAC en combinaison avec des cytotoxiques classiques.

Il paraît judicieux d'initier une recherche dans ce domaine pour optimiser la prise en charge des patients atteints d'un cancer des VADS.

#### *Les autres traitements*

Esteller et ses collaborateurs (Esteller *et al.*, 2000) ont démontré que l'efficacité du traitement de première intention des gliomes par un agent alkylant, la Carmustine (BiCNU<sup>®</sup>, Gliadel<sup>®</sup>) était dépendante de la fonctionnalité du gène MGMT, la réponse au traitement étant moins bonne en cas de méthylation de la région promotrice de ce gène.

Hors il s'avère que le pourcentage de méthylation de MGMT dans les gliomes est équivalent à celui retrouvé dans les cancers des VADS (30%).

Les agents alkylants, dont la Carmustine, peuvent donc représenter un intérêt dans le traitement de première intention des cancers de VADS.

Aucun essai thérapeutique dans ce domaine n'a été entrepris jusqu'à présent.

## **La méthylation des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures: Quelle signification clinique ?**

### **Méthylation et cancers des VADS**

Christian Adrien RIGHINI <sup>1-2-3</sup>, Florence de FRAIPONT <sup>2-3</sup>, Emile REYT <sup>1</sup>, Marie-Christine FAVROT <sup>2-3</sup>.

1 : Service ORL et Chirurgie cervico-faciale

2 : Centre d'Innovation en Biologie

CHU de Grenoble, 38043, Grenoble cedex 09

3 : INSERM/Université Joseph Fourier U578

Institut Albert Bonniot, Rond point de la Chantourne, 38700, La Tronche

Auteur a qui doit être adressé la correspondance :

Marie-Christine Favrot

Centre d'Innovation en Biologie, Pavillon B

CHU de Grenoble, 38043, Grenoble cedex 09

Tel : +33-4 76 76 54 84

Fax : +33-4 76 76 56 64

E-mail : [MCFavrot@chu-grenoble.fr](mailto:MCFavrot@chu-grenoble.fr)

## **Résumé :**

Au cours de la transformation maligne, la cellule accumule des anomalies épigénétiques qui n'affectent pas la séquence d'ADN mais qui sont transmissibles au cours des divisions et modifient l'expression des gènes. Parmi ces anomalies, la méthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs (ST) qui inhibe leur transcription, est un mécanisme d'inactivation aussi fréquent que les pertes d'allèles ; le profil de méthylation (ou ensemble des gènes méthylés dans une tumeur), comme les pertes d'hétérozygotie, varie beaucoup en fonction du type histologique. Dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures, (carcinomes malpighiens de la cavité buccale, du larynx et de l'oro-hypopharynx), 19 gènes ont été analysés dont 5 sont très fréquemment méthylés, ie : p16, ECAD, DAPK, MGMT et TIMP3. La technique d'analyse des méthylations de l'ADN par traitement au bisulfite puis amplification par PCR est suffisamment sensible et spécifique pour permettre de détecter ces anomalies, au niveau des liquides biologiques qui drainent la tumeur ou au niveau de l'ADN tumoral circulant. Dans les cancers des voies aériennes supérieures, on trouve une excellente corrélation entre le profil de méthylation dans la tumeur et dans la salive, un résultat qui permet d'envisager l'analyse de ces anomalies pour la détection précoce de ces cancers chez des sujets à risque ou pour la surveillance des malades après traitement et le diagnostic rapide de la rechute. Le profil de méthylation dans une tumeur pourrait aussi refléter son pronostic et aider au diagnostic en cas d'examen anatomopathologique difficile. Enfin, la méthylation de l'ADN est réversible sous l'effet d'agents déméthylants, ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques nouvelles, en combinaison avec les drogues classiques.

**Mots clés :** épigénétique, méthylation de l'ADN, cancers des voies aéro-digestives supérieures, applications cliniques

**Summary:**

During malignant transformation, the malignant cell accumulates epigenetic abnormalities that do not alter the DNA sequence but are transmissible during divisions and modify genes expression. The methylation of CpG islands in the tumor suppressor genes (TS genes) promoters inhibits their transcription; it is a mechanism of gene inactivation as frequent as allelic deletions. The methylation profile (or panel of methylated genes in a tumor), similarly to allelic deletions, varies with the tumor histology. Within head and neck squamous cell carcinoma (oral cavity, larynx and oropharynx ), 19 genes have been analysed, among them 5 are frequently methylated, ie : p16, ECAD, DAPK, MGMT et TIMP3. The method of methylation analysis, based on a bisulfite treatment followed by a PCR amplification, is sensitive and specific enough to allow the detection of abnormalities in biological fluid that drain the tumor or in circulating tumoral DNA. In the head and neck squamous cell carcinoma, correlation between the methylation profile in tumor and paired saliva is excellent; thus methylation analysis in saliva is a very promising approach for early cancer detection in high risk patients or for the post treatment follow up and rapid diagnosis of relapse. The methylation signature might also reflect the tumor prognosis and complete the histology to define the diagnosis. Finally, DNA methylation is reversible with demethylating agents, a new avenue for cancer therapy in association with conventional chemotherapy.

**Key words:** epigenetic, ADN methylation, head and neck squamous cell carcinoma, clinical applications

## ***Introduction :***

Au cours de la transformation maligne, les cellules accumulent des anomalies génétiques et épigénétiques ; ces dernières modifient l'expression du gène et sont transmissibles au cours des divisions cellulaires sans modification de la séquence d'ADN [1]. Les dérégulations épigénétiques sont fréquentes dans la cellule maligne [2]. Feinberg et collaborateurs ont, les premiers, montré l'existence d'une hypométhylation globale du génome dans les cellules cancéreuses humaines [3]. Ces anomalies entraînent une instabilité génomique propice à un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire et à l'émergence de clones cellulaires anormaux. L'hypométhylation du génome s'accompagne d'une hyperméthylation localisée de l'ADN au niveau de dinucléotides CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) situés dans la région promotrice de certains gènes [1]; Cette hyperméthylation entraîne une inhibition transcriptionnelle de l'expression des gènes. La répression épigénétique est un des mécanismes d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (gènes ST) et il est au moins aussi fréquent que les mutations ou les pertes d'allèles (gènes ST). Le « choix » par la cellule d'inactiver un gène par perte d'allèles, mutation ou méthylation de son promoteur, dépend probablement de son exposition aux carcinogènes et de la séquence temporelle des événements qui conduisent à la transformation ; ainsi l'incidence de la méthylation d'un promoteur de gène ST est souvent élevée lorsque le gène n'a pas ou peu subi de perte d'hétérozygotie. Le rôle des méthylations localisées de l'ADN dans le processus de transformation et de progression tumorale est de mieux en mieux compris et ces anomalies sont réversibles sous l'effet de molécules inhibitrices, ce qui offre des perspectives thérapeutiques. Cependant, l'intérêt pour le clinicien d'une définition des anomalies épigénétiques dans la tumeur de son patient, reste à définir pour chaque type de tumeur. L'objectif de cet article est de faire le point sur les données actuelles concernant les méthylations des gènes ST dans les cancers des voies aériennes supérieures, ie :carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale, de l'oro-hypopharynx et du larynx à l'exception des tumeurs du cavum, des cavités naso-sinusiennes et des glandes salivaires dont l'épidémiologie, le traitement et le pronostic sont très différents.

## *Mécanisme d'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur par méthylation et méthodes d'analyse*

Nous rappelons brièvement les mécanismes d'inhibition d'un gène par méthylation et les techniques d'analyse mais le lecteur pourra se reporter pour plus de détails à une revue récente du bulletin du cancer par G. Filion et PA Defossez [4].

La mémoire épigénétique permet au cours du développement puis dans l'organisme adulte, à chaque type cellulaire, d'acquérir ses spécificités fonctionnelles puis de les conserver grâce à l'expression « tissu spécifique » de certains gènes et leur inactivation par méthylation dans d'autres tissus. Cette méthylation a lieu dans les régions promotrices des gènes au niveau des dinucléotides CpG ou « îlots CpG ». Ces régions de 0,5 et 4 kilobases ont une teneur en GC supérieure à 50% et un rapport CpG sur GpC d'au moins 0,6 [1]. Dans le génome humain, leur nombre serait de 29000 et 45000 et plus de 50% des gènes possèderaient des îlots CpG au niveau de leur promoteur. La méthylation de l'ADN, au niveau des îlots CpG, correspond à la substitution d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>), à partir d'un donneur, la S-adénosyl-méthionine (SAM), à un atome d'hydrogène sur le carbone 5 d'une cytosine située en position 5' d'une guanine ; Cette modification chimique est sous le contrôle d'enzymes, les DNA méthyltransférases ou DNMTs.

L'analyse de ces modifications, dans les prélèvements tumoraux, s'est "popularisée" avec le développement du traitement bisulfite associé soit à une amplification par PCR, soit à un séquençage appelé pyroséquençage [5] . A l'heure actuelle, la technique la plus utilisée est la MSP pour méthylation spécifique PCR. La première étape consiste en une modification chimique, au bisulfite de sodium, des cytosines non méthylées de l'ADN en uraciles alors que les 5-méthylcytosines sont conservées. La séquence d'ADN est donc modifiée différemment selon que les cytosines sont méthylées ou non. Cette différence est ensuite visualisée, après une amplification par PCR du gène étudié, à l'aide d'amorces spécifiques. Si le gène est méthylé dans l'échantillon analysé, la sensibilité de la méthode permet de détecter une cellule cancéreuse dans environ 1000 cellules normales. Récemment, une nouvelle technique, plus simple, associant traitement bisulfite et PCR quantitative en temps réel, permet de quantifier les niveaux de méthylation et de détecter 1 allèle méthylé dans 10 000 allèles non méthylés [6].

Quelque soit la technique utilisée, la recherche de méthylation dans des prélèvements tumoraux est facilitée par la stabilité de l'ADN au niveau des pièces opératoires conservées en paraffine ou dans des liquides biologiques contaminés par des cellules malignes ; de plus les

techniques d'amplification permettent de travailler sur de très faibles quantités d'ADN telles que celles obtenues à partir de biopsies tumorales ou de plasma. Enfin, contrairement aux pertes d'allèles, la méthylation d'un gène est enregistré comme un signal positif, plus facile à détecter au sein d'ADN non tumoral. La sensibilité de la technique dépend de la prévalence de l'anomalie dans le type tumoral analysé ; celle-ci n'est jamais de 100% mais l'analyse d'un panel de gènes permet d'augmenter la probabilité de détecter un événement anormal dans l'échantillon tumoral analysé. Si le gène étudié est méthylé, la sensibilité de la technique, allant de 1 pour 1000 à 1 pour 10 000, permet d'analyser des prélèvements contenant très peu de cellules malignes ou d'ADN tumoral comme les liquides biologiques au contact de la tumeur (salive, lavage broncho-alvéolaire, urine) ou le plasma [7] [8]. La spécificité de la technique dépend de la présence ou non de ces anomalies dans les tissus normaux environnant la tumeur et de leur exposition aux carcinogènes, tabac et alcool. Il faut cependant noter que la densité de méthylation d'un gène ST et donc le degré d'inactivation de sa transcription peut varier dans la cellule maligne et qu'il pourrait augmenter au cours des divisions. L'analyse de l'expression de la protéine est donc indispensable pour compléter une étude par biologie moléculaire

***Quels sont les principaux gènes méthylés dans les cancers des voies aériennes supérieures ?***

De nombreuses anomalies génétiques ont été décrites dans les carcinomes des VADS, qu'il s'agisse d'activation d'oncogènes ou de pertes de gènes ST sans qu'il y ait de signature moléculaire unique. Les anomalies génétiques les plus précoces sont des pertes sur les bras courts des chromosomes 9 puis 3, alors que les pertes sur le bras court du chromosome 17 apparaissent au stade de dysplasie ; au stade de carcinome invasif, les pertes sur les bras longs des chromosomes 11 et 13 précèdent les pertes sur les bras courts des chromosomes 8 et 6 et du bras long du chromosome 18. Au niveau de ces chromosomes, seuls 3 gènes ST, ie : p16, p53 et hOGG1 qui interviennent dans la réparation de l'ADN, ont été clairement impliqués dans les carcinomes des VADS [9]. Ce sont Herman et ses collaborateurs [10] qui rapportèrent pour la première fois que la méthylation du promoteur de P16 ou CDKN2A, était un autre mécanisme d'inactivation de ce gène dans les carcinomes des VADS. Depuis cette première étude, la méthylation de dix neuf autres gènes ST, pour la plupart impliqués dans d'autres tumeurs, a été analysée ; leurs localisations chromosomiques et leurs fonctions sont décrites dans le tableau 1.

La fréquence des anomalies liées à une méthylation d'un gène dans les tumeurs des VADS, varie suivant les gènes mais aussi d'une étude à l'autre (tableau 2) ; pour certains gènes, le nombre d'études et/ou d'échantillons analysés est trop faible pour permettre d'estimer la prévalence de la méthylation dans les cancers des VADS.

Quatre gènes sont fréquemment méthylés; ce sont aussi les plus étudiés, ie : p16, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire est méthylé dans 33% des échantillons environ ; ECAD (pour E cadherine) impliqué dans les phénomènes d'adhésion cellulaire et de métastases, est méthylé dans 56% des tumeurs des VADS ; MGMT, un agent de détoxification des adduits de l'ADN qui pourrait prédire la sensibilité à la chimiothérapie, est méthylé dans 32% des échantillons et DAPK (pour death associated protein kinase), impliqué dans l'apoptose, dans 27% d'entre eux. Nous avons, entre 2003 et 2005, analysé 90 tumeurs des VADS prélevées au diagnostic chez des patients caucasiens, exposés au tabac et/ou à l'alcool (résultats soumis à publication) ; nous confirmons la fréquence des méthylation de ces 4 gènes, mais nous avons aussi observé, dans 46% des tumeurs, une méthylation du gène TIMP3 qui code pour un inhibiteur des métalloprotéases impliqué dans les phénomènes de métastases et d'angiogenèse. Ce gène, qui n'avait jamais été étudié dans les cancers des VADS est méthylé dans 25 à 30% des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules et lié à l'intoxication tabagique [11]. TIMP3 est situé au niveau du bras long du chromosome 22 où les pertes d'hétérozygotie sont fréquentes dans le cancer du poumon mais n'ont jamais été décrites dans les cancers des VADS, suggérant que la méthylation du promoteur de TIMP3 est un mécanisme important d'inactivation de ce gène dans le cancer des VADS.

Le gène RAR  $\beta$  qui code pour le récepteur de l'acide rétinoïque, est fréquemment méthylé dans les cancers et les lésions prénéoplasiques des VADS mais cette anomalie est peu spécifique du processus tumoral [12], [13]. Quatre autres gènes, ie : p14 et p15 impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, RASSF1A, un homologue de RAS, et hMHL1 impliqué dans la réparation de l'ADN, sont méthylés, respectivement, dans 19%, 19%, 11,5% et 13% des échantillons tumoraux mais avec de grandes variations suivant les séries de la littérature, en particulier pour hMHL1. Dans notre série, nous confirmons les résultats de la littérature pour les 3 premiers gènes mais nous ne trouvons aucune méthylation de hMHL1 bien que ce gène soit fréquemment méthylés dans d'autres modèles tumoraux. Dix autres gènes ont été plus rarement analysés et nécessitent des études complémentaires pour confirmer leur intérêt dans les cancers des VADS. Ainsi, nous ne retrouvons pas l'existence de méthylation de ATM alors que la méthylation de DCC est présente dans 24% des échantillons de notre série,

celle de APC et FHIT, un gène dont la méthylation semble associée à l'intoxication tabagique, dans 10% d'entre eux.

***Existe-t-il un profil de méthylation spécifique des tumeurs des voies aériennes supérieures ?***

L'incidence des méthylations de chacun des gènes varie entre les différentes études ; Ces variations peuvent être expliquées par la taille faible de certaines cohortes, des différences de méthodes d'analyse, mais surtout par des différences dans les populations étudiées (origine ethnique, âge), dans les localisations tumorales et dans les expositions à des agents carcinogènes (tabac, alcool, bétel, infection éventuelle au virus HPV ...). Comme pour les anomalies génétiques, il n'existe pas d'anomalie épigénétique unique et présente dans toutes les tumeurs des VADS. Pour une exploitation de ces anomalies à but diagnostique, la sensibilité du test dépendra de l'incidence de l'anomalie dans ce type de tumeurs ; cette incidence est relativement faible pour chaque gène, nécessitant de définir un profil de méthylation pour les cancers des VADS et d'étudier un ensemble de gènes potentiellement anormaux. Ainsi, Ogi et coll [14] ont montré que l'analyse de 12 gènes permettait de détecter une anomalie d'au moins 1 d'entre eux chez 65% des patients, d'origine japonaise, porteurs d'un cancer des VADS. De même, Viswanathan et coll [15] ont sélectionné, pour une population indienne, 5 gènes qui leur permettaient de mettre en évidence une méthylation d'au moins un d'entre eux dans 75% des échantillons de cancer des VADS. Dans notre série de 90 malades caucasiens, nous avons montré que l'analyse de 6 gènes (ECAD, p16, TIMP3, MGMT, DAPK et RASSF1) permettait de mettre en évidence au moins un gène méthylé dans 75% des tumeurs des VADS analysées.

La méthylation des gènes ST peut être un évènement précoce au cours de la transformation de l'épithélium des voies aériennes supérieures et survenir plusieurs années avant les manifestations cliniques de cancer chez des sujets exposés au tabac ou à l'alcool. Ainsi la méthylation de p16 est détectable dans les biopsies de dysplasies sévères de la muqueuse buccale [16;12] ou dans des liquides de rinçage buccale chez des malades présentant des leucoplasies [17]. Il est donc nécessaire, si l'on veut exploiter les méthylations de gènes ST pour faire un diagnostic précoce de cancer des VADS, d'évaluer leur spécificité pour le processus tumoral et/ou le délai entre l'apparition des anomalies épigénétiques et celle d'un cancer. Au moins 2 équipes ont analysé les tissus normaux adjacents à la tumeur avec des résultats divergents : une incidence élevée des méthylations de p16, DAPK et MGMT dans ces tissus normaux pour Kulkarni [18] et nulle ou faible pour Maruya [12]. Dans notre série

nous avons, chez 30 malades, analysé la tumeur et la muqueuse histologiquement normale prélevée à quelques centimètres de la tumeur et mis en évidence une méthylation de TIMP3 ou DAPK que dans 3 muqueuses normales mais prélevées chez les malades ayant les tumeurs les plus évoluées. Les discordances entre ces études sont probablement liées à la définition du tissu sain (clinique ou histologique) et à la distance entre la zone de prélèvement du tissu sain et les marges de la tumeur.

***Les anomalies épigénétiques sont-elles détectables dans les liquides biologiques prélevés chez des malades porteurs de cancer des VADS ?***

Dans le cancer du poumon ou le cancer de vessie, la présence d'anomalies génétiques ou épigénétiques dans les liquides biologiques au contact de la tumeur (salive, expectorations ou urine) est bien démontrée [19]. Dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures, la salive contient des cellules malignes exfoliées, identifiables à l'examen cytologique si elles sont en nombre suffisant et l'on peut détecter des anomalies génétiques; mais peu d'études se sont intéressées à la recherche d'anomalies épigénétiques. L'étude de Rosas [7], portant sur 30 patients porteurs d'un carcinome des VADS au diagnostic, a montré qu'il était possible de détecter au niveau de la salive, la méthylation de l'un des 3 gènes, P16, MGMT et DAPK, chez deux tiers des patients présentant une de ces anomalies au niveau de la tumeur et seulement chez ceux là. La positivité de la salive est d'autant plus fréquente que la tumeur est localisée dans la cavité buccale. Notre étude conforte ces résultats ; nous avons analysé la méthylation des 9 gènes les plus fréquemment méthylés dans notre série (ie : TIMP3, ECAD, P16, MGMT, RASSF1A, DAPK, P15, P14, FHIT ) dans la salive de 60 patients porteurs d'un cancer des VADS au diagnostic ; 94% des échantillons de salive présentaient au moins une des anomalies présentes dans la tumeur avec une excellente concordance entre les méthylations observées dans la tumeur et dans la salive. Cette concordance «salive-tumeur» pour les cancers des VADS, est très supérieure à celle observée entre les liquides d'aspiration bronchique et les cancers du poumon. Nous n'avons pas détecté de méthylation dans des prélèvements de salive réalisés chez des sujets, sans pathologie cancéreuse, mais ayant les mêmes caractéristiques que la population souffrant de cancer des VADS (âge, sexe et intoxication tabagique ou éthylique.).

Les méthylations de gènes ST, comme les anomalies génétiques, peuvent aussi être recherchées dans l'ADN tumoral circulant présent dans le plasma ou le sérum de malades porteurs de cancer des VADS. Dans l'étude de Sanchez-Cespedes [20] portant sur 95 patients,

plus de la moitié des malades présentaient une méthylation de P16, MGMT ou DAPK dans la tumeur prélevée au diagnostic et 21 d'entre eux, une méthylation au niveau de l'ADN circulant. De même, Wong et coll. [21] ont analysé chez 20 patients, au diagnostic, la méthylation de p15 et p16 au niveau tumoral et plasmatique et ont retrouvé une méthylation d'un des 2 gènes dans 65% des échantillons sanguins.

***La recherche de méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs a-t-elle un intérêt dans la prise en charge des cancers des voies aériennes supérieures ?***

Il est possible d'envisager des applications cliniques, à la recherche de méthylation de gènes ST, car les méthodes d'analyse sont robustes, relativement spécifiques et sensibles pour permettre l'analyse de liquides biologiques à condition d'avoir défini un profil de méthylation caractéristique de la population étudiée. Une application évidente est le diagnostic précoce de la tumeur primitive chez des sujets à risque ou celui de la rechute. Le profil de méthylation observé dans la tumeur pourrait aussi avoir une valeur pronostique ou permettre de préciser le diagnostic lorsque l'examen histologique est difficile. Enfin, on peut espérer que la détermination de ces anomalies sera à l'origine de progrès thérapeutiques.

**Le diagnostic précoce.** Les cancers des voies aériennes supérieures affectent chaque année, environ 780 000 nouveaux patients dans le monde et 15 000 en France. Malgré des progrès dans la prise en charge thérapeutique, le taux de survie globale de ces cancers, tous stades et localisations confondus, est de 45%; l'absence d'amélioration significative depuis 20 ans est liée, essentiellement, à un diagnostic tardif et des rechutes locorégionales fréquentes et non curables si la tumeur est découverte à un stade trop avancé. Le diagnostic précoce des cancers des voies aériennes supérieures ou le dépistage, est difficile chez des patients qui refusent la prise en charge clinique pour de nombreuses raisons dont l'intoxication éthylo-tabagique. Il est plus simple de surveiller ces malades et d'envisager des méthodes de diagnostic précoce des rechutes lorsque ces malades ont déjà été pris en charge pour le traitement de la tumeur primitive. Plusieurs études suggèrent que la recherche systématique et régulière de méthylation de gènes ST dans la salive permettrait un diagnostic précoce des tumeurs primitives ou des rechutes de cancers des VADS mais ceci n'a jamais été confirmé dans une étude prospective. Nous avons, chez 22 patients traités par chirurgie et radiothérapie et suivis prospectivement, analysés régulièrement des prélèvements de salive et recherchés la méthylation de un ou plusieurs gènes anormaux dans la tumeur primitive. La

méthylation d'un ou plusieurs gènes a persisté ou est réapparue dans la salive, après traitement, chez 5 patients alors que l'examen clinique et par FDG-PET était négatif ; ils ont tous rechuté quelques mois après l'examen salivaire anormal et la détection, à un stade très précoce, a permis une chirurgie curatrice. Les examens salivaires étaient négatifs chez les 17 autres patients ; 16 sont en rémission et 1 seul a rechuté avec une tumeur d'évolution extrêmement rapide en quelques mois.

**Le pronostic.** Quelques études seulement suggèrent que la méthylation des gènes ST dans les cancers des VADS soit corrélée au pronostic ; ainsi, Fan [22] rapporte qu'en analyse statistique multivariée, la méthylation des gènes MGMT et ATM serait corrélée à une diminution de la survie des patients. Dans notre série et en analyse multivariée mais avec un suivi médian de 564 jours seulement, la présence d'un ou plusieurs gènes méthylés dans les tumeurs analysées, n'est pas corrélée au pronostic.

**L'aide à l'examen anatomo-pathologie.** Le profil de méthylation varie avec chaque type histologique, même lorsque les carcinogènes impliqués sont les mêmes. [11] ; ainsi, les profils de méthylation observés dans les cancers des voies aériennes supérieures et dans les cancers du poumon sont différents (tableau 3). Devant l'association d'un carcinome des voies aériennes et d'un carcinome du poumon chez un patient fumeur, 2 diagnostics peuvent être évoqués : l'association de 2 cancers primitifs ou un cancer primitif des VADS et une métastase pulmonaire. Ces 2 situations cliniques demandent des prises en charge différentes. L'examen anatomo-pathologique est souvent pris en défaut et pourrait être précisé par la définition des profils de méthylation. Une autre application potentielle est le contrôle de la qualité des berges de la tumeur pendant la chirurgie. Elle repose, aujourd'hui, sur un examen histologique extemporané ; Goldenberg et coll [23] ont montré qu'il était possible de détecter, par PCR quantitative, la présence de méthylation dans les berges de la tumeur durant le geste chirurgical.

**Les agents déméthylants en thérapie.** Le traitement de cellules malignes à l'aide d'agents déméthylants permet la réexpression des gènes inactivés par méthylation de leurs promoteurs. Contrairement aux anomalies génétiques, les anomalies épigénétiques sont donc réversibles ; ceci offre des possibilités thérapeutiques au stade de tumeurs établies mais surtout des possibilités de chimio-prévention chez des sujets exposés à des facteurs de risque. La 5-aza-2'déoxycytidine (Décitabine®), un inhibiteur de la DNMT1, a été utilisée pour le

traitement des cancers hématologiques, du col utérin et les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules mais il n'y a pas d'essais thérapeutiques dans le traitement des cancers des VADS. Cependant, même si dans les cellules normales, la méthylation des promoteurs intervient peu dans la régulation des gènes, ces molécules ne sont pas dénuées de toxicité, car elles ne sont pas totalement spécifiques des méthyltransférases de l'ADN.

Ainsi, à côté des DNMT d'autres molécules comme les HDAC, qui ciblent les histones déacétylases, peuvent être utilisées. Les inhibiteurs des HDAC appartiennent à 4 familles dont les plus connus sont les acides gras à courtes chaînes comme la trichostatine A et les tétrapeptides cycliques comme la trapoxine. Ces molécules ont montré une certaine efficacité en combinaison avec des traitements classiques dans les maladies hématologiques mais aucun essai n'a été mené dans les cancers des VADS. Les résultats expérimentaux orientent vers l'utilisation de ces inhibiteurs (HDAC ou DNMT) en combinaison avec des drogues classiques

### ***Conclusion et perspectives***

Depuis plusieurs années, notre compréhension des mécanismes génétiques et épigénétiques qui conduisent au cancer des VADS, a beaucoup progressé et leur connaissance ouvre des perspectives cliniques intéressantes, aussi bien pour le diagnostic que pour le traitement. Cependant, l'exploitation clinique en routine tarde un peu. Dans un objectif diagnostique, l'exploitation des méthylations de gènes ST nécessite de définir un panel optimum de gènes, caractéristique de la population étudiée, à moins que le développement des techniques d'analyse à haut débit, applicable à l'étude des méthylations de l'ADN, viennent remplacer l'analyse de gènes présélectionnés. Cependant, la définition d'un profil global de méthylation des gènes ST dans une tumeur devra être complété par celui des protéines car toute méthylation n'aboutit pas à une inactivation complète de l'expression et donc de la fonction de la protéine dans la tumeur. La validation de ces profils globaux de méthylation, comme celle des profils d'expression génique, nécessitent d'initier des études prospectives à grande échelle et de développer de nouveaux outils bioinformatiques, avant de pouvoir les exploiter en clinique. Au plan thérapeutique, la possibilité de corriger les lésions épigénétiques ouvrent de vraies perspectives de chimio-prévention dans des populations à risque, pour lesquelles on aurait déterminé que ces anomalies sont suffisamment importantes pour conduire au cancer.

## **Références:**

1. Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21.
2. Ehrlich, M. 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21:5400-5413.
3. Feinberg, A.P., Gehrke, C.W., Kuo, K.C., and Ehrlich, M. 1988. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 48:1159-1161.
4. Filion, G.J., and Defossez, P.A. 2006. [Epigenetics and cancer]. *Bull Cancer* 93:343-347.
5. Curtis, C.D., and Goggins, M. 2005. DNA methylation analysis in human cancer. *Methods Mol Med* 103:123-136.
6. Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Blake, C., Shibata, D., et al. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28:E32.
7. Rosas, S.L., Koch, W., da Costa Carvalho, M.G., Wu, L., Califano, J., Westra, W., et al. 2001. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 61:939-942.
8. de Fraipont, F., Moro-Sibilot, D., Michelland, S., Brambilla, E., Brambilla, C., and Favrot, M.C. 2005. Promoter methylation of genes in bronchial lavages: a marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 50:199-209.
9. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., et al. 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488-2492.
10. Herman, J.G., Merlo, A., Mao, L., Lapidus, R.G., Issa, J.P., Davidson, N.E., et al. 1995. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525-4530.
11. Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., and Herman, J.G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229.
12. Maruya, S., Issa, J.P., Weber, R.S., Rosenthal, D.I., Haviland, J.C., Lotan, R., et al. 2004. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clin Cancer Res* 10:3825-3830.
13. Shaw, R.J., Liloglou, T., Rogers, S.N., Brown, J.S., Vaughan, E.D., Lowe, D., et al. 2006. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 94:561-568.

14. Ogi, K., Toyota, M., Ohe-Toyota, M., Tanaka, N., Noguchi, M., Sonoda, T., et al. 2002. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:3164-3171.
15. Viswanathan, M., Tsuchida, N., and Shanmugam, G. 2003. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 105:41-46.
16. Kresty, L.A., Mallery, S.R., Knobloch, T.J., Song, H., Lloyd, M., Casto, B.C., et al. 2002. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 62:5295-5300.
17. Lopez, M., Aguirre, J.M., Cuevas, N., Anzola, M., Videgain, J., Aguirregaviria, J., et al. 2003. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients--a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur J Cancer* 39:2306-2309.
18. Kulkarni, V., and Saranath, D. 2004. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 40:145-153.
19. Belinsky, S.A., Klinge, D.M., Dekker, J.D., Smith, M.W., Bocklage, T.J., Gilliland, F.D., et al. 2005. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin Cancer Res* 11:6505-6511.
20. Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Wu, L., Nawroz-Danish, H., Yoo, G.H., Koch, W.M., et al. 2000. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 60:892-895.
21. Wong, T.S., Man, M.W., Lam, A.K., Wei, W.I., Kwong, Y.L., and Yuen, A.P. 2003. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR. *Eur J Cancer* 39:1881-1887.
22. Fan, C.Y. 2004. Epigenetic alterations in head and neck cancer: prevalence, clinical significance, and implications. *Curr Oncol Rep* 6:152-161.
23. Goldenberg, D., Harden, S., Masayeva, B.G., Ha, P., Benoit, N., Westra, W.H., et al. 2004. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:39-44.
24. Hasegawa, M., Nelson, H.H., Peters, E., Ringstrom, E., Posner, M., and Kelsey, K.T. 2002. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 21:4231-4236.

25. Nakahara, Y., Shintani, S., Mihara, M., Ueyama, Y., and Matsumura, T. 2001. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 163:221-228.
26. Yeh, K.T., Chang, J.G., Lin, T.H., Wang, Y.F., Tien, N., Chang, J.Y., et al. 2003. Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol Rep* 10:659-663.
27. Chang, H.W., Chow, V., Lam, K.Y., Wei, W.I., and Yuen, A. 2002. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 94:386-392.
28. Nakayama, S., Sasaki, A., Mese, H., Alcalde, R.E., Tsuji, T., and Matsumura, T. 2001. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 93:667-673.
29. Dong, S.M., Sun, D.I., Benoit, N.E., Kuzmin, I., Lerman, M.I., and Sidransky, D. 2003. Epigenetic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 9:3635-3640.
30. Ai, L., Vo, Q.N., Zuo, C., Li, L., Ling, W., Suen, J.Y., et al. 2004. Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:150-156.
31. Chang, K.W., Kao, S.Y., Tzeng, R.J., Liu, C.J., Cheng, A.J., Yang, S.C., et al. 2002. Multiple molecular alterations of FHIT in betel-associated oral carcinoma. *J Pathol* 196:300-306.
32. Gao, S., Worm, J., Guldborg, P., Eiberg, H., Krogdahl, A., Sorensen, J.A., et al. 2004. Loss of heterozygosity at 9q33 and hypermethylation of the DBCCR1 gene in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 91:760-764.
33. Gao, S., Worm, J., Guldborg, P., Eiberg, H., Krogdahl, A., Liu, C.J., et al. 2004. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 109:230-237.
34. Tsou, J.A., Hagen, J.A., Carpenter, C.L., and Laird-Offringa, I.A. 2002. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 21:5450-5461.
35. Chan, E.C., Lam, S.Y., Tsang, K.W., Lam, B., Ho, J.C., Fu, K.H., et al. 2002. Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage. *Clin Cancer Res* 8:3741-3746.

36. Topaloglu, O., Hoque, M.O., Tokumaru, Y., Lee, J., Ratovitski, E., Sidransky, D., et al. 2004. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. Clin Cancer Res 10:2284-2288. Order.

**Tableau 1** : Dénomination, localisation chromosomique et fonction des gènes ST méthylés dans les cancers des VADS

<b>Abréviation</b>	<b>Dénomination complète</b>	<b>Localisation</b>	<b>Cible</b>
<b>P16</b>	= INK4A, = CDKN2A, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	9p21	Cycle cellulaire
<b>MGMT</b>	O <sup>6</sup> -methylguanine DNA methyltransferase	10q26	Réparation de l'ADN
<b>DAPK</b>	Death-associated protein kinase 1	13q34	Apoptose
<b>ECAD</b>	E-cadherin	16q22	Adhésion cellulaire
<b>P14</b>	= ARF, androgen receptor factor	9p21	Cycle cellulaire
<b>P15</b>	= INK4B, CDKN2B, cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	9p21	Cycle cellulaire
<b>RASSF1A</b>	Ras effector homolog	3p21	Apoptose
<b>HMLH1</b>	Human homolog of bacterial Mut L	3p21	Réparation de l'ADN
<b>Rar<math>\beta</math></b>	Retinoic acid receptor $\beta$	3p24	Apoptose
<b>APC</b>	Adenomatosis polyposis coli	5q21-22	Adhésion cellulaire
<b>GSTP1</b>	Glutathione S-transferase $\pi$	11q13	Détoxification carcinogène
<b>VHL</b>	Von Hippel-Lindau suppressor gene	3p 25-26	Gène suppresseur
<b>P73</b>	Tumor protein 73	1p36	Angiogénèse, apoptose
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated gene	11q22	Réparation ADN
<b>DCC</b>	Cell-cell adhesion "Deleted in Colorectal Cancer"	18q21	Adhésion cellulaire
<b>FHIT</b>	Fragile histidine triad	3p14.2	Apoptose
<b>DBC1</b>	Deleted in bladder cancer 1	9q32-33	Cycle cellulaire
<b>ABO</b>	ABO blood group	9q34	Adhésion cellulaire
<b>P53</b>	TP53 gene	17p13	Apoptose

**Tableau 2:** Methylation des gènes ST dans les cancers des VADS : données de la littérature

gène	nombre d'études analysées	Références les plus significatives	Nombre d'échantillons étudiés	Nombre d'échantillons méthylés	% méthylation
P16	10	[7, 12, 14, 15, 20, 24-26]	62 (30 –100)	20 (10 –28)	33 (27 – 50)
MGMT	6	[7, 12, 15, 18, 20]	61 (32 –99)	20 (7 – 41)	32 (20 – 52)
DAPK	7	[7, 12, 14, 18, 20, 22, 24]	64 (30 – 100)	16 (7 – 41)	27 (7 –68)
ECAD	7	[12, 15, 18, 24, 26-28]	63 (23 – 100)	34 (10 - 64)	56 (31 –85)
P14	3	[12, 14]	68 (32 –96)	13 (5 –20)	19 (14 – 26)
P15	3	[14, 15, 26]	81 (48 – 99)	14 (6 –23)	19 (6 –27)
RASSF1A	2	[24, 29]	68	7	11,5
hMLH1	3	[14, 15, 22]	105 (96 –120)	16 (0 39)	13 (0 –32)
Rarβ	2	[12, 13]	56 (32-79)	36 (15-58)	60 (47-73)
APC	1	[11]	10	0	0
GSTP1	2	[20, 22]	70 (41 –100)	0	0
VHL	1	[26]	48	0	0
P73	1	[12]	32	1	3
ATM	1	[30]	100	25	25
DCC	1	[14]	96	16	16
FHIT	1	[31]	29	8	27
DBC1	1	[32]	34	15	44
ABO	1	[33]	30	10	33
P53	1	[26]	48	2	4

**Tableau 3** Comparaison de l'incidence des méthylations de 11 gènes étudiés dans les cancers des VADS et les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CPNPC).

Gene	VADS *			CPNPC **		
	Echantillons méthylés (n=)	Echantillons analysés (n=)	Proportion (%)	Echantillons méthylés (n=)	Echantillons analysés (n=)	Proportion (%)
p16	198	615	33	334	945	35
p15	42	243	19	0	63	0
p14	38	204	19	13	295	4
MGMT	120	364	32	122	513	25
DAPK	115	448	27	173	613	28
ECAD	173	342	56	107	19	18
RASSF1A	13	126	11.5	80	230	35
hMLH1	47	315	13	3	20	0
Rarβ	73	111	60	182	218	39
APC	0	10	0	230	311	74
GSTP1	0	141	0	14	174	8

\* : chiffres extraits du tableau 2.

\*\* : chiffres extraits des données de Tsou et al. [34], de de Fraipont et al. [8], de Chan et al. [35] et de Topaloglu et al. [36].

## **CONCLUSIONS – PERSPECTIVES**

Notre travail a permis de préciser que :

- 1) l'étude de la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur par MSP est une méthode sensible et spécifique ;
- 2) la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur tient une part importante dans quatre étapes clés (réparation de l'ADN, contrôle du cycle cellulaire, apoptose, adhésion cellulaire) de la cancérogenèse des carcinomes des VADS ;
- 3) certains gènes sont fréquemment méthylés permettant de définir un profil de méthylation ou « méthylotype », différent de tumeurs proches de part leur histologie et les toxiques impliqués dans leur cancérogenèse, tels que les cancers du poumon, contribuant ainsi à une meilleure caractérisation tumorale ;
- 4) l'étude de la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur au niveau salivaire est possible avec une bonne corrélation entre les résultats obtenus dans ce milieu et ceux obtenus au niveau tumoral ;
- 5) l'étude de la méthylation des gènes suppresseurs de tumeur dans la salive après traitement, même si celui-ci a comporté de la radiothérapie, représente une méthode de surveillance et de détection précoce des rechutes tumorales et constitue donc un biomarqueur potentiel utile aux cliniciens en complément de l'examen clinique ;

Par ailleurs il semble que :

- 1) la présence d'une ou plusieurs méthylations au sein des tumeurs ne soit pas prédictive d'une rechute locale du cancer et n'ait pas de valeur pronostique. Néanmoins, s'agissant d'une étude prospective, la médiane de suivi des patients est faible, ce qui ne nous permet pas de conclure définitivement à ce sujet ; toutefois trois facteurs de mauvais pronostic validés dans les cancers malpighiens des VADS sont retrouvés dans notre travail : le stade tumoral, la différenciation tumorale et les antécédents de radiothérapie. Ceci nous conforte dans le fait que la population étudiée était bien représentative des patients pris en charge pour ce type de cancer.

- 2) la méthylation du gène Rar $\beta$  n'est pas spécifique du tissu tumoral contrairement aux autres gènes que nous avons analysés ;

Outre les 16 gènes que nous avons déjà analysés, nous envisageons dans l'avenir d'étudier l'ensemble des gènes qui ont été décrits dans la littérature comme fréquemment méthylés dans les cancers des VADS, ce qui devrait permettre d'atteindre un chiffre compris entre 25 et 30 gènes, le but étant d'arriver à ce que la totalité des tumeurs étudiées ait au moins un gène méthylé.

Une fois cette étape atteinte, nous pourrions alors définir un méthylotype plus « robuste » que celui que nous avons défini.

Une fois ce méthylotype défini, il nous semble intéressant de l'étudier au niveau tumoral et au niveau des adénopathies métastatiques.

En effet, il sera peut-être alors possible de dire si la méthylation d'un ou plusieurs gènes est prédictive d'un envahissement ganglionnaire cervical.

Cette étude est intéressante surtout pour les patients ayant un cou dit « N0 clinique », c'est-à-dire n'ayant pas de ganglion décelable cliniquement et ou radiologiquement, mais chez lesquels 20 à 30% d'envahissement ganglionnaire histologique est retrouvé, quelque soit la localisation.

Si la méthylation d'un ou plusieurs gènes au niveau tumoral est corrélée au risque de métastase ganglionnaire, nous pourrions alors envisager de sélectionner les patients pour qui un évidement ganglionnaire est utile, contribuant ainsi à faire diminuer la morbidité chirurgicale liée aux évidements ganglionnaires cervicaux.

Une autre application possible est l'analyse épigénétique des berges tumorales histologiquement saines pour déterminer si la présence de méthylations dans ces tissus est corrélée à un taux de rechute locale plus élevée ; si tel était le cas, ce pourrait être un moyen de sélectionner des patients pour une radiothérapie post opératoire.

Ce type d'étude est superposable avec l'analyse des instabilités microsatellites réalisée par Temam et ses collaborateurs (Temam, 2004b). Les premiers résultats de cette étude ont conduit à la mise en place d'un PHRC national (« protocole marge ») dont le centre investigateur est l'Institut Gustave Roussy (IGR) et auquel le service ORL du CHU de Grenoble participe. Nous envisageons de collaborer avec l'IGR pour compléter les analyses génétiques réalisées par une analyse épigénétique.

L'étude de ces gènes devra également être faite au niveau sanguin, afin de voir si le sang (sérum / plasma) représente un moyen de surveillance intéressant pour les patients.

Pour cela, la mise au point de la MSP pour l'analyse des ces échantillons devra être finalisée.

En comparant les résultats obtenus au niveau salivaire et sanguin, il nous sera alors possible de dire si un de ces deux moyens de surveillance est plus efficace que l'autre ou s'ils sont complémentaires.

A terme, il sera indispensable de mettre au point une méthode d'analyse plus rapide des méthylations quelque soit le milieu étudié (tumeur, salive, sang) en ayant recours à une technologie automatisée et informatisée telle qu'une biopuce à ADN, permettant d'étudier les gènes les plus informatifs.

Nous nous sommes jusqu'alors intéressés qu'aux patients traités pour une tumeur des VADS.

Hors, si nous voulons être efficace en terme de dépistage primaire de ces cancers, il faudra étudiés par le biais de la salive et/ou du sang, les sujets ayant un haut risque de développer un cancer des VADS à savoir les sujets éthylo-tabagiques.

En fonction des résultats, nous pourrons alors dire si l'étude des altérations épigénétiques représente ou non un intérêt pour le dépistage de masse de ce type de cancer.

Enfin, il apparaît que les thérapies déméthylantes qui ont déjà été testées dans d'autres types de cancers peuvent avoir un intérêt pour le traitement des cancers des VADS.

Aucune recherche dans ce domaine n'a été entreprise pour les cancers des VADS.

Nous envisageons donc une coopération avec l'unité de recherche clinique en cancérologie du CHU de grenoble afin de tester les inhibiteurs de la DNMT1 et des HDAC seuls, ou en associations avec des sels de Platine qui comptent parmi les agents cytotoxiques les plus actifs dans ce type de cancer, dans le cadre d'un essai thérapeutique de phase III.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, et al.** Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-9.
- Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, et al.** Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 3155-9.
- Ai L, Stephenson KK, Ling W, et al.** The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma : a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod pathol* 2003; 16: 944-50.
- Ai L, Vo QN, Zuo C, et al.** Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) gene in head and neck squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation with clinical correlation in 100 cases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 150-6.
- Almadori G, Paludetti G, Cerullo M, Ottaviani F, d'Alatri L.** Marijuana smoking as a possible cause of tongue carcinoma in young patients. *J Laryngol Otolology* 1990; 104: 896-9.
- An Q, Liu Y, Gao Y et al.** Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non small cell lung cancer patients. *Cancer lett* 2002; 188: 109-14.
- André K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P.** Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer : a case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncol* 1995; 31: 301-9.
- Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR.** Microsatellite instability in human solid tumors (review). *Cancer* 1998; 82: 1808-20.
- Baatenburg de Jong RJ, Hermans JO, Molenaar J, Briaire JJ, le Cessie S.** Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2001; 23: 718-24.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K.** Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 3-28.
- Belinsky SA.** Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nature Rev Cancer* 2004; 4: 1-9.
- Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, et al.** Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1945-52.
- Bestor TH.** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum mol Genet* 2000; 9: 2395-402.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M.** A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397: 579-83.
- Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Block G.** Vitamin C and cancer prevention : the epidemiologic evidence. *Am J Clin Wutz* 1991; (suppl) 53: 270-82.

- Blons H, Cabelguenne A, Carnot F, et al.** Microsatellite analysis and response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999a; 84: 410-5.
- Blons H, Radicella P, Laccourreye O, et al.** Frequent allelic loss at chromosome 3p distinct from genetic alterations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene in head and neck cancer. *Mol Carcinog* 1999b; 26: 254-60.
- Blons H, Laccourreye O, Houillier AM, et al.** Delineation and candidate gene mutation screening of the 18q22 minimal region of deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2002; 21: 5016-23.
- Blons H, Laccourreye O, Laurent-Puig P.** Altérations cellulaires et cancérogenèse ORL, marqueurs moléculaires et cibles thérapeutiques potentielles. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2003; 120: 152-60.
- Bockmuhl U, Wolf G, Schmidt S, et al.** Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck* 1998; 20: 145-51.
- Bolla M, Laplanche A, Lefur R, et al.** Prevention of second primary tumours with a second generation retinoid in squamous cell carcinoma of oral cavity and oropharynx : long term follow-up. *Eur J Cancer* 1996; 32: 375-6.
- Bonner JA, Giralt J, Harari P, et al.** Cetuximab prolongs survival in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: A phase III study of high dose radiation therapy with or without cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 22 ASCO Annual Meeting Proceedings, p.5507.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al.** Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 6: 567-78.
- Boulet D, Aubey C.** La consommation d'alcool en France de 1950 à 1982. Haut comité d'études et d'information sur l'alcoolisme, 1984 ; pp 269-84.
- Bourhis J, Lubin R, Roche B, et al.** Analysis of P53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1228-33.
- Bourhis J, Wibault P, Lusinchi A, Bobin S, Eschwege F.** Status of accelerated fractionated radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Current Opin Oncol* 1997; 9: 262-6.
- Bourhis J, Lapeyre M, Rives M et al.** Very accelerated radiotherapy in HNSCC: results of the GORTEC 94-02 randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000a; 19: 412a.
- Bourhis J, Lartigau E.** Biomodulation and radiotherapy. *Cancer Radiother* 2000b; (suppl) 4 : 128-33.
- Bourhis J, Wibault P, Lusinchi A, Eschwege F.** La radiothérapie dans les carcinomes des voies aéro-digestives supérieures. Bilan et perspectives. Dans : Masson, ed. *Cancers des voies aéro-digestives supérieures. Données actuelles.* Marandas P. Paris ; 2004, pp.85-103.

- Cabarrot E.** Epidémiologie, cancérogenèse, développement tumoral, classifications. Dans Masson, ed. Cancérologie générale. Cabarrot E, Lagrange JL, Zucker JM. Paris ; 2004, pp 23.
- Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, et al.** p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1465-73.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, et al.** Genetic progression model for head and neck cancer : implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-92.
- Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D.** Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 347-52.
- Caponigro F.** Rational and clinical validation of epidermal growth factor receptor as a target in the treatment of head and neck cancer. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 311-20.
- Chan EC, Lam SY, Tsang KW, et al.** Aberrant promoter methylation in chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3741-6.
- Chang KW, Kao SY, Tseng RJ, et al.** Multiple molecular alterations of FHIT in betel-associated oral carcinoma. *J pathol* 2002a; 196: 300-6.
- Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen A.** Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002b; 94: 386-92.
- Chao KS, Majhail N, Huang C, et al.** Intensity-modulated radiation therapy reduces late salivary toxicity without compromising tumor control in patients with oropharyngeal carcinoma: a comparison with conventional techniques. *Radiother Oncol* 2001; 61: 275-80.
- Chen AY, Matson LK, Roberts D, Goepfert H.** The significance of comorbidity in advanced laryngeal cancer. *Head Neck* 2001; 23: 566-72.
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R.** DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89-93.
- Cheng L, Eicher SA, Cuo Z.** Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 465-8.
- Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q.** Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 1999; 84: 220-4.
- Collela S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R.** Sensitive and quantitative universal pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35: 146-50.
- Cottrell SE, Laird PW.** Sensitive detection of DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 120-30.

- Daly-Schweitzer N.** Radiothérapie des cancers, lésions radio-induites dans les cellules de mammifères. Dans : Masson, ed. Cancérologie clinique. Daly-Schweitzer N ; Paris ; 1998, pp 37-45.
- De Fraipont F, Moro-Sibilot D, Michelland S, Brambilla E, Brambilla C, Favrot MC.** Promoter methylation of genes in bronchial lavages : a marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer ? Lung Cancer 2005; 50: 199-209.
- Denis F, Garaud P, Bardet E, et al.** Late toxicity results of the GORTEC 94-01 randomized trial comparing radiotherapy with concomitant radiochemotherapy for advanced-stage oropharynx carcinoma: comparison of LENT/SOMA, RTOG/EORTC, and NCI-CTC scoring systems. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 55: 93-8.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP.** Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science 1996; 274: 430-2.
- Dhenault A, Boiteux S, Radicella JP.** Genomic structure and promoter characterization of the human 8-OH-guanine glycosylase gene (OGG1) gene. GenBank accession AJ 131341, 1999.
- Dizdaroglu M.** Chemical detection of free radical-induced damage to DNA. Free radical Biol Med 1991; 10: 225-242.
- Doll R, Peto R.** Mortality in relation to smoking : 20 years' observations on male. British doctors. Br Med J 1976; 2: 1525-36.
- Dong A, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH, Cheng X.** Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. Nucleic Acids Res 2001; 29: 439-48.
- Dong SM, Sun DI, Benoit NE, Kuzmin I, Lerman MI, Sidransky D.** Epigenetic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. Clin Cancer Res 2003; 9: 3635-40.
- Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG.** De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. Anal Biochem 2004; 333: 119-27.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al.** Methylight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research 2000; 28: e32.
- Ehrlich M.** DNA methylation in cancer: too much, but also too little. Oncogene 2002; 21: 5400-13.
- Eisen EA, Tolbert PE, Hallock MF, Monson RR, Smith TJ, Woskie SR.** Mortality studies of machining fluid exposure in the automobile industry. A case control study of larynx cancer. Am J Int Med 1994; 26 : 185-202.
- EI-Deiry WS.** The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. Oncogene 2003; 22: 7486-95.
- EI-Naggar AK, Hurr K, Huff V, Clayman GL, Luna MA, Batsakis JG.** Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. Am J Pathol 1996; 148: 2067-72.

- Estécio MR, Youssef EM, Rahal P, et al.** LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas. *Oncogene* (in press).
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al.** Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350-4.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-9.
- Faivre S, Temam S.** La chimiothérapie dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures. Dans : Masson, ed. *Cancers des voies aréo-digestives supérieures. Données actuelles.* Marandas P. Paris ; 2004, pp.57-66.
- Fan CY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY.** Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 1079-82.
- Fan CY, Barnes EL, Swalsky PA, et al.** Deficiency of oxidative DNA damage repair due to OGG1 mutation is a common event in malignant transformation of squamous mucosa of the head and neck and is not present in reactive squamous cell hyperplasia. *Mod pathol* 2000; 13: 137-40.
- Fan CY.** Genetic alterations in head and neck cancer : interactions among environmental carcinogens, cell cycle control, and host DNA repair. *Curr Oncol Rep* 2001; 3: 66-71.
- Fan CY.** Epigenetic alterations in head and neck cancer: prevalence, clinical significance, and implications. *Curr Oncol Rep* 2004; 6: 152-61.
- Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, et al.** Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 1079-82
- Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M.** Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988; 48: 1159-61.
- Ferlay J, Black RJ, Pisani P, Valdivieso MT, Parkin DM.** *Eucan 90 : cancer in the European Union.* IARC. Lyon, 1996.
- Field JK.** Genomic instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1996; 16: 2421-31.
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, et al.** Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 2000; 287: 2017-19.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D.** Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 1890-1900.
- Fouret P, Temam S, Charlotte F, Lacau-St-Guily J.** Tumour stage, node stage, p53 gene status, and bcl-2 protein expression as predictors of tumour response to platinum-fluorouracil chemotherapy in patients with squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 2002; 87: 1390-5.

- Franceschi S, Talamini R, Barra S, et al.** Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 1990; 50: 6502-7.
- Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV et al.** Risk factors for oral cancer in Brazil : a case-control study. *Int J Cancer* 1989; 43 : 992-1000.
- Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T.** Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J* 2001; 20: 2536-44.
- Gao S, Worm J, Guldberg P et al.** Loss of heterozygosity at 9q33 and hypermethylation of the DBCCR1 gene in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2004a; 91: 5295-300.
- Gao S, Worm J, Guldberg P, et al.** Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004b; 109: 230-7.
- Gatsman BR, Atarshi Y, Reichert TE, et al.** Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 1999; 59: 5356-64.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al.** Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300: 489-92.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al.** Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.
- Grandis JR, Tweardy DJ.** TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1993: 188-91.
- Gregoire V, Maingon P.** Intensity-modulated radiation therapy in head and neck squamous cell carcinoma: an adaptation of 2-dimensional concepts or a reconsideration of current clinical practice. *Semin Radiat Oncol* 2004; 14: 110-20.
- Guenel P, Brugère J, Leclerc A, Luce D, Rodriguez J.** Etude des risques liés à la consommation d'alcool, sur une série de cas français de cancer des voies aérodigestives supérieures. *Haut comité d'étude et d'information sur l'alcoolisme* 1986; 4 : 253-64.
- Gustavsson P, Jakobsson R, Juhansson H, Lewin F, Norell S, Rutkuist LE.** Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus : a case control study in Sweden. *Occ Environ Med* 1998; 55: 393-400.
- Ha PK, Califano JA.** Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 2006; 7: 77-82.
- Hammond ME, Taube SE.** Issues and barriers to development of clinically useful tumor markers: a development pathway proposal. *Semin Oncol* 2002; 29: 213-21.
- Hasegawa M, Nelson NH, Peters E, et al.** Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002; 21: 4231-6.

- Herman JG, Merlo A, Mao L.** Inactivation of the CDKN2/p16/MST1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-30.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-6.
- Herman JG, Baylin SB.** Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-54.
- Hill C, Koscielny S, Doyon F, Benahmou E.** Evolution de la mortalité par cancer en France, 1950-1990, mise à jour 1986-1990. Paris : Inserm, 1993, pp1-87.
- Hill C.** Epidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures. *Bull Cancer* 2000; 5: 5-8.
- Hobbs CG, Birchall MA.** Human papillomavirus infection in the aetiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12: 88-92.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al.** p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Hong WK, Luppmar SM, Itri LM, et al.** Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1990; 323: 795-801.
- Huang MJ, Yeh KT, Shih HC, et al.** The correlation between CpG methylation and protein expression of p16 in oral squamous cell carcinomas. *Int J Mol Med* 2002; 10: 551-4.
- International Agency for Research on Cancer. Tobacco habits other than smoking.** IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Volume 37. IARC. Lyon, 1985 ; pp 37-140.
- International Agency for Research on Cancer. Alcohol drinking.** IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Volume 44. IARC. Lyon, 1988 ; pp 1-416.
- International Agency for Research on Cancer. Nickel and nickel compounds.** IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 49. IARC. Lyon, 1990 ; pp 1-405.
- International Agency for Research on cancer. Mechanistic consideration in the molecular epidemiology of head and neck cancer.** IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Volume 40. IARC. Lyon, 2004 ; pp 393-414.
- Ito T, Fujieda S, Tsuzuki H, et al.** Decreased expression of Bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 1999; 140: 81-91.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al.** DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-65.
- Jang SJ, Chiba I, Hirai A, Hong WK, Mao L.** Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related ? *Oncogene* 2001; 20: 2235-42.

- Janot F, Rhein B, Koka V.** Préservation laryngée par chimiothérapie première. A propos de l'expérience de deux centres du GETTEC dans les cancers de l'endolarynx traités entre 1985 et 1995. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 2002 ; 119: 12-20.
- Janot F, Julieron M, Leridant AM.** La chimiothérapie de conservation d'organe dans les cancers du larynx et de l'hypopharynx. Dans : Masson, ed. *Cancers des voies aérodigestives supérieures. Données actuelles.* Marandas P. Paris ; 2004, pp. 67-76.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al.** Cancer Statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29.
- Johnston AS, Piccirillo JF, Creech CM, et al.** Validation of comorbidity education program. *J Reg Manag* 2001; 28: 125-31.
- Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature* 2002; 3: 415-28.
- Julieron M.** La réparation mandibulaire. Dans : Masson, ed. *Cancers des voies aérodigestives supérieures. Données actuelles.* Marandas P. Paris ; 2004, pp.107-14.
- Kapranos N, Stathopoulos GP, Manolopoulos L, et al.** p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res* 2001; 21: 521-8.
- Khuri FR, Lee JJ, Lippman SM, et al.** Randomized phase III of low-dose isotretinoin for prevention of second primary tumors in stage I and II head and neck cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 426-7.
- Ko YC, Huang YL, Lee CH.** Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 450-3.
- Kowalski LP, Carvalho AL.** Socio-economic factors. In Taylor & Francis, ed. *Prognosis in head and neck cancer.* Baatenburg de Jong RJ. London; 2006, pp 257 - 68.
- Kulkarni V, Saranath D.** Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004; 40: 145-53.
- Kuo MY, Jeng JH, Chiang CP, Hahn LJ.** Mutations of Ki-ras oncogene codon 12 in betel quid chewing-related human oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 70-4.
- Laird PW.** The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev cancer* 2003; 3: 253-66.
- Landis SH, Murray T, Bolden S.** Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 595-604.
- Lavieille JP, Righini C, Reyt E, Brambilla C, Riva C.** Implications of p53 and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34: 84-92.
- Ledermann S.** Alcool, alcoolisme et alcoolisation. Travaux et documents, Institut national d'études démographiques, 1964, cahier N°4.

- Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, Kirkpatrick A, Collette L, Sahmoud T.** Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a european organization for research and treatment of cancer phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 890-9.
- Lese CM, Rossie KM, Appel BN, et al.** Visualization of Int2 and Hst1 amplification in oral squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes & Cancer* 1995; 12: 288-95.
- Le Tourneau C, Velten M, Jung GM, Bronner G, Flesch H, Borel C.** Prognostic indicators for survival in head and neck squamous cell carcinomas : analysis of a series of 621 cases. *Head Neck* 2005; 27: 801-8.
- Li X, Lee NK, Ye YW, et al.** Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1524-9.
- Lopes Bittencourt Rosas S, Koch W, et al.** Promoter hypermethylation patterns of p16, O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-methyltransferase, and Death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 939-42.
- López M, Aguirre JM, Cuevas N, et al.** Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients – a diagnostic and/or pronostic tool ? *Eur J cancer* 2003; 39: 2306-9.
- Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, et al.** Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 2006, 28: 256-69.
- Lowe, SW, Lin AW.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-95.
- Mackerras D, Buffler PA, Randall DE, Nichaman MZ, Pickle LW, Mason TJ.** Carotene intake and the risk of laryngeal cancer in coastal Texas. *Am J Epidemiol* 1988; 128: 980-8.
- Maier H, Zoller J, Hermann A, Kreiss M, Heller WD.** Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1993; 103: 655-61.
- Maier H, Sennewald E, Heller GF, Weidner H.** Chronic alcohol consumption; the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1994; 110: 168-73.
- Mandelsohn J.** Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20 :1-13.
- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al.** Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 1996; 271: 659-62.
- Marandas P, Marandas N.** Situation actuelle des cancers des voies aéro-digestives supérieures en France et données épidémiologiques. Dans : Masson, ed. *Cancers des voies aréo-digestives supérieures. Données actuelles.* Marandas P. Paris ; 2004, pp.3-20.
- Marshall JR, Graham S, Haughey BP, et al.** Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1992; 28: 9-15.

- Maruya S, Issa JP, Weber RS, et al.** Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3825-30.
- Mc Kaig RG, Baric RS, Olshan AF.** Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head neck* 1998; 20: 250-65.
- Ménégoz F, Chérié-Challine L.** Le cancer en France. Incidence et mortalité. Situation en 1995-Evolution entre 1975 et 1995. Les registres des cancers français (FRANCIM) et le ministère de l'Emploi et de la solidarité (DGS). Paris : Documentation française, 1998.
- Ménégoz F, Exbrayat C, Colonna M, Aude AM, Schaerer R.** Le bulletin du registre du cancer de l'Isère N°1, 1999.
- Ménégoz F, Macé Lesec'h J, Ravie JP, et al.** Les cancers de la lèvre, de la cavité buccale et du pharynx en France : incidence, mortalité et tendance (période 1975-1995). *Bull Cancer* 2002; 89: 419-29.
- Méric JB, Zelek L, Khayat D.** Cancers des voies aéro-digestives supérieures. Dans : Masson, ed. Guide pratique de cancérologie, 3<sup>ème</sup> édition. Méric JB, Zelek L, Khayat D. Paris ; 2004, pp. 77-86.
- Meyerhardt JA, Mayer RJ.** Follow-up strategies after curative resection of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 349-60.
- Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A.** Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995; 55: 975-8.
- Miller CS, Jhonstone BM.** Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma : a meta analysis, 1982 – 1997. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2001; 91 : 622–35.
- Mineta H, Miura K, Suzuki I, et al.** Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1011-7.
- Miyamoto K, Toshikazu U.** Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 293-301.
- Momparler RL, Bovenzi V.** DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 145-54.
- Mork J, Lie AK, Glattre E, et al.** Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344: 1125-31.
- Muller D, Million R, Lidereau R, et al.** 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* 1994; 2: 113-20.
- Muscat JE, Wynder EL.** Diesel exhaust, diesel fumes and laryngeal cancer. *Otolaryngol, Head and Neck Surg* 1985; 112: 437-40.
- Muscat JE, Wynder EL.** Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. *Cancer* 1992; 69: 2244-51.

- Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T.** High frequency of homozygous deletion and methylation of p16 (INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2001; 163: 221-8.
- Nakayama S, Sasaki A, Mese H, et al.** The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 667-73.
- Negri E, D'Avanzo B, Tavani A.** The role of vegetables and fruit in cancer risk; In Hill et al eds. *Epidemiology of diet and cancer*. Ellis Horwood. Chichester 1994 ; pp 327-34.
- Ng HH, Bird A.** DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 158-63.
- Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, et al.** Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3164-71.
- Oh YT, Chun KH, Oh JI, Park JA, Kim YU, Lee SK.** PKCdelta modulates p21WAF1/CIP1 ability to bind to Cdk2 during TNFalpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 1138-47.
- Okami K, Reed AL, Cairns P, et al.** Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 3541-5.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P.** The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607-14.
- Osman I, Sherman E, Signh B, et al.** Alteration of p53 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck: impact on treatment outcome in patients treated with larynx preservation intention. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2980-7.
- Otto SJ, de Koning HJ.** Update on screening and early detection of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2004; 14: 151-6.
- Panosetti, Luboinski B, Mamelle G, Richard JM.** Multiple synchronous and metachronous cancers of the upper aerodigestive tract : a nine-year study. *Laryngoscope* 1989; 99: 1267-73.
- Park NH, Li SL, Xie JF, Cheerick HM.** In vitro and animal studies of the role of viruses in oral carcinogenesis. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1992; 28: 145-52.
- Parkin DM, Whealn SL, Ferlay J, Raymond L, Young J.** Cancer incidence in five continents, volume 7. IARC Scientific publications N° 143. Lyon, 1997.
- Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, et al.** The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 1821-7.
- Patel A, Groopman JD, Umar A.** DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 286-97.
- Patrianakos C, Hoffman D.** Chemical studies of tobacco smoke. LXIV on the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *J Anal Chem* 1979; 3: 150-4.

- Peng J, Raverdy N, Ganry O, De la Roche Saint-André G, Dubreuil A, Lovriaux A.** Epidémiologie des voies aéro-digestives supérieures dans le département de la Somme. *Bull Cancer* 2000 ; 87: 201-6.
- Perucho M.** Microsatellite instability : the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1996; 2: 630-1.
- Piccirillo JF, Vlahiotis A.** General patient factors. In Taylor & Francis, ed. *Prognosis in head and neck cancer*. Baatenburg de Jong RJ. London; 2006, pp 73 – 84.
- Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L.** Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma : three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative group. Meta-analysis of chemotherapy on head and neck cancer. *Lancet* 2000; 335: 949-55.
- Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, et al.** Clinical relevance of expression of the CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer. *J Clin Onco* 1999; 17: 3150-9.
- Razin A, Szyf M.** DNA methylation patterns : formation and function. *Biochim Biophys Acta* 1984; 782 : 331-42
- Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S.** 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* 2001; 61: 4122-9.
- Réseau Francim.** Le cancer en France : incidence et mortalité. Situation en 1995, évolution entre 1975 et 1995. La documentation Française, Paris.
- Revzani A, Mollié A, Doyon F, Sancho-Garnier H.** Atlas de la mortalité par cancer en France. Paris: Inserm, 1997.
- Rideout WM III, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA.** 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990; 249: 1288-90.
- Righini CA, Bettega G, Lequeux T, Chaffanjeon P, Lebeau J, Reyt E.** Use of tubed gastro-omental free flap for hypopharynx and cervical oesophagus reconstruction after total laryngo-pharyngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262: 362-7.
- Righini Ch, Soriano E, Hitter A, Morel N, Bolla M, Reyt E.** Combined induction chemotherapy and radiotherapy in case of Undifferentiated Carcinoma of Nasopharynx Tumor (UCNT). *Rev Laryngol Otol Rhinol*, 2006 (sous presse).
- Robertson KD.** DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20:3139-55.
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolfe AP.** DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genet* 2000; 25: 338-42.
- Rocco JW, Sidransky D.** p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001 ; 264 : 42-55.

- Rogers MA, Thomas DB, Davis S, Vaughan TL, Nevissi AE.** A case control study of element levels and cancer of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2 : 305-12.
- Roh HJ, Shin DM, Lee JS, et al.** Visualization of the timing of gene amplification during multistep head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 6496-502.
- Rothman KJ, Keller AZ.** Effect of the joint exposure to alcohol and tobacco on the risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chron Dis* 1973; 25 : 711-6.
- Rubio Bueno P, Naval Gias L, Garcia Delgado R, Domingo Cebollada J, Diaz Gonzalez FJ.** Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base. *Head Neck* 1998; 20: 232-9.
- Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A.** Microsatellite instability and hMLH1 and hMLH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 2001; 81: 535-41.
- Sanchez-Cespedes M, Esteller M, WU L, et al.** Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 892-5.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Momoto S, et al.** Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 7015-9.
- Schantz SP, Guo-Pei Yu.** Head and Neck Cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* 2002; 128 : 268-74.
- Scully C.** Viruses and oral squamous carcinoma. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1992; 28 : 57-9.
- Scully C, Field JK, Tanzawa H.** Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000; 36: 256-63.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA.** Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 1983; 51: 2116-20.
- Shaw R.** The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006a; 35: 101-8.
- Shaw R, Liloglou T, Rogers SN, et al.** Promoter methylation of p16, RAR , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 2006b; 94: 561-8.
- Shima K, Kobayashi I, Saito I, et al.** Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and P53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000; 38: 445-50.
- Shin DM, Hittelman WN, Hong WK.** Biomarkers in upper aerodigestive tract tumorigenesis: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 697-709.
- Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T.** Inactivation of the p14(ARF), p15 (INK4B) and p16 (INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2001; 37: 498-504.

- Shklar G, Cataldo E, Meyer I.** Reliability of cytologic smear in diagnosis of oral cancer. A controlled study. *Arch Otolaryngol* 1970; 91: 158-60.
- Silvermann S Jr, Gorsby M, Greenspan JR.** Tobacco usage in patients with head and neck cancer. A follow-up study in habit changes and second primary oral oropharyngeal cancers. *J Amer Dent Assoc* 1983; 103: 33-5.
- Singer-Sam J, Le Bon JM, Tanguay RL, Riggs AD.** A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 687.
- Sjögren EV.** Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma. In Taylor & Francis, ed. *Prognosis in head and neck cancer*. Baatenburg de Jong RJ. London; 2006, pp 37-70.
- Smeele LE, Leemans CR, Langendijk JA, et al.** Positive surgical margins in neck dissection specimens in patients with head and neck squamous cell carcinoma and the effect of radiotherapy. *Head Neck* 2000; 22: 559-63.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al.** Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 449-55.
- Somech R, Izraeli S, Simon A, et al.** Histone deacetylase inhibitors: a new tool to treat cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 461-72.
- Soriano E., Righini Ch, Faure CI, et al.** Course and prognosis of basaloid squamous cell carcinoma : case-control study of 49 patients. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, 2005 ; 122 : 173-180.
- Spafford MF, Koch WM, Reed AL, et al.** Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosa cells by microsatellite analysis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 607-12.
- Steathdee G, Brown R.** Aberrant DNA methylation in cancer : potential clinical interventions. In expert Reviews Molecular Medecine. Cambridge: Cambridge University Press; 2002, 1-7.
- Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, et al.** Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2125-29.
- Sudbo J, Kildal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A.** DNA content as prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1270-78.
- Tabershaw IR, Gaffey WR.** Mortality study of workers in the manufacture of vinyl chloride and its polymers. *J Occup Med* 1974; 16: 509-18.
- Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH.** Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum pathol* 1999; 30: 1221-5.
- Teknos TN, Cox C, Yoo S, et al.** Elevated serum vascular endothelial growth factor and decreased survival in advanced laryngeal carcinoma. *Head Neck* 2002; 24: 1004-11.

- Temam S, Flahault A, Perie S, et al.** p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000; 18: 385-94.
- Temam S, Janot F.** Facteurs pronostiques des carcinomes épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures. Dans : Masson, ed. *Cancers des voies aréo-digestives supérieures. Données actuelles.* Marandas P. Paris ; 2004a, pp. 21-26.
- Temam S, Casiraghi O, Lahaye JB, et al.** Tetranucleotide microsatellite instability in surgical margins for prediction of local recurrence of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004b ; 15 : 4022-8.
- Temam Stéphane.** Diagnostic moléculaire des carcinomes épidermoïdes ORL. Th : *Cancérologie : Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre : 2004, 135p.*
- Temam S., Bénard J, Dugas C, et al.** Molecular detection of early-stage laryngopharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2547-51.
- The department of Veteran Affairs Laryngeal Cancer Study Group.** Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1685-90.
- Topaloglu O, Hoque MO, Tokumar Y, et al.** Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2284-8.
- Torrisani J, Lopez F.** Methylation de l'ADN et régulation épigénétique des cancers. *Hépatogastro* 2003 ; 6 : 455-67.
- Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA.** DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002; 21: 5450-61.
- Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, et al.** Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol : IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 1988; 41: 483-91.
- UICC. TNM classification of malignant tumors, sixth edition (2002).** pp 23-46.
- Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G.** Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105: 41-6.
- Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M.** Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 2000; 408: 495-8.
- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Ki Hong W.** Head and Neck cancer. *N Engl J Med* 1993; 328 : 184-94.
- Wade PA.** Methyl CpG binding proteins : coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 2001; 20: 3166-73.
- Wald N.** Retinol, Beta-carotene and cancer. *Cancer Surv* 1987; 6: 635-51.

- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH.** Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genet* 1998; 20: 116-7.
- Wang LE, Sturgis EM, Eicher SA, et al.** Mutation sensitivity to benzo( $\alpha$ )pyrene diol epoxide and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1773-8.
- Wang MB, Alavi S, Engstrom M, et al.** Detection of chromosome 11q13 amplification in head and neck cancer using fluorescence in situ hybridization. *Anticancer Res* 1999; 19: 925-31.
- Wei Q, Eicher SA, Guan Y, et al.** Reduced expression of hMLH1 and hGTBP / hMSH6 : a risk factor for head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 309-14.
- Westra WH, Califano J.** Toward early oral cancer detection using gene expression profiling of saliva: a thoroughfare or dead end ? *Clin Cancer res* 2004; 10: 8130-1.
- WHO.** In : Shanmugaratnam K. *Histological typing of tumors of the upper respiratory tract and ear.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2005.
- Winn DM, Blot WJ, Mc Laughlin JK, et al.** Mouth wash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer, *Cancer Res* 1991; 51: 3044-7.
- Wong TS, Man MW, Lam AK, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP.** The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR. *Eur J Cancer* 2003a ; 39: 1881-7.
- Wong TS, Tang KC, Kwong DLW, et al.** Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol* 2003b ; 22: 869-74.
- Wu CL, Sloan P, Read AP, Harris R, Thakker N.** Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Res* 1993; 54: 6484-8.
- Xi S, Dyer KF, Kimak M, et al.** Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 154-64.
- Xie S, Wang Z, Okano M, et al. Nogami M, Li Y, He WW.** Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999; 236: 87-95.
- Xu L, Chow, J, Bonacum J, et al.** Microsatellite instability at AAAG repeat sequences in respiratory tract cancers. *Int J Cancer* 2001; 91: 200-4.
- Yeh KT, Chang JG, Lin TH, et al.** Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol Rep* 2003; 10: 659-63.
- Yoo GH, Xu HJ, Brennan JA, et al.** Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4603-6.
- Yoo CB, Jones PA.** Epigenetic therapy of cancer : past, present and future. *Nature reviews drug Discovery* 2006; 5: 37-50.

- Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, et al.** Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 1017-8.
- Zheng T, Boyle P, Hu HF.** Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer : a case-control study in the Beijing People's Republic of China. *Cancer Causes Control* 1990; 1: 235-42.
- Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA.** Circulating DNA: a new diagnostic gold mine ? *Cancer Treat Rev* 2002; 28: 255-71.
- Zuo C, Ai L, Ratliff P, et al.** O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase gene : epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 967-75.

## **ANNEXES**

## Annexe 1

Grade des recommandations. Extrait du guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations ANAES / Janvier 2000.

### GRADE DES RECOMMANDATIONS

Niveau de preuve scientifique fourni par la littérature	Force des recommandations
<b>Niveau 1</b>	
Essais comparatifs randomisés de forte puissance	<b>Grade A</b>
Méta-analyse d'essais comparatifs randomisés	
Analyse de décision basée sur des études bien menées	Preuve scientifique établie
<b>Niveau 2</b>	
Essais comparatifs randomisés de faible puissance	<b>Grade B</b>
Etudes comparatives non randomisées bien menées	
Etudes de cohorte	Présomption scientifique
<b>Niveau 3</b>	
Etudes cas-témoins	<b>Grade C</b>
Essais comparatifs avec série historique	
<b>Niveau 4</b>	
	Faible niveau de preuve scientifique
Etudes comparatives comportant des biais importants	
Etudes rétrospectives	
Séries de cas	
Etude épidémiologiques descriptives (transversale, longitudinale)	

En l'absence de précision, les recommandations proposées correspondront à un **accord professionnel**.

Cette classification a pour but d'explicitier les bases des recommandations. L'absence de niveau de preuve doit inciter à engager des études complémentaires lorsque cela est possible.

Cependant, l'absence de niveau de preuve ne signifie pas que les recommandations élaborées ne sont pas pertinentes et utiles (exemple de l'efficacité de la mastectomie dans le cancer du sein, des antibiotiques dans l'angine, ...).

Extrait du Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations ANAES / Janvier 2000

## Annexe 2

Nombre de cas de cancers chez la femme enregistrés au registre du cancer de l'Isère en 2002. Les lignes 1 et 7 correspondent aux nombres de cas de cancers des VADS, soit 42 cas.

Femmes, 2002	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-64	65-69	70-74	75-79	80-84	85 et +	Total		
lèvre, bouche, phar.				1	1															36	
oesophage																					15
estomac				1	1	1	3	2	2	2	5	11	9	5	6	46					46
colon-rectum				2	3	12	8	19	26	22	41	42	35	41	255						255
Foie						1	1	2	1	2	6	6	3	2	24						24
Pancréas						1	1	1	3	3	10	10	11	6	46						46
Larynx						1	1	1	1	2					6						6
Poumon				1	2	4	6	4	9	8	10	12	13	6	82						82
Mésothéliome										1	2	1	1	5							5
Mélanome de la peau				1	2	4	5	6	7	7	7	4	3	1	59						59
Sein				1	7	28	53	97	99	110	94	100	98	61	35	23	806				806
Col de l'utérus				2	2	5	6	3	5	1	2	3	4	3	1	40					40
Corps de l'utérus				1	1	2	2	7	21	21	12	9	10	7	4	97					97
Ovaire			1	2	2	1	3	3	11	13	9	11	8	6	7	83					83
Vessie										1	2	1	5	1	14						14
Rein	1					1	4	4	2	4	5	8	4	7	6	46					46
Système nerveux				2	1	1	3	4	9	1	9	6	7	13	9	10	2	3	80		80
Thyroïde	1	1		1	2	6	6	8	10	12	15	11	12	4	6	5	1	101			101
LMNH							1	1	5	11	9	13	13	3	5	74					74
Maladie de Hodgkin			1	2	2	3				1	1	1	1	15							15
Myélome multiple					1	3	2	2	4	3	8	3	1	27							27
Toutes leucémies	1			1	2	4	3	4	6	4	5	8	2	6	51						51
Autres	1	1	1	2	1	3	5	15	15	15	22	27	43	41	62	269					269
Tous cancers	4	2	3	6	11	19	34	70	104	174	213	246	234	243	285	264	174	191	2277		2277

### Annexe 3

Classification Histologique internationale (WHO, 1991) des tumeurs malignes épithéliales de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.

#### Malignant epithelial tumours

##### Cavité buccale et oropharynx

Squamous cell carcinoma	8070/3 <sup>1</sup>
Verrucous carcinoma	8051/3
Basaloid squamous cell carcinoma	8083/3
Papillary squamous cell carcinoma	8052/3
Spindle cell carcinoma	8074/3
Acantholytic squamous cell carcinoma	8075/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3

##### Hypopharynx et larynx

Squamous cell carcinoma	8070/3
Verrucous carcinoma	8051/3
Basaloid squamous cell carcinoma	8083/3
Papillary squamous cell carcinoma	8052/3
Spindle cell carcinoma	8074/3
Acantholytic squamous cell carcinoma	8075/3
Adenosquamous carcinoma	8560/3
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3
Giant cell carcinoma	8031/3
Malignant salivary gland-type tumours	
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3
Adenoid cystic carcinoma	8200/3

<sup>1</sup> : Morphology code of the International Classification of Diseases for oncology (ICD-O) {821} and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behavior is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours, and /1 for borderline or uncertain behavior.

# Evolution et pronostic du carcinome basaloïde squameux des voies aéro-digestives supérieures

## Etude cas-témoins à propos de 49 cas

E. Soriano (1), Ch. Righini (1), Cl. Faure (2), S. Lantuejoul (2), M. Colonna (3), M. Bolla (4), E. Brambilla (2), E. Rey (1)

(1) Service d'ORL, Hôpital Michallon, CHU BP 217, 38043 Grenoble cedex

(2) Service de pathologie cellulaire, CHU de Grenoble

(3) Registre du cancer de l'Isère, Meylan

(4) Service de cancérologie-radiothérapie, CHU de Grenoble.

Tirés à part : Ch. Righini, adresse ci-dessus.

E-mail : CRighini@chu-grenoble.fr

Reçu le 17 mars 2005. Accepté le 16 mai 2005.

### Course and Prognosis of Basaloid Squamous Cell Carcinoma: Case-Control Study of 49 Patients

E. Soriano, Ch. Righini, Cl. Faure, S. Lantuejoul, M. Colonna, M. Bolla, E. Brambilla, E. Rey

*Ann Otolaryngol Chir Cervicofac, 2005 ; 122, 4 : 173-180*

**Introduction :** The course and prognosis of basaloid squamous cell carcinoma (BSCC) are not well known.

**Objectives :** To study the course and prognosis in a population of BSCC patients.

**Materials and methods :** We analyzed a retrospective cohort of 49 patients with BSCC in comparison with a cross-matched population of 49 patients treated for well- to moderately differentiated squamous cell carcinoma (SCC).

**Results :** The statistical analysis showed that survival in BSCC group was lower than in the SCC group. Local recurrence in the BSCC group was not higher than in the SCC group, but mortality by distant metastasis was six times higher than in the SCC population.

**Conclusions :** We consider BSCC patients as a high-risk population and we complete diagnosis explorations including a FDG-PET before curative treatment. We also recommend post-operative or exclusive radiotherapy which may be associated with concomitant chemotherapy.

**Key words:** Basaloid squamous cell carcinoma, head and neck, prognosis.

### Evolution et pronostic du carcinome basaloïde squameux des voies aéro-digestives supérieures. Etude cas-témoins à propos de 49 cas.

**Pré requis :** Le pronostic et l'évolution du carcinome basaloïde squameux (BSCC) des voies aéro-digestives supérieures (VADS) ne sont pas définis.

**Objectifs :** Etudier le pronostic et l'évolution d'une population de patients atteints de BSCC des VADS.

**Matériel et Méthodes :** Nous avons effectué une étude d'observation cas-témoins à partir d'une population de 49 patients traités pour un BSCC, comparée avec une population témoin de carcinome épidermoïde moyennement à bien différencié (SCC).

**Résultats :** La comparaison des taux de survie montre qu'il existe une différence de survie au bénéfice de la population témoin, alors qu'elle présentait initialement les mêmes critères pronostiques péjoratifs. Dans notre série, les rechutes loco-régionales ne sont pas plus fréquentes que dans la population témoin, mais le taux de décès par métastase y est 6 fois supérieur.

**Conclusions :** Au vu de ces résultats, nous recommandons que le BSCC soit considéré comme un facteur histopathologique de mauvais pronostic à part entière. Nous proposons de compléter le bilan par une TEP-FDG avant tout traitement à visée curative et d'associer une chimiothérapie concomitante à la radiothérapie exclusive ou post-opératoire.

**Mots-clés :** Carcinome basaloïde squameux, voies aéro-digestives supérieures, pronostic.

### INTRODUCTION

Il y a moins de vingt ans, Waïne *et al.* [1] décrivaient une forme atypique de carcinome épidermoïde touchant la muqueuse des voies aéro-digestives supérieures (VADS) : le carcinome basaloïde squameux (*basaloïd squamous cell carcinoma* pour les anglo-saxons, ou BSCC). Cette entité histopathologique est rare puisque environ 200 cas sont rapportés dans la littérature pour les VADS. Dès les premières publications, il apparaissait que les patients traités pour un BSCC avaient un mode évolutif et un pronostic moins favorable que les patients traités pour un carcinome épidermoïde. De nombreuses études sont venues confirmer ces caractéristiques [1-7] et d'autres concluent de façon opposée [8-12]. Mais toutes ces études ont en commun une faible effectif de patients et donc une faible puissance statistique des résultats. A ce jour, il apparaît donc difficile pour les auteurs d'affirmer ou non le caractère péjoratif du pronostic du carcinome basaloïde squameux.

Nous avons été amenés à traiter plusieurs dizaines de patients pour un carcinome basaloïde des VADS. Si pour certains le pronostic était comparable aux patients traités pour un

carcinome épidermoïde, pour d'autres l'évolution était beaucoup plus péjorative avec la survenue d'un décès précoce. Il nous a donc paru important de déterminer si ces décès étaient en relation avec le caractère basaloïde de la tumeur et si la survie d'une telle population était significativement plus péjorative que celle des patients traités pour un carcinome épidermoïde.

Cette étude clinique avait donc pour but d'évaluer le pronostic et le mode évolutif propre à ces tumeurs, à partir d'une population de 49 patients atteints de carcinome basaloïde squameux des VADS dont l'évolution et la survie ont été comparées à celle d'une population témoin de carcinomes épidermoïdes moyennement à bien différenciés.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

La population de cas est constituée de 49 patients traités entre 1988 et 2002 dans le service d'ORL au CHU de Grenoble, pour un cancer du pharynx, du larynx ou de la cavité buccale, dont l'anatomo-pathologie de la tumeur était un carcinome basaloïde squameux (BSCC).

### Critères d'inclusions

Pour l'inclusion des cas, un recul de 2 ans minimum après traitement était requis. Toutes les pièces histologiques ont bénéficié d'une relecture des lames par deux anatomo-pathologistes pour la confirmation du diagnostic. Un contingent basaloïde minimum de 10 % au sein de la tumeur était nécessaire pour l'inclusion du patient.

Chaque cas a été apparié avec un patient témoin qui présentait un carcinome épidermoïde moyennement à bien différencié. L'appariement a été effectué pour la région anatomique atteinte, le sexe, le stade TNM au moment du diagnostic initial ou de la rechute si le patient a été inclus à ce moment et le traitement.

En effet chaque cas et son témoin étaient inclus avec la même décision thérapeutique initiale. Lorsque le diagnostic de carcinome basaloïde était porté lors d'une récurrence, le patient témoin était inclus également à sa date de récurrence, tous deux ayant eu le même traitement auparavant, pour la même tumeur initiale. Le traitement proposé pour la récurrence était toujours le même pour les deux populations.

### Critères d'exclusions

Pour les patients cas, nous disposons d'une série clinique initiale de 76 patients mais 13 patients n'ont pas été inclus en raison d'un recul non suffisant (< 2 ans) et 14 patients ont été exclus après relecture des lames histologiques où le diagnostic de carcinome basaloïde a été soit douteux, soit infirmé.

Pour les patients témoins, les motifs d'exclusion ont été définis comme suit :

— différence d'âge entre cas et témoin supérieure à 30 ans ;

— différence d'année de prise en charge supérieure à 10 ans.

### Définition histopathologique du BSCC

D'un point de vue histopathologique [1, 2, 13-15] (fig. 1), la tumeur se présente sous la forme de massifs pleins à contours arrondis ou polycycliques, composés de petites cellules monomorphes disposées en palissade. Les cellules présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (7-8/10) et des noyaux ovales hyperchromatiques non nucléolés. De nombreuses figures mitotiques sont présentes (15 à 50 par 2 mm<sup>2</sup>). On ne met pas en évidence de ponts d'union entre les cellules. Ces lobules peuvent être centrés par des foyers de nécrose de type comédionienne, et dans un tiers des cas on retrouve des images de rosettes dans les massifs cellulaires. Des espaces microkystiques d'aspect pseudocylindromateux sont souvent mis en évidence au sein de l'architecture cellulaire, après coloration au PAS (*periodic acid Schiff*) et/ou au bleu alcalin, avec présence de dépôts de matériel basal. Le stroma périphérique contient beaucoup de fibroblastes et de cellules inflammatoires. Au sein de la tumeur cohabitent des plages de carcinome basaloïde et de carcinome épidermoïde plus ou moins bien différenciés, en pourcentage variable. Ce contingent malpighien, caractérisé par la présence de globes cornés et de cellules séparées par des ponts d'union inter-cellulaire, est le plus souvent moyennement à bien différencié. A la périphérie de la tumeur, on peut retrouver des foyers de carcinome *in situ*. Les diagnostics différentiels histopathologiques

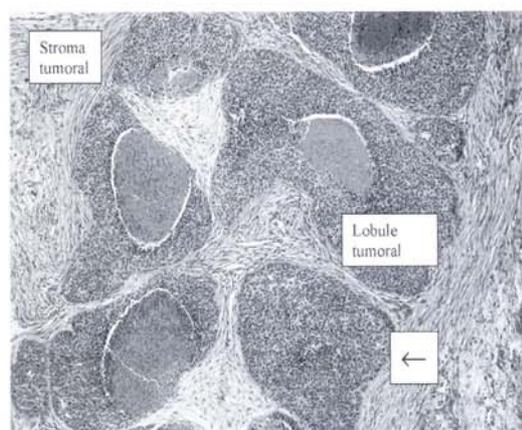


Figure 1 : Carcinome basaloïde pur (HES x 100). → : cellules disposées en palissade.

sont principalement le carcinome adénoïde kystique, le carcinome neuro-endocrin et le carcinome épidermoïde peu différencié.

Pour l'étude, les caractéristiques histologiques des tumeurs remplissaient les critères diagnostiques des BSCC de la classification OMS des tumeurs de la tête et du cou (1991), qui reprennent ceux de Waine *et al.* [1].

Nous avons classé les tumeurs en trois catégories, selon le pourcentage de contingent basaloïde au sein de la tumeur :

- groupe 1 : 10 à 39 % de contingent basaloïde (soit environ un tiers) ;
- groupe 2 : 40 à 79 % de contingent basaloïde (soit environ deux tiers) ;
- groupe 3 : plus de 80 % de contingent basaloïde (carcinomes basaloïdes dits purs).

Toutes les pièces ont bénéficié d'analyses immuno-histochimiques par l'étude des marqueurs neuro-endocrines pour le diagnostic différentiel (N-CAM, synaptophysine ou chromogranine A). Ces marqueurs étaient négatifs pour tous les BSCC sauf 2 qui exprimaient une positivité inférieure à 20 % pour un seul marqueur neuro-endocrin (N-CAM ou chromogranine A).

### Analyse des données

Pour les deux populations, nous avons calculé le suivi (toujours à partir de la date de prise en charge initiale), la survie globale, la survie spécifique, et la survie sans rechute. Les taux de survie ont été calculés pour les deux populations à partir de la date de la fin du traitement jusqu'à la date de dernière consultation (ou bien de décès).

Les courbes de survie ont été calculées par la méthode non paramétrique de Kaplan-Meier et les comparaisons entre elles effectuées en analyse univariée par le test de Log-rank.

### RÉSULTATS

La population de BSCC regroupait 49 patients avec un âge médian de 59,5 ans au moment du diagnostic contre une médiane d'âge de 56,5 ans pour les témoins.

Le *sex ratio* était de 23:1. La différence médiane d'âge entre chaque cas et chaque témoin était de 6 ans.

Dans le groupe BSCC, 96 % des patients étaient fumeurs et 80 % des patients consommaient plus de 30 g d'alcool par jour. Dans le groupe témoin, 94 % des patients étaient fumeurs et 78 % des patients consommaient plus de 30 g d'alcool par jour.

Les localisations les plus fréquentes du carcinome basaloïde squameux pour notre étude étaient l'hypopharynx et l'oropharynx. Sur 49 localisations, il y avait 18 oropharynx

ou cavités buccales, 20 hypopharynx, 8 larynx, 2 adénopathies malignes en apparence primitive (AMAP) et 1 cavum.

Plus d'un patient sur 2 (55 %) était diagnostiqué à un stade T3 ou T4. Les stades T1 et T2 représentaient 41 % de la répartition. Au moment du diagnostic, 57 % des patients présentaient une adénopathie clinique ou radiologique, 43 % étaient N0.

Sur 49 patients, 8 ont bénéficié d'une chimiothérapie première dans le cadre d'un schéma de préservation laryngée avec 5 bonnes réponses ( $\geq$  à 80 % de fonte tumorale) et 3 réponses partielles (entre 50 et 80 % de fonte tumorale). Les 5 patients bons répondeurs ont été traités par radiothérapie (dont un a eu un curage suivi de radiothérapie), les autres ont été traités par chirurgie puis radiothérapie. Ces prises en charges étaient identiques chez les cas et leurs témoins, pour les mêmes localisations et les mêmes stades.

Le traitement par chirurgie première plus ou moins suivie de radiothérapie concernait 31 patients (63 %). Le traitement par radiothérapie exclusive concernait 18 patients (37 %) dont 15 étaient diagnostiqués en situation de rattrapage (soit 31 %). Il n'existait que 3 patients traités par radiothérapie première dont le diagnostic de carcinome basaloïde avait été fait initialement. Ces répartitions étaient les mêmes pour les deux populations.

La médiane de suivi pour la population des carcinomes basaloïdes squameux (BSCC) était de 27,5 mois contre 60 mois pour la population témoin ; la médiane d'apparition des décès de 20 mois contre 29 mois pour les témoins.

Si le nombre de décès dans les deux populations était proche (33 chez les cas contre 27 pour les témoins), leur répartition et leurs dates d'apparition sont différentes.

En effet, 55 % des décès étaient imputables à la maladie initiale (décès spécifique), contre 35 % chez les témoins. Le taux de contrôle était de 24 % pour la population cas contre 37 % pour les témoins.

Les taux de récurrence loco-régionale (*fig. 2*) étaient identiques pour les deux populations (33 % et 35 %), mais leurs implications dans les causes de décès étaient différentes. Seuls 15 % des décès pour la population de BSCC étaient dus à une récurrence loco-régionale, contre 40 % pour les témoins.

L'apparition de métastases (*fig. 2*) a été constatée chez 45 % de l'ensemble de la population cas (contre 6 % pour les témoins) et 64 % des causes de décès leurs ont été imputées (contre 11 % pour les témoins). La médiane d'apparition des métastases dans la population de BSCC a été de 12 mois et la survie médiane après diagnostic des métastases était de 7 mois.

La médiane de survie globale (*tableau 1*) pour les patients BSCC était de 25 mois contre 65 pour les témoins. La survie à 3 ans était de 41 % contre 65 % pour les témoins. A 5 ans, elle était respectivement de 32 et 53 %. La comparaison des taux de survie glo-

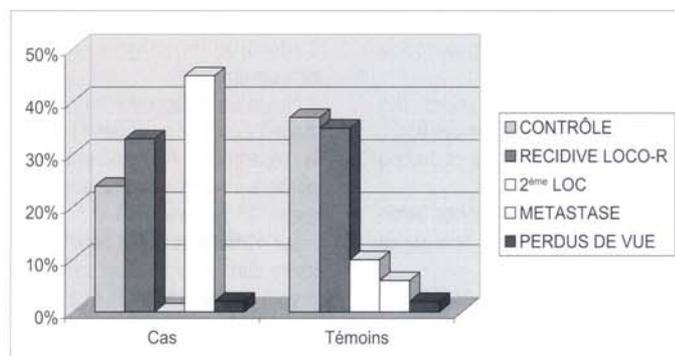


Figure 2 : Comparaison de l'évolution des populations cas et témoins.

bale pour les deux populations retrouvait une différence statistique significative ( $p < 0,05$ ). Si l'on prend en compte uniquement les décès liés à la maladie initiale, la comparaison des taux de survie spécifique des deux populations (fig. 3), retrouvait une différence statistique encore plus significative ( $p < 0,01$ ).

La médiane de survie sans rechute (tableau I) était de 24 mois dans la population de BSCC contre 54 mois dans la population témoin. A 3 ans on retrouvait 42 % de rémission contre 66 % chez les témoins et à 5 ans, 37 % contre 50 %.

176

La comparaison des taux de survie sans rechute, a permis de retrouver une différence statistique ( $p < 0,05$ ) au profit de la population témoin. Cette différence de survie sans rechute n'a pas été retrouvée lorsque l'on prenait en compte seulement les rechutes loco-régionales.

### Survie des populations selon la localisation anatomique

Lorsque l'on comparait les taux de survie globale, spécifique et sans rechute, en fonction du site anatomique

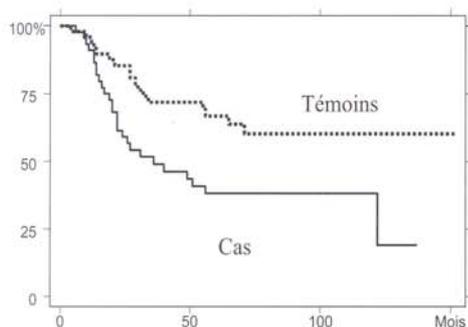


Figure 3 : Comparaison de la survie spécifique des populations cas et témoins.

Tableau I

Survie des populations cas et témoins.

Survie		1 an	2 ans	3 ans	4 ans	5 ans	Médiane
Globale	Cas	84 %	54 %	41 %	39 %	32 %	25
	Témoins	92 %	78 %	65 %	63 %	53 %	65
Spécifique	Cas	91 %	59 %	49 %	46 %	38 %	35
	Témoins	94 %	85 %	72 %	72 %	67 %	> 120
Sans récurrence	Cas	62 %	50 %	42 %	39 %	37 %	24
	Témoins	86 %	73 %	66 %	59 %	50 %	54

atteint pour la population cas, on ne trouvait aucune différence de survie selon que la tumeur était oropharyngée, hypopharyngée ou laryngée.

En revanche, la comparaison des taux de survie en fonction de la localisation anatomique chez les témoins retrouvait une différence ( $p < 0,05$ ) de survie spécifique avec : survie spécifique des tumeurs du larynx supérieure à celle des tumeurs de l'oropharynx, elle-même supérieure à celle des tumeurs de l'hypopharynx.

### Survie des populations en fonction du stade T

La comparaison des taux de survie des populations T1 et T2 ( $n = 20$  dans chaque groupe) retrouvait une différence de survie sans rechute entre les deux populations ( $p < 0,05$ ). En effet, pour la population de BSCC le taux de rechute loco-régionale ou à distance à 2 ans était proche de 50 % (48,5 %), alors que pour la population témoin il n'était que de 16,5 %.

Pour les stades T3 et T4 ( $n = 27$  dans chaque groupe), la comparaison des taux de survie ne retrouvait pas de différence significative entre les cas et les témoins.

Il n'existait aucune différence statistique au sein de la population cas, entre les T1-T2 et les T3-T4 pour la survie globale, spécifique et sans rechute.

### Survie des populations en fonction du stade N

La comparaison des taux de survie pour les stades N0 (n = 21 dans chaque groupe) ne retrouvait aucune différence de survie entre les cas et les témoins.

La comparaison des taux de survie des populations de patients N1 à N3 (n = 28 dans chaque groupe) entre les cas et les témoins retrouvait une différence statistique de survie globale (p = 0,01), de survie spécifique (p < 0,01) et de survie sans récurrence (p < 0,05).

La comparaison des taux de survie des populations N0 et N1-N3 chez les cas, retrouvait une différence limite significative pour la survie spécifique (p = 0,054).

Chez les populations N0 et N1-N3 témoins, la comparaison des taux de survie globale, spécifique et sans rechute ne retrouvait pas de différence statistique.

### Survie des populations opérées en rechute

Le taux de contrôle local, pour cette population (n = 15 dans chaque groupe), était de 7 % à 5 ans pour les patients BSCC, contre 27 % pour les témoins. Le taux de récurrence loco-régionale à 5 ans était le même pour les deux populations (27 %) et le taux d'apparition de métastase était presque 8 fois supérieur à celui de la population témoin (53 % contre 7 % à 5 ans).

La médiane de survie globale pour cette population était de 22 mois contre 54 mois chez les témoins. La comparaison des différents taux de survie montrait qu'il n'existait pas de différence significative de survie entre les cas et les témoins.

### Survie des populations traitées par chirurgie première

Le taux de contrôle local était de 34 % à 5 ans pour les BSCC (n = 31) contre 42 % pour les témoins (n = 31). Le taux de décès spécifique était de 52 % à 5 ans pour les cas, contre 19 % chez les témoins. Le taux de récurrence loco-régionale était de 26 % à 5 ans (contre 23 % chez les témoins) et le taux d'apparition de métastase était 7 fois supérieur à celui de la population témoin (42 % à 5 ans contre 6 %).

La médiane de survie était de 25 mois pour les cas contre 54 mois pour les témoins. La comparaison des taux de survie entre les cas et les témoins ne retrouvait pas de différence pour la survie globale et la survie sans rechute. En revanche, il existait une différence statistique pour la survie spécifique (p = 0,02) des cas et des témoins dans cette population au bénéfice de la population témoin.

La comparaison, chez les cas, des taux de survie des patients traités pour une récurrence et des patients opérés en première intention ne retrouvait aucune différence pour la survie globale, spécifique et sans récurrence. En revanche, les mêmes comparaisons chez les patients témoins permettaient de retrouver une différence significative en terme de survie spécifique (p < 0,05) au bénéfice des patients traités en première intention.

### Survie des populations en fonction des critères pronostiques anatomo-pathologiques

La comparaison des taux de survie des patients cas ayant une tumeur bourgeonnante (n = 16) avec ceux des patients ayant une tumeur ulcéreuse (n = 26) ne retrouvait aucune différence pour la survie globale, spécifique et sans rechute.

Dans la population cas, 16 patients avaient une exérèse chirurgicale carcinologique limite ou non satisfaisante (contre 8 dans la population témoin) et 30 patients une exérèse satisfaisante.

On ne retrouvait pas, entre ces deux groupes, de différence de survie globale (p = 0,58), de survie spécifique (p = 0,94) et de survie sans rechute (p = 0,90).

Dans la population cas, 10 patients présentaient des embolies tumorales sur les pièces opératoires contre 9 chez les patients témoins. Pour les patients BSCC, la présence d'embolie(s) sur la pièce opératoire était associée à un taux de métastase de 24 % (contre 0 % pour les témoins). Pour ce groupe, la survie globale à 3 ans était de 20 % (contre 67 % chez les témoins), et, à 5 ans elle était de 0 % (contre 56 % pour les témoins). La comparaison des taux de survie des patients cas et témoins présentant des embolies sur la pièce opératoire, retrouvait une différence significative pour la survie globale (p < 0,05), la survie spécifique (p < 0,05) et la survie sans récurrence (p < 0,05).

La comparaison des taux de survie selon l'importance du contingent basaloïde au sein de la tumeur (groupe 1, 2 et 3) n'a fait apparaître aucune différence pour la survie globale (p = 0,66), spécifique (p = 0,90) et sans récurrence (p = 0,84).

### LA POPULATION DE BSCC SURVIVANTS

Dans notre étude, 28 % des patients étaient vivants à 5 ans, soit 13 patients. Parmi ces 13 patients il y avait 4 localisations laryngées, 5 patients T1-T2, 8 patients N0, 11 patients traités en première intention et aucun patient ne présentait d'embolie sur pièce opératoire.

### DISCUSSION

Nous avons un effectif de 49 patients traités pour un BSCC qui présentaient déjà beaucoup de critères pronostiques péjoratifs :

- une majorité de localisation hypopharyngée (41 %) ;
- une majorité de stades T avancés (55 % de T3-T4) ;
- une majorité de patients présentant des adénopathies cervicales au moment du diagnostic (57 %) ;
- un effectif important de patients en situation de rattrapage (31 %).

Cette population, très hétérogène sur le plan des localisations, des stades cliniques et des traitements réalisés, nécessitait donc de pouvoir être comparée à une population en tous points identiques.

La comparaison des taux de survie entre ces deux populations a fait clairement apparaître une différence statistique pour la survie globale ( $p < 0,05$ ), la survie spécifique ( $p < 0,05$ ) et la survie sans rechute ( $p < 0,05$ ), au bénéfice de la population témoin alors qu'elle présentait initialement tous les mêmes critères pronostiques péjoratifs.

Dans notre étude, la survie de la population de BSCC n'était pas modifiée par la localisation anatomique initiale, le stade T, le statut de rechute ou de traitement en première intention, l'aspect macroscopique de la tumeur, l'importance du contingent basaloïde au sein de la tumeur et la qualité de l'exérèse chirurgicale carcinologique. Dans la population témoin, la survie spécifique est en revanche modifiée par la localisation anatomique initiale (larynx > oropharynx > hypopharynx), le stade N (N0 > N1 à N3), le statut de rechute ou traitement de première intention (1<sup>ère</sup> intention > rechute).

178

Pour les patients BSCC, le statut N initial semblait modifier la survie en l'aggravant, mais la comparaison de la survie spécifique entre la population de BSCC N0 et la population de BSCC N1 à N3 retrouvait une différence statistique limite ( $p = 0,054$ ), ce qui ne nous a pas permis de conclure véritablement. En revanche, toujours dans la population de patients BSCC, la survie des patients était non seulement grevée par la présence d'embolie(s) sur pièce opératoire, mais elle était encore plus défavorable que celle du même groupe de la population témoin.

La comparaison des taux de survie entre les différentes sous-populations cas et témoins a montré que la survie spécifique des patients opérés en première main, la survie globale, spécifique et sans rechute des patients présentant une adénopathie clinique initiale et la survie sans rechute des patients au stade T1 et T2 étaient toutes supérieures pour les patients témoins.

Il apparaît donc dans notre série que le BSCC est un facteur histopathologique pronostique défavorable, indépendant de la localisation, du stade T, du statut de rechute ou non, des critères pronostiques anatomo-pathologiques, et enfin, du pourcentage de contingent de basaloïde dans la tumeur.

De plus, une population de patients BSCC à un stade N avancé ou bien présentant des embolies sur la pièce opératoire, présente un pronostic encore plus défavorable qu'une population de SCC comparable.

## Evolution des BSCC

Si les patients porteurs d'un BSCC avait un pronostic plus défavorable que les témoins, l'évolution de la maladie était également différente. Dans notre série, les rechutes loco-régionales n'était pas plus fréquentes que dans la population témoin, mais nous obtenions un taux de décès par métastase presque 6 fois supérieur à celui de la population témoin ( $p < 0,001$ ). Un patient sur deux a développé une ou des métastase(s), et presque deux tiers des décès leurs sont imputés. La médiane d'apparition des métastases était de 12 mois seulement et concernait majoritairement le poumon, le foie, puis les os, le cerveau et enfin la peau.

Aucun patient n'a développé de deuxième localisation, très probablement en raison de la très courte médiane de survie globale (25 mois).

Le taux de contrôle local de la maladie était supérieur pour la population témoin (mais non spécifique).

Ainsi, la population de BSCC a vu son pronostic grevé par une évolution générale très rapide, indépendamment des critères pronostiques jusque-là connus.

## Les survivants

Les taux de décès globaux entre les deux populations restent assez proche (67 % contre 55 % pour les témoins). Nous avons donc pour un tiers de la population de BSCC, un recul supérieur à 5 ans. Or l'étude rétrospective des critères pronostiques ne nous permet pas de savoir quel est ou quels sont les éléments prédictifs d'une bonne réponse au traitement. Sur les 13 survivants, 2 étaient en situation de rattrapage, 8 étaient T3-T4, 5 présentaient des adénopathies au moment du diagnostic et 5 avaient un carcinome basaloïde pur (> 80 %).

Le seul critère de bon pronostic pouvant être discuté dans la population BSCC est l'absence d'embolie sur les pièces opératoires car tous les patients survivants n'avaient pas d'embolie(s) sur la pièce opératoire. Même si le faible effectif ne nous permet pas de conclure, il n'en demeure pas moins une forte présomption que l'absence d'embolie sur la pièce opératoire est un critère prédictif majeur, de bon pronostic, pour cette population. L'inverse a été démontré dans notre étude : la présence d'embolie(s) sur la pièce opératoire aggrave significativement le pronostic des patients porteurs d'un BSCC.

## Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature

La plus grande série de BSCC publiée est celle de Banks et al. [8] en 1992. Elle contenait 40 cas en étude rétrospective clinique et immuno-histochimique. Cette étude a apporté des résultats novateurs sur les analyses immuno-

histochimiques pour le diagnostic différentiel des BSCC (versus le carcinome adénoïde kystique ou le carcinome indifférencié). Sur ces 40 patients, 15 ont développé des métastases (37,5 %) et la médiane de survie était de 18 mois. Même si cette population de BSCC n'avait pas été appariée, Banks *et al.* [8] ont avancé que « stade par stade, le comportement des BSCC était identique au SCC conventionnels ».

La plus grande série de BSCC appariée à une population témoin, est celle de Winzenburg *et al.* [5] en 1998. Elle comparait 23 carcinomes basaloïdes squameux avec 23 carcinomes peu différenciés (PDSC). Une différence entre la survie des deux populations était retrouvée avec une survie à 2 ans de 23,5 % pour les BSCC contre 53 % pour les PDSC.

Même si notre étude ne comporte pas de comparaison avec une population de carcinome épidermoïdes peu différenciés, nous disposons de 3 arguments pour dire que le BSCC a un pronostic plus péjoratif que les SCC quels que soient leurs degrés de différenciation :

— tout d'abord les résultats de notre étude montrent que les BSCC ont un pronostic plus péjoratif que les SCC moyennement à bien différenciés ;

— les études de Winzenburg *et al.* [5] et de Moro *et al.* [16] pour le poumon en 1994, qui montrent que les BSCC ont un pronostic plus péjoratif que les SCC peu différenciés ;

— les études de la survie des SCC en fonction du degré de différenciation de Bataini *et al.* [17] et de Lusinchi *et al.* [18] qui montrent que le degré de différenciation tumorale n'est pas corrélé à la survie.

Les autres études cas-témoins souffrent du manque d'effectif (10 BSCC pour Erdamar *et al.* [19], 6 BSCC pour Luna *et al.* [9] et 17 BSCC pour De Sampo Goes *et al.* [11]).

Un autre argument de discussion important sur le caractère prédictif péjoratif qu'apporte notre étude, repose sur le pronostic des BSCC en fonction de l'importance du contingent basaloïde dans la tumeur. En effet, pour Winzenburg *et al.* [5], les carcinomes basaloïdes purs ont un meilleur pronostic que les carcinomes basaloïdes non purs. Or, dans notre série, nous montrons que la survie n'est pas modifiée par le pourcentage de contingent basaloïde au sein de la tumeur. D'autres auteurs, comme Erisen *et al.* [12] retrouvent des résultats identiques mais sur une très petite série.

Dans l'ensemble, nos résultats sur le pronostic péjoratif des BSCC des VADS et sur les taux anormalement élevés de décès par métastases vont dans le sens de la majorité des auteurs [1- 7]. Notre étude, de par son effectif et sa méthodologie, apporte donc des arguments sérieux à la discussion sur le pronostic et l'évolution des BSCC. Des arguments statistiques par une analyse multivariée devraient conforter ces résultats, mais nous ne disposons pas d'un effectif de patients suffisant lors de l'inclusion

des patients. Nous suivons actuellement une trentaine de patients qui devraient pouvoir compléter cette étude dans deux ans et permettre de compléter l'effectif pour réaliser une analyse multivariée.

## CONCLUSION

Au vu de ces résultats, nous recommandons que le BSCC soit considéré comme un facteur histopathologique de mauvais pronostic à part entière.

Lorsque le diagnostic de BSCC est établi à l'occasion du bilan initial, nous proposons de compléter le bilan par une TEP-FDG avant tout traitement à visée curative, afin d'éliminer la possibilité de lésions métastatiques infra-cliniques.

Si le critère basaloïde de la tumeur ne change pas les indications principes du traitement des cancers des VADS, il doit être en revanche un argument suffisant pour la réalisation d'une chimiothérapie concomitante systématique lorsqu'une indication de radiothérapie exclusive ou post-opératoire est posée. Les indications de chimio-radiothérapie post-opératoire devront être toujours discutées à partir de l'élément pronostique péjoratif que représente le carcinome basaloïde squameux.

Enfin, le suivi des patients devra être régulier, basé sur l'examen clinique et la radiographie pulmonaire systématique. La surveillance paraclinique de ces patients à risque doit s'intégrer dans une démarche logique sans multiplier les examens d'imageries (TDM ou TEP-FDG) en l'absence d'arguments cliniques ou radiologiques, car malheureusement, le diagnostic de récurrence sur le mode métastatique, aussi précoce soit-il, ne conduit pas dans ces cas à un traitement curatif.

## RÉFÉRENCES

1. WAIN SL, KIER R, VOLLMER RT, BOSSEN EH. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Hum Pathol* 1986;17:1158-66.
2. ABE K, SASANO H, ITAKURA Y, NISHIHARA T, MORI S, NAGURA H. Basaloid-squamous carcinoma of the esophagus. A clinicopathologic, DNA ploidy, and immunohistochemical study of seven cases. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:453-61.
3. FERLITO A, ALTAVILLA G, RINALDO A, DOGLIONI C. Basaloid squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:1024-35.
4. BAHAR G, FEINMESSER R, POPOVTZER A, *et al.* Basaloid squamous carcinoma of the larynx. *Am J Otolaryngol* 2003;24:204-8.
5. WINZENBURG SM, NIEHANS GA, GEORGE E, DALY K, ADAMS GL. Basaloid squamous carcinoma: a clinical comparison of two histologic types with poorly differentiated squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119:471-5.
6. COPPOLA D, CATALANO E, TANG CK, ELFENBEIN IB, HARWICK R, MOHR R. Basaloid squamous cell carcinoma of floor of mouth. *Cancer* 1993;72:2299-305.
7. LARNER JM, MALCOLM RH, MILLS SE, FRIERSON HF JR, BANKS ER, LEVINE PA. Radiotherapy for basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 1993;15:249-52.
8. BANKS ER, FRIERSON HF JR, MILLS SE, GEORGE E, ZARBO RJ, SWANSON PE. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and

- neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:939-46.
9. LUNA MA, EL NAGGAR A, PARICHATIKANOND P, WEBER RS, BATSAKIS JG. Basaloid squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract. Clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis. *Cancer* 1990;66:537-42.
  10. BRACERO F, GAMIZ MJ, SOLDADO L, et al. Hypopharynx and larynx basaloid squamous carcinoma: our experience with 6 cases. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:229-36.
  11. DE SAMPAIO GOES FC, OLIVEIRA DT, DORTA RG, NISHIMOTO IN, LANDMAN G, KOWALSKI LP. Prognoses of oral basaloid squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma: a comparison. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:83-6.
  12. ERISEN LM, COSKUN H, OZUYSAL S, BASUT O, ONART S, HIZALAN I, TEZEL I. Basaloid squamous cell carcinoma of the larynx: a report of four new cases. *Laryngoscope* 2004;114:1179-83.
  13. KLJANIENKO J, EL-NAGGAR A, PONZIO-PRION A et al. Basaloid squamous carcinoma of the head and neck. Immunohistochemical comparison with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993 Aug; 119: 887-90.
  14. BRAMBILLA E, MORO D, VEALE D, et al. Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: a new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Hum Pathol* 1992; 23: 993-1003.
  15. COLETTA RD, COTRIM P, ALMEIDA OP, ALVES VA, WAKAMATSU A, VARGAS PA. Basaloid squamous carcinoma of oral cavity: a histologic and immunohistochemical study. *Oral Oncol* 2002; 38:723-9.
  16. MORO D, BRICHON PY, BRAMBILLA E, VEALE D, LABAT F, BRAMBILLA C. Basaloid bronchial carcinoma. A histologic group with a poor prognosis. *Cancer* 1994;73:2734-9.
  17. BATAINI JP, ASSELAÏN B, JAULERRY C, et al. A multivariate primary tumour control analysis in 465 patients treated by radical radiotherapy for cancer of the tonsillar region: clinical and treatment parameters as prognostic factors. *Radiother Oncol* 1989; 14: 265-77.
  18. LUSINCHI A, WIBAULT P, MARANDAS P, KUNKLER I, ESCHWEGE F. Exclusive radiation therapy: the treatment of early tonsillar tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:273-7.
  19. ERDAMAR B, SUOGLU Y, SIRIN M, KARATAY C, KATIRCIOGLU S, KIYAK E. Basaloid squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *Eur Arch Otorhinol* 2000;257:154-7.
  20. DE SAMPAIO GOES FC, OLIVEIRA DT, DORTA RG, NISHIMOTO IN, LANDMAN G, KOWALSKI LP. Prognoses of oral basaloid squamous cell carcinoma and squamous cell carcinoma: a comparison. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:83-6.

## Traitement par chimiothérapie d'induction et radiothérapie des cancers du cavum de type UCNT

Combined induction chemotherapy and radiotherapy  
in case of undifferentiated carcinoma of nasopharynx  
tumours (UCNT)

Ch. A. Righini<sup>1</sup>  
E. Soriano<sup>1</sup>  
N. Morel<sup>1</sup>  
A. Hitter<sup>1</sup>  
M. Bolla<sup>2</sup>  
E. Reyt<sup>1</sup>  
(Grenoble)

### Résumé

**Objectifs :** les objectifs de notre étude étaient d'étudier la morbidité et les résultats carcinologiques du traitement associant chimiothérapie d'induction – radiothérapie dans les UCNT (Undifferentiated Carcinoma of Nasopharynx Tumor). **Patients et méthodes :** il s'agissait d'une étude rétrospective (1987–2002) de patients traités en première intention. Les patients ayant des métastases viscérales lors du bilan initial ont été exclus. Deux types de chimiothérapie ont été administrés : le protocole BAC (Bléomycine, Adriamycine, Cisplatyl) et le protocole FUCIFOL (5 Fluoro-uracyl, Cisplatyl, Elvorine). Le traitement par radiothérapie a comporté soit une radiothérapie exclusive, soit une chimio-radiothérapie concomitante. Les taux de survie ont été calculés selon la méthode non paramétrique de Kaplan-Meier et comparées entre eux par des tests de Logrank. Les analyses multi variées ont été effectuées par régression logistique. **Résultats :** 44 patients (32 hommes, 12 femmes) d'un âge moyen de 46 ans (14–77) ont été inclus. La tolérance du traitement a été globalement bonne (chimiothérapie 71 %, radiothérapie 82 %). La mortalité liée au traitement a été nulle. L'efficacité de la chimiothérapie a été meilleure avec le schéma BAC. Au terme du traitement, une réponse complète a été obtenue dans 82 % des cas. La première cause d'échec a été l'apparition de métastases (64 % des décès). Les taux de survie spécifique et sans rechute à 3 ans ont été respectivement de 78 % et 69 %. En analyse multi variée, les variables indépendantes chimiothérapie néo-adjuvante et réponse initiale au traitement étaient liées de manière significative au décès spécifique avec un p respectif de 0.02 et 0.0084. **Conclusions :** l'association chimiothérapie d'induction-radiothérapie est efficace dans le traitement des UCNT. La tolérance au traitement est bonne. Nos résultats sont comparables à ceux de la littérature.

**Mots-clés :** Carcinome indifférencié du cavum, chimiothérapie néo-adjuvante, radiothérapie, tolérance et efficacité du traitement.

### Summary

**Objective:** The objectives of our study were to consider the morbidity and the effectiveness of combined induction chemotherapy and radiotherapy in case of Undifferentiated Carcinoma of Nasopharynx Tumor (UCNT). **Patients and methods:** It was a retrospective study (1987 – 2002) including patients without any previous treatment. Patients with distant metastases during initial check-up were excluded. Two types of chemotherapy were administered: The protocole BAC (Bleomycin, Adriamycin, Cisplatinum) and the protocole FUCIFOL (Fluorouracil, Cisplatinum, Elvorin). The protocole of radiotherapy was either a radiotherapy alone or a concomitant chemotherapy and radiotherapy. The survival rates were calculated with the nonparametric method of Kaplan-Meier and compared with logrank tests. The multivariate analysis were made with the regressive logistic method. **Results:** Forty four patients (32 males, 12 females), average age 46 years (14–77) were selected. On the whole, the tolerance of the treatment was good (chemotherapy 71%, radiotherapy 82%). The mortality consecutive to the treatment was null. The effectiveness of treatment was better with the protocole BAC. At the end of the treatment, a total response was obtained in 82% of cases. The first etiology of treatment failure was the emergence of metastases (64% of deaths). The specific and free survival rates at 3 years were respectively 78% and 69%. With the multivariate analysis, the independent variables inductive radiotherapy and the initial response to treatment were significantly linked to the specific death with a respective p value of 0.02 and 0.0082. **Conclusions:** Combined induction chemotherapy and radiotherapy is efficient in the treatment of UCNT. The tolerance of treatment was good. Our results are comparable with those reported in the literature.

**Key-words:** Undifferentiated carcinoma of nasopharynx tumour, primary chemotherapy, radiotherapy, tolerance and effectiveness of the treatment.

1. CHU A. Michallon, Service d'ORL et de chirurgie cervico-faciale, 38043 Grenoble cedex 09, France.  
Email: CRighini@chu-grenoble.fr
2. CHU A. Michallon, Service de Radiothérapie, 38043 Grenoble cedex 09, France.

Article reçu : 23/01/06

accepté : 05/04/06

### INTRODUCTION

Quatre vingt dix pourcents des cancers du cavum sont de nature épithéliale, regroupés sous le terme de carcinomes nasopharyngés [1]. Parmi eux, l'UCNT

(Undifferentiated Carcinoma of Nasopharynx Tumor) est le type histologique le plus fréquent [2]. Il existe des foyers d'endémie en Asie du sud est et dans les pays du Maghreb ; en Europe, les régions où son incidence est la plus élevée se situent sur le pourtour méditerranéen [3]. Il se distingue des autres cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) par : 1) son indépendance par rapport aux carcinogènes que sont le tabac et l'alcool ; 2) l'implication de l'Ebstein Barr Virus (EBV) dans la carcinogénèse [4, 5] ; 3) sa chimio et radio-sensibilité conditionnant son traitement. Les buts de notre étude étaient d'étudier la morbidité et les résultats carcinologiques de l'association chimiothérapie d'induction - radiothérapie dans le traitement des carcinomes de type UCNT.

### PATIENTS ET MÉTHODE

Il s'agit d'une étude rétrospective (1987 - 2002). Les trois principaux critères d'inclusion des patients étaient : 1) l'histologie ; 2) le mode de traitement ; 3) l'absence de métastases autres que ganglionnaires cervicales au moment du diagnostic. Seuls les patients traités pour un cancer du cavum de type UCNT ont été inclus. Il s'agissait soit de carcinomes indifférenciés (type 3 selon la classification OMS) soit de carcinomes peu différenciés (type 2). Aucun n'avait été préalablement traité pour cette localisation.

Le traitement devait comporter une association chimiothérapie d'induction - radiothérapie. Un suivi clinique minimum de trois ans après la fin du traitement était exigé.

Tous les patients ont eu avant de débiter le traitement un scanner et/ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) avec des coupes débutant, en haut, au niveau de la base du crâne et se terminant, en bas, à l'aplomb de la jonction cervico-thoracique. Tous ont eu une échographie hépatique, une radiographie des poumons et, pour les patients inclus après 2000, un scanner injecté du thorax

Deux types de chimiothérapie ont été utilisés : le schéma BAC (Bléomycine 10mg/m<sup>2</sup>/24h J1-J3, Adriamycine 40 mg/m<sup>2</sup> J4, Cisplatyl 100 mg/m<sup>2</sup> J4-J5), 3 cures de 5 jours à 3 semaines d'intervalle, et le schéma FUCIFOL (5 Fluoro-uracyl 2000 mg/m<sup>2</sup>, Cisplatyl 35 mg/m<sup>2</sup> et Elvorine 250 mg/m<sup>2</sup>), 6 cures hebdomadaires de 24 heures. Tous les patients avaient une clairance de la créatinine, un ionogramme sanguin, une numération formule (NFS) avant le début du traitement. En cas de schéma BAC, les patients bénéficiaient d'une échographie cardiaque avec étude de la fraction d'éjection myocardique (FEM) ; le ionogramme et la NFS étaient contrôlés après et avant chaque cure, quelque soit le type de chimiothérapie.

La radiothérapie a été dans tous les cas une radiothérapie externe avec ou sans potentialisation par un sel de Platine (Cisplatyl ou Paraplatine 100mg/m<sup>2</sup> à J1, J2

et J43 de la radiothérapie). Elle était débutée dans un délai de 3 à 6 semaines après la fin de la chimiothérapie.

L'évaluation de la réponse au traitement a été clinique incluant, une cavoscopie et une palpation des aires ganglionnaires, et radiologique (scanner et/ou IRM). Les taux de survie ont été calculés selon la méthode non paramétrique de Kaplan-Meier et comparés entre eux par des tests de Logrank. Les analyses multivariées ont été effectuées par régression logistique. Les patients perdus de vue, même en rémission loco-régionale et générale au moment de la dernière consultation ont été comptabilisés avec les patients décédés.

### RÉSULTATS

44 patients, 32 hommes et 12 femmes, d'un âge moyen de 46 ans (14-77) ont été inclus, soit un peu moins de 3 cas (2, 8) par an. 20 (45 %) étaient originaire du Maghreb, 24 du sud de l'Europe (55 %). Aucun n'avait d'antécédent de cancer des voies aéro-digestives supérieures (VADS) et/ou d'irradiation cervicale. Dans 72 % des cas (n= 32) les patients n'avaient pas d'imprégnation tabagique et/ou oenologique. 29 avaient au moins une adénopathie cervicale (66 %), 21 avaient une otite muqueuse uni ou bilatérale (48 %) et 20 présentaient une obstruction nasale associée ou non à des épistaxis (46 %). 70 % (n= 31) des patients présentaient au moins un de ces trois signes cliniques.

Dans 7 cas (16 %), il s'agissait d'un carcinome peu différencié (OMS 2) et dans 37 cas (84 %) d'un carcinome indifférencié (OMS 3). Pour 31 patients (70 %) un dosage des anticorps IgA anti-VCA a été réalisé. Ce dosage était positif pour 28 patients (90 % des cas testés) et négatifs chez 3 patients ; pour ces 3 patients, la tumeur était un carcinome peu différencié. La répartition en fonction du T et du N est résumée dans le tableau I.

36 patients (82 %) ont eu une chimiothérapie selon le schéma BAC ; dans tous les cas il s'agissait d'un carcinome indifférencié. 8 (18 %) ont été traités selon le schéma FUCIFOL ; dans 7 cas il s'agissait d'un carcinome peu différencié et dans 1 cas d'un carcinome indifférencié. Le dernier patient avait une FEM ne permettant pas l'utilisation d'Adriamycine.

La radiothérapie externe a été potentialisée par des sels de Platine dans 10 cas (23 %). La dose moyenne délivrée au niveau du cavum a été de 66 (60-70) Grays et de 54 (50-60) Grays au niveau des aires ganglionnaires.

Si l'on prend en compte uniquement les patients ayant eu la totalité de leur chimiothérapie, quelque soit le protocole (n= 40), 29 (73 %) ont eu une réponse complète (clinique et radiologique) ; une réponse complète à la chimiothérapie a été noté chez 78 % (n= 25) des patients ayant eu un protocole BAC et 50 % (n= 4) des patients ayant eu un protocole FUCIFOL. Le taux de réponse complète avec le protocole BAC a été significativement plus élevé qu'avec le protocole FUCIFOL (p: 0.03).

TABLEAU I : Répartition des cas selon le T et le N.

	T1	T2	T3	T4	Total
N0	-	4	5	6	15
N1	-	3	2	3	8
N2	2	6	6	3	17
N3	1	3	-	-	4
Total	3	16	13	12	44

TABLEAU II : Tolérance de la chimiothérapie.

Chimiothérapie	Tolérance bonne	Tolérance moyenne *	Tolérance médiocre **	Nb de cas
BAC	25 (70%)	7 (19%)	4 (11%)	36
FUCIFOL	6 (75%)	2 (25%)	-	8
Total	31 (71%)	9 (20%)	4 (9%)	44

\* : report (de 8 à 15 jours) d'au moins une cure ;  
\*\* : arrêt de la chimiothérapie

La tolérance de la chimiothérapie a été bonne dans 31 cas (71 %) ; elle a été moyenne dans 9 cas (20 %) et médiocre dans 4 cas (9 %). La tolérance en fonction du type de chimiothérapie est résumée dans le tableau II. Les deux causes de report ont été : 1) une toxicité hématologique dans 7 cas (BAC : 5, FUCIFOL : 2) ; 2) des troubles digestifs avec vomissements et/ou diarrhées dans 4 cas, entraînant des perturbations électrolytiques graves (hyponatrémie et/ou hypokaliémie) dans 2 cas, associés à une toxicité hématologique dans 2 cas (BAC : 3, FUCIFOL : 1). Les 4 cas d'arrêt de la chimiothérapie l'ont été pour toxicité hématologique. Ces patients ont eu 2 cures sur les 3 prévues. Il n'y avait pas de différence significative en ce qui concerne la tolérance (et la morbidité) entre les deux protocoles de chimiothérapie.

La tolérance de la radiothérapie a été bonne dans 36 cas (82 %) ; elle a été moyenne dans 8 cas (18 %). La tolérance en fonction du type de radiothérapie est résumée dans le tableau III. Il n'y avait pas de différence en fonction du type de radiothérapie. La cause de report a été l'apparition d'une mucite grade II – III. Dans tous les cas les patients ont pu terminer leur radiothérapie. Aucun cas de radiomucite grade IV n'a été constaté.

TABLEAU III : Tolérance de la radiothérapie.

Radiothérapie	Tolérance bonne	Tolérance moyenne *	Tolérance médiocre **	Nb de cas
Chimio-radiothérapie	8 (80%)	2 (20%)	-	10
Radiothérapie seule	28 (82%)	6 (25%)	-	34
Total	36 (82%)	8 (20%)	-	44

\* : report (de 8 à 15 jours) d'au moins une cure ;  
\*\* : arrêt de la chimiothérapie

Aucun décès liés au traitement n'a été constaté.

La médiane du suivi a été de 54 mois. 4 patients ont été perdus de vue, 44 mois en moyenne après la fin de leur traitement ; tous étaient en rémission loco-régionale et générale lors de leur dernière consultation.

Au terme du traitement, 36 patients (82 %) étaient en rémission loco-régionale. Parmi les 8 autres, 6 ont présenté une poursuite évolutive locale, 2 ont présenté une rechute ganglionnaire et ont pu bénéficier d'une chirurgie ganglionnaire cervicale de rattrapage (évidement unilatéral 1, bilatéral 1). Au terme de notre analyse, les 2 derniers patients étaient en rémission loco-régionale et générale avec un délai de suivi respectif de 53 et 42 mois. Pour les 6 autres patients, 2 ont été traités avec de la chimiothérapie selon le protocole BAC, 2 cures puis arrêt compte tenu d'une toxicité hématologique et d'une altération de l'état général ne permettant pas la poursuite du traitement ; 4 ont bénéficié de soins de soutien. Tous sont décédés dans un délai inférieur à 18 mois, 4 d'une poursuite évolutive locale et 2 d'une poursuite évolutive locale et métastatique ; il s'agissait dans tous les cas de patients traités initialement pour un cancer à un stade avancé (stade III – IV).

Au total 11 (25 %) patients sont décédés au cours des 5 ans de suivi : 7 d'une évolution métastatique (16 %) en incluant les 2 patients décédés d'une poursuite évolutive locale et métastatique, et 4 d'une poursuite évolutive locale (9 %). Aucun n'est décédé d'une cause intercurrente. On peut noter que la première cause de mortalité a été l'apparition de métastases avec 64 % des décès qui leur ont été imputés.

Le taux de survie globale des 44 patients était de 78 % à 3 ans et 66 % à 5 ans ; n'ayant aucun décès intercurrent dans la cohorte des patients étudiés, les taux de survie spécifique à 3 et 5 ans étaient identiques (tableau IV). Le taux de survie sans rechute était de 69 % à 3 ans et 64 % à 5 ans (tableau IV). La comparaison en analyse uni variée des taux de survie globale (et spécifique) ne retrouvait pas de différence en fonction de l'origine ethnique, du sexe et du type histologique (OMS 2 / OMS 3), de la présence ou non d'adénopathies au moment du diagnostic.

TABLEAU IV : Taux de survie.

Survie	1 an	3 ans	5 ans
Globale	91%	78%	66%
Spécifique	91%	78%	66%
Sans rechute	81%	67%	64%

En revanche, la comparaison des taux de survie spécifique retrouvait une différence statistique significative entre :

1) les patients pour les quels le diagnostic avait été fait dans les 3 mois (n= 21) de l'apparition des signes fonctionnels ou cliniques, et ceux dont le diagnostic avait été fait après 3 mois (n= 23) avec des taux respectifs de 90 % et 68 % à 3 ans, 78 % et 49 % à 5 ans (p : 0.043) ;

2) les patients traités par chimiothérapie type BAC (n= 36) et ceux traités selon un schéma FUCIFOL (n= 8), les premiers ayant un taux de survie de 82 % à 3 ans et 73 % à 5 ans, les seconds un taux de survie de 62 % à 3 ans et 21 % à 5 ans (p : 0.009) ;

3) les patients ayant présenté lors de l'évaluation post thérapeutique une rémission loco-régionale complète (n= 36) et ceux qui avaient une réponse incomplète (n= 8), avec des taux respectifs de 91 % et 25 % à 3 ans, 71 % et 25 % à 5 ans (p : 0.0001).

Les résultats étaient identiques en ce qui concerne la survie sans rechute en comparant les mêmes sous groupes hormis pour le délai diagnostique, avec cette fois-ci une différence non significative.

En analyse multi variée, si la variante dépendante est le décès spécifique, les variables indépendantes sexe, pays d'origine, délai diagnostique, présence d'adénopathies cervicales au moment du diagnostic, type histologique, type de radiothérapie, ne participaient pas de manière significative au décès. En revanche, les variables indépendantes chimiothérapie d'induction et réponse initiale au traitement étaient liées de manière significative au décès spécifique avec un p respectif de 0.02 et 0.0084. Dans ce modèle, les rapports de vraisemblance logistique donnaient pour les deux dernières variables des valeurs de p respectives de 0.02 et 0.006.

#### DISCUSSION

Les UCNT du cavum sont une entité carcinologique différente des autres carcinomes malpighiens des VADS. L'entité UCNT regroupe en fait les carcinomes indifférenciés (OMS type 3) et les carcinomes peu différenciés (OMS type 2) dont ils partagent l'évolution et le pronostic [6, 7].

Le nombre de patients inclus dans notre série a été faible. Cela tient en grande partie aux caractères épidémiologiques de ce cancer. En effet, d'un point de vue épidémiologique, notre étude confirme que ce type de cancer touche une population ciblée. Il s'agit de sujets jeunes, originaires du pourtour méditerranéen, majoritairement du Maghreb, sans facteur de risque éthylo-tabagique (72 % des cas), avec une forte corrélation entre les tumeurs traitées et l'EBV (90 % des recherches). Elle ne concerne donc qu'une fraction de la population française, ce qui explique le faible nombre de nouveaux cas traités chaque année (3) dans notre institution, alors que 250 nouveaux cas annuels, en moyenne, de cancers des VADS toutes localisations confondues sont traités. Les signes cliniques au moment du diagnostic étaient ceux rapportés dans la littérature. Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de notre population étaient donc en accord avec ceux rapportés dans la littérature pour ce type de cancer [2, 3]. Notre population était donc représentative des patients traités pour un UCNT et nos résultats pouvaient ainsi être comparés aux études

publiées concernant les UCNT traités par l'association chimiothérapie d'induction-radiothérapie

D'un point de vue thérapeutique, les UCNT sont des tumeurs chimio et radiosensibles. La chimiothérapie d'induction a, dans notre étude, quelques soit le protocole utilisé une morbidité acceptable et une morbidité nulle, sans différence en fonction du type de chimiothérapie. La tolérance de la radiothérapie a été également bonne sans différence entre la radiothérapie seule et la radiothérapie avec adjonction des sels de Platine.

Plusieurs études de phase II de chimiothérapie d'induction ont rapporté des taux de réponse complète pouvant aller jusqu'à 80 % [8, 9]. En terme d'efficacité, le schéma FUCIFOL est, dans notre expérience, moins efficace que le schéma BAC. En effet le taux de réponse complète avec le schéma FUCIFOL est significativement plus faible qu'avec le schéma BAC ; la conséquence directe est une diminution significative de la survie spécifique en analyse uni ou multivariée. Dans la littérature, les drogues répertoriées comme étant efficace dans le traitement des UCNT sont : le Cisplatyl (CDDP), la bléomycine, la doxorubicine, l'épirubicine [10], la mitoxantrone [11], le méthotrexate et le 5 Fluoro-uracyl. La majorité des protocoles de chimiothérapie recensés comportent une ou l'association de plusieurs de ces drogues à des doses variables. Les modalités d'administration et la durée des traitements sont également extrêmement variables. Il est donc, stricto sensu, très difficile de comparer les résultats de la chimiothérapie d'induction dans le traitement des UCNT d'une étude à l'autre. Il en est de même en ce qui concerne la comparaison de la toxicité de la chimiothérapie.

La chimiothérapie administrée de façon concomitante à la radiothérapie est supposée augmenter l'efficacité de radiothérapie sur la tumeur et diminuer la probabilité de métastases par son effet cytotoxique systémique. Un autre argument pour utiliser la chimiothérapie concomitante à la radiothérapie dans les UCNT vient de l'analyse de l'effet observé dans les autres carcinomes épidermoïdes des VADS. En effet, en 1995, une méta-analyse portant sur plus de 7000 patients inclus dans une étude randomisée, a montré pour la première fois que la chimiothérapie utilisée de façon concomitante à la radiothérapie apportait un bénéfice significatif sur la survie, ce qui n'est pas le cas pour la chimiothérapie d'induction ou adjuvante [12]. En ce qui concerne le traitement des UCNT, la place de la chimiothérapie concomitante n'est pas parfaitement établie. Seule une étude randomisée de phase III portant sur 193 patients a comparé la radiothérapie seule versus la chimio-radiothérapie concomitante (CDDP à 100 mg/m<sup>2</sup> à J1, 21 et J41). Le gain de plus de 30 % en survie spécifique à 3 ans pour le bras chimio-radiothérapie montre le réel bénéfice de cette association sans permettre toutefois de déterminer les indications de ce traitement par rapport à une radiothérapie conventionnelle. Par contre il n'y a pas, à notre connaissance, d'étude portant sur la morbidi-

té de la radiothérapie seule ou associée à de la chimiothérapie dans le traitement des UCNT.

L'association chimiothérapie d'induction-radiothérapie est plus efficace en terme de survie par rapport à la radiothérapie seule dans le traitement des UCNT. L'étude de phase III réalisée par l'INSG (International Cancer Study Group) entre 1989 et 1993 a été la première à démontrer le bénéfice lié à l'utilisation de la chimiothérapie d'induction avant la radiothérapie. Dans cette étude une différence de survie sans rechute à 3 ans était significativement plus élevée ( $p < 0.001$ ) dans le groupe avec chimiothérapie (52 %) par rapport au bras radiothérapie seule (34 %) [13]. Par la suite, ces résultats ont été confirmés par deux études randomisées confirmant l'intérêt de la chimiothérapie d'induction associée à la radiothérapie dans le traitement des UCNT, particulièrement dans les formes localement avancées [14, 15].

Si l'on compare la survie sans rechute à 3 ans de notre série à des séries semblables (nombre de patients et type de traitement), celle-ci est plus élevée de 7 %, en moyenne (tableau V). Ceci s'explique vraisemblablement par le nombre élevé de petites tumeurs T1-T2 (44 %) et le nombre également élevés de patients ayant un faible statut ganglionnaire (N0-N1) dans notre série (53 %). Dans notre expérience, les deux causes d'échec du traitement ont été par ordre décroissant de fréquence l'apparition de métastases et une poursuite évolutive locale, ce qui est conforme aux données de la littérature [20-24]. De nombreuses études utilisant la chimiothérapie à visée palliative dans les UCNT métastatiques, soulignent la chimio-sensibilité de ces tumeurs [25]. Les taux de réponse varient d'une étude à l'autre selon le type de patients inclus, avec en particulier des réponses plus fréquentes pour les métastases pulmonaires et osseuses. On note également des variations selon le type de chimiothérapie, avec notamment des taux de réponse plus élevés dans les protocoles utilisant du CDDP [26]. A noter que la radiothérapie à visée palliative peut aussi être utile dans certaines localisations métastatiques, en particulier les métastases osseuses douloureuses et en cas de dissémination ostéopériurales. En cas de non stérilisation ou de rechute après traitement, en fonction de l'état général du patient, de la trophicité des tissus irradiés et du volume tumoral résiduel, la ré-irradiation reste la méthode la plus utilisée, souvent en association avec la chimiothérapie [27].

TABLEAU V : Taux de survie sans rechute à 3 ans chez des patients traités par chimiothérapie néo-adjuvante suivie de radiothérapie.

Auteurs (ref)	Année	Nb de patients	Survie SR à 3 ans (%)
Dimery [17]	1991	43	65
Boussen [18]	1991	30	53
Fountzilias [19]	1991	39	63
Notre série	2005	44	67

Ref : références ; Nb : nombre ; Survie SR : survie sans rechute.

## CONCLUSION

La présentation épidémiologique et clinique des patients porteurs d'un UCNT inclus dans notre étude étaient en tout point comparables avec celles décrites dans la littérature. Tous ont été traités par chimiothérapie d'induction et radiothérapie. La morbidité de ce traitement a été acceptable et aucun patient n'est décédé du fait du traitement. L'efficacité du traitement a été moins importante pour les patients traités avec le protocole FUCIFOL, avec une survie spécifique moins bonne à 3 et 5 ans par rapport aux patients traités avec le protocole BAC. Nous proposons donc de ne plus utiliser le protocole FUCIFOL sauf si, en particulier pour des causes cardiaques, le protocole BAC ne peut être administré. En ce qui concerne le choix du type de radiothérapie, radiothérapie seule versus chimio-radiothérapie concomitante, notre étude ne peut répondre quant à la supériorité de l'une par rapport à l'autre. En terme de résultats carcinologiques, nos résultats sont comparables à ceux de la littérature.

## Références bibliographiques

- FANDI A, ALTUN M, AZLI N, ARMAND JP, CVITKOVIC E. Nasopharyngeal cancer: Epidemiology, staging, and treatment. *SEM ONCOL.* 1994;21:382-97.
- World Health Organisation: WHO handbook for reporting results of cancer treatment. *WHO Offset Publication, 48, Geneva, Switzerland, 1979.*
- MUIR CS, WATERHOUSE J, MACK T. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ 88, vol. V, Lyon:IARC, 1987.*
- ZHENG X, YAN L, NILSSON B, EKLUND G, DRETTNER B. Epstein-Barr virus infection, salted fish and nasopharyngeal carcinoma. A case-control study in southern China. *ACTA ONCOL.* 1994;33:867-72.
- CHOI PH, SUEN MW, PATH MR, HUANG DP, LO KW, LEE J. Nasopharyngeal carcinoma: Genetic changes, Epstein-Barr virus infection or both. *CANCER.* 1993;72:2873-8.
- KRUEGER GR, WUSTROW J. Current histological classification of nasopharyngeal carcinoma at Cologne University. In: *Grundman E, Krueger GRF, Ablashi DV, eds: Cancer campaign: nasopharyngeal carcinoma, vol 5. Stuttgart, Germany, Gustave Fisher Verlag, 1981, 51-6.*
- SCHMINKE A. Ueber lymphoepitheliale geschwulste Beiter. *PATHOL ANAT.* 1921;58:161-70.
- BABOUCHE M, CVITKOVIC E, AZLI N et al. High complete response in advanced nasopharyngeal carcinoma with bleomycin, epirubicin, and cisplatin before radiotherapy. *J NATL CANCER INST* 1990;82:616-20.
- DIMERY I, PETERS LJ, GOEPFERT H et al. Effectiveness of combined induction chemotherapy and radiotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J CLIN ONCOL.* 1993;11:1919-28.
- SHIU WC, TSAO SY. Efficacy of 4'-epidoxorubicin (Farmorubicin) in advanced nasopharyngeal carcinoma. *CLIN TRIALS J.* 1988;26:149-52.
- DUGAN M, CHOY D, NGAI A et al. Multicenter Phase II Trias of mitoxantrone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma in southeast Asia: an asian-oceanian clinical oncology association study group. *J CLIN ONCOL.* 1993;11:70-76.
- MUNRO AJ. An overview of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy in head and neck cancer. *BR J CANCER.* 1995;71:83-91.
- INTERNATIONAL NASOPHARYNX CANCER STUDY GROUP. Preliminary results of a randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy (cisplatin, epirubicin, bleomycin) plus

- radiotherapy versus radiotherapy alone in stage IV (N2-3, M0) undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: A positive effect on progression-free survival. *INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS.* 1996; 35:463-9.
14. AL-SARRAF M, LEBLANC M, GIRI P. Superiority of chemoradiotherapy vs radiotherapy in patients with locally advanced nasopharyngeal cancer: Preliminary results of intergroup 0099 (SWOG, RTOG, ECOG). *PROC AM SOC CLIN ONCOL.* 1996;15: 882-9.
  15. EL GUEDDARI B. On behalf of the International Nasopharynx Cancer study Group. Final results of the VUMCA I randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy (cisplatin, epirubicin, bleomycin) plus radiotherapy alone in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *PROC ASCO.* 1998;17:abst.1482.
  16. LEE AW, POON YF, FOO W et al. Retrospective analysis of 5,037 patients with nasopharyngeal carcinoma treated during 1976-1985: overall survival and patterns of failure. *INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS.* 1992;23:261-70.
  17. DIMERY IW, PETERS LJ, GOEPFERT H, MORRISON WH, BYERS RM, GUILLORY C, MCCARTHY K, WEBER RS, HONG WK. Effectiveness of combined induction chemotherapy and radiotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J CLIN ONCOL.* 1993;11:1919-28.
  18. BOUSSEN H, CVITKOVIC E, WENDLING JL et al. Chemotherapy of recurrent and/or metastatic UCNT with cisplatin, bleomycin and 5-FU. *J CLIN ONCOL.* 1991;9:1675-81.
  19. FOUNTZILAS G, DANILIDIS J, KOSMIDIS P. Platinum-based chemotherapy followed by radiation therapy of locally advanced nasopharyngeal cancer : a retrospective analysis of 39 cases. *ACTA ONCOL.* 1991;30:831-4.
  20. AHMED A, STEFANI S. Distant metastases of nasopharyngeal carcinoma. A study of 256 male patients. *J SURG ONCOL.* 1986;33: 194-7.
  21. CVITKOVIC E, BACHOUCHI M, BOUSSEN H et al. Leukemoid reaction, bone marrow invasion, fever of unknown origin, and metastatic pattern in the natural history of advanced undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type: A review of 255 consecutive cases. *J CLIN ONCOL* 1993;11:2434-42.
  22. CVITKOVIC E, BOUSSEN H, ARMAND JP. Nasopharyngeal cancer, undifferentiated type: The medical oncologist view point. *In: Muggia FM ed. Cancer chemotherapy: concepts, clinical investigations and therapeutic advances. Norwell: MA Kluwer,* 1989:175-211.
  23. KWONG D, SHAM J, CHOY D. The effect of locoregional control on distant metastatic dissemination in carcinoma of the nasopharynx. *INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS.* 1994;30:1029-36.
  24. MICHEAU C, BOUSSEN H, KLIJNANIENKO J. Bone marrow biopsies in patients with undifferentiated carcinoma of the nasopharyngeal carcinoma. *CHINA INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS* 1994;30:1037-42.
  25. CVITKOVIC E, AZLI N, BABOUCHI M, BOUSSEN H, ARMAND JP. Treatment of metastatic UCNT. *Head and Neck cancer. AMSTERDAM: EXPERTA MEDICA,* 1993;3:437-45.
  26. BOURHIS J, SCHWAAB G. Cancer du nasopharynx (cavum). *ENCYCL MÉD CHIR (ELSEVIER, PARIS), OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE,* 1999;20-590-A-10:14.
  27. HWANG JM, FU KK, PHILIPS TL. Results and prognostic factors in the retreatment of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *INT J RADIAT ONCOL BIOL PHYS.* 1998;41:1099-111.

## Annexe 6

6 a - Classification T des tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.

Lèvre, cavité buccale	
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 cm, ≤ 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	<i>Lèvre</i> : envahissement de la corticale osseuse, nerf alvéolaire inférieur, plancher de la bouche, peau <i>Cavité buccale</i> : envahissement de la corticale osseuse, muscles profonds extrinsèques de la langue, sinus maxillaire, peau
T4b	Espace masticateur, apophyses ptérygoïdes, base du crâne, artère carotide interne

Pharynx	
<i>Oropharynx</i>	
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 cm, ≤ 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	Larynx, musculature, profonde ou extrinsèque de la langue, muscle ptérygoïdien médian, palais osseux, mandibule
T4b	Muscle ptérygoïdien latéral, apophyses ptérygoïdes, paroi latérale du nasopharynx, base du crâne, artère carotide
<i>Hypopharynx</i>	
T1	Une sous-localisation et ≤ 2 cm
T2	Plus d'une sous-localisation ou > 2 cm, ≤ 4 cm
T3	Avec fixation du larynx ou > 4 cm
T4a	Cartilage thyroïde/cricoïde, os hyoïde, glande thyroïde, œsophage, tissu mou du compartiment central
T4b	Muscles pré-vertébraux, artère carotide, structures médiastinales

Larynx	
<i>Étage sus-glottique</i>	
T1	Une sous-localisation, mobilité normale
T2	Envahissement de la muqueuse de plus d'une sous-localisation adjacente de l'étage sus-glottique ou glottique, ou d'une région adjacente en dehors de l'étage sus-glottique ; sans fixation
T3	Limitée au larynx avec fixation des cordes vocales ou envahissement rétro-cricoïde, pré-épiglottique, espace para-glottique, érosion du cartilage thyroïde
T4a	Envahissement du cartilage thyroïde, trachée, tissus mous du cou, muscles profonds/extrinsèques de la langue, muscles sous-hyoïdiens, thyroïde, œsophage
T4b	Espace pré-vertébral, structures médiastinales, artère carotide
<i>Glotte</i>	
T1	Limitée aux cordes vocales, mobilité normale (a) une corde (b) deux cordes
T2	Extension aux étages sus-, sous-glottique, mobilité diminuée
T3	Fixation de(s) corde(s) vocale(s), espace para-glottique, érosion du cartilage thyroïde
T4a	Envahissement du cartilage thyroïde ; trachée, tissus mous du cou, muscles profonds/extrinsèques de la langue, muscles sous-hyoïdiens, thyroïde, œsophage
T4b	Espace prévertébral, structures médiastinales, artère carotide

Larynx	
<i>Étage sous-glottique</i>	
T1	Limitée à l'étage sous-glottique
T2	Extension aux cordes vocales, mobilité normale ou diminuée
T3	Fixation de(s) corde(s) vocale(s)
T4a	Envahissement du cartilage thyroïde/cricoïde ; trachée, muscles profonds/extrinsèques de la langue, muscles sous-hyoïdiens, thyroïde, œsophage
T4b	Espace prévertébral, structures médiastinales, artère carotide

6 b – Regroupements en stades des tumeurs de la cavité buccale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx.

### **Cavité buccale**

Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
Stade IVA	T1,T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stade IVB	tous T	N3	M0
	T4b	tous N	M0
Stade IVC	tous T	tous N	M1

### **Oro-et Hypopharynx**

Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
Stade IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stade IVB	T4b	tous N	M0
	tous T	N3	M0
Stade IVC	tous T	tous N	M1

### **Larynx**

Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M0
Stade III	T3	N0	M0
	T1,T2,T3	N1	M0
Stade IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stade IVB	T4b	tous N	M0
	tous T	N3	M0
Stade IVC	tous T	tous N	M1

Christian A. Righini · Georges Bettega  
Thomas Lequeux · Philippe Chaffanjeon  
Jacques Lebeau · Emile Rey

## Use of tubed gastro-omental free flap for hypopharynx and cervical esophagus reconstruction after total laryngo-pharyngectomy

Received: 19 November 2003 / Accepted: 18 June 2004 / Published online: 7 September 2004  
© Springer-Verlag 2004

**Abstract** In case of total laryngo-pharyngectomy (TLP), replacement of the pharyngoesophageal segment is more often done with jejunal flap; however, in some cases, this flap doesn't represent the best surgical technique of reconstruction. The tubed gastro-omental free flap (TGO) offers an alternative procedure in selective cases. The objective of the study was to assess the TGO as a method of pharyngoesophageal reconstruction. Our study was based on a literature review and a retrospective study of six consecutive cases of TGO reconstruction after TLP. Six patients aged from 52 to 70 years underwent TGO reconstruction after TLP. Five patients had previously received systemic chemotherapy and external irradiation at curative doses, and three had undergone previous surgery. No abdominal complication occurred. Partial necrosis of the gastric flap occurred in one case. Except for this case, the feeding tube could be removed after 15 days. One patient was successfully treated with pneumatic esophageal dilatation for stricture 2 months after surgery. Four patients died of loco-regional tumor evolution or distant metastatic disease. For both of the patients who survived (mean follow-up, 40 months), a normal diet and an esophageal voice were obtained. The TGO offers a safe method of reconstructing the pharyngoesophageal segment in a surgical field compromised of previous multimodal therapy.

**Keywords** Squamous cell carcinoma · Total pharyngolaryngectomy · Reconstruction · Gastro-omental free flap

### Introduction

In some cases of advanced squamous cell carcinoma, surgical treatment requires a large resection. Reconstruction for major full-thickness defects involving the skin in addition to the larynx, pharynx and esophagus is a real challenge. Successful replacement of the excised tissues with minimum deformity, as well as restoring pharyngeal function to give the best chance of recovering good swallowing, are the primary aims of the head and neck surgeon. Immediate reconstruction is necessary because it reduces scar formation, decreases patient morbidity and shortens the length of the hospital stay. Ideally, the surgeon must choose the simplest reconstruction without multiple stages or multiple flaps. Microvascular reconstructive surgery provides free flaps that can be used to achieve such a difficult reconstruction. Among these, the gastro-omental flap isn't often used. The first case of immediate reconstruction of the cervical esophagus and pharynx with a transplanted free graft of the gastric antrum was reported in 1961 by Hiebert and Cummings [1]. These authors proposed this technique only when a gastric pull-up or colon interposition was impossible. Eighteen years ago, Baudet described the first gastro-omental free flap to repair a delayed pharyngocutaneous fistula in a patient after extensive surgery for carcinoma of the pyriform sinus followed by intensive radiation therapy [2]. In 1990, Mixer reported the first cases (five patients) of simultaneous reconstruction of cervical soft tissue and the esophagus with a gastric tubed omental free flap with good results [3]. Since then, 14 cases of tubed gastro-omental free flap have been reported in the literature [4, 5, 6]. This report describes the use of tubed gastro-omental free flap in immediate reconstruction of the

C. A. Righini (✉) · T. Lequeux · E. Rey  
ENT Department, University Hospital of Grenoble,  
P.O. Box 217, 38043 Grenoble, France  
E-mail: CRighini@chu-grenoble.fr  
Tel.: +33-4-76765693  
Fax: +33-4-76765615

G. Bettega · J. Lebeau  
Department of Maxillofacial Surgery,  
University Hospital of Grenoble, Grenoble, France

P. Chaffanjeon  
Department of Thoracic Surgery,  
University Hospital of Grenoble, Grenoble, France

hypopharynx, esophagus and soft tissues in six patients treated with total laryngectomy and circumferential pharyngectomy with or without skin resection.

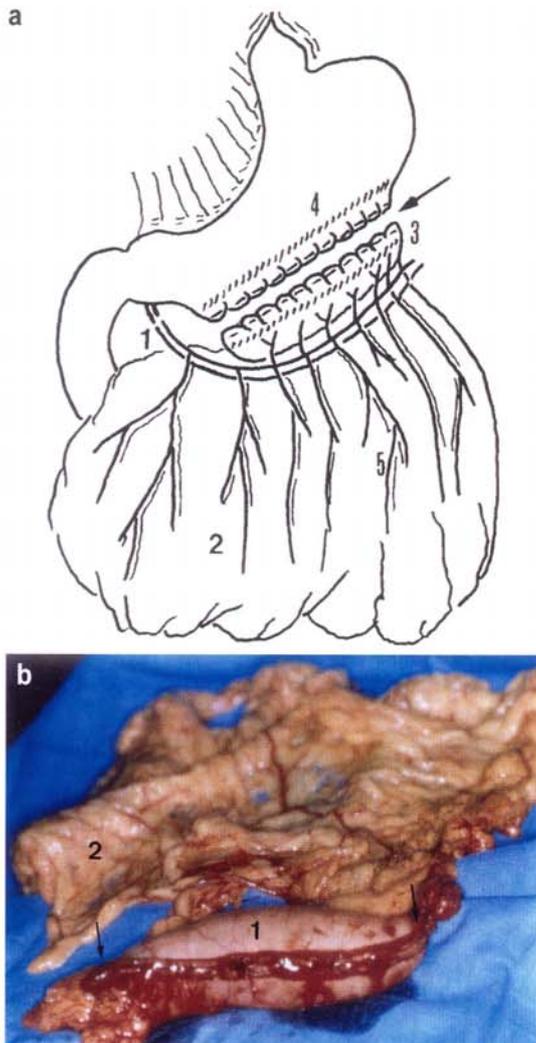
### Subjects and methods

Our study was based on a literature review and a retrospective study of six men with a mean age of 57 years (range, 52–70) treated at the ENT Department of Grenoble University Hospital between 1994 and 2001. Location, extension and TNM classification of the tumor for each patient are shown in Table 1. Five patients (nos. 1, 2, 3, 5 and 6) had been treated previously with chemotherapy followed by radiotherapy for a larynx or hypopharynx squamous cell carcinoma. Three of them also had surgery after radiotherapy owing to the persistence of all or part of the initial tumor. In case of pharyngocutaneous fistula, it was always surrounded by heavily irradiated, deeply infected and fibrous tissue. In the remaining four patients, two had a cervical abscess. Bacteriological specimens showed *Enterococcus faecalis* in one case and *Streptococcus faecium* in the other. One patient (no. 4) had had adjuvant chemotherapy without tumoral response. In case of an esophageal invasion, the largest esophageal extension was under 2 cm. Endoscopic procedure with biopsy was performed for all patients. Histological examination revealed an invasive squamous cell carcinoma in all cases. The complete check up included a panendoscopy, a cervical and thoracic scan and an ultrasound scan of the liver. No patient had another tumor located in the upper aerodigestive tract, and no metastasis was detected. After control of their general condition by a hyperprotidic diet via a nasogastric tube or gastrostomy, all patients received a tubed gastro-omental free flap. The patients were prepared and draped in the usual fashion for head and neck cancer removal. The abdomen was concomitantly prepared as a separate sterile field. The procedure was undertaken simultaneously by a team of head and neck, plastic and abdominal surgeons. Three patients had a total laryngectomy with a circumferential pharyngectomy and a bilateral neck dissection. Three patients, who previously had been treated with a laryngectomy and a neck dissection, had a pharyngectomy of the remaining hypopharynx. A cervical skin resection

was necessary in five cases and an esophageal resection in three cases. The largest esophageal and soft tissue defects were 5 cm and 140 cm<sup>2</sup>, respectively. While one surgical team performed the extirpation and prepared the recipient vessels, a second achieved the tubed gastro-omental flap for transfer, using a median abdominal incision located above the umbilicus. After the omentum had been mobilized from the colon and the right and left gastro-epiploic vessels identified, the greater curvature of the stomach was isolated on the marginal gastroepiploic arcades. Then, a gastric graft was harvested from the greater curvature of the stomach, starting just after the antrum. A GIA 50 stapler was used to incise and simultaneously close the stomach (Fig. 1a). Care was taken to avoid encroachment on the pylorus or gastroesophageal junction. For the patient with a preoperative gastrostomy, the gastric tube was removed and an inlet patch of gastric wall was removed and immediately stitched up. The resulting gastric tube together with the omentum was pedicled on the right gastroepiploic vessels. The free flap was not detached from the vessels until the recipient site was fully prepared for tissue transplantation. Then, the tubed gastro-omental flap was transferred to the neck, after excision of both extremities of the gastric part (Fig. 1b). Further to stomach closure, a needle catheter jejunostomy was placed for early postoperative feeding. The microvascular anastomoses were performed after the gastric tube was inserted into the pharyngoesophageal defect (Fig. 2). The extremities of the gastric tube were trimmed to approximate the oropharyngeal and esophageal diameters. Placement of the gastric graft was made under slight tension to obtain a linear form. An interrupted suture technique (Dexon 4-0) was used to reconstruct the mucosal plan. A second suture (Prolene 3-0) was made to join the gastric adventis and pharyngeal or esophageal muscles in both. The last suture was covered with the great omentum to reduce the risk of fistula formation. The flap was not perfused with any liquids, nor was it subjected to cooling. Neck vessels were found appropriate for use as recipient vessels in all cases: superior thyroid artery in four cases, lingual artery in two cases, superior thyroid vein in three cases and common facial vein in three cases. Once the vessels were joined together, flap viability was evidenced by color change, increased rugae formation and bleeding from the cut edges of the flap. The

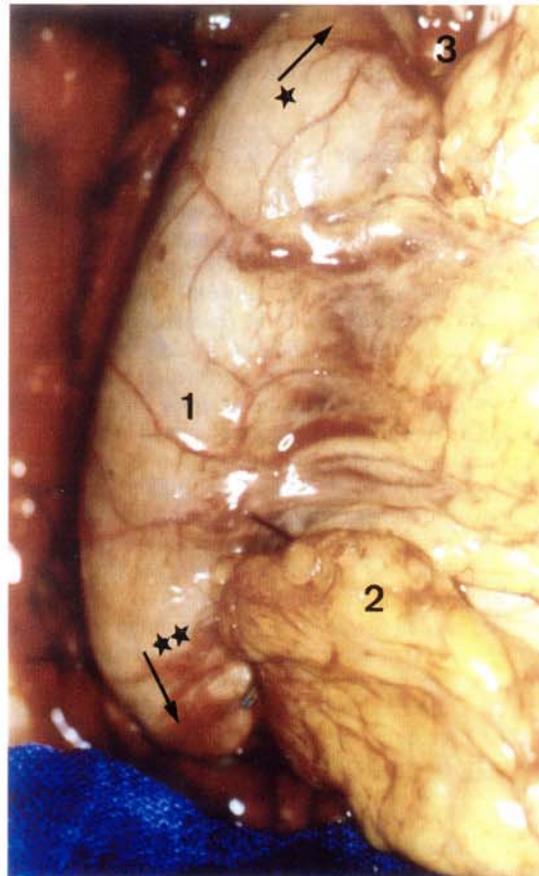
**Table 1** Location, extension and TNM classification of the tumor for each patient. C: chemotherapy (5 FU, cisplatinum), R: radiotherapy (7,000 rads), S: surgery

Patients	Sex	Age	Initial TNM classification	Previous treatment	Cutaneous fistula	Extension (hypopharynx and larynx excluded)	Gastrostomy
No. 1	M	52	T4 N1 M0	C + R	No	Soft tissues, esophagus	No
No. 2	M	70	T4 N0 M0	C + R + S	Yes (abcess +)	Soft tissues	Yes
No. 3	M	57	T4 N2a M0	C + R + S	Yes (abcess +)	Esophagus	No
No. 4	M	54	T4 N0 M0	C	No	Oropharynx, esophagus, soft tissues	No
No. 5	M	54	T4 N0 M0	C + R + S	Yes	Soft tissues	No
No. 6	M	55	T4 N2a M0	C + R	Yes	Soft tissues	No



**Fig. 1** a Sampling of tubed gastro-omental flap. 1 Right gastro-epiploic vessels; 2 great omentum; 3 gastric tube; 4 great antrum; 5 epiploic vessels. b Tubed gastro-omental free flap removed. 1 Gastric tube; 2 great omentum; → excision of both extremities

omentum was carefully tailored and sutured in place. It was used to provide bulk in the area of the anterior resection as well as to provide protection for the carotid artery. Then the neck was closed using 2 or 3 Delbey drains. The cervical cutaneous flap was turned over the omentum and fixed with few cutaneous stitches. The omentum was not totally covered to avoid stricture of the gastro-epiploic pedicle, and in case of cervical skin resection, a part of it was filled in the resulting defect (Fig. 3a). Particular care was taken to fully extend the neck to ensure that the omentum was not constricted, and a very light dressing was placed on top. All patients stayed 24 hours in an intensive care unit. We kept a constant watch on the omentum color, which was the key indicator of its viability and in a round-about way an indicator of the gastric tube viability. Pharyngoscopy

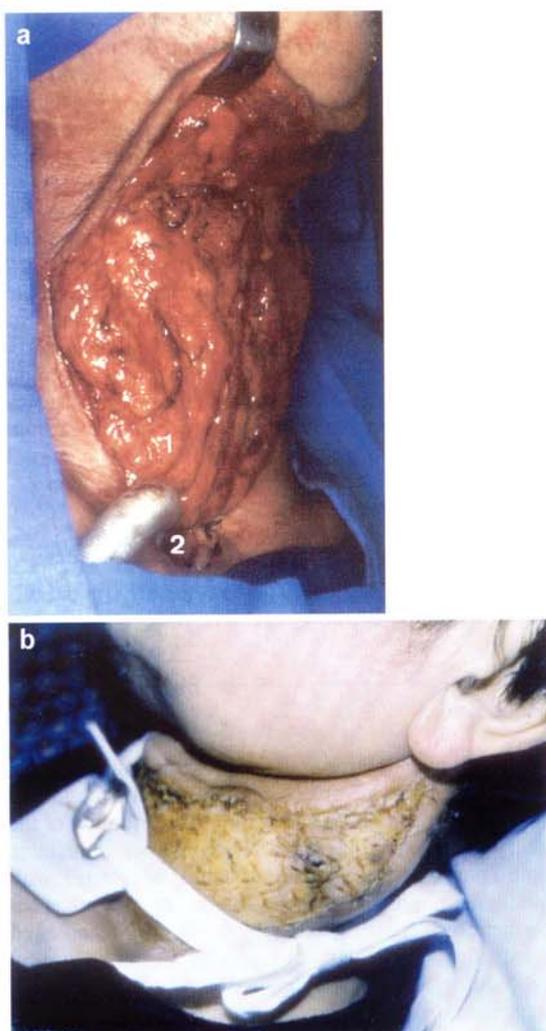


**Fig. 2** Tubed gastro-omental flap placed in the cervical defect. 1 Gastric tube; 2 great omentum; 3 gastro-epiploic vessels anastomosed with superior thyroid artery and vein; \* → oropharynx suture; \*\* → esophageal suture

with a 4-mm flexible fibroscope was performed every day to look at the color of the gastrum. A barium swallow was performed between postoperative days 10 and 15. In case of skin defect, a split-thickness skin graft was performed 3 weeks after the pharynx healing was obtained (Fig. 3b).

## Results

The mean surgical procedure time was 7 h 30 min. The immediate free flap viability was good in all cases. Endoscopy demonstrated an almost normal-looking gastric mucosa with evidence of some degree of edema and inflammation. No abdominal complication occurred. A partial loss of the gastric tube and omentum flap occurred in one patient 5 days after the procedure. Necrotic areas had to be removed under general anesthesia, and the defect was closed with a latissimus dorsi myocutaneous flap with a good result. Four patients had an uneventful postoperative course, and esophageal continuity without the formation of fistula



**Fig. 3 a** Great omentum filling the cervical soft tissues defect over the gastric tube. **b** Split-thickness skin graft in place (day 21)

was radiographically demonstrated for these patients. For this group, an oral food intake was begun on the 15th day, with a satisfactory feeding ( $>1,500$  kcal/24 h) on the 21st day (15–25), allowing the removal of the feeding tube without complication. One patient had fistula, which healed spontaneously within 3 weeks with a satisfactory feeding on the 28th day. In case of cervical skin resection, the omentum was left to granulate, and a split-thickness skin graft was performed under local anesthesia at 3 weeks after the pharynx healed, with 100% graft taking in all cases. One patient developed omental sag that interfered with tracheostomy care, and this necessitated the wearing of a tracheostomy tube for 2 months night and day. Secondly, the omentum size reduced significantly, and tracheostomy tube could be removed. In one case, stenosis involving the esogastric anastomosis occurred at 2 months, but was successfully treated by one pneumatic dilatation. Four patients died

of loco-regional tumor evolution or distant metastatic disease, which occurred at an average of 18 months after surgery. Today, two patients are alive without tumor evolution at 36 and 56 months, respectively. These patients can eat normally, and an esophageal voice has been progressively acquired with the help of speech therapy. For these two patients, from a cosmetic point of view, the result was judged to be excellent by a panel of independent observers.

## Discussion

Tumor recurrence after total laryngectomy often required circumferential resection of the hypopharynx, frequently extended into the oropharynx or the cervical esophagus. Reconstruction of such defects is clearly best performed with large flaps that fit either the caliber of the esophageal stump or that of oropharyngeal defect. Removed from the great curvature, the potential tubed gastro-omental flap is about 20 cm in length and 10 cm in diameter, which fits most defects encountered in clinical practice [7]. The possibility of varying the size of the gastric graft widely, without a significant reduction of its diameter in the middle part, makes the tubed gastro-omental flap well suited for cases of such difficult reconstructions [4]. A drawback associated with jejunal flap, which is the free flap most used to reconstruct the hypopharynx and esophagus after total pharyngo-laryngectomy, is its limited width. Although a 20 to 24 cm length of jejunum may be obtained as a vascularized free graft, the width is limited to the intraluminal circumference of 3 to 5 cm [7, 8]. Replacement of the pharyngo-esophageal mucosal segment with similar tissue offers the optimum in potential restoration of lost functions. The gastric antral mucosa offers distinct advantages. The smooth and wet mucosal surface of gastric mucosa does not collect food debris. It can produce large quantities of mucous and small quantities of acid [3]. This is a real advantage for irradiated patients who suffer from xerostomia. No specific problem arises from the persistence of small acid secretion from the ectopic gastric tissue, and it seems not to be necessary to give a proton pump inhibitor postoperatively [4]. The vascular pedicle of gastro-omental free flap can be developed to up to 30 cm, and it provides donor blood vessels with diameters over 2 mm, improving the success of vessel anastomosis [2, 4, 7]. For this reason, preference for the right gastro-epiploic vessels is imposed by the anatomical and dynamic predominance of this pedicle compared with the left gastro-epiploic one, as clearly proved by the anatomic studies [2]. The considerable length of the pedicle allows distant vascular implantation without the need for vein grafts at a suitable distance from the recipient site where post-surgical or post-radiotherapeutic sclerosis precludes reliable vascular anastomoses. In Guedon's study, thoracodorsal vessels, the scapular circumflex vessels and thoracoacromial vessels are used in descending order with good results [4]. The short

pedicle of jejunum free flap does not permit distant microvascular anastomosis if this is required. The greater omentum, which is attached to the gastric flap, affords the ideal coverage for both the stomach portion, especially over the pharyngeal and esophageal sutures, and the surrounding tissues to fill all dead spaces. It provides carotid artery protection in case of radical neck dissection, and, in case of skin resection, it can be used to provide bulk in the resulting defect [9]. A mesenteric flap combined with a free jejunal transfer was proposed by Yamamoto in 1995 for the same indications [10]. However, the author admits himself that the volume of mesenteric tissue is limited, and it can not provide sufficient volume to fill a large soft tissue defect. The favorable action of the omentum on the healing process is well documented and proved to be especially useful when surgery was performed in heavily irradiated areas and in case of chronic empyema [11, 12]. This is not the case with mesenteric tissue. When it is used earlier in the disease process, the TGO resists postoperative radiotherapy without any problem [2, 10]. In every case of skin resection, the omentum demonstrates its ability to reduce significantly the size of the initial skin defect by stretching the surrounding skin and improving its pliability [4]. For this reason, we think it is not necessary to close the neck immediately with a split-thickness skin graft, because the real skin defect cannot be primarily approximated. Because of its excellent vascularity, the omentum can easily be skin-grafted with excellent results. According to Panje, the omentum usually undergoes 50% atrophy over 3 to 6 months [7]. Only two cases (7.7%) of omental sag are found among the 26 patients (including our six patients) listed in the literature. No patient required a second stage to reduce the omentum volume. For this reason, it doesn't seem necessary to reduce significantly the omentum size during neck closure. The tubed gastric graft and the great omentum have the same pedicle. In our experience, the omentum's good color was always combined with a good vascularization of gastric mucosa objectified with the fiberscope. Indeed, the fiberscopy was difficult in some cases because of mucus hyper-production, especially for the first 3 days. So, for these reasons, we can say that the omentum's viability as evidenced by a bright yellow color is a good indicator of the entire flap; for us, it is not necessary to use postoperatively a Doppler probe placed on a superficial omental vessel to check the flap's viability [3]. Theoretically, previous gastrostomy precludes the use of any gastro-omental free flap. However, in cases of transcutaneous gastrostomy, a gastro-omental free flap can be successfully transferred provided that gastroepiploic vessels are found to be patent on abdominal exploration [4]. Disadvantages of the gastro-omental free flap include the requirement for an abdominal operation and for two or three operating teams and the propensity for excessive mucus production [3]. No abdominal complication is related in the literature in keeping with the flap sample. For us, the need for several operating teams offers, on the contrary,

advantages. Indeed, the gastro-omental flap can be harvested at the same time as resection of the head and neck cancer. This significantly reduces operative time. If resection and reconstruction are made by two different teams, as in our experience, the two operating teams can intervene for each other to obtain a better quality resection and choose the best recipient vessels. Excessive mucus production by the gastric mucosa may be noted during the early postoperative period [7]. If it is too unpleasant for the patient, a naso-pharyngeal probe can be placed during 48 or 72 h in the lumen of the gastric tube, and soft aspiration draws up the gastric liquid. No total loss of tubed gastro-omental free flap occurred in any of the patients among the 26 cases reported (including our 6 patients), but limited superficial necrotic areas had to be removed under local anesthesia from the omentum in eight patients (30.8%) [4]; a partial necrosis of gastric and omentum parts of the flap occurred 5 days after the procedure in our study (3.8%). Including our six patients, five (19.2%) fistulas were reported [4]. In all cases, healing was obtained with local treatment within 4 weeks. These results are comparable to results obtained with jejunal free graft [13].

---

## Conclusion

The tubed omental free graft is a versatile and composite flap that can provide mucosal lining as well as abundant soft tissue. It can be used to restore the continuity of the pharyngo-intestinal tract and to reconstruct in the same time a part of the cervical skin if it must be resected, with minimum donor-site defects, low morbidity, excellent cosmetic results and rapid rehabilitation. This reliable and sturdy flap is particularly appropriate in cases of surgical procedure realized in a septic environment, for example, a large pharyngo-cutaneous fistula with or without cervical abscess, or if the quality of cervical tissues is compromised by previous multimodality therapy, especially preoperative radiotherapy. In these cases, free flaps should be considered as a secondary option when local or pedicled musculo-cutaneous flaps are not available. However, TGO represents a better solution of reconstruction than jejunal flap, which is not a good flap when local sepsis exists or if skin reconstruction is necessary. In our opinion, TGO may be also proposed at the first intention when the hypopharyngeal tumor is extended and placed at the posterior wall of the oro-hypopharyngeal junction, imposing a large circumferential oropharyngeal resection. In this case, the large width of the tubed gastric flap in its upper part is an advantage to reconstruct the oro-hypopharyngeal junction.

---

## References

1. Hiebert CA, Cummings GO Jr (1961) Successful replacement of cervical esophagus by transplantation and revascularization of free graft of gastric antrum. *Ann Surg* 154:103-112

2. Baudet J (1979) Reconstruction of the pharyngeal wall by free transfer of the greater omentum and stomach. *Int J Microsurg* 1:53-59
3. Mixer RC, Rao VK, Katsaros J, Noon, J Tan E (1990) Simultaneous reconstruction of cervical soft tissue and esophagus with a gastro-omental free flap. *Plast Reconstr Surg* 86:905-909
4. Guedon CE, Marmuse JP, Gehanno P, Barry B (1994) Use of gastro-omental free flaps in major neck defects. *Am J Surg* 168:491-493
5. Carlson GW, Thourani VH, Codner MA, Grist WJ (1997) Free gastro-omental flap reconstruction of the complex, irradiated wound. *Head Neck* 19:68-71
6. Genden EM, Kaufman MR, Katz B, Vine A, Urken ML (2001) Tubed gastro-omental free flap for pharyngoesophageal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127:847-853
7. Panje WR, Little AG, Moran WJ, Ferguson MK, Scher N (1987) Immediate free gastro-omental flap reconstruction of the mouth and throat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96:15-21
8. Jones TR, Jones NF (1992) Advances in reconstruction of the upper aerodigestive tract and cranial base with free tissue transfer. *Clin Plast Surg* 4:819-833
9. Inoue Y, Tai Y, Fujita H, Tanaka S, Migita H, Hiyokawa K (1994) A retrospective study of 66 esophageal reconstructions using microvascular anastomoses: problems and our methods for atypical cases. *Plast Reconstr Surg* 94:277-284
10. Yamamoto Y, Nohira K, Shintomi Y, Yoshida T, Minakawa H, Okushiba S (1995) Mesenteric flap in free jejunal transfers: a versatile technique for head and neck reconstruction. *Head Neck* 17:213-218
11. Beelen RHJ (1991) The greater omentum: physiological and immunological concept. *Neth J Surg* 43:145-149
12. Le Fourn B, Lebatard-Sartre JY, Gousset-Lejeune F, Michaud JL, Pannier M (1994) Use of omentum in the treatment of chronic thoracic empyema. *Ann Chir Plast Esthet* 39:715-724
13. Bradford CR, Esclamado RM, Carroll WR, Sullivan MJ (1994) Analysis of recurrence, complications and functional results with free jejunal flaps. *Head Neck* 16:149-154



PERGAMON

Oral Oncology 34 (1998) 84–92

ORAL  
ONCOLOGY

## Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas

J.-P. Lavieille<sup>a,b</sup>, C. Righini<sup>b</sup>, E. Reyt<sup>b</sup>, C. Brambilla<sup>a</sup>, C. Riva<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Airways Cancer Research Group, Albert Bonniot Institute, La Tronche Cedex, France

<sup>b</sup>Head and Neck Department, University Hospital, Grenoble, France

<sup>c</sup>Laboratory of Bioenergetics, Joseph Fourier University, Grenoble, France

Received 24 July 1996; received in revised form 6 September 1996; accepted 18 July 1997

### Abstract

Point mutations at the tumour suppressor gene *p53* are one of the most frequent genetic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN), which lead to the nuclear accumulation and overexpression of inactive p53 protein. The overexpression of mutant p53 protein can induce a specific humoral response in cancer patients. p53 protein was studied in 112 SCCHN. Biopsies and sera samples were collected before initiation of treatment. 74 patients received neoadjuvant chemotherapy (5-fluorouracil–cisplatin–folinic acid). p53 protein expression was evaluated by immunohistochemistry (IHC) on paraffin-embedded sections. The analysis of mutations was assessed by PCR–SSCP of exons 5–10 on DNA from 28 representative cases. Antibodies specific for p53 protein were analysed in sera of 74 patients by an ELISA procedure. Overexpression (> 20% positive cells) of p53 protein was frequent (56%: 63/112) and was correlated with localisation of the primary tumour and tumour stage. p53 mutations were detected in 57% (16/28) of studied cases. The prevalence of p53 antibodies in sera was high (44% 32/74) and among this population, 68% (20/29) had a positive immunophenotype and 67% (6/9) a p53 mutation in the tumour. In addition, the presence of anti-p53 antibodies was slightly associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy. If the humoral response seems to be an indicator of the p53 protein status, the detection of anti-p53 antibodies could be a good approach in the early detection of the presence of p53 alterations in SCCHN and recurrent tumours or the appearance of second primary cancer. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Tumour suppressor gene; p53; Head and neck tumour; Prognosis; Drug resistance; Squamous cell carcinoma

### 1. Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide and the fourth cause of mortality in males in France [1]. Epidemiological studies have shown a strong association between this cancer and alcohol and tobacco abuse. Approximately 60% of these tobacco- and alcohol-related cancers are locally advanced (T3, T4, N+) when diagnosed and associated with cure rates of less than 30%. The primary cause of death of these individuals is uncontrolled loco-regional disease. In contrast, patients with early tumours limited to the primary site (T1–2, N0) have a substantial risk of developing a second primary malignancy of the upper aerodigestive tract. Our current research focuses on: (i) the identification of factors that would identify high-risk groups; and (ii) the detection of secondary tumours.

The tumour suppressor gene *p53* is a gene localised on the short arm of chromosome 17, which codes for a

phosphoprotein expressed at very low levels in the nucleus of normal cells [2]. *p53* alterations are the most frequent genetic alterations in human malignancies and are detected in more than 50% of cancers of many types [3]. Point mutations at *TP53* lead to the nuclear accumulation of inactive p53 proteins in tumour cells. Many studies have described p53 accumulation in HNSCC with very good correlation with p53 mutations [4–6]. The frequency of p53 alterations increases with increasing severity of airway epithelium dysplasia and supports the theory that functional aberrations of p53 protein are important in the development of head and neck cancers [7]. In several studies of breast [8], colon [9] and other cancers [10], it has been reported that p53 gene alterations could be considered as a new, independent marker associated with lowered patient survival. Overall, tumours exhibiting p53 accumulation are generally high grade and more aggressive. However, the clinical significance of p53 gene alterations in HNSCC is currently under investigation [11].

Accumulation of mutant p53 in tumour cells can lead to the production of p53-Ab in the serum by a self immunisation process [12]. Serum antibodies recognising p53 have been detected in patients with a wide variety of tumour types, including breast [13,14], lung [13,15], liver [16], leukaemia [17] and childhood lymphoma [18] cases. Several reports indicate a positive correlation between p53 missense mutations, and/or p53 accumulation and p53-Abs [17,19,20]. In addition, p53-Abs can indicate a poor prognosis in breast cancer [21]. In lung cancer, p53 antibodies can be detected in high risk patients (i.e. heavy smokers) and may represent a very early marker of p53 alteration [22]. p53-Abs were reported in 18.8% and 17% of the patients in two series of HNSCC [23,24]. The present study was designed to evaluate p53 alterations and p53 antibody detection in patients with SCCHN and their relationship to the histoclinical features of the invasive lesions and the response to neoadjuvant chemotherapy.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Case selection

Specimens from 112 primary head and neck lesions diagnosed as squamous cell carcinoma were obtained from the Michallon University Hospital, Grenoble, France between January 1992 and December 1995. All patients included in this study had an initial primary lesion and none had undergone any previous treatment.

### 2.2. Clinical treatment

Previously untreated patients ( $n = 74$ ) with stage III or IV pharyngeal or laryngeal cancer were treated with a weekly association of cisplatinum ( $35 \text{ mg/m}^2$ ), 5-fluorouracil ( $2 \text{ g/m}^2$ ) and folinic acid ( $500 \text{ mg/m}^2$ ) before definitive locoregional treatment. The complete protocol consisted of six cycles administered every 7 days, followed by radiotherapy in the case of complete response and by surgery and radiotherapy in other cases. 17 patients received exclusive radiotherapy (60 GY on cervical node areas and 72 GY on the tumoral bed in 35 courses). 21 patients were treated by radical exclusive surgery.

Tumoral response was estimated 3 weeks after completion of chemotherapy, 2 months after the end of radiotherapy or by histological examination of a surgical specimen. Complete response (CR) was defined as the complete disappearance of the tumour at the clinical, CT scan and histological examinations of the initial tumoral area. Other tumoral responses were considered as failure of therapy.

### 2.3. Immunohistochemistry (IHC)

Tissues were fixed in 4% buffered formaldehyde for 4–12 h and then paraffin-embedded. Serial  $5 \mu\text{m}$  thick sections were mounted on 3-amino-propyltriethoxysilane-coated slides. The first section was stained with haematoxylin–eosin for histological review. All the tumours and the preneoplastic lesions were classified according to the UICC. After identification, an immunohistochemical study was carried out on adjacent sections.

All the lesions were analysed for p53 protein expression using immunohistochemistry (IHC), following techniques described previously [6], with five specific antibodies PAb-1801 (Oncogene Science Inc., Manhasset, New York, U.S.A.), D07 (Dako, Glostrup, Denmark), CM1 (Novocastra Lab., Newcastle, U.K.) D40 (produced by T. Soussi) and PAB-240 (Oncogene Science Inc.). The five p53 antibodies used are detailed in Table 1 [25]. Only nuclear staining was taken into consideration. No cytoplasmic staining was consistently observed with any of the antibodies in the same cells. The samples were scored as follows: (–) for negative staining, (+) for 1–20% of positive cells for at least two antibodies, (2+) for 21–40% of positive cells, and (3+) for >40% of positive cells. The threshold for positive nuclear staining was based on the detection of 21–40% clear positive tumour cells for at least two out of the five antibodies tested. The term immunophenotype was defined and assigned for the results of p53 immunostaining.

### 2.4. Isolation and preparation of DNA

Genomic DNA was extracted from 28 HNSCC archival pathology specimens. For tumours, over 95% of cells removed from each slide appeared histologically malignant, and contamination with adjacent non-malignant cells was avoided by microdissection when necessary. DNA was extracted as described previously [26]. In brief, the tissue was dewaxed by two washes in xylene and then one wash in 95% ethanol. Samples were digested for 5 days at  $37^\circ\text{C}$  with proteinase K ( $0.2 \text{ mg/ml}$ ) in a buffer containing 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 25 mM EDTA, 0.5% SDS.

Table 1  
p53 antibodies

Antibodies	Type*	p53 amino acid sequence specificity
CM1	p	Whole p53†
DO7	m	21–25
PAb-1801	m	46–55
PAb-240	m	213–217‡
D40	m	?

\*p, polyclonal; m, monoclonal.

†Mainly directed toward the N terminus of human p53.

‡PAb-240 recognises only mutant p53 under non-denaturing conditions.

### 2.5. PCR and single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis

The PCR technique was used to amplify the genomic DNAs corresponding to exons 5 to 10 of the *p53* gene. Six pairs of sense and antisense primers (Clontech Lab. Palo Alto, U.S.A.) with sequences allowing the synthesis of the six exons were used. The PCR reaction mixture (25 µl) for SSCP analysis contained 50 pmol of primer pairs, 200 µM of each dNTP, 0.1 µCi of alpha (<sup>32</sup>P)dCTP (3000 Ci/mmol) and 1.0 unit of Taq polymerase (Appligene) in buffer recommended by the manufacturer. The amplification reaction was carried out in a thermocycler (Kontron) with an initial denaturation step (10 min, 94°C), followed by 30 cycles consisting of the three steps: 95°C for 30 s, 66°C for 45 s and 72°C for 90 s. An additional cycle was performed at 72°C for 10 min.

The SSCP technique used was originally described by Orita *et al.* [27]. Amplification products were diluted 1/4 in sequencing stop solution and heat-denatured in boiling water for 5 min, chilled on ice and loaded on to a non-denaturing polyacrylamide gel (6–8% acrylamide in 1×TBE with 4% glycerol). Electrophoresis was performed at room temperature to 4°C for 4–15 h. Gels were exposed to Hyperfilm β max (Amersham) at –20°C.

### 2.6. Immunoassay (ELISA) for anti-p53 antibodies in human serum

Sera were collected at the time of diagnosis and were stored at –20°C. We devised a new ELISA procedure using synthetic peptides as the antigen [12]. Briefly, six peptides were used in this assay. Five of them corresponded to the various immunodominant epitopes of *p53*, whereas the sixth corresponded to the control peptide (human serum albumin). Each serum was tested separately for each peptide. Results were expressed as the ratio between the binding to *p53* peptides and the control peptides.

### 2.7. Statistical methods

Associations between categorical variables (TNM stage, pathological grades) and *p53* protein expression were investigated using the Chi square test. Probability values of less than 0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Study population

Most of the 112 patients had a history of chronic alcohol (94%) or tobacco (95%) use. They were

mainly male (106/112), and their age at the time of tumour diagnosis ranged from 36 to 77 years (average: 58 years). Histologically, the tumours were essentially well (74%), moderately (12%), or poorly (14%) differentiated. The localisation of primary tumours were mainly the pharynx (83 cases), the larynx (20 cases), the oral cavity (6 cases) and other sites (3 cases). The staging classification from UICC showed a preponderance of advanced tumours (Table 2).

### 3.2. Immunohistochemical detection of p53

We compared variations in labelled cell number between five *p53* epitopes in 67 fixed samples. These five antibodies were chosen for their region-specific reactivity: DO7, PAb1801 and CM1 are directed mainly towards the N terminus of human *p53*, PAb-240 and D40 epitopes have been mapped to *p53* mid-region. The results are summarised in Table 3.

The comparison was carried out at different levels. Firstly, between the three epitopes located in the N terminus, the cell labelling was very homogeneous and 59/67 immunophenotypes were identical for the three epitopes and 8/67 were identical for only two epitopes. Comparing immunolabelling with monoclonal DO7 and PAb-1801, 62/67 displayed an identical immunophenotype, and only 5/67 differed. Out of the homogeneous N terminus epitopes 59/67, PAb-240 and/or D40 labelling was assessed for confirmation ( $n=27$ ). Then, N terminus immunostaining and central immunostaining were compared, 5/13 were +/+, 8/13 +/-, 12/14 -/- and 2/14 -/+.

Of the 112 invasive tumours, 63/112 (56%) showed a positive immunophenotype with a score of at least (2+)

Table 2  
Characteristics of squamous cell carcinoma patients

Characteristics	No. of patients
Age, years	
Median	58
Range	(36–77)
Male/female	106/6
Tobacco/alcohol	106/105
Tumours $n=112$	
Well differentiated	14%
Med. differentiated	12%
Poorly differentiated	74%
Tumour site	
Pharynx	83
Larynx	20
Oral cavity	6
Other sites	3
Primary tumour stage	
I	7
II	8
III	36
IV	61

Table 3  
Summary of p53 immunohistochemical detection and presence of anti-p53 antibodies

Patient no	DO7*	PAb-1801	CM1	PAb-240	D40	Anti-p53 Abs†
1	+	-	+	-	nd	neg
2	2+	2+	2+	3+	nd	pos
3	-	-	-	3+	nd	pos
4	3+	3+	3+	nd	nd	pos
5	+	2+	+	nd	nd	neg
6	3+	3+	3+	3+	nd	pos
7	2+	2+	2+	nd	nd	neg
8	+	2+	2+	-	nd	neg
9	-	-	+	nd	nd	pos
10	+	2+	2+	nd	nd	pos
11	+	+	+	nd	nd	neg
12	3+	3+	3+	3+	nd	pos
13	-	-	-	nd	nd	neg
14	-	-	3+	-	2+	pos
15	-	-	-	nd	nd	neg
16	-	-	-	nd	nd	pos
17	3+	+3	3+	nd	nd	neg
18	-	+	+	nd	nd	pos
19	-	-	-	nd	nd	neg
20	3+	-	-	+	3+	pos
21	-	-	-	-	nd	neg
22	-	-	-	nd	nd	neg
23	+	-	2+	nd	nd	neg
24	+	2+	+	nd	nd	pos
25	+	2+	3+	-	nd	neg
26	-	-	-	nd	nd	neg
27	nd	nd	nd	nd	nd	neg
28	nd	nd	nd	nd	nd	pos
29	3+	3+	3+	nd	nd	neg
30	-	-	-	nd	nd	neg
31	3+	3+	3+	+	nd	neg
32	2+	2+	2+	nd	nd	neg
33	3+	3+	3+	nd	nd	neg
34	3+	-	-	-	nd	pos
35	-	-	-	nd	nd	pos
36	+	+	2+	2+	nd	neg
37	3+	3+	3+	nd	nd	pos
38	-	-	-	nd	nd	neg
39	nd	nd	nd	nd	nd	neg
40	3+	3+	3+	nd	nd	pos
41	nd	nd	nd	nd	nd	neg
42	-	-	-	-	-	neg
43	nd	nd	nd	nd	nd	neg
44	-	-	3+	nd	nd	neg
45	+	+	2+	nd	nd	neg
46	3+	3+	3+	nd	nd	pos
47	-	-	-	nd	nd	neg
48	-	-	-	-	nd	neg
49	3+	3+	3+	nd	nd	pos
50	-	-	-	nd	nd	neg
51	-	-	-	nd	nd	pos
52	2+	2+	2+	-	nd	pos
53	+	2+	2+	nd	nd	neg
54	-	-	-	nd	nd	pos
55	3+	3+	3+	-	nd	pos
56	3+	3+	3+	-	2+	pos
57	nd	nd	nd	nd	nd	pos
58	-	-	-	nd	nd	neg
59	-	-	-	-	nd	neg
60	-	-	-	-	nd	neg

—continued

Table 3—continued

Patient no	DO7*	PAb-1801	CM1	PAb-240	D40	Anti-p53 Abs†
61	—	—	—	nd	nd	pos
62	—	—	—	—	nd	neg
63	3+	3+	nd	nd	nd	neg
64	nd	nd	nd	nd	nd	neg
65	—	—	—	—	nd	neg
66	3+	3+	3+	nd	nd	pos
67	2+	2+	+	nd	nd	pos
68	—	—	—	—	+	neg
69	2+	2+	3+	—	nd	pos
70	—	—	—	—	nd	neg
71	—	—	—	—	nd	neg
72	2+	+	2+	nd	nd	pos
73	+	+	2+	—	nd	pos
74	—	—	—	nd	nd	neg

\* score: —, negative staining; +, 1–20% of positive cells for at least two antibodies; 2+, 21–40% of positive cells; 3+, >40% of positive cells; nd, not done.

† neg, absence of anti-p53 antibodies; pos, presence of anti-p53 antibodies.

with two out of five antibodies tested. p53 expression was heterogeneous in most tumours but positive staining was confined to the nucleus and varied in intensity from 1+ to 3+.

No correlation was found between p53 immunophenotype and histological differentiation, node status or the age of patients (data not shown). However, a correlation was found between localisation of the primary tumour and positive immunostaining of p53. p53 accumulated more frequently in pharyngeal tumours (oro- and hypopharynx), 53/86 (62%), than in laryngeal tumours 6/19 (31%) ( $P=0.0169$  Chi square=5.708). In addition, p53 had accumulated more in T3–4 tumours 53/82 (63%) than in T1–2 tumours 11/27 (40%) ( $P=0.0385$ , Chi square=4.281).

### 3.3. PCR and SSCP analysis

To determine whether p53 protein accumulation in tumour tissues was associated with p53 mutation, p53 DNA from 28 representative cases with known immunohistochemical staining was amplified and analysed by SSCP. DNA was isolated from total extract ( $n=10$ ) or microdissected specimens ( $n=18$ ) and PCR was used to amplify exons 5–10, which contain greater than 90% of the p53 mutations found in different human tumours. The results are summarised in Table 4. In total, we found that 16/28 (57%) of the tumours had mutations within exons 5, 6, 7 and 10. Twelve of the 16 resulted in protein accumulation and four in false negatives for IHC indication of mutation. Twelve of the 28 had a wild-type DNA (within exons 5–10), with eight samples resulting in a p53 protein accumulation and four in undetected protein. In addition, we analysed the DNA from a normal tonsil from a child negative for p53 by

IHC. No p53 mutation in exons 5–8 was observed in this case—control with negative p53 immunostaining.

### 3.4. p53 expression in tumours, and presence of anti-p53 antibodies in patients before chemotherapy

Induction chemotherapy was administered in 74 patients with advanced tumours arising from the larynx or hypopharynx (stages III and IV). An overall response rate of 73% (54/74) and a complete response rate of 40% (30/74) were observed. Among patients with a complete response, 21 patients (70%) had a p53-positive tumoral immunophenotype while only 50% of patients for whom chemotherapy failed presented a p53-positive immunophenotype. A trend appeared between a complete response to induction chemotherapy and a higher percentage of p53 positive immunostaining in biopsies collected before treatment, but did not reach significance ( $P=0.0869$ , Chi square=2.931). No correlation was found between the presence of mutations in 26 tumour patients and tumoral response to induction chemotherapy (Table 4) ( $P=0.2488$ , Chi square=1.33), nor with the presence of anti-p53 antibodies in sera ( $P=0.5148$ , Chi square=0.424).

### 3.5. Serological analysis of p53

The presence of circulating p53-Ab was tested in 74 sera using a sensitive ELISA procedure. Circulating p53-Ab were found in 32/74 (44%). The analysis of the tumoral immunophenotypes and the associated sera in 67 patients revealed a relationship between the accumulation of p53 protein in tumours and the production of p53 antibodies in sera. Among the population with circulating p53 antibodies, 20/29 (68%) had a positive immunophenotype (score at least + with at least two

Table 4  
Summary of clinicopathological parameters, p53 mutations, immunohistochemical detection, presence of anti-p53 antibodies and clinical response to induction chemotherapy in HNSCC

Patient no	TNM*	Protein expression†	p53 mutation exons	anti-p53 Abs‡	Response to chemotherapy§
2	T3N2M0	Yes	6 and 7	pos	CR
3	T3N3M0	Yes	WT	pos	NR
75	T4N2cM0	Yes	5 and 6	nd	CR
4	T4N0M0	Yes	6	pos	NR
6	T3N2bM0	Yes	6	pos	CR
8	T4N3M0	Yes	5 and 6	neg	CR
10	T3N0M0	Yes	6	pos	CR
76	T3N2bM0	No	5	nd	NR
14	T3N0M0	Yes	6	pos	CR
15	T3N0M0	No	WT	neg	NR
77	T3N0M0	Yes	5	nd	NR
78	T3N2aM0	Yes	WT	neg	CR
26	T3N1M0	No	WT	neg	CR
27	T3N1M0	Yes	7	neg	CR
29	T3N0M0	Yes	7	neg	CR
36	T3N2cM0	Yes	WT	neg	NR
37	T3N1M0	Yes	WT	pos	NR
79	T4N2cM0	No	6	nd	NR
38	T1N3M1	No	WT	nd	NR
39	T3N2bM0	Yes	WT	pos	CR
51	T3N0M0	No	5 and 7	pos	CR
80	T3N2cM0	Yes	WT	nd	NR
61	T3N0M0	Yes	WT	nd	CR
63	T3N1M0	Yes	WT	neg	CR
81	T3N2cM0	No	5	nd	NR
82	T3N0M0	Yes	WT	nd	NR

\*Tumours were staged according to the TNM classification of tumors (UICC 1987).

†Yes, positive immunostaining with a score  $\geq 2+$  as defined in Table 3; No, immunostaining with a score  $\leq +$  as defined in Table 3.

‡Neg, absence of anti-p53 antibodies; pos, presence of anti-p53 antibodies; nd, not done.

§CR, complete response; NR, non-responders, including partial response, stabilised and progressive disease.

antibodies). Among the patients with a positive immunophenotype, 20/35 (57%) had an immunogenic protein, and 15/35 (43%) a non-immunogenic protein. In 9 cases (13%), p53 immunostaining was considered as negative according to our criteria while p53-Ab were present in the sera (Table 3).

There was a slight association which did not reach significance ( $P=0.1385$ , Chi square = 1.988) between the presence of p53 antibodies and tumour localisation, where 59% of patients with pharyngeal tumours but only 29% of patients with laryngeal tumours, produced anti-p53 antibodies. No correlation was found between the serological status and the clinical stage of the disease nor with lymph node involvement or the degree of differentiation of the tumours (data not shown).

#### 4. Discussion

Analysis of p53 protein by immunohistochemistry in 112 invasive squamous cell carcinoma of the head and neck demonstrated a consistent proportion (56%) of p53 expression. This finding is validated by a reproducible protocol retrieving N terminal epitopes at com-

parable levels and confirmed by Pab-240 and/or D40 central epitopes, as previously described by Horne *et al.* [28] in breast cancer. We found that among the five antibodies used, Pab-1801 and DO7 proved to be the most effective for the immunodetection of p53 protein in routinely processed head and neck material. However, the proportion of p53 positive tumours has been previously reported by different authors who found a range of p53 positive staining between 34 and 81% [29,30].

In this study, no correlation was found between protein expression of p53 and the level of differentiation of the tumour, node status or the age of the patients, in accordance with previous reports [29,31,32]. However, a correlation between the localisation of the primary tumour ( $P=0.0169$ ) and tumour (T) stage ( $P=0.0385$ ) was found. This study shows that in our population of 112 patients, p53 protein accumulated more frequently in pharyngeal (oropharynx and hypopharynx) lesions (62%) than in laryngeal lesions (31%) with a predominance in hypopharyngeal tumours (68%). In addition, p53 was found to accumulate more frequently in T3,4 stages than in T1,2 stages. These data confirm that the p53 gene may play a role in the late stages of tumoral

disease, as has been shown by Field *et al.* [32], which supports the fact that p53 expression was correlated with a very poor prognosis in advanced tumours [33]. The analysis of *p53* gene status in tumour tissue revealed that among the 28 cases studied, 16/28 (57%) had mutations within exons 5, 6, 7 and 10, while 12/16 (75%) resulted in protein accumulation and 4/16 (25%) were false negative for immunohistochemical indication of accumulative mutation. The hypothesis could be that those mutations abolishing p53 expression (splicing signal mutations, nonsense mutations, insertions or deletions) do not produce the protein and therefore give a negative result. Disparity between *p53* SSCP-profile alterations and immunophenotype in 25% of tumours is consistent with other reports [34]. However, the results remain controversial, since it has been reported by Ahomadegbe *et al.* [29] that *p53* gene mutations established by sequencing are strongly associated with p53 protein overexpression in HNSCC ( $P < 10^{-4}$ ).

Using either truncated p53 or synthetic peptides, it has been demonstrated that the epitopes recognised by p53-Abs are mainly located in the amino and carboxy terminal regions of the protein, regions which are not in the hot spot areas for the *p53* mutation [12,13]. These immunodominant epitopes have also been detected in the sera of mice and rabbits hyperimmunised with wild-type p53 [35]. Taken together, the presence of immunodominant epitopes outside the hot spot region of the *p53* mutation, the correlation between p53 accumulation and *p53* gene mutation in tumour cells and p53 antibody responses, the similarity of humoral responses in patients independent of the cancer type and the similarity of antigenic site profiles in patients and hyperimmunised animals, all suggest that p53 accumulation is a major component of the humoral response in patients with cancer. This accumulation could lead to a self immunisation process culminating in the appearance of p53 auto-antibodies.

Among the population tested for anti-p53 antibodies, we found a high prevalence of antibodies (44%) in the sera of 74 patients with invasive carcinoma. This is the highest reported either among HNSCC patients compared to 17% [23] or 18.8% [24] among other different pathologies [12,36]. One explanation for the high prevalence of p53-Abs found in our series may reside in the predominance of T3-4 tumours in our population. The presence of p53 antibodies was not statistically associated to clinical parameters, such as tumour localisation or T stage, but we noticed an enhanced production of antibodies in the sera of patients with pharyngeal tumours (50%), in comparison to laryngeal tumours (29%). This difference may correspond with the particular laryngeal anatomy. The tumours arising from the vocal cord are initially located in a closed anatomical space with poor vascular or lymphatic anastomosis, demonstrated by a low percentage of metas-

tasis involving nodes or other sites arising from laryngeal tumours [37].

Among the population with circulating p53 antibodies, 68% had a positive immunophenotype in the tumour. Interestingly, Cough *et al.* [23] showed that p53 antibodies were present in 50% of patients with *p53* mutations in their tumour but were not found in those devoid of the *p53* mutation. Our results are in good agreement with those findings, since the presence of p53 antibodies was almost entirely restricted to the group of tumours with p53 protein accumulation and/or mutations (Table 4). The absence of immunohistochemical staining to p53 in the few cases with positive p53-PAb, 8/68 (12%) (Table 3), were found mainly in the larynx. We cannot exclude a low level of p53 accumulation which did not meet our criteria of positivity. However, these results suggest that anti-p53 antibodies could be produced in the absence of p53 accumulation in the tumour tested. In fact, a second malignancy with p53 protein accumulation could generate the serum antibodies. Patients who have had a primary HNSCC have a higher than normal risk of developing a simultaneous or subsequent second primary cancer [38]. This observation has been attributed to a field cancerisation that allows independent transformation and gene mutations in epithelial cells at different sites.

The production of p53 antibodies was not specific for the wild-type or mutant form of p53 protein (Table 3), which is in agreement with a previous report [10]. This conclusion is supported by the fact that the immunodominant epitope for this immune response has been shown to reside in the N or C terminal domains (Table 2) of the protein outside of the mutational region [35].

We found that only p53 protein overexpression was slightly associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy. We can speculate on the role of p53 accumulation in response to chemotherapy or chemosensitivity. In fact, our results suggest that alterations of *p53* and therefore anti-p53 antibodies could be a good marker of sensitivity to DNA-damaging agents, such as cisplatin, in these tumours. This is consistent with *in vitro* data described previously by Petty *et al.* [39] and *in vivo* in breast tumours [40], as was reported recently by Hawkins *et al.* [41]. Furthermore, increased sensitivity to chemotherapeutic agents, such as cisplatin or taxol, correlated with increased G2/M cell cycle arrest and apoptosis induction in cells lacking functional p53 [42].

In conclusion, p53 auto-antibodies are found frequently in the serum of patients presenting SCCHN. This presence of p53 antibodies depends on the overexpression of p53 protein and/or *p53* gene mutation. These results suggest that serological analysis of p53 may be a useful tool in the complement of tests already available (molecular and immunohistochemical analysis) for assessing *p53* status in tumour cells. If supple-

mentary studies in head and neck tumours demonstrate that the presence of p53 protein alterations ultimately lead to a worse prognosis, the detection of p53 auto-antibodies could give potentially useful indications to the clinician to help in the early detection of progressive preneoplastic lesions, tumoral aggressiveness and the appearance of second primary tumours.

### Acknowledgements

The authors wish to thank Dr E. Brambilla, Department of Cellular Pathology, University Hospital, Grenoble, for pathological reports, and Dr H. Roth, Concertation Unit, University Hospital, Grenoble, for statistical analysis. This work was supported by grants PHRC from the French Health Ministry, Ligue contre le Cancer, CAMPLP, Association pour la Recherche sur le Cancer.

### References

- [1] Hill C, Koscielny S, Doyon F, Benhamou E. Evolution de la mortalité par cancer en France entre 1950 et 1990. Mise à jour 1986–1990. INSERM, Paris, Statistiques de santé, 1993, 87pp.
- [2] Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. In: Molecular Genetics of Cancer J.K. Cowell, ed, 1995, pp. 135–178.
- [3] Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of P53 alteration in human cancer—a review. *International Journal of Cancer* 1994;57:1–9.
- [4] Field JK, Spandidos DA, Stell PM. Overexpression of p53 gene in head and neck cancer, linked with heavy smoking and drinking. *Lancet* 1992;339:502–503.
- [5] Sauter ER, Cleveland D, Trock B, Ridge JA, Kleinszanto AJ. p53 is overexpressed in fifty percent of pre-invasive lesions of head and neck epithelium. *Carcinogenesis* 1994;15:2269–2274.
- [6] Walting D, Allen C, Coltrera M. Overexpression of p53 in head and neck cancer. *Head and Neck* 1992;14:437–444.
- [7] Lavielle JP, Brambilla E, Riva-Lavielle C, Rey E, Charachon R, Brambilla C. Immunohistochemical detection of p53 protein in preneoplastic lesions and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngologica*. (Stockh) 1995;115:334–339.
- [8] Andersen TI, Holm R, Nesland JM, Heimdal KR, Ottestad L, Borresen AL. Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. *British Journal of Cancer* 1993;68:540–548.
- [9] Hamelin R, Laurent-Puig P, Oschwang S, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106:42–48.
- [10] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. P53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53.
- [11] Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, et al. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1996;88(21):1580–1586.
- [12] Lubin R, Schlichtholz B, Teillaud JL, et al. P53 antibodies in patients with various types of cancer: assay, identification and characterization. *Clinical Cancer Research* 1995;1:1463–1469.
- [13] Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, et al. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Research* 1992;52:6380–6384.
- [14] Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer* 1982;30:403–408.
- [15] Wild CP, Ridanpaa M, Anttila S, et al. p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue. *International Journal of Cancer* 1995;64:176–181.
- [16] Volkmann M, Muller M, Hofman WJ, et al. The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the alpha-feto-protein status. *Hepatology* 1993;18:559–565.
- [17] Preudhomme C, Lubin R, Lepelly P, Vanrumbeke M, Fenaux P. Detection of serum anti-p53 antibodies and their correlation with p53 mutation in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994;8:1589–1591.
- [18] Caron de Fromental C, May-Levin F, Mouriesse H, Lemerle J, Chandrasekaran K, May P. Presence of circulating antibodies against cellular protein p53 in a notable proportion of children with B cell lymphoma. *International Journal of Cancer* 1987;39:185–189.
- [19] Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent upon the type of p53 mutations. *Cancer Research* 1992;53:4168–4174.
- [20] Guinee DG Jr, Trivis WD, Trivers GE, et al. Gender comparison in human lung cancer analysis of p53 mutations, anti-p53 serum antibodies and c-erb2 expression. *Carcinogenesis (Lond)* 1995;16:993–1002.
- [21] Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995;345:621–622.
- [22] Lubin R, Zalzman G, Bouchet L, et al. Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Medicine* 1995;1:701–702.
- [23] Cough MJ, Koch M, Brennan JA, Sidransky D. The humoral response to oncoprotein p53 in head and neck cancer. *Head and Neck* 1994;16:495.
- [24] Bourhis J, Lubin R, Roche B, et al. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1996; 88(17):1228–1233.
- [25] Tenaud C, Negoescu A, Labat-moleur F, et al. P53 immunolabelling in archival paraffin-embedded tissues: optimal protocol based on microwave heating for 8 antibodies on lung carcinomas. *Modern Pathology* 1994;7(8):853–859.
- [26] Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. In: PCR Protocols a Guide to Methods and Applications, Vol. 19. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich: San Diego, 1990, pp. 153–158.
- [27] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1989;86:2766–2770.
- [28] Horne CM, Andersort JJ, Tiniakos DC, et al. p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: a comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *British Journal of Cancer* 1996;73:29–35.
- [29] Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, et al. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995;10:1217–1227.
- [30] Brachman DG, Graves D, Vokes E, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Research* 1992;52:4832–4836.
- [31] Pavelic ZP, Gluckman JL, Gapany M, et al. Improved immunohistochemical detection of p53 protein in paraffin-embedded

- tissues reveals elevated levels in most head and neck and lung carcinomas: correlation with clinicopathological parameters. *AntiCancer Research* 1992;12:1389–1394.
- [32] Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 1993;119:1118–1122.
- [33] Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein—an independent marker of prognosis in breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 1992;84:845–855.
- [34] Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *Journal of Pathology* 1992;166:329–330.
- [35] Legros Y, Lafort C, Soussi T. Linear antigenic sites defined by the B-cell response to human p53 are localized predominantly in the amino and carboxy-termini of the protein. *Oncogene* 1994;9:2071–2076.
- [36] Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJA, Kellen JA, Bunting PS. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *International Journal of Cancer* 1994;58:480–487.
- [37] Bocca E, Pignataro O, Oldini C. Supraglottic laryngectomy: 30 years of experience. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* 1983;92:14–18.
- [38] Sturgis EM, Miller RH. Second primary malignancies in head and neck cancer patient. *Annals of Otolaryngology and Laryngology* 1995;104:946–954.
- [39] Petty RD, Cree IA, Sutherland LA, et al. Expression of the p53 tumour suppressor gene product is a determinant of chemosensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;199:264–270.
- [40] Koechli OR, Schaer GN, Seifert B, et al. Mutant p53 protein associated with chemosensitivity in breast cancer specimens. *Lancet* 1994;344:1647–1648.
- [41] Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA. Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Research* 1996;56:592–598.
- [42] Wahl AF, Donalson KL, Fairchild C, et al. Loss of normal p53 function confers sensitization to taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature Medicine* 1996;2:72–79.

## Annexe 9

### LETTRE D'INFORMATION

#### Collection de tissus ORL et de matériels biologiques

*Organisateurs de la recherche : CHU Grenoble*

Madame, Monsieur,

Vous allez bénéficier d'une intervention chirurgicale dans le service ORL. Dans la règle, l'organe ou les tissus prélevés pendant l'opération sont envoyés dans le service d'anatomie pathologique pour y être analysés. Ensuite, le reste des prélèvements est détruit.

Nous vous informons que, sauf opposition de votre part, des fragments non utilisés pour ce diagnostic pourront être conservés sous contrôle. Ils pourront servir à des recherches scientifiques dans le domaine de la pathologie dont vous êtes atteint, à l'exclusion de toute recherche visant à étudier les caractéristiques génétiques identifiantes (c'est à dire qui permettraient de vous identifier par l'analyse de vos cellules).

#### *Objectifs de l'étude*

Nous analysons le tissu restant à but de recherche médicale, en particulier, les relations entre les gènes et les protéines. Ensuite, nous comparons ces données avec la maladie et sa progression afin d'identifier des gènes et protéines d'importance diagnostique, pronostique et thérapeutique. Ces analyses à but de recherche médicale sont partiellement pratiquées dans notre institution universitaire et partiellement chez des partenaires externes ayant à leur disposition des infrastructures spécifiques.

#### *Bénéfices attendus*

Ces analyses pratiquées actuellement à but de recherche médicale pourraient permettre demain un diagnostic plus précoce et des traitements plus efficaces pour des patients souffrant de la même maladie que vous, par exemple par la mise sur le marché de nouveaux médicaments. Dans l'immédiat, ces analyses ne modifieront pourtant ni le diagnostic ni le traitement de votre maladie. Néanmoins les résultats des examens pratiqués actuellement ou ultérieurement peuvent éventuellement aboutir à des propositions de traitement ou de modalités de surveillance de votre maladie.

Afin de pratiquer ces analyses à des fins de recherche et de pouvoir interpréter correctement leurs résultats, nous avons besoin de votre accord pour :

- prélever et stocker des échantillons tissulaires obtenus à partir de la pièce opératoire,
- prélever et stocker un échantillon sanguin de 10 ml obtenu dans le cadre des examens préopératoires de routine,
- prélever et stocker des échantillons de salives,
- demander régulièrement de vos nouvelles à votre médecin traitant après votre retour à domicile,
- stocker sous forme confidentielle les informations ci dessus dans un registre informatisé, dont les résultats ne seront utilisés que sous forme anonymisée.

### *Risques potentiels*

Il n'y a pas de risque supplémentaire par rapport aux nécessités du traitement de votre maladie.

### *Fichier informatique et anonymat*

Seule l'équipe médicale en charge de votre traitement aura accès à vos données personnelles. Le secret professionnel est strictement respecté par les médecins. En cas d'analyses supplémentaires (avec des partenaires scientifiques externes ou avec l'industrie pharmaceutique), vos données seront codées et rendues anonymes de façon à ce qu'aucune relation avec votre personne ne soit possible.

Ces fragments de tissu prélevés seront susceptibles le cas échéant d'être transmis à d'autres équipes de recherche médicale, pour les besoins de leurs propres travaux de recherche. Les données nominatives portant sur ces fragments seront transmises dans les conditions prévues au chapitre 5 bis de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978.

Les données nominatives vous concernant recueillies à cette occasion pourront par ailleurs faire l'objet d'un traitement automatisé (c'est à dire figurer sur un fichier informatique).

Conformément à l'article 40-4 de la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978, vous avez le droit de vous opposer à ce que les données nominatives vous concernant fassent l'objet d'une exploitation.

Si vous ne vous opposez pas à cette dernière, vous pourrez exercer à tout moment votre droit d'accès et de rectification sur ces données comme prévu par la loi « Informatique et Libertés » auprès des responsables de l'étude. Pour toutes les informations de nature médicale, ce droit pourra être exercé par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix (article 40-5 de loi 78-17 du 6 janvier 1978).

Les mesures décrites ne sont absolument pas dangereuses pour vous et vous n'aurez pas de dépenses ni de risques supplémentaires.

Il nous semble important de répéter que ni votre diagnostic, ni votre traitement ne seront modifiés par ces analyses, dont vous ne remarquerez rien. Vous êtes tout à fait libre d'accepter ou de refuser maintenant les autorisations demandées sans que cela ne modifie vos relations avec les médecins qui vous traitent. De même, vous pourrez à tout moment dans le futur demander la destruction des tissus, échantillons sanguins et tissulaires et des informations vous concernant.

Si vous donnez votre accord, nous tenons à vous remercier vivement de votre collaboration, et de votre participation active à l'amélioration de la médecine de demain. Si vous le désirez, le Docteur Christian RIGHINI, ORL, Tél. 04 76 76 56 93 ou le Professeur Elisabeth Brambilla, Pathologie Cellulaire, Tél. 04 76 76 54 86 se tiennent à votre disposition pour tout renseignement complémentaire.

## DECLARATION DE CONSENTEMENT

### Collection de tissus ORL et de matériels biologiques

Prélèvement et stockage d'échantillons ainsi que stockage de données dans le cadre d'un projet de recherche médicale.

Monsieur/Madame le Dr .....m'a informé en détail sur les analyses pratiquées dans le cadre du projet mentionné ainsi que sur l'organisation, les objectifs et les risques de ces analyses. J'ai bien compris les informations et des réponses suffisantes ont été apportées à mes questions.

J'ai obtenu la garantie que mes données personnelles seront traitées confidentiellement, ainsi que les résultats générés par les analyses.

Je sais que je peux à tout moment retirer mon accord pour la participation à ce projet, sans donner de raisons particulières. Cette décision n'entraîne pas de désavantage pour moi.

Je donne mon accord, pour le prélèvement et l'utilisation des échantillons tissulaires non utilisés pour le diagnostic, pour le prélèvement d'un échantillon sanguin de 10, pour un prélèvement de salive, dans le cadre d'un projet de recherche médicale.

J'accepte de fournir les informations concernant l'évolution future de ma maladie.

Nom de l'investigateur :  
(ou du médecin qui le représente)

Nom du patient(e) :

Date :

Date :

Lieu :

Lieu :

Signature :

Signature :

## **Annexe 10**

Contentements pour les populations témoins.

10 a – Prélèvement tissu amygdalien.

### **AUTORISATION CONSERVATION PRELEVEMENT TISSULAIRE** (*tissu amygdalien*)

Nom :

Prénom :

Madame, Monsieur,

Vous allez bénéficier d'une amygdalectomie. Les tenants et les aboutissants, ainsi que les suites habituelles de cette intervention vous ont été expliquées par le médecin ORL que vous avez vu en consultation et qui a posé l'indication.

Sauf cas particulier, les amygdales ne font pas l'objet d'une analyse particulière et sont habituellement éliminées. Si vous nous l'autorisez, une des deux amygdales sera conditionnée (congelée) et conservée dans le service de pathologie cellulaire (Professeur E. BRAMBILLA). Elle pourra alors faire l'objet d'analyses histologiques et biologiques fort utiles à la recherche médicale.

Toutes les analyses qui seront faites, le seront sous le couvert de l'anonymat. Vous pouvez à tout moment, si vous le souhaitez, demander à ce que le prélèvement soit détruit.

La Tronche, le

*Signature*

10 b – Prélèvement de salive.

**AUTORISATION CONSERVATION PRELEVEMENT BIOLOGIQUE** (*salive*)

Nom :

Prénom :

Madame, Monsieur,

Vous venez de consulter dans le service ORL. Lors de cette consultation, il vous a été demandé un prélèvement de salive. Ce prélèvement pourra faire l'objet d'analyse biologique fort utile à la recherche médicale.

Toutes les analyses qui seront faites, le seront sous le couvert de l'anonymat. Les analyses seront faites dans le département de biologie intégrée (Madame le Professeur FAVROT). Vous pouvez à tout moment, si vous le souhaitez, demander à ce que le prélèvement soit détruit.

En cas de renseignements complémentaires, vous pouvez joindre le Docteur RIGHINI Christian, Praticien Hospitalier dans le service ORL.

La Tronche, le

*Signature*

## Annexe 11

Fiches de liaison.

11 a – Fiche de liaison bloc ORL et DBI / Département d'anatomopathologie (tissu tumoral, tissu référent, salive et sang).

### TUMOROTHEQUE POUMON/ORL

#### Protocole Biomark-Scan

#### Fiche de liaison pour le laboratoire de pathologie cellulaire et DBI (UF de Cancérologie Biologique et Biothérapies)

(Professeur E. BRAMBILLA – Tél. : 04 76 76 54 86)

(Professeur M.C. FAVROT – Tél. : 04 76 76 54 80)

Identité du patient (*étiquette*) :

Date d'intervention chirurgicale :

Type d'intervention :

Nom du Chirurgien :

#### Récapitulatif

- |  |                              |                              |
|--|------------------------------|------------------------------|
| 1) Consentement signé du patient   | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> |
| 2) Prélèvement sanguin (2 tubes EDTA 7 ml – 1 tube sec 7ml)<br>Accompagné du bon DBI (marqué UF Cancérologie – Protocole Biomark-Scan) | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> |
| 3) Prélèvement d'aspiration bronchique   | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> |
| Prélèvement de salive  | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> |
| Accompagné du bon DBI (marqué UF Cancérologie – Protocole Biomark-Scan)  |                              |                              |
| 4) Bon jaune descriptif (diagnostic et prélèvement) joint  | oui <input type="checkbox"/> | non <input type="checkbox"/> |

**Le prélèvement doit parvenir au laboratoire de Pathologie Cellulaire  
du Pr E. BRAMBILLA, 4<sup>ème</sup> étage, à l'état frais.**

Heure de départ du prélèvement :

Heure d'arrivée du prélèvement :

Signature :

*1 exemplaire de ce document est envoyé avec le prélèvement,  
1 autre est gardé dans un classeur au bloc ORL/Poumon (bureau de la surveillante)*

## **Protocole Bio - mark Ganglions**

**Etiquette patient :**

**Résumé Clinique**

**Opérateur référent :**

**Heure du prélèvement :**

**Site du ganglion prélevé (territoire I -> V) :**

**Taille macroscopique du ganglion et aspect macroscopique au bloc (le ganglion ne doit pas être ouvert) :**

**Le prélèvement doit parvenir au laboratoire de pathologie cellulaire**

## Annexe 12

Base de données utilisées pour l'article intitulé « Tumor specific methylation in saliva : a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence ». Righini C.A. et al.

Légende :

T Tumeur  
Prel. Prélèvement  
Id. Identification  
S Salive  
Nb Nombre  
Méthyl Méthylation  
H Homme  
F Femme  
CM Carcinome malpighien  
K Kératinisant  
NK Non kératinisant  
PK Peu Kératinisant  
BD Bien Différentié  
MD Moyennement différencié  
PD Peu Différentié  
I Infiltrant

Codes :

Alcool, Tabac, Irradiation \* 0 = non  
1 = oui

\* : avant prélèvement

Gènes :

0 = pas de méthylation  
1 = méthylation présente

Patients	Sexe	Age	Alcool	Tabac	Irradiation	Localisation T	TNM	Stade	Type prel.	Date prel.	Id. Bloc T	histologie
Alv. J	H	50	1	1	0	oropharynx	cT3 N0 M0	III	biopsie	03/05/2004	04 B 01 681	CM K BDI
Aun. Y	F	62	1	1	0	cavité buccale	pT4 N2c M0	IV	pièce	23/10/2003	03 36 29	Basaloïde squameux
Bal. A	H	61	0	1	0	oropharynx	pT3 N1 M0	III	pièce	02/03/2004	04 B 01 230	CM PK MDI
Bar. R	H	46	1	1	1	cavité buccale	rT4 N2a M0	IV	biopsie	26/01/2004	04 B 00 331	CM K BDI
Bar. J	H	60	1	1	0	cavité buccale	pT3 N0 M0	III	pièce	04/09/2003	03 30 01	CM K BDI
Bas. A	H	63	1	0	0	hypopharynx	cT1 N0 M0	I	biopsie	04/08/2004	04 B 02 882	CM PDI
Bel. A	H	73	0	1	1	larynx	rT4 N2c M0	IV	pièce	22/07/2004	04 B 03 106	CM K BDI
Bel. M	H	48	0	1	0	cavité buccale	pT2 N2b M0	IV	pièce	05/09/2003	03 30 19	CM K BDI
Bel. P	H	54	1	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	pièce	28/04/2004	04 B 01 645	CM K BDI
Bes. P	H	59	0	0	0	cavité buccale	cT4 N0 M0	IV	biopsie	27/01/2004	04 B 00 345	CM NK PDI
Bey. V	F	33	0	0	0	cavité buccale	pT1 N0 M0	I	pièce	16/04/2003	03 13 32	CM K BDI
Bin. P	H	45	1	1	0	hypopharynx	cT4 N0 M0	IV	biopsie	18/06/2004	04 B 02 344	Basaloïde squameux
Boc. A	H	65	1	1	1	cavité buccale	rT4 N0 M0	IV	biopsie	19/01/2004	04 B 00 225	CM K MDI
Bod. Y	H	50	1	1	0	cavité buccale	pT4 N2c M0	IV	pièce	08/04/2004	04 B 01 400	CM K BDI
Bol. M	H	74	0	1	0	cavité buccale	pT4 N2c M0	IV	pièce	15/10/2003	03 34 95	CM K BDI
Bou. P	H	57	1	1	0	cavité buccale	pT3 N0 M0	III	pièce	06/04/2004	04 B 01 352	CM K BDI
Bou. A	H	71	1	1	1	oropharynx	rT2 N0 M0	II	pièce	12/05/2004	04 B 01 806	CM K BDI
Bre. F	H	54	0	0	0	cavité buccale	pT4 N0 M0	IV	pièce	29/01/2004	04 B 00 397	CM K TBDI
Bru. G	H	51	1	1	0	cavité buccale	pT2 N2b M0	IV	pièce	15/12/2003	03 43 13	CM PK PDI
Cam. A	H	54	0	1	0	larynx	pT2 N0 M0	II	pièce	05/01/2005	05 B 00 051	CM K BDI
Cap. R	H	46	1	1	0	hypopharynx	cT4 N0 M0	IV	biopsie	04/12/2003	03 41 73	CM K PDI
Cau. L	F	67	1	1	0	larynx	pT3 N1 M0	III	pièce	17/05/2004	04 B 01 896	CM PK MDI
Cer. G	H	71	1	1	1	oropharynx	rT2 N0 M0	II	pièce	21/01/2004	04 B 00 288	CM K TBDI
Cha. J	F	59	1	1	0	oropharynx	cT4 N0 M0	IV	biopsie	12/11/2003	03 38 46	CM K MDI
Cha. L	H	72	1	1	1	oropharynx	rT2 N0 M0	II	biopsie	29/01/2004	04 B 00 396	CM K BDI
Cha. D	H	51	1	1	1	larynx	rT3 N0 M0	III	biopsie	13/08/2004	04 B 02 978	CM K BDI
Cha. G	F	60	1	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	pièce	17/09/2003	03 36 59	CM K BDI
Che. L	H	75	1	1	0	oropharynx	cT2 N2b M0	IV	biopsie	04/03/2004	04 B 00 906	CM MDI
Cle. N	F	55	0	0	0	hypopharynx	pT3 N0 M0	III	pièce	03/11/2004	04 B 03 999	CM K BDI
Del. JC	H	62	1	1	0	cavité buccale	pT3 N2c M0	IV	pièce	08/07/2004	04 B 02 620	CM K BDI
Dem. R	H	71	0	1	1	oropharynx	rT1 N0 M0	I	pièce	10/03/2004	04 B 00 981	CM PK BDI
Der. P	H	56	0	1	1	oropharynx	rT4 N0 M0	IV	biopsie	19/12/2003	03 43 81	CM K BDI
De S. I	H	62	1	1	1	larynx	rT4 N0 M0	IV	pièce	08/01/2004	04 B 84	CM K BDI
Des. P	H	70	1	1	1	hypopharynx	rT3 N0 M0	III	pièce	11/08/2004	04 B 02 962	CM K BDI
Die. L	H	67	0	1	0	larynx	cT3 N0 M0	III	biopsie	07/04/2004	04 B 01 375	CM K BDI

Patients	Sexe	Age	Alcool	Tabac	Irradiation	Localisation T	TNM	Stade	Type prel.	Date prel.	Id. Bloc T	histologie
Dri. H	H	56	1	1	0	hypopharynx	cT2 N2a M0	IV	biopsie	03/12/2003	03 41 57	CM K BDI
Dub. P	H	75	1	1	0	oropharynx	pT2 N0 M0	II	pièce	29/09/2004	04 B 03 526	CM K BDI
Dur. C	H	63	1	1	0	oropharynx	pT2 N0 M0	II	pièce	24/05/2004	04 B 01 981	CM K BDI
Fal. JL	H	48	0	1	0	larynx	pT1b N0 M0	I	pièce	31/08/2004	04 B 03 153	CM K BDI
For. J	H	59	1	1	0	larynx	pT2 N0 M0	II	pièce	04/07/2003	03 22 21	CM K BDI
Fra. A	H	61	1	1	0	hypopharynx	cT2 N2c M0	IV	biopsie	29/07/2004	04 B 02 827	CM K BDI
Fro. P	H	50	1	1	0	oropharynx	cT4 N1 M0	IV	biopsie	07/10/2003	03 33 71	CM K BDI
Gal. A	H	50	1	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	pièce	20/07/2004	04 B 02 733	CM K BDI
Gan. JP	H	65	0	0	1	cavité buccale	rT4 N1 M0	IV	pièce	16/06/2004	04 B 02 328	CM K BDI
Gat. Y	H	46	1	1	1	oropharynx	rT4 N0 M0	IV	biopsie	01/03/2004	04 B 00 838	CM K BDI
Gil. L	H	60	0	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	pièce	25/02/2004	04 B 00 780	CM K TBDI
Gon. A	H	62	1	1	0	larynx	pT3 N2c M0	IV	pièce	32/12/03	03 44 72	CM K TBDI
Gre. JP	H	52	1	1	0	oropharynx	cT2 N2a M0	IV	biopsie	25/07/2003	03 24 20	CM PK MDI
Gui. JM	H	48	1	1	0	oropharynx	pT2 N0 M0	II	pièce	01/09/2003	03 29 49	CM K BDI
Guy. S	H	44	1	1	0	larynx	pT4 N0 M0	IV	pièce	18/04/2003	03 15 43	CM K BDI
Ham. A	H	58	1	1	0	oropharynx	cT2 N1 M0	III	biopsie	17/12/2003	03 20 08	CM K MDI
Her. F	H	62	1	1	0	cavité buccale	pT4 N2b M0	IV	pièce	27/01/2004	04 B 00 360	CM K MDI
Jot. AM	F	41	0	1	0	larynx	pT3 N0 M0	III	pièce	26/08/2004	04 B 03 117	CM K BDI
Kna. L	H	68	0	1	1	oropharynx	rT4 N0 M0	IV	biopsie	04/05/2004	04 B 01 699	CM K BDI
Lin. N	F	50	0	1	1	oropharynx	rT1 N0 M0	I	pièce	07/10/2003	03 33 64	CM K BDI
Lou. C	H	41	1	1	0	cavité buccale	pT2 N1 M0	III	pièce	04/05/2004	04 B 01 709	CM K BDI
Mal. A	H	66	0	1	0	hypopharynx	cT2 N0 M0	II	biopsie	19/02/2004	04 B 00 705	Basaloïde squameux
Mal.G	H	50	1	1	0	oropharynx	cT1 N0 M0	I	biopsie	05/01/2004	04 B 00 09	CM K PDI
Man. A	H	53	1	1	0	oropharynx	pT3 N0 M0	III	pièce	22/01/2004	04 B 00 293	CM NK PDI
May. T	H	37	1	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	biopsie	12/11/2003	03 38 50	CM K MDI
Mec. H	H	54	1	1	0	oropharynx	cT1 N0 M0	I	biopsie	13/10/2003	03 34 05	CM K BDI
N'Di. C	F	39	1	1	0	oropharynx	cT4 N2b M0	IV	biopsie	27/10/2003	03 36 52	CM K MDI
Oua. M	H	55	0	1	0	larynx	pT2 N0 M0	II	pièce	14/04/2004	04 B 01 457	CM K TBDI
Pac. R	H	62	1	1	0	larynx	pT4 N1 M0	IV	pièce	26/05/2004	04 B 02 029	CM K BDI
Pag. F	F	51	1	1	1	oropharynx	rT3 N0 M0	III	pièce	13/07/2004	04 B 02 670	CM K BDI
Pal. R	H	66	1	1	0	hypopharynx	pT4 N2c M0	IV	pièce	27/04/2004	04 B 01 616	CM K BDI
Pat. J	H	53	0	1	0	oropharynx	pT3 N2b M0	IV	pièce	07/10/2003	03 32 69	Basaloïde squameux
Pel. L	H	67	0	1	0	oropharynx	cT1 N2b M0	IV	biopsie	25/03/2004	04 B 01 197	Basaloïde squameux
Pey. M	H	48	1	1	0	oropharynx	cT2 N0 M0	II	biopsie	24/09/2003	03 35 66	CM K MDI
Pom. I	H	72	1	1	0	oropharynx	pT2 N0 M0	II	pièce	21/04/2004	04 01 552	CM K TBDI

Patients	Sexe	Age	Alcool	Tabac	Irradiation	Localisation T	TNM	Stade	Type prel.	Date prel.	Id. Bloc T	histologie
Qui. R	H	71	0	1	0	oropharynx	cT2 N0 M0	II	biopsie	25/07/2003	03 24 47	CM NK I
Rag. P	H	50	1	1	0	cavité buccale	pT4 N2c M0	IV	pièce	10/12/2003	03 42 68	CM K TBDI
Reg. R	H	75	1	1	1	larynx	rT3 N0 M0	III	pièce	30/09/2004	04 B 03 545	CM K BDI
Rod. A	H	52	1	1	0	hypopharynx	cT2 N2a M0	IV	biopsie	09/12/2003	03 42 27	CM K BDI
Rou. JF	H	48	1	1	0	hypopharynx	cT2 N0 M0	II	biopsie	30/01/2004	04 B 00 406	CM K BDI
Sag. M	H	46	0	1	0	oropharynx	pT4 N2c M0	IV	pièce	15/09/2004	04 B 03 355	CM K BDI
Sha. H	H	70	1	1	1	hypopharynx	rT3 N0 M0	III	pièce	04/02/2004	04 B 00 482	CM K BDI
Son. M	H	72	1	1	0	hypopharynx	cT3 N0 M0	III	biopsie	04/11/2003	03 37 53	CM K MDI
Tac. D	H	62	1	1	0	hypopharynx	cT2 N2a M0	IV	biopsie	22/12/2003	03 44 00	CM K BDI
Tal. R	H	52	1	1	0	hypopharynx	pT4 N2c M0	IV	pièce	24/02/2004	04 B 00 745	CM K BDI
Tho. JP	H	49	1	1	0	hypopharynx	cT4 N2c M0	IV	biopsie	24/06/2004	04 B 02 413	CM PK BDI
Tou. Y	H	55	0	1	1	oropharynx	rT3 N0 M0	III	biopsie	02/02/2004	04 B 00 437	CM K MDI
Two. M	F	49	1	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	pièce	06/01/2004	04 B 00 038	CM K BDI
Vat. R	F	74	1	1	1	cavité buccale	rT3 N0 M0	III	biopsie	05/11/2003	04 B 00 057	CM K MDI
Val. JP	H	64	1	1	0	larynx	pT3 N0 M0	III	pièce	08/07/2003	03 23 39	CM K BDI
Vas. M	H	50	1	1	1	hypopharynx	rT4 N0 M0	IV	biopsie	17/11/2003	03 39 01	CM K MDI
Vaz. G	H	42	1	1	0	oropharynx	cT4 N3 M0	IV	biopsie	19/05/2004	04 B 01 941	CM K BDI
Vin. G	F	75	0	1	0	larynx	pT3 N0 M0	III	pièce	08/06/2004	04 B 02 196	CM PK MDI
Zam. J	H	54	1	1	1	oropharynx	rT2 N0 M0	II	pièce	24/02/2004	03 27 56	CM NK BDI
Zor. LC	H	43	1	1	0	cavité buccale	pT2 N0 M0	II	pièce	18/08/2004	04 B 03 025	CM K BDI

Patients	id. S	P14	P14 (S)	P15	P15 (S)	P16	P16 (S)	APC	APC (S)	MGMT	MGMT (S)	FHIT	FHIT (S)	DAPK	DAPK (S)	hMLH1
Alv. J	4 98	0		1		0		0		0		0		0		0
Aun. Y	3 29	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Bal. A	4 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bar. R	pas de salive	1		0		0		0		1		0		0		0
Bar. J	3 07	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Bas. A	6 12	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bel. A	5 91	0		0		0		0		0		0		0		0
Bel. M	3 08	0		0		0		0		0		0		0		0
Bel. P	4 88	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Bes. P	pas de salive	0		0		1		0		0		0		0		0
Bey. V	pas de salive	0		0		0		0		0		0		0		0
Bin. P	5 47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Boc. A	3 86	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bod. Y	4 68	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bol. M	3 22	0		0		0		0		0		1		1		0
Bou. P	4 64	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
Bou. A	5 06	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
Bre. F	3 99	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Bru. G	3 67	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Cam. A	8 54	0		0		0		0		1		0		1		0
Cap. R	3 57	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cau. L	5 16	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Cer. G	3 89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cha. J	3 39	1		1		1		0		1		0		1		0
Cha. L	4 00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cha. D	6 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cha. G	3 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Che. L	4 35	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Cle. N	7 53	1		0		1		1		1		1		1		0
Del. JC	5 76	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dem. R	4 39	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Der. P	3 69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
De S. I	3 77	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
Des. P	6 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Die. L	4 66	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Patients	id. S	P14	P14 (S)	P15	P15 (S)	P16	P16 (S)	APC	APC (S)	MGMT	MGMT (S)	FHIT	FHIT (S)	DAPK	DAPK (S)	hMLH1
Dri. H	3 54	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Dub. P	6 85	0		0		0		0		0		0		0		0
Dur. C	5 19	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Fal. JL	6 42	0		0		0		0		0		0		0		0
For. J	2 86	0		0		0		0		1		0		1		0
Fra. A	6 01	0		0		0		0		0		0		0		0
Fro. P	3 19	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal. A	5 83	0		0		0		0		0		0		0		0
Gan. JP	5 43	0		0		0		0		0		0		1		0
Gat. Y	4 27	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gil. L	4 22	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Gon. A	3 73	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Gre. JP	2 91	0		1		1		1		0		0		0		0
Gui. JM	pas de salive	0		0		0		0		0		0		0		0
Guy. S	pas de salive	0		0		0		0		1		0		0		0
Ham. A	3 68	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Her. F	3 93	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jot. AM	6 41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
Kna. L	5 00	0		0		0		0		0		0		0		0
Lin. N	3 18	0		0		0		0		0		0		0		0
Lou. C	4 99	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mal. A	4 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mal.G	3 74	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Man. A	3 91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
May. T	3 40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mec. H	3 20	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
N'Di. C	3 31	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oua. M	pas de salive	0		1		1		0		1		0		0		0
Pac. R	5 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pag. F	5 80	0		0		0		0		0		0		0		0
Pal. R	4 85	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
Pat. J	3 17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Pel. L	pas de salive	0		1		0		1		0		0		0		0
Pey. M	3 16	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pom. I	4 79	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1

Patients	id. S	P14	P14 (S)	P15	P15 (S)	P16	P16 (S)	APC	APC (S)	MGMT	MGMT (S)	FHIT	FHIT (S)	DAPK	DAPK (S)	hMLH1
Qui. R	2 92	0		0		0		1		0		1		1		0
Rag. P	3 63	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
Reg. R	6 87	0		0		0		0		0		0		0		0
Rod. A	3 59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Rou. JF	4 04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sag. M	6 55	0		0		0		0		0		0		0		0
Sha. H	4 07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Son. M	3 34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tac. D	3 70	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Tal. R	4 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Tho. JP	5 57	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Tou. Y	4 06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Two. M	3 75	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
Vat. R	3 35	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Val. JP	pas de salive	0		0		1		0		1		0		1		0
Vas. M	3 46	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vaz. G	5 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Vin. G	5 36	1		1		0		0		1		0		0		0
Zam. J	4 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zor. LC	6 34	0		0		0		0		1		0		0		0

Patients	hMLH1 (S)	ECAD	ECAD (S)	RASSF1A	RASSF1A (S)	TIMP3	TIMP3 (S)	Nb. Methyl. T	Nb. Methyl. S
Alv. J		1		0		1		3	
Aun. Y	0	1	1	1	0	1	1	6	3
Bal. A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bar. R		0		0		0		2	
Bar. J	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Bas. A	0	1	0	0	0	0	0	2	1
Bel. A		0		0		1		1	
Bel. M		0		0		0		0	
Bel. P	0	0	0	1	1	0	0	3	3
Bes. P		0		1		0		2	
Bey. V		0		0		0		0	
Bin. P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Boc. A	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Bod. Y	0	1	1	0	0	0	0	2	1
Bol. M		1		0		1		4	
Bou. P	0	1	1	0	0	1	0	6	3
Bou. A	0	1	1	0	0	1	0	7	3
Bre. F	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Bru. G	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Cam. A		0		0		1		3	
Cap. R	0	0	0	0	0	1	1	2	1
Cau. L	0	1	0	0	0	1	0	5	2
Cer. G	0	1	1	0	0	1	0	2	1
Cha. J		0		0		0		5	
Cha. L	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cha. D	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Cha. G	0	0	0	1	1	0	0	2	2
Che. L	0	1	0	0	0	1	0	6	2
Cle. N		0		0		0		6	
Del. JC	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Dem. R	0	1	1	0	0	1	1	4	4
Der. P	0	0	0	0	0	1	1	1	1
De S. I	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Des. P	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Die. L	0	1	1	0	0	1	1	3	3

Patients	hMLH1 (S)	ECAD	ECAD (S)	RASSF1A	RASSF1A (S)	TIMP3	TIMP3 (S)	Nb. Methyl. T	Nb. Methyl. S
Dri. H	0	0	0	1	1	1	0	4	2
Dub. P		0		0		0		0	
Dur. C	0	0	0	0	0	1	1	3	3
Fal. JL		0		0		0		0	
For. J		1		1		1		5	
Fra. A		0		0		0		0	
Fro. P	0	1	0	1	1	1	1	5	3
Gal. A		0		0		0		0	
Gan. JP		0		0		1		2	
Gat. Y	0	1	0	0	0	1	0	3	1
Gil. L	0	1	1	0	0	1	1	4	3
Gon. A	0	0	0	0	0	1	1	3	3
Gre. JP		1		0		1		5	
Gui. JM		0		0		0		0	
Guy. S		0		0		0		1	
Ham. A	0	1	0	1	0	0	0	4	2
Her. F	0	1	1	1	0	1	1	4	3
Jot. AM	0	1	0	0	0	1	0	4	1
Kna. L		0		0		0		0	
Lin. N		0		0		0		0	
Lou. C	0	0	0	0	0	1	1	3	2
Mal. A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mal.G	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Man. A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
May. T	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mec. H	0	1	0	1	1	1	1	6	4
N'Di. C	0	0	0	1	1	0	0	2	2
Oua. M		1		0		1		5	
Pac. R	0	0	0	1	1	0	0	1	0
Pag. F		0		0		0		0	
Pal. R	0	0	0	0	0	1	1	3	3
Pat. J	0	0	0	1	1	0	0	2	1
Pel. L		1		0		0		3	
Pey. M	0	0	0	1	1	0	0	2	2
Pom. I	0	1	0	0	0	1	0	6	2

Patients	hMLH1 (S)	ECAD	ECAD (S)	RASSF1A	RASSF1A (S)	TIMP3	TIMP3 (S)	Nb. Methyl. T	Nb. Methyl. S
Qui. R		1		0		1		5	
Rag. P	0	0	0	0	0	1	0	3	2
Reg. R		0		0		0		0	
Rod. A	0	1	1	1	1	0	0	3	3
Rou. JF	0	1	0	0	0	1	1	2	1
Sag. M		0		0		1		1	
Sha. H	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Son. M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tac. D	0	0	0	0	0	0	0	2	1
Tal. R	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Tho. JP	0	1	0	1	1	1	0	4	2
Tou. Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Two. M	0	0	0	0	0	1	1	3	3
Vat. R	0	0	0	1	0	0	0	3	2
Val. JP		1		1		1		6	
Vas. M	0	1	1	0	0	1	0	3	2
Vaz. G	0	1	1	0	0	1	0	4	2
Vin. G		0		0		1		4	
Zam. J	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Zor. LC		0		0		1		2	

## **Etude des altérations épigénétiques dans les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS).**

**Implication dans le diagnostic, le suivi et le pronostic des patients.**

### **RESUME**

---

Depuis 20 ans, des progrès notables dans le traitement des cancers des VADS ont été réalisés, permettant une amélioration sensible du contrôle locorégional de la maladie mais sans améliorer la survie des patients. L'absence d'amélioration de la survie des patients s'explique par : le retard au diagnostic, un taux de rechute locale élevé et la survenue de seconds cancers. Le dépistage clinique n'a pas fait la preuve de son efficacité tant pour le dépistage primaire que secondaire. Par ailleurs, la clinique seule est incapable d'établir un pronostic pour chaque patient. Pour pallier à ces insuffisances, des recherches dans le domaine de la biologie de ces cancers ont été menées pour mieux comprendre leur cancérogenèse et rechercher des biomarqueurs pouvant avoir une valeur pronostique ou un intérêt dans le dépistage. En matière de cancérogenèse des cancers des VADS, 2 grands types de modifications ont été identifiés à l'échelon cellulaire : les altérations génétiques et épigénétiques. Notre travail s'est focalisé sur la méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs au niveau tumoral et salivaire. Seize gènes ont été étudiés dans le cadre d'une étude prospective. Nous avons pu définir un profil de méthylation à partir de 6 gènes avec une bonne corrélation entre les résultats obtenus au niveau tumoral et salivaire ; nos résultats nous ont permis de confirmer l'intérêt de l'étude de la salive des patients après traitement : la persistance ou la réapparition de méthylations précédant la rechute tumorale. Au niveau tumoral, la présence de méthylations n'a pas de valeur pronostique.

**MOTS CLES** Cancers malpighiens, salive, voies aéro-digestives supérieures, méthylation gènes suppresseurs de tumeur, biomarqueurs, dépistage, rechute, pronostic.

---

## **Study of epigenetic alterations in cancers of the upper aerodigestive tracts (UADTs).**

**Implication in patients' diagnosis, follow-up, and prognosis.**

### **SUMMARY**

---

For the last 20 years, significant improvement in the treatment of the UADT tumors has been done, resulting in better locoregional disease control yet without improving the survival rate. This fact is attributed to : delay in diagnosis, high local relapse rate, and second cancer occurrence. Clinical screening has not been efficient for the detection of primary and secondary cancers. On the other hand, clinical screening cannot establish a prognosis for every patient. To palliate to these imperfections, studies in cancer biology have been performed to better understand the carcinogenesis and to find biomarkers that could have a prognostic value or an early detection benefit. In carcinogenesis of tumors of the UADTs, 2 main types of modifications have been identified at the cellular level: genetic and epigenetic alterations. Our work focused on methylation of tumor suppressor genes in tumors and saliva. Sixteen genes have thus been analyzed; we were then able to define a 6-gene methylation panel with a good correlation between results obtained in tumors and those obtained in saliva. Our results confirm the benefit of saliva analysis in cancer patients after treatment: persistence or reappearance of gene methylation precedes clinically evident tumor relapse. On the other hand, the presence of methylations in tumors has no prognostic value.

**KEY WORDS** Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, saliva, Upper Aerodigestive Tract, tumor suppressor gene methylation, biomarkers, detection, relapse, prognosis.