

Université de Montréal

**Modèle cellulaire de carcinogenèse pour les cancers de
l'oropharynx induits par le VPH**

par
Monika Knapik

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de MSc.
en sciences biomédicales
option générale

avril 2014

© Monika Knapik, 2014

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Modèle cellulaire de carcinogenèse pour les cancers de l'oropharynx induits par le VPH

Présenté par :
Monika Knapik

a été évalué par un jury composé de personnes suivantes :

Jean-François Cailhier, président-rapporteur
Apostolos Christopoulos, co-directeur de recherche
Francis Rodier, co-directeur de recherche
Akram Rahal, membre du jury

Résumé

Problématique: Le virus du papillome humain (VPH) est présent dans près de 50% des cancers de l'oropharynx. Le potentiel oncogénique du VPH est encodé dans les oncoprotéines E6 et E7, qui agissent en modulant différents gènes, dont les gènes suppresseurs de tumeur p53 et pRb. Les cellules VPH positives démontrent une altération au niveau de la signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (RDA), un mécanisme de contrôle dans l'arrêt de la croissance des cellules ayant subi des dommages au niveau de leur ADN.

Hypothèse et objectifs : Nous croyons que les défauts au niveau de la RDA des cancers VPH positifs peuvent être exploités afin de sensibiliser préférentiellement les cellules cancéreuses aux traitements de radiothérapie. Cette stratégie de recherche nécessite l'élaboration d'un modèle cellulaire de carcinogénèse isogénique pour le cancer de l'oropharynx que nous proposons de développer et de caractériser. L'étude vise à dériver des lignées isogéniques à partir de kératinocytes primaires et cellules épithéliales de l'oropharynx pour ensuite valider la carcinogénèse de notre modèle *in vitro* & *in vivo*

Méthodologie : Des lignées cellulaires de kératinocytes primaires et de cellules épithéliales de l'oropharynx ont été successivement modifiées par transduction afin de présenter les mutations associées aux cancers de l'oropharynx induits par le VPH. Les cellules ont été modifiées avec des lentivirus codants pour la télomérase (hTERT), les oncogènes E6, E7 et RasV¹². Afin de valider la cancérogénèse *in vitro* de notre modèle, des études d'invasion en matrigel et de croissance sans ancrage en agar mou ont été réalisées. Les populations cellulaires transformées ont été ensuite introduites dans des souris immunodéficientes afin d'évaluer leur tumorigénicité *in vivo*.

Résultats : À partir des plasmides recombinés construits par méthodes de clonage traditionnelle et de recombinaison « Gateway », nous avons produit des lentivirus codants pour la télomérase humaine (hTERT), les oncogènes viraux E6 et E7 et l'oncogène Ras. Les kératinocytes primaires et cellules épithéliales de l'oropharynx ont été infectés successivement par transduction et sélectionnés. Nous avons validé l'expression de nos transgènes par

méthode d'immunofluorescence, de Western Blot et de réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR). Nous avons établi trois lignées des cellules épithéliales de l'oropharynx (HNOE) à partir d'échantillons tissulaires prélevés lors d'amygdalectomie (HNOE42, HNO45, HNOE46). Les cellules transduites avec le lentivirus exprimant le promoteur fort CMV/TO de l'oncogène RasV¹² ont présenté un changement morphologique compatible avec une sénescence prématurée induite par l'oncogène Ras. En exprimant des quantités plus faibles du RasV¹² mutant, la lignée cellulaire HEKn hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² a réussi à échapper à la sénescence induite par l'oncogène Ras. La population cellulaire exprimant HEKn hTERT-E6-E7-PGK RasV¹² a présenté un phénotype malin en culture et à l'étude d'invasion, mais n'a pas démontré de résultats positifs à l'étude de croissance sans ancrage en agar mou ni en xéno greffe en souris immunodéficientes.

Conclusion : Nos résultats démontrent qu'en présence des oncogènes viraux E6 et E7, il y a un troisième mécanisme suppresseur de tumeur qui médie la sénescence induite par l'oncogène Ras. Nous avons identifié que la présence de E6 seule ne suffit pas à immortaliser les kératinocytes primaires humains (HEKn). Nous n'avons pas réussi à créer un modèle in vitro de carcinogenèse pour les cancers de l'oropharynx induits par le VPH.

Mots-clés : VPH, cancer oropharynx, modèle cellulaire, carcinogenèse

Abstract

Background: Human papillomavirus (HPV) is present in almost 50% of all oropharyngeal cancers. The oncogenic potential of HPV is encoded by the E6 and E7 oncoproteins, which act by modulating different genes, including tumour suppressor genes p53 and pRb. The process of inactivation of p53 and pRb is largely responsible for the genomic instability that contributes to malignant transformation of cells. HPV-positive cancer cells show an alteration in their DNA Damage Response (DDR) signalling pathway that allows them to inhibit key tumour suppressor genes and to ignore DNA damage signals.

Hypothesis and objectives: We believe that these DDR defects can be exploited to preferentially sensitize cancerous cells to radiotherapy by using a defined cell culture model. We propose to characterize a defined cell culture model for HPV induced oropharyngeal cancer. Derive isogenic cell culture lines from primary skin keratinocytes and oropharyngeal epithelial cells. and to validate the carcinogenesis of our model in vitro and in vivo.

Methods: We propose to use primary skin keratinocytes and oropharyngeal epithelial cells which will be sequentially modified by transduction using a Gateway Lentiviral System to present the mutations associated with HPV induced oropharyngeal cancer. The cells will be modified with lentivirus encoding the human telomerase (hTERT), E6, E7 and Ras oncogenes. To validate the in vitro carcinogenesis of our model, we will assess anchorage independent growth and invasiveness by means of soft agar medium and matrigel studies. To assess in vivo tumorigenicity, the transformed cell populations will be introduced into immunodeficient mice.

Results: We constructed recombinant lentivector plasmids using traditional cloning and Gateway recombination methods. Using the constructed lentivectors, we generated lentiviruses encoding the catalytic subunit for human telomerase (hTERT), the E6 and E7 viral oncogenes and Ras oncogene. Primary keratinocytes and oropharyngeal epithelial cells were infected successively by transduction with the above-mentioned lentiviruses and then underwent selection. We validated the expression of our transgenes by methods of

immunofluorescence, Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). We have successfully established and kept in culture three lines of epithelial oropharyngeal cells (HNOE42, HNOE45, HNOE46) from tissue samples collected during tonsillectomy. Cells transduced with lentivirus expressing CMV/TO, a strong promoter for the RasV¹² oncogene, showed morphological changes compatible with premature Ras oncogene induced senescence. Cell line HEKn hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² managed to escape Ras oncogene induced senescence by expressing lower amount of mutated RasV¹². The HEKn hTERT-E6-E7-PGK RasV¹² cell line presented a malignant phenotype in culture and on matrigel invasion assay. However, soft agar assay for anchorage independent cell growth and xenograft assay in immunodeficient mice were both negative for tumorigenicity.

Conclusion: Our results demonstrate that in the presence of E6 and E7, a third tumor suppressor mechanism mediates Ras oncogene induced senescence. Furthermore, we have found that the presence of E6 alone is not sufficient to immortalize primary human keratinocytes (HEKn). We have not managed to create an in vitro carcinogenesis cell culture model for HPV induced oropharyngeal cancer.

Keywords: HPV, oropharyngeal cancer, cellular model, carcinogenesis

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| RÉSUMÉ | I |
| ABSTRACT | III |
| TABLE DES MATIÈRES | V |
| LISTE DES TABLEAUX | VIII |
| LISTE DES FIGURES | IX |
| DÉDICACE | XI |
| REMERCIEMENTS | XII |
| LISTE DES SIGLES | XIII |
| CHAPITRE I: CARCINOME ÉPIDERMOÏDE DE LA TÊTE ET DU COU | 1 |
| 1.1 CARCINOGENÈSE | 1 |
| 1.2 MODÈLE DE CARCINOGENÈSE MULTI-ÉTAPES | 2 |
| 1.3 ALTÉRATIONS MOLÉCULAIRES ET GÉNÉTIQUES DES CANCERS TÊTE ET COU | 3 |
| 1.3.1 SUPPESSEUR DE TUMEUR P16 ^{INK4A} /CDKN2A | 5 |
| 1.3.2 ONCOGÈNE CYCLINE D1 | 6 |
| 1.3.3 GÈNE SUPPESSEUR DE TUMEUR P53 | 8 |
| 1.3.4 ONCOGÈNE EGFR | 9 |
| 1.3.5 ONCOGÈNE C-MYC | 10 |
| 1.3.6 VOIE DE SIGNALISATION PI3K-PTEN-AKT | 11 |
| CHAPITRE II : PAPILOMAVIRUS | 13 |
| 2.1 CLASSIFICATION | 13 |
| 2.2 CYCLE DE VIE DU VPH | 13 |
| 2.3 BIOLOGIE DU VPH | 15 |
| 2.3.1 ONCOPROTÉINES VIRALES | 17 |
| 2.4 CARCINOGENÈSE | 20 |
| CHAPITRE III : CANCER DU COL DE L'UTÉRUS ET VPH | 22 |
| 3.1 PRÉVALENCE | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 INFECTION | 22 |
| 3.3 PROGRESSION VERS LE CANCER DU COL DE L'UTÉRUS | 23 |
| CHAPITRE IV : CARCINOME ÉPIDERMOÏDE DE LA TÊTE ET DU COU ET VPH | 25 |
| 4.1 PRÉVALENCE | 25 |
| 4.2 CARCINOGENÈSE | 26 |
| 4.3 IMPLICATIONS CLINIQUES | 29 |
| CHAPITRE V: HYPOTHÈSE & OBJECTIFS | 34 |
| CHAPITRE VI : MÉTHODOLOGIE | 35 |
| 6.1 SYSTÈME GATEWAY | 35 |
| 6.1.1 SYSTÈME D'EXPRESSION LENTIVIRAL GATEWAY ET CLONAGE | 35 |
| 6.1.2 PRODUCTION DE LENTIVIRUS ET TRANSFECTION | 35 |
| 6.1.3 GATEWAY LENTIVIRUS ET TRANSDUCTION | 36 |
| 6.2 MISE EN CULTURE DE CELLULES ÉPITHÉLIALES HUMAINES NORMALES DE L'OROPHARYNX (HNOE) | 36 |
| 6.3 CULTURE CELLULAIRE | 37 |
| 6.4 RT-qPCR | 38 |
| 6.5 IMMUNOFLUORESCENCE | 39 |
| 6.6 WESTERN BLOT | 40 |
| 6.7 ÉTUDE D'INVASION EN MATRIGEL | 40 |
| 6.8 CROISSANCE SANS ANCRAGE EN AGAR MOU | 41 |
| 6.9 XÉNOGREFFE EN SOURIS | 41 |
| CHAPITRE VII : RÉSULTATS | 43 |
| 7.1 SYSTÈME GATEWAY | 43 |
| 7.1.1 CLONAGE DE LA SÉQUENCE CODANTE DE HPV16-E6 HPV16-E7 EN VECTEUR ENTRÉE | 43 |
| 7.1.2 PRODUCTION DE VECTEURS LENTIVIRAUX PAR RECOMBINAISON | 44 |
| 7.2 GÉNÉRATION DES LIGNÉES CELLULAIRES TRANSDUITES | 46 |
| 7.3 VALIDATION EXPRESSION DES TRANSGÈNES | 49 |
| 7.3.1 RT-qPCR | 50 |
| 7.3.2 IMMUNOFLUORESCENCE | 52 |
| 7.3.3 WESTERN BLOT | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 7.4 CARACTÉRISATION DES MODÈLES CELLULAIRES DE CANCER INDUIT PAR LE VPH | 54 |
| 7.4.1 COURBES DE CROISSANCE HEKN | 55 |
| 7.4.2 COURBES DE CROISSANCE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES HUMAINES DE L'OROPHARYNX (HNOE) | 61 |
| 7.4.3 ÉTUDE D'INVASION EN MATRIGEL | 64 |
| 7.4.4 CROISSANCE SANS ANCRAGE EN AGAR MOU | 66 |
| 7.5 XÉNOGREFFE EN SOURIS | 67 |
| <u>DISCUSSION</u> | 70 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u> | 77 |
| <u>ANNEXE 1 : ÉTUDES ÉVALUANT LA CORRÉLATION ENTRE LE STATUT VPH ET LA SURVIE DANS LES CARCINOMES ÉPIDERMOÏDE DE LA TÊTE ET COU</u> | 88 |
| <u>ANNEXE 2 : CARTE TOPOGRAPHIQUE DU VECTEUR D'ENTRÉE PENTR4</u> | 91 |
| <u>ANNEXE 3 : CARTE TOPOGRAPHIQUE DU VECTEUR D'ENTRÉE PLENTI</u> | 92 |
| <u>ANNEXE 4</u> | 93 |
| <u>ANNEXE 5</u> | 94 |

Liste des tableaux

Tableau 1. Gènes impliqués dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

Tableau 2 : Essais cliniques présentement en cours de phase II et III sur la désintensification des traitements des cancers VPH positifs

Tableau 3. Tableau RT-qPCR

Tableau 4. Clonage : lentivecteurs d'entrée, destination et recombinaison d'expression

Tableau 5. Infections par transduction

Tableau 6. RT-qPCR HPV16-E6

Tableau 7. RT-qPCR HPV16-E7

Tableau 8. Lignées cellulaires HNOE établies HNOE42, HNOE45 et HNOE46

Liste des figures

Figure 1. Modèle de progression génétique des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

Figure 2. Activité de la Cycline D1, des CDK et CDKI à la phase G1-S

Figure 3. Cycle de vie du VPH

Figure 4. Organisation génomique du VPH16

Figure 5. Activité cellulaire des oncoprotéines virales E6 et E7

Figure 6: Mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse des cancers VPH positifs

Figure 7. Lésions intraépithéliales dans le développement des cancers du col de l'utérus

Figure 8. Modèle intégré de carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

Figure 9. Production de vecteurs d'entrée recombinants

Figure 10. Recombinaison clonase LR

Figure 11. Chronologie des infections successives par transduction

Figure 12. Images des lignées cellulaires

Figure 13. Immunofluorescence

Figure 14. Western Blot avec dosage d'expression de RasV¹²

Figure 15. Courbes de croissance des HEK_n sauvage et HEK_n hTERT

Figure 16. Courbes de croissance des HEK_n hTERT et HEK_n E6

Figure 17. Courbes de croissance des HEK_n hTERT-E6 et HEK_n hTERT-E6-E7

Figure 18. Courbes de croissance des HEK_n hTERT-E6-E7, HEK_n hTERT-E6-E7 CMV

RasV¹², HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹²

Figure 19. Culture cellulaire suite à l'introduction de RasV¹²

Figure 20. Courbes de croissance des lignées cellulaires HNOE

Figure 21. Étude d'invasion en matrigel

Figure 22. Photographie microscopique des résultats de l'étude d'invasion en matrigel

Figure 23. Étude croissance en agar mou

Figure 24. Mesure volumétrique (mm^3) des masses tumorales de la lignée HEK_n hTERT E6 E7-PGK RasV¹² en fonction du nombre de jours écoulés post-injection

Figure 25. Mesure volumétrique (mm^3) des masses tumorales de la lignée HeLa (contrôle positif) en fonction du nombre de jours écoulés post-injection

Figure 26: Schéma modifié du notre modèle cellulaire de carcinogenèse isogénique

*Je dédie ce mémoire à mes parents,
Jolanta et Jerzy Knapik
qui n'ont jamais cessé de croire en moi.*

Remerciements

Tout d'abord merci à Dr Apostolos Christopoulos, mon directeur de recherche, qui m'a orientée vers cette maîtrise. Merci pour votre soutien, vos conseils et votre encouragement. Un grand Merci à Dr Francis Rodier, mon codirecteur de recherche, qui a été la pierre angulaire de ce projet. Merci de m'avoir guidée tout au long de ce projet avec une patience infinie. Vous avez été un mentor exceptionnel! Merci pour votre soutien, votre disponibilité et vos mots encouragements.

Une mention spéciale à Guillaume Cardin, assistant de recherche, collègue de travail et ami pour tout son aide et support dans la réalisation des expériences de laboratoires. Merci Guillaume d'avoir pris le temps de vérifier, lire et commenter mes nombreuses sections. Guillaume, sans toi je n'y serais jamais arrivée! Je remercie également Kim Leclerc-Desaulniers, technicienne en santé animale, qui a rendu les expériences en souris possibles.

Finalement, j'aimerais remercier Damian, ma tendre moitié, pour sa patience infinie durant les longues heures passées à l'hôpital et ses encouragements perpétuels lors de la rédaction de ce mémoire. Merci à tous ceux que j'oublie, sans qui cet accomplissement n'aurait été possible.

Liste des sigles

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
CÉR: Comité d'éthique de la recherche
CDK: Cyclin Dependant Kinase
CDKI : Cyclin Dependant Kinase Inhibitor
CHUM: Centre hospitalier de l'Université de Montréal
CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
E: Early Protein
E6-AP: E6-Associated Protein
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
FBS: Fetal Bovine Serum
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization
GFP: Green Fluorescent Protein
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HEKn: Human Epidermal Keratinocytes, Neonatal
HKGS : Human Keratinocyte Growth Supplement
HNOE: Human Normal Oropharyngeal Epithelial cells
HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV: Human Papilloma Virus
HSIL : High grade Squamous Intraepithelial Lesion
hTERT: Human Telomerase Reverse Transcriptase
KER-SFM: Keratinocyte Serum Free Medium
L: Late Protein
LSIL : Low grade Squamous Intraepithelial Lesion
ORL: Oto-rhino-laryngologie

OMS : Organisation mondiale de la Santé
PBS: Phosphate Buffered Solution
PCR: Polymerase Chain Reaction
pRb: Retinoblastoma protein
RDA : Réponse aux dommages à l'ADN
RT-PCR: Reverse-Transcriptase PCR
SEM: Serum Enriched Medium
SMEM: Spinner Modified minimum Essential Medium
TBP : TATA Box Binding Protein
TP: Température Pièce
UFC: Unité Formant Colonies
VPH: Virus du papillome humain

Chapitre I: Carcinome épidermoïde de la tête et du cou

1.1 Carcinogénèse

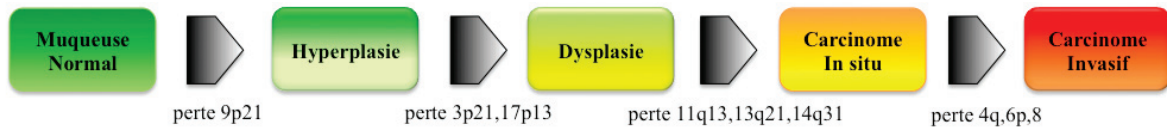
La carcinogénèse et les étapes dans le développement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou demeurent à ce jour des entités peu connues et décrites. En 1996, Califano *et al.* ont été les premiers à proposer un modèle moléculaire de carcinogénèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Grâce à des analyses de perte allélique par microsatellites, ils ont démontré que l'accumulation de pertes d'hétérozygocité était associée avec la progression histopathologique des lésions. Les lésions de bas grade telles les dysplasies démontraient des pertes d'hétérozygocité au niveau des chromosomes 3p, 9p et 17p tandis que les carcinomes démontraient des altérations au niveau des chromosomes 11q, 4q et 8¹. Bien que le modèle proposé par Califano était incomplet, il a permis de confirmer que la carcinogénèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou est le résultat d'une accumulation sériée d'événements génomiques spécifiques impliquant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Des études subséquentes ont démontré que les gènes principalement impliqués dans la carcinogénèse moléculaire des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou étaient les gènes codant pour p53, p16^{INK4A} et la cycline D1. Des mutations précoces somatiques au niveau du gène p53 sont présentes dans 60-80% des cas de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{2,3}. Le gène p16^{INK4A} localisé sur le chromosome 9p21 est fréquemment inactivé par une mutation ou par un mécanisme de méthylation⁴. Le gène CCND1 localisé sur le chromosome 11q13 codant pour la protéine cycline D1 est amplifié dans plus de 80% des cas⁵. De fait, l'inactivation du chromosome 9p21 et la mutation du p53 sont des altérations précoces retrouvées dans les lésions précurseurs de la tête et du cou négatives pour le virus du papillome humain (VPH). Parallèlement, les mêmes voies de signalisation sont altérées précocement dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs par l'entremise des oncoprotéines virales E6 et E7⁶. Un gène récemment identifié dans la carcinogénèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou est le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR). Selon Sheu *et al.* le taux d'amplification et de

surexpression du EGFR s'élèverait jusqu'à 30% dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou⁷.

1.2 Modèle de carcinogenèse multi-étapes

Il est dorénavant largement accepté que les tumeurs solides proviennent de l'accumulation de multiples mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes^{8,9}. La plupart des cancers sont initiés par la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs suivie par des altérations au niveau des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs¹⁰. La carcinogenèse en plusieurs étapes décrit un processus cumulatif d'événements mutationnels des gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes qui va de l'initiation tumorale vers la promotion tumorale et finalement la progression tumorale. En 1996, six ans après le développement d'un modèle de carcinogenèse multi-étapes pour le cancer colorectal⁹, Califano *et al.* furent les premiers à proposer un modèle de progression séquentielle génétique pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou suite à l'analyse d'une série de 87 lésions épithéliales (lésions hyperplasiques, lésions dysplasiques, carcinomes *in situ* et carcinome invasif) pour la perte allélique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de microsatellites. Ils ont identifié la perte d'hétérozygotie comme événement précoce dans le développement de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et cette perte serait associée à la progression histopathologique de la lésion. De plus, ils ont identifié des altérations génétiques fréquemment observées dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Les lésions hyperplasiques de bas grade et dysplasiques ont montré une perte d'hétérozygotie sur les chromosomes 3p, 9p et 17p. Ils ont constaté une corrélation entre l'augmentation progressive de la fréquence de perte d'hétérozygotie des loci 9p21 et 3p21 et la progression histopathologique de la lésion (Figure 1). La fréquence de perte d'hétérozygotie a augmenté progressivement dans les lésions suivantes : lésions hyperplasiques bénignes, dysplasie et carcinome *in situ* pour atteindre un plateau dans le carcinome épidermoïde invasif. Les altérations des chromosomes 11q, 13q, 14q, 4q, 6p et 8 ont été identifiées dans des lésions histopathologiquement plus agressives¹ (Figure 1). Bien qu'incomplet, le modèle proposé par Califano *et al.* (Figure 1) a permis de confirmer que la carcinogenèse des carcinomes

épidermoïdes de la tête et du cou s'effectue par une accumulation séquentielle d'événements génétiques spécifiques impliquant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.



Adapté de Califano et al. Cancer research 1996

Figure 1. Modèle de progression génétique des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (adaptée de Califano *et al.*)¹. Corrélation entre l'agressivité histopathologique de la lésion (de gauche à droite) et la progression de la fréquence de perte d'hétérozygotie. Le facteur déterminant pour la progression tumorale est l'accumulation des altérations et pas nécessairement l'ordre dans lequel elles se sont produites. Les gènes suppresseurs de tumeurs candidats sont p16 (9p21), p53 (17p) et pRb (13q) et le proto-oncogène candidat cycline D1 (11q13).

1.3 Altérations moléculaires et génétiques des cancers tête et cou

Des études antérieures ont confirmé que les principaux gènes impliqués dans la carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou sont les gènes codant pour les gènes suppresseurs de tumeurs p16INK4a (9p21) et p53 (17q13) et les proto-oncogènes cycline D1 (11q13) et EGFR (7p11).

| Chromosomal location | Gene | Cancer gene status |
|--------------------------------|----------------|---------------------------|
| <i>Tumour-suppressor genes</i> | | |
| 3p14 | <i>FHIT</i> | Candidate |
| 3p21 | <i>RASSF1A</i> | Candidate |
| 8p23 | <i>CSMD1</i> | Candidate |
| 9p21 | <i>CDKN2A</i> | Established |
| 9p23 | <i>PTPRD</i> | Candidate |
| 10q23 | <i>PTEN</i> | Established |
| 17p13 | <i>TP53</i> | Established |
| 18q21 | <i>SMAD4</i> | Established |
| <i>Oncogenes</i> | | |
| 3q25 | <i>CCNL1</i> | Candidate |
| 3q25 | <i>PARP1</i> | Candidate |
| 3q26 | <i>PIK3CA</i> | Established |
| 3q26 | <i>TP63</i> | Candidate |
| 3q26 | <i>DCUN1D1</i> | Candidate |
| 7p11 | <i>EGFR</i> | Established |
| 7q31 | <i>MET</i> | Established |
| 8q24 | <i>MYC</i> | Candidate |
| 8q24 | <i>PTK2</i> | Candidate |
| 11q13 | <i>CCND1</i> | Established |
| 11q13 | <i>CTTN</i> | Candidate |
| 11q13 | <i>FADD</i> | Candidate |

Leemans et al. Nature reviews Cancer 2011

Tableau 1. Gènes impliqués dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

Les gènes candidats et gènes établis impliqués dans la carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou présentés avec leur localisation chromosomique la plus fréquemment atteinte.

1.3.1 Suppresseur de tumeur p16^{INK4a}/CDKN2A

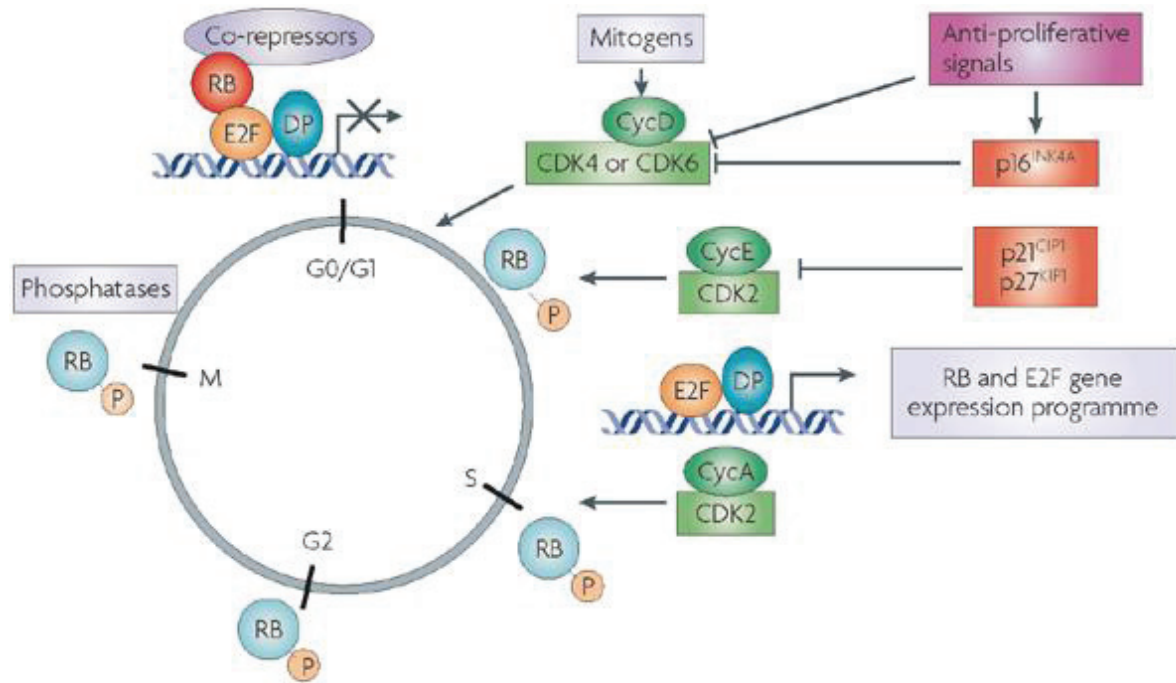
L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p16INK4a/CDKN2A localisé sur le locus du chromosome 9p21 est la mutation génétique la plus fréquemment identifiée dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{4,11}. La perte de gène p16INK4a comme événement précoce dans la progression tumorale a été confirmée par Van der Riet *et al.* En utilisant l'analyse par PCR de microsatellites, ils ont identifié une incidence comparable de la perte allélique pour le chromosome 9p dans les lésions préinvasives et les lésions invasives confirmant ainsi que l'inactivation de p16INK4a est un événement précoce dans la progression tumorale des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou¹¹. Reed *et al.* ont été les premiers à démontrer la fréquence de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p16INK4a. L'inactivation de p16INK4a a été identifiée par immunohistochimie et par technique d'anticorps monoclonaux dans 24 des 29 (83%) des échantillons de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou analysés. Les principaux mécanismes d'inactivation du gène p16INK4a identifiés sont les délétions homozygotes (67 %) et l'hyperméthylation du promoteur (21 %). Les mutations ponctuelles et les mutations dans le cadre de lecture demeurent rares (9%)⁴. Le produit du gène de p16INK4a appartient à la famille des inhibiteurs kinases cycline-dépendantes (CDKI); des kinases qui régulent négativement le cycle cellulaire à la phase G1. Le produit du gène de p16INK4a agit comme un inhibiteur puissant de la kinase cycline-dépendante 4 et de la kinase cycline-dépendante 6 (CDK4/CDK6) qui sont essentielles pour la progression du cycle cellulaire dans la phase G1-S. L'inactivation précoce de p16INK4a dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou soulève l'activité inhibitrice de p16INK4a sur les CDK4/CDK6. Ceci favorise la liaison entre la cycline D1 et les CDK4/CDK6, la phosphorylation de pRb et la libération du facteur de transcription E2F qui amorce la progression de la cellule dans le cycle cellulaire la phase G1-S (Figure 2). Les mutations impliquant l'inactivation de p16INK4a dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou permettent aux cellules de proliférer et de croître, leur conférant ainsi un potentiel tumorigène. Récemment, Shah *et al.* ont suivi 89 patients indiens atteints de carcinomes épidermoïdes de la cavité orale pendant un minimum de deux ans pour déterminer la signification pronostique de différents marqueurs moléculaires en utilisant des techniques d'immunohistochimie et d'anticorps monoclonaux. Après un ajustement d'analyses multivariées pour la taille de la

tumeur, le statut ganglionnaire et l'infiltration lymphatique, ils ont constaté que les statuts p53 négatif et p16 positif des tumeurs sont des prédicateurs indépendants de la survie sans rechute. Seule la négativité pour p53 a été associée avec l'amélioration de la survie globale¹². Une réexpression in vitro du suppresseur de tumeur p16INK4a dans les lignées cellulaires humaines de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou par une technique de thérapie génique (adénovirus recombinant exprimant un taux élevé de protéine p16INK4a) a démontré un effet antitumoral significatif en arrêtant le cycle cellulaire à la transition G1-S¹³. La prévalence importante des mutations de p16INK4a dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou fait de ce gène un candidat idéal pour des thérapies de remplacement génique. Cependant, à ce jour, aucune thérapie ciblée de l'axe de p16INK4a n'a été développée.

1.3.2 Oncogène Cycline D1

Le gène CCND1 (PRAD-1) situé sur le chromosome 11 (11q13) code pour la cycline D1, une protéine régulatrice du cycle cellulaire. L'expression de la cycline D1 dans la cellule est influencée par des signaux mitogéniques extracellulaires et joue un rôle de contrôle de la progression du cycle cellulaire à la phase G1, ce qui engage la cellule à la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) et à la division cellulaire. Un complexe actif de cycline D1 et CDK4 ou CDK6 favorise la libération du facteur de transcription E2F, ce qui permet la transition de la cellule à travers la phase G1-S (Figure 2). L'amplification ou la surexpression de l'oncogène cycline D1 a été observée chez plus de 80 % des cas des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou⁵. La surexpression de cycline D1 dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou a été identifiée dans 41 à 74 % de cas^{14,15}. La surexpression de la protéine cycline D1 est souvent corrélée avec l'amplification du gène CCND1; ce qui confère à la cellule une réduction dans sa dépendance aux signaux mitogéniques pour sa prolifération^{14,15}. Bien que rares, les anomalies chromosomiques telles que les réarrangements du locus 11q13 (12%) agissent en dérégulant l'expression de la cycline D. Ces anomalies ont été associées à des résultats cliniques défavorables et une survie diminuée^{14,16}. La surexpression de la cycline D1 a été caractérisée comme facteur de mauvais pronostic associée

à une réduction de la survie et à une récurrence précoce des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou chirurgicalement résécables¹⁵.



Nature Reviews | Cancer

Knudsen et al. Nature reviews Cancer 2008

Figure 2. Activité de la Cycline D1, des CDK et CDKI à la phase G1-S

L'expression de la cycline D1 dans la cellule est influencée par des signaux mitogéniques extracellulaires. Le complexe actif de cycline D1 et CDK4 ou CDK6 favorise la libération du facteur de transcription E2F de la liaison inhibitrice exercée par le Rb permettant ainsi la transition de la cellule à travers la phase G1-S. L'activité de Rb est contrôlée par les kinases cycline-dépendantes (CDK) qui l'inactivent en le phosphorylant. Le p16INK4a agit comme un inhibiteur (CDKI) puissant de CDK4 et CDK6 et son expression est influencée par des signaux antiprolifératifs¹⁷.

1.3.3 Gène suppresseur de tumeur p53

Le gène suppresseur de tumeur p53, situé sur le locus du chromosome 17q13, code pour une protéine nucléaire qui joue un rôle crucial dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire et la protection de l'intégrité du génome¹⁸. La coordination du cycle cellulaire, la régulation de la réparation de l'ADN, de la transcription et de l'apoptose sont les activités principales exercées par p53¹⁹. La mutation du p53 est l'une des mutations les plus fréquemment détectées dans tous les cancers humains et environ 50% des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou portent cette mutation²⁰. Lorsqu'un dommage à l'ADN est identifié par la cellule, le gène suppresseur de tumeur p53 est activé et agit en supprimant la prolifération cellulaire. Le p53 stimule l'arrêt du cycle cellulaire principalement dans la phase G1 et G2, permettant ainsi à la cellule de réparer l'ADN endommagé^{19,21}. Si, d'autre part, le dommage à l'ADN est considéré trop important, le p53 active des voies pro-apoptotiques qui mèneront à la mort cellulaire programmée de la cellule endommagée. L'inactivation de la fonction du p53 confère aux cellules un avantage sélectif de croissance leur permettant de survivre, proliférer et se reproduire malgré les dommages accumulés à l'ADN. Jusqu'à 50-60% de tous les cas de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou démontrent des mutations somatiques précoces du gène suppresseur de tumeur p53^{2,3,22}. Les mutations les plus fréquemment rapportées sont les mutations faux sens et non-sens qui produisent une protéine p53 tronquée non fonctionnelle. Les «points chauds» de mutations du codon du gène p53 identifiés sont 220, 245-248 et 278-281²⁰. L'inactivation du locus 9p21 et les mutations du gène p53 sont des anomalies génétiques fréquemment retrouvées dans les lésions précurseurs de la tête et cou, suggérant que ces mutations seraient des événements précoces dans la carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou¹. Boyle *et al.* ont analysé plus de 100 échantillons de lésions de la tête et du cou et ont identifié un taux de mutation du p53 de 19% dans les lésions préinvasives, par rapport à un taux de mutation du p53 de 43% dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou invasifs²⁰. Ces résultats suggèrent que, bien que les mutations p53 peuvent se produire à la fois précocement et tardivement dans la progression tumorale, elles sont préférentiellement retrouvées dans les lésions cancéreuses invasives^{2,20}. L'altération du p53 augmente la vulnérabilité de la cellule à l'accumulation de mutations génétiques^{20,22}. Shin *et al.* ont évalué 69 échantillons de carcinomes épidermoïdes

de la tête et du cou fixés en formaline ou inclus en paraffine par des analyses d'immunohistochimie et d'anticorps monoclonaux. Ils ont observé que l'expression de la protéine p53 mutée était le facteur prédictif négatif le plus significatif de la survie globale dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. L'expression de la protéine p53 mutée a également été associée à un risque plus élevé d'échec au traitement, de récurrence et de développement d'un deuxième primaire²². Dans une étude récente prospective multicentrique de sept ans, Poeta *et al.* ont évalué l'association entre les mutations du gène p53 et le taux de survie de patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Quatre cent vingt patients ont été répartis en deux groupes en fonction du degré réarrangement de la structure de la protéine p53, en utilisant des techniques de chromatographie en phase liquide à haute performance. En post-traitement chirurgical, les patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et présentant une mutation de p53 ont démontré une survie globale significativement réduite en comparaison aux patients avec p53 sauvage (rapport de risque de décès 1,4). Cette association était plus forte lorsque la mutation de p53 avait un effet perturbateur sur la structure de la protéine p53 (rapport de risque de décès 1.7)².

1.3.4 Oncogène EGFR

Le gène codant pour le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est situé sur le chromosome 7p11. Il code pour un récepteur glycoprotéique transmembranaire avec une activité intrinsèque de tyrosine kinase de la famille des récepteurs ErbB. L'activation du récepteur par un ligand entraîne une homodimérisation ou une hétérodimérisation des récepteurs, ce qui permet la transphosphorylation des résidus de tyrosine kinase et une activation du récepteur. Le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α) et le facteur de croissance épidermique (EGF) sont les principaux ligands qui lient l'EGFR. Lorsque l'EGFR est anormalement activé, il agit comme un oncogène puissant dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Une haute polysomie et l'amplification du gène d'EGFR ont été identifiées chez près de 60% de cas de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou²³. La surexpression de la protéine EGFR a été observée dans plus de 90 % des cas²⁴. Grandis *et al.* ont été les premiers à identifier une expression accrue de la protéine EGFR comme marqueur

pronostique pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{24,25}. En utilisant des techniques d'hybridation in situ fluorescente (FISH) sur 75 échantillons de tumeurs, Chung *et al.* ont démontré que la présence d'un grand nombre de copies du gène EGFR, ainsi que la présence d'amplification du gène, sont associées à une diminution significative de la survie sans progression de la maladie et de la survie globale²³. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent incertains. Shin *et al.* ont examiné l'expression de l'EGFR dans l'épithélium normal et dans des échantillons chirurgicaux de tumeurs de patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Ils ont constaté que la régulation à la hausse de l'expression de l'EGFR augmentait avec le degré croissant de dysplasie des lésions de la tête et du cou. Les carcinomes épidermoïdes ont démontré le plus haut degré de régulation à la hausse de l'expression de l'EGFR²⁶. Ces trouvailles soutiennent le concept d'une carcinogenèse multi-étapes et suggèrent que la régulation à la hausse de l'expression de l'EGFR est un événement précoce dans la progression tumorale des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Une étude multinationale randomisée contrôlée a démontré que la radiothérapie concomitante à haute dose avec cetuximab hebdomadaire augmente la réponse clinique et la survie de patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou locorégionalement avancés²⁷. Le cetuximab est un anticorps monoclonal IgG dirigé contre le domaine de liaison du récepteur d'EGFR. En outre, seulement 13 % des patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou qui expriment l'EGFR répondent aux anticorps monoclonaux thérapeutiques dirigés contre le récepteur (cetuximab)²⁸. L'EGFRvIII, un mutant de l'EGFR présent chez 42% des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou; il a été associé à une résistance relative au cetuximab²⁹.

1.3.5 Oncogène c-myc

Le produit du gène c-myc est une protéine nucléaire qui agit comme un puissant facteur de prolifération. Le proto-oncogène c-myc agit sur les voies de signalisation de la croissance, de la prolifération et de la différenciation cellulaire³⁰. Bien que les mécanismes moléculaires restent à être déterminés, la surexpression de c-myc a été associée à la promotion du cycle cellulaire et la transition de la phase G1 à S. Les taux d'amplification de c-myc ont

été rapportés dans 11 et 48% des cas de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{31,32}. Field *et al.* ont observé une baisse de la survie chez les patients présentant des niveaux élevés d'expression de la protéine c-myc. Les autres paramètres clinicopathologiques évalués, tels que la classification TNM, l'extension extracapsulaire, la différenciation histologique, l'âge et le sexe, n'ont pas été associés à une augmentation de la surexpression de c-myc³¹. L'amplification de c-myc a été identifiée chez 22% des cas de carcinome du nasopharynx et cette amplification est corrélée avec un pronostic plus réservé³³.

1.3.6 Voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT

L'activation de la voie de signalisation de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) active à son tour des cascades de signaux de transduction qui favorisent la prolifération, la survie, la motilité et le métabolisme cellulaire. AKT est directement activé par PI3K qui est le principal acteur de la voie de signalisation PI3K dans le cancer. AKT favorise la survie cellulaire et l'entrée dans le cycle cellulaire en phosphorylant les protéines Bcl-2 et Bad BH3 qui régulent l'apoptose. PTEN est un régulateur négatif de la voie de signalisation du PI3K qui met fin à la voie de signalisation PI3K en déphosphorylant phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP₃)³⁴. Les preuves culminent à l'appui de l'implication de la voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT dans le développement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou³⁵. Pedrero *et al.* ont évalué la fréquence des altérations génétiques dans la voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou en utilisant des techniques de PCR quantitatif en temps réel, de Western blot et d'analyse de microsatellites. Ils ont rapporté que les altérations de la voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT étaient présentes dans 47 % des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. Les gènes PI3K3CA et AKT2 étaient amplifiés dans 37% et 17% des cas respectivement³⁶. L'altération de la voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT a été proposée comme événement précoce dans la carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou.

Bien que notre compréhension de la biologie moléculaire dans le développement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ait considérablement augmenté dans la dernière

décennie, nos connaissances actuelles de la carcinogenèse ne représentent qu'une petite portion d'une image beaucoup plus vaste. Depuis la description d'un modèle de carcinogenèse multi-étapes par Califano¹, l'implication de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, d'oncogènes et de voies moléculaires a été démontrée dans le développement des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou. L'introduction d'un traitement novateur anti-EGFR dans la pratique clinique est la preuve que la compréhension de la carcinogenèse est cruciale afin de développer des traitements ciblés qui permettront d'améliorer les résultats et la survie des patients.

Chapitre II : Papillomavirus

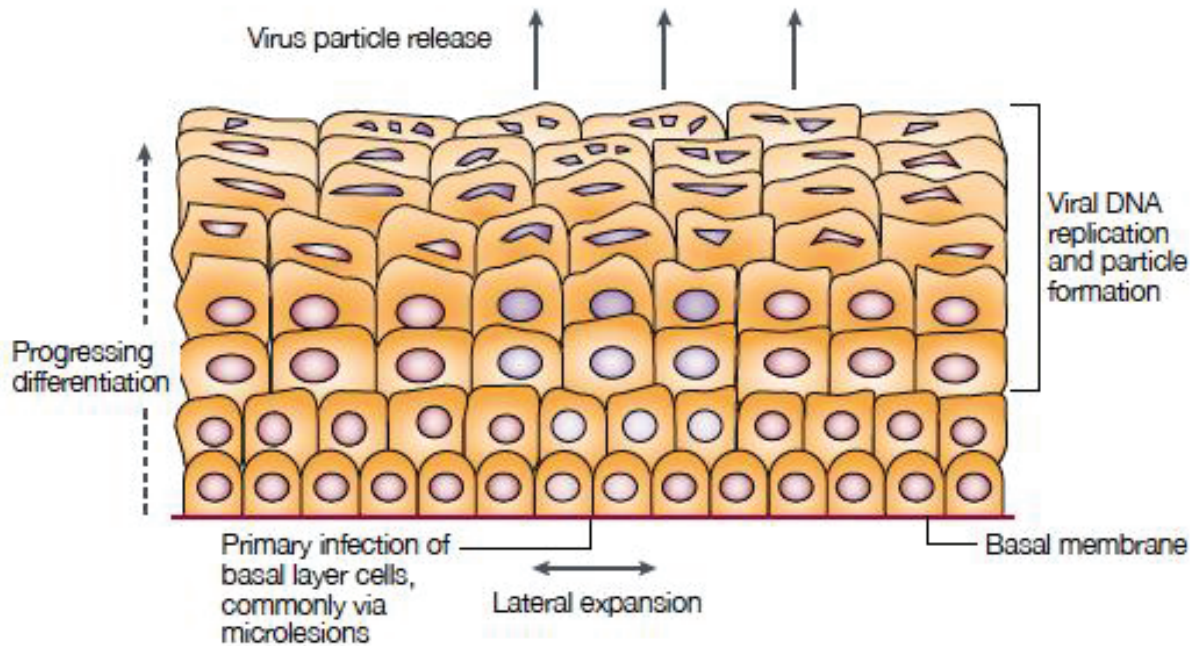
2.1 Classification

Les virus du papillome humains (VPH) sont des petits virus composés d'acide désoxyribonucléique (ADN) circulaire à double brin d'environ 8000pb enveloppés d'une capsidie icosaédrique³⁷. Plus de 150 différents sous-types de virus du papillome humain (VPH) ont été identifiés³⁸. Les sous-types du papillomavirus retrouvés chez l'humain sont sous-divisés en 5 genres par analyse génomique de leur séquence d'ADN. Chaque genre possède un tropisme épithélial et une association avec des pathologies qui lui est propre³⁸. La plupart des infections causées par le VPH sont bénignes et la transmission du VPH s'effectue principalement par contact peau à peau³⁹. Le genre α regroupe les sous-types cutanés associés avec les verrues vulgaires (VPH2 et VPH57) et verrues planes (VPH3 et VPH10)^{40,41}, les sous-types muqueux de bas risque et haut risque associés avec les verrues génitales (VPH6 et VPH 11), les lésions pré-malignes et maligne du col de l'utérus (VPH16, 18, 31, 33 et 35). Le sous-type α de bas risque a également été impliqué dans le développement de la papillomatose respiratoire (VPH6, VPH11)⁴² qui dans sa forme juvénile peut progresser vers une lésion maligne pulmonaire dans approximativement 5% des cas⁴³. Les sous types β , γ et μ sont associés avec des lésions cutanées³⁸. Douze sous-types de VPH (VPH16, 18, 31, 33, 35,39, 45, 51, 52, 58 et 59) ont été classifiés à haut risque de néoplasie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et deux sous-types à possible risque de cancer (VPH68 et VPH73)^{44,45}. Néanmoins, les VPH16 et VPH18 demeurent les plus prévalents autant au niveau des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx que des lésions pré-malignes et malignes du col de l'utérus^{46,47}.

2.2 Cycle de vie du VPH

Le cycle de vie du VPH est étroitement lié à celui de la cellule hôte⁴⁸. Dans le cas des cancers oropharyngés et des cancers du col de l'utérus, le VPH crée une infection prolongée des cellules épithéliales squameuses stratifiées. Les bris d'intégrité muqueux ou cutanés

permettent aux virions du VPH d'atteindre les cellules souches de la membrane basale, les seules cellules possédant un potentiel prolifératif dans l'épithélium stratifié⁴⁹. L'interaction entre le récepteur de surface α_6 -integrine⁵⁰, les protéoglycans de sulfate d'héparane⁵¹ et les protéines de la capsid virale permet au virus de se lier aux cellules souches de la membrane basale. Après l'endocytose, le virus est acheminé au noyau cellulaire dans un endosome⁵². L'infection des cellules souches est essentielle à l'amplification et à la production des nouveaux virions puisque le génome viral du VPH ne contient pas d'enzymes de réplication. Dans les cellules basales, un petit nombre de copies du génome du virus sont présentes sous forme épisomale stable (sans intégration au génome de la cellule hôte)⁴⁶. L'expression des protéines précoces (*early*) E6 et E7 entraîne la cellule en phase S et permet de créer un environnement propice à la réplication virale et la prolifération cellulaire⁵². En effet, la synthèse de nouveaux virions n'a lieu qu'après un cycle mitotique de la cellule souche infectée. Le génome viral est répliqué de façon concomitante lors de la réplication de l'ADN et la différenciation de la cellule hôte. La différenciation cellulaire est essentielle à la complétion du cycle de vie du virus. Au niveau des cellules basales, les génomes viraux sont maintenus en épisomes où leur réplication virale est considérée non productive. L'expression génique est régulée étroitement avec la progression des cellules vers l'épithélium de surface⁵³. Dans la couche suprabasale de l'épithélium, le VPH amplifie son ADN à un haut taux de copies et synthétise les protéines virales⁵⁴. Après l'amplification du génome viral, les protéines tardives (*late*) L1 et L2 encapsident les virions qui seront relâchés à la surface épithéliale pour infecter les cellules environnantes⁴⁹.



zur Hausen H. Nat Rev Cancer 2002

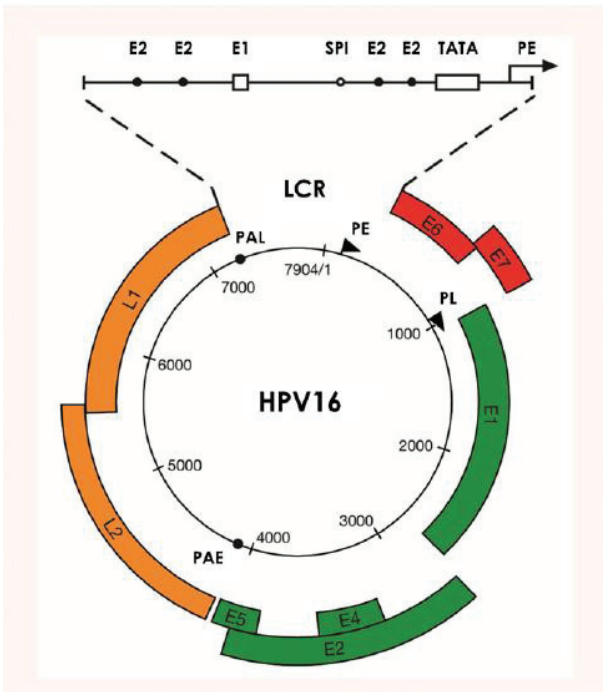
Figure 3. Cycle de vie du VPH

Des microlésions responsables des bris d'intégrité cutanés ou muqueux permettent aux virus VPH d'atteindre les cellules basales. Les cellules infectées se divisent et l'infection se propage latéralement. Certaines cellules migrent dans la couche suprabasale et se différencient. Lors de la différenciation cellulaire, les gènes viraux sont activés, l'ADN viral est répliqué et les protéines de la capsidie sont formées. Les particules virales sont assemblées et relâchées à la surface pour infecter les cellules environnantes.

2.3 Biologie du VPH

Le génome du VPH est composé de gènes précoces et tardifs codant pour les protéines précoces E1 à E7 et les protéines tardives L1 et L2. Les protéines E1 à E5 sont impliquées dans la transcription et la répllication virale. Les protéines virales E6 et E7 sont impliquées dans la transformation tumorale. Finalement, les protéines tardives L1 et L2 sont responsables des protéines de la structure de la capsidie virale⁵⁵. La transcription des protéines virales débute

suite à une interaction entre les facteurs de l'hôte et la longue région de contrôle (LCR) du génome viral (Figure 4). E6 et E7 sont les premières protéines virales transcrites lors de la réplication du VPH⁵⁶.



Doorbar et al. Vaccine 2012

Figure 4. Organisation génomique du VPH16

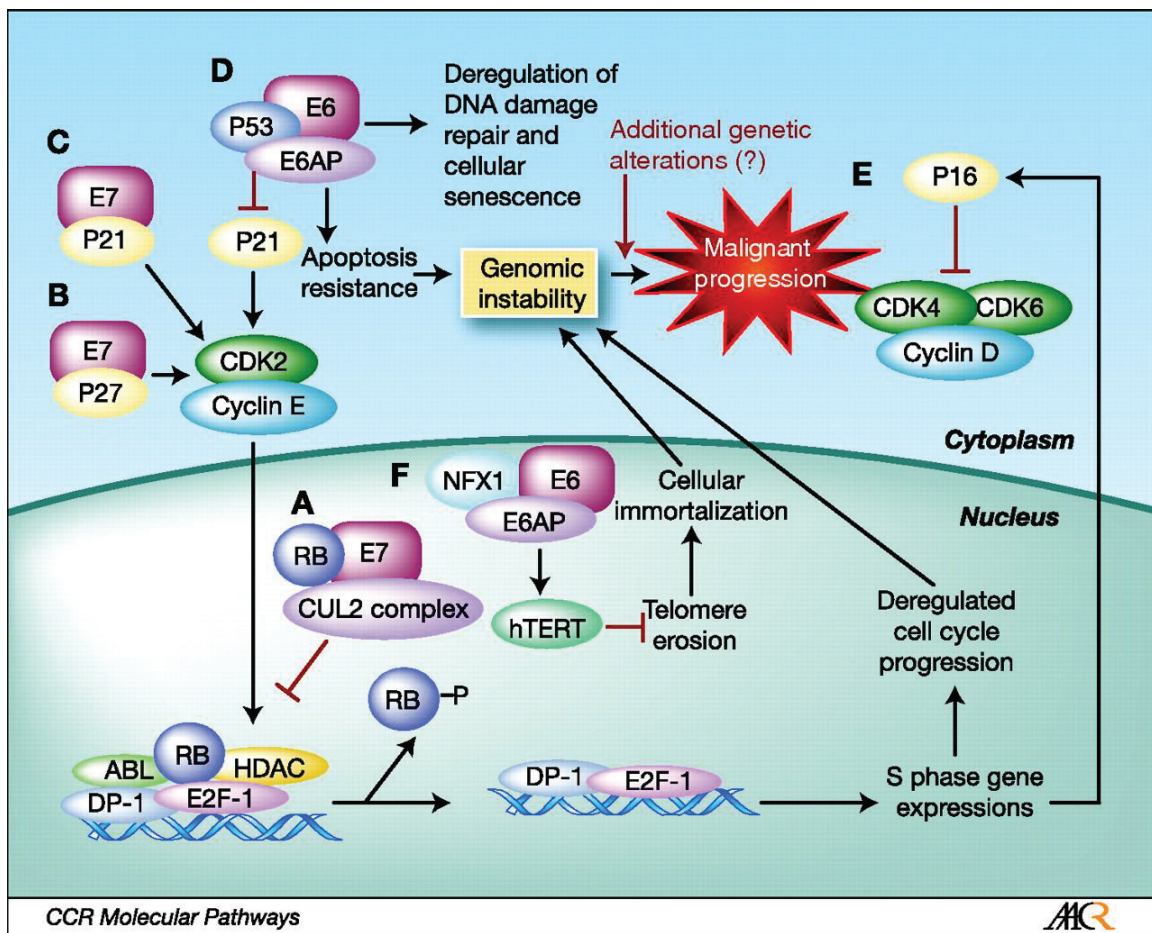
Le génome du VPH16 est composé d'une longue région de contrôle (LCR) et huit gènes exprimés durant les différents cycles de vie du virus. Un épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm) permet à ces gènes de coder pour tous les produits de gènes du VPH. Dans la LCR on retrouve, les sites de liaison de différents facteurs de transcription (SP1) et de protéines virales E1 et E2 impliquées dans le contrôle de l'expression génique et de la réplication virale³⁸.

2.3.1 Oncoprotéines virales

Les oncoprotéines E6 et E7 sont responsables de la modulation de plusieurs gènes, mais leur activité principale est celle de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb. Normalement, le gène suppresseur de tumeur p53 contrôle la croissance et le passage de la cellule de la phase G0/G1 à la phase S du cycle cellulaire. Lorsqu'un dommage à l'ADN est identifié, la protéine p53 arrête la prolifération cellulaire en G0/G1 et induit les mécanismes de réparation de l'ADN. Cependant, lorsque le dommage à l'ADN est trop sévère, le p53 entame les mécanismes d'apoptose⁴⁸. L'oncoprotéine E6 s'associe avec la protéine E6-AP pour former la ligase d'ubiquitination E3 qui a pour fonction d'inactiver p53^{57,58} (Figure 5D). L'ubiquitination identifie le p53 pour la dégradation protéolytique par le protéasome. L'inactivation de p53 permet à la cellule de continuer de proliférer malgré la présence de dommages à l'ADN, la rendant extrêmement vulnérable à l'instabilité génomique, l'accumulation de mutations et la progression tumorale. L'oncoprotéine virale E6 empêche les cellules d'entrer en apoptose en dégradant p53. Elle s'associe avec Bak une protéine proapoptotique de la famille Bcl-2 indépendante de la voie de p53 et stimule sa dégradation⁵⁹. E6 serait également impliqué dans l'augmentation de la transcription et l'activation de la télomérase dans les cellules épithéliales primaires^{60,61}. Son activité a été suggérée au niveau des facteurs de transcription de la télomérase humaine transcriptase inverse (hTERT). Une activité inhibitrice du répresseur de transcription NFX1-123 serait plus particulièrement responsable de l'activation de la télomérase et immortalisation des cellules⁶² (Figure 5F).

L'activité des oncoprotéines E6 et E7 est complémentaire, l'oncoprotéine E6 permet à la cellule infectée d'échapper à l'apoptose et l'oncoprotéine E7, en inhibant le gène suppresseur de tumeur pRb, maintient la cellule en prolifération active (Figure 5A). Le pRb est un régulateur négatif du cycle cellulaire qui prévient la transition de la cellule de la phase G1 à la phase S. Il a pour fonction d'inhiber le facteur de transcription E2F qui est un promoteur de nombreux gènes impliqués dans la mitose, la différenciation et la prolifération cellulaire⁶³. L'activité de pRb est contrôlée à son tour par un complexe des kinases, les kinases cycline-dépendantes (CDK) qui sont des régulateurs positifs de la progression cellulaire de la phase G1 à la phase S. Les CDK inactivent le pRb en le phosphorylant. Cette phosphorylation permet la dissolution de la liaison inhibitrice exercée par le pRb sur le facteur de transcription

E2F et la reprise de transcription des gènes spécifiques à la phase S du cycle cellulaire⁶⁴. La liaison de l'oncoprotéine virale E7 avec le suppresseur de tumeur pRb⁶⁵ permet la dissolution de la liaison entre le pRb et le facteur de transcription E2F, ce qui a pour conséquence une expression constitutive des gènes de prolifération habituellement régulés par le E2F⁴⁶. L'oncoprotéine virale E7 s'associe également avec d'autres protéines cellulaires impliquées dans la prolifération cellulaire tels la cycline E, la cycline A et les inhibiteurs de kinase cycline-dépendante p21 et p27⁶⁶ (Figure 5B & 6C). Les produits du gène E5 contribuent à l'activité des oncoprotéines virales E6 et E7 en amplifiant les réponses de croissance et différenciation cellulaire et en modulant l'activité des protéines kinases mitogéniques³⁹. Une prolifération cellulaire ininterrompue s'ensuit sans différenciation cellulaire. Lorsque le cycle de vie du virus n'est pas complété, l'infection virale est désignée non productive.



Chung et al. Clinical cancer research AACR 2009

Figure 5. Activité cellulaire des oncoprotéines virales E6 et E7

L'oncoprotéine E7 inhibe l'activité de pRb et l'identifie pour dégradation (A). La dissolution de la liaison inhibitrice exercée par le pRb sur le facteur de transcription E2F permet la reprise de transcription des gènes spécifiques à la phase S du cycle cellulaire. E7 inhibe l'arrêt de progression du cycle cellulaire en interagissant avec les inhibiteurs kinase cycline-dépendante p21 et p27 (B & C). L'oncoprotéine E6 inactive et dégrade p53 par une association avec la protéine E6-AP (D). En l'absence de pRb, l'expression de p16^{INK4A} est augmentée par une boucle de rétroaction (E). E6 induit l'activité de la télomérase et immortalise les cellules en dégradant le répresseur de transcription NFX1 de hTERT (F). Les oncoprotéines virales E6 et E7 entraînent une perte des points de contrôles du cycle cellulaire, créant ainsi une prolifération aberrante des cellules et une instabilité génomique qui mènent vers la transformation maligne des cellules⁶⁷.

Il y a ensuite transcription des gènes précoces E1 et E2. La protéine E2 régule la transcription des gènes E6 et E7 à la baisse. Cette régulation permet de libérer l'inhibition sur les suppresseurs de tumeurs p53 et pRb permettant ainsi la reprise de la différenciation cellulaire. Conjointement, la réplication du génome viral est activée par la liaison du produit du gène E1 hélicase avec l'origine de la réplication virale dans la LCR. La réplication du génome viral extrachromosomique a lieu durant la phase S. Les particules virales de la capsid sont produites à partir des gènes L1 et L2 qui codent pour une protéine majeure et mineure de la capsid. Les virions sont assemblés dans le noyau et libérés par desquamation de la couche cornée de l'épithélium. Les produits du gène E4 sont impliqués dans la maturation et la libération des particules virales³⁹. Lorsque le cycle de vie du virus est complété, l'infection virale est désignée productive.

2.4 Carcinogénèse

Dans les lésions néoplasiques de haut grade, le cycle de vie du virus et l'expression virale sont perturbés. Le virus ne peut compléter son cycle de vie normale (infection non productive)⁴⁶. Dans les lésions pré-malignes et malignes, l'ADN viral devient précocement intégré dans le génome de la cellule hôte. L'intégration de l'ADN viral perturbe le cadre de lecture ouvert du gène E2 et inhibe son expression^{68,69}. Cette inhibition perturbe l'activité de la protéine E2, qui exerce en temps normal une fonction de régulateur négatif de la transcription des gènes E6 et E7. L'effet final est une expression augmentée des oncoprotéines E6 et E7 et une inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb. L'inactivation de p53 et pRb entraîne une perte de contrôle du cycle cellulaire, une prolifération augmentée et aberrante des cellules. Il en résulte une instabilité génomique qui mène à une accumulation de dommages à l'ADN que les cellules ne réussissent pas à réparer. Après plusieurs années d'infection, l'accumulation de dommages et de mutations à l'ADN conduit vers une transformation maligne des cellules. La progression vers le cancer du col de l'utérus s'effectue généralement sur une période de 10 à 20 ans³⁹. Néanmoins, une progression néoplasique rapide à l'intérieur de 2 à 3 ans a été rapportée dans des lésions dysplasiques modérées à sévères du col de

l'utérus⁷⁰. L'inactivation de p53 et pRb par les oncoprotéines E6 et E7 est considérée comme étant l'événement déclencheur de la carcinogenèse chez les cancers induits par le VPH⁷¹.

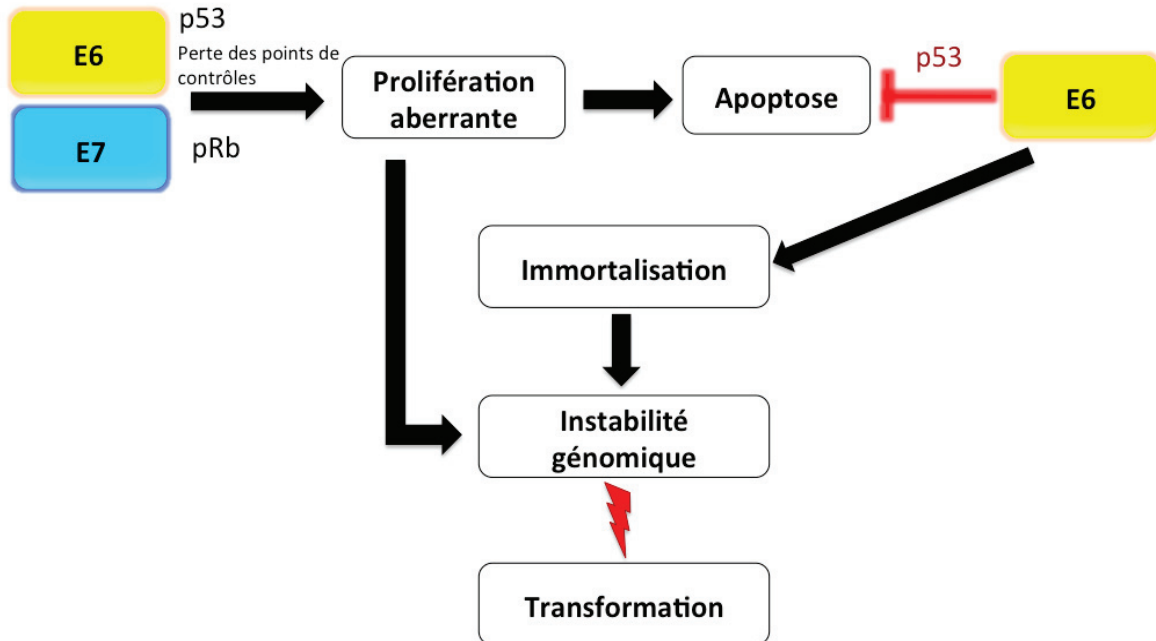


Figure 6: Mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse des cancers VPH positifs. En inhibant les gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb, les oncoprotéines virales E6 et E7 entraînent une perte des points de contrôles du cycle cellulaire, créant ainsi une prolifération aberrante des cellules et une instabilité génomique qui mènent vers la transformation maligne des cellules.

Chapitre III : Cancer du col de l'utérus et VPH

3.1 Prévalence

Le cancer du col de l'utérus est le troisième cancer le plus prévalent chez la femme à travers le monde, après les cancers cutanés et le cancer du sein. Il est la deuxième cause de décès par cancer chez la femme après le cancer du sein⁷². En 1983, Zur Hausen, un virologue allemand, fut le premier à établir le lien de causalité entre le virus du papillome humaine et le cancer du col de l'utérus, ce pourquoi il a reçu le prix Nobel de médecine^{73,74}. Les sous-types de VPH à haut risque sont associés mondialement avec 530 232 de cancer du col de l'utérus avec une mortalité de 275 008 cas annuellement^{74,75}.

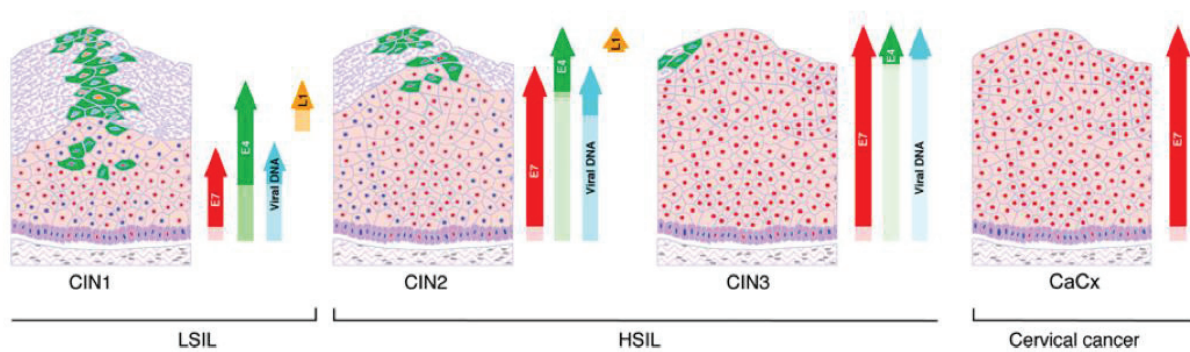
3.2 Infection

La plupart des infections au VPH de l'épithélium cervical sont transitoires et la grande majorité (90 %) se résout en dedans de 12-36 mois^{76,77}. L'infection au VPH a une prépondérance pour la zone de transformation à la jonction squamo-columnaire de l'ectocervix où se développe la grande majorité des cancers du col³⁸. Les facteurs de risque d'infection au VPH sont liés au contact sexuel : multiples partenaires, début de l'activité sexuelle à un jeune âge, histoire de maladie transmise sexuellement, de verrues génitales, de PAP anormal ou de partenaire avec un cancer du pénis. La transmission du VPH par contact sexuel peut mener à une de trois situations : au développement de verrues ano-génitales souvent asymptomatiques et autorésolutives (VPH6 et 11), à une infection à VPH latente asymptomatique (VPH6 et 11), ou une infection active où le VPH engendre des changements cellulaires prédisposant au cancer (VPH à haut risque)³⁹. Plus de 30 sous-types de VPH transmis par contact sexuel ont été identifiés, infectant l'épithélium du col de l'utérus, le vagin, la vulve, le pénis et l'anus³⁹. Les sous-types à haut risque du VPH ont été isolés dans plus de 99.7 % des cancers épidermoïdes du col de l'utérus⁷⁸. Le VPH16 est le sous-type le plus prévalent et représente à lui seul plus de la moitié (57 %) des cas de cancers du col mondialement avec une prévalence régionale pour l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Afrique

du Nord, suivi du VPH18 qui est impliqué dans 17 % des cas de cancer du col mondialement⁷⁹. Conjointement, en infection isolée ou multiple, les sous-types VPH16 et VPH18 sont impliqués dans 74 % des cas. Les autres sous-types à haut risque VPH 45, 31, 33, 52 et 58 sont identifiés dans 20 % des cas⁷⁹.

3.3 Progression vers le cancer du col de l'utérus

Dans les lésions productives normales du VPH, l'expression virale est étroitement régulée. Lors du cycle de vie du virus, les protéines virales sont produites à un moment précis et en quantité prédéterminée. La synthèse du virus s'effectue dans les couches superficielles de l'épithélium⁴⁶. L'expression virale dans les lésions intraépithéliales de bas grade (Cervical intraepithelial neoplasia (CIN1)) est similaire aux lésions normales productives du VPH (Figure 7). Les lésions intraépithéliales de haut grade se développent après de nombreuses années d'infection active persistante. Dans les lésions pré malignes et malignes, l'ADN viral du virus du papillome humain s'intègre précocement dans le génome de la cellule hôte. Cette intégration précoce est nécessaire à la transformation maligne des cellules⁶⁸. Dans les lésions intraépithéliales de haut grade (CIN2, CIN3), le cycle de vie du virus est altéré et présente une expression prolongée de E7. La production de virions est limitée à une plus petite portion de l'épithélium de surface. Dans les lésions de carcinome épithélial du col de l'utérus, l'ADN du virus est intégré dans le génome de la cellule hôte et le cycle de vie du virus est complètement dérégulé. Ceci est souvent associé avec la perte de l'expression de E2 et une dérégulation de E6 et E7 (Figure 7)⁴⁶.



Doorbar. Clin Sci (Lond) 2006

Figure 7. Lésions intraépithéliales dans le développement des cancers du col de l'utérus. Expression de E7 (noyaux rouges), expression de E4 (cellules vertes), expression de L1 (noyaux jaunes). L'expression des protéines virales varie avec la progression tumorale. L'expression virale dans les lésions intraépithéliales de bas grade (CIN1) est similaire aux lésions normales productives du VPH. Dans les lésions intraépithéliales de haut grade, le cycle de vie du virus est altéré et présente une expression prolongée de E7 (CIN2, CIN3). Dans les lésions de carcinome épithélial du col (CaCx), l'ADN du virus est intégré dans le génome de la cellule hôte et le cycle de vie du virus est complètement dérégulé. CIN : Cervical intraepithelial neoplasia, LSIL : Low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL : High grade squamous intraepithelial lesion.

Chapitre IV : Carcinome épidermoïde de la tête et du cou et VPH

4.1 Prévalence

Répertoriés au cinquième rang en terme d'incidence mondiale⁸⁰, les cancers de la tête et du cou sont classifiés en fonction de leur topographie en sous-unités anatomiques tels le larynx, le nasopharynx, l'oropharynx, l'hypopharynx, et la cavité orale. Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou présentent une prépondérance masculine (2 :1)⁸¹. Les facteurs de risques principaux demeurent le tabac et l'alcool à 75 % et l'effet de ceux-ci est synergique^{82,83}. Le virus du papillome humain (VPH), et plus spécifiquement les sous-types à haut risque VPH16 et VPH18, sont présents dans 25 % de cas de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{84,85}. Au plan mondial, on estime que 135 000 cas de cancers du pharynx sont diagnostiqués annuellement et que 95 000 patients y succombent annuellement^{80,86}. En 2009 aux États-Unis, on recensait 12 660 nouveaux cas de cancer de l'oropharynx et 2 410 décès⁸⁷. L'oropharynx est la région la plus fréquemment touchée par le VPH; 36 % des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx sont VPH positifs. L'ADN du VPH est également détecté dans 24 % des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale et 24 % des carcinomes épidermoïdes du larynx⁸⁵. L'incidence du VPH dans les cancers de l'oropharynx a été rapportée jusqu'à 60 %⁸⁸. Le sous-type le plus prévalent dans le cancer du col de l'utérus, VPH16, est également le plus prévalent dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et cou et représente 95 % des cancers VPH positifs⁸⁹. L'ADN viral du VPH16 est fréquemment intégré et transcriptionnellement actif dans les noyaux cellulaires des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{47,84,90}. Le VPH18 est moins prévalent dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou; il représente 3 % des cancers de l'oropharynx, 17 % des cancers du larynx et 35 % des cancers de la cavité orale. Les autres sous-types à haut risque du VPH isolés dans les cancers du col de l'utérus (VHP31, 33, 35, 45, 56, 58 et 59) sont rarement identifiés dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et cou⁸⁵.

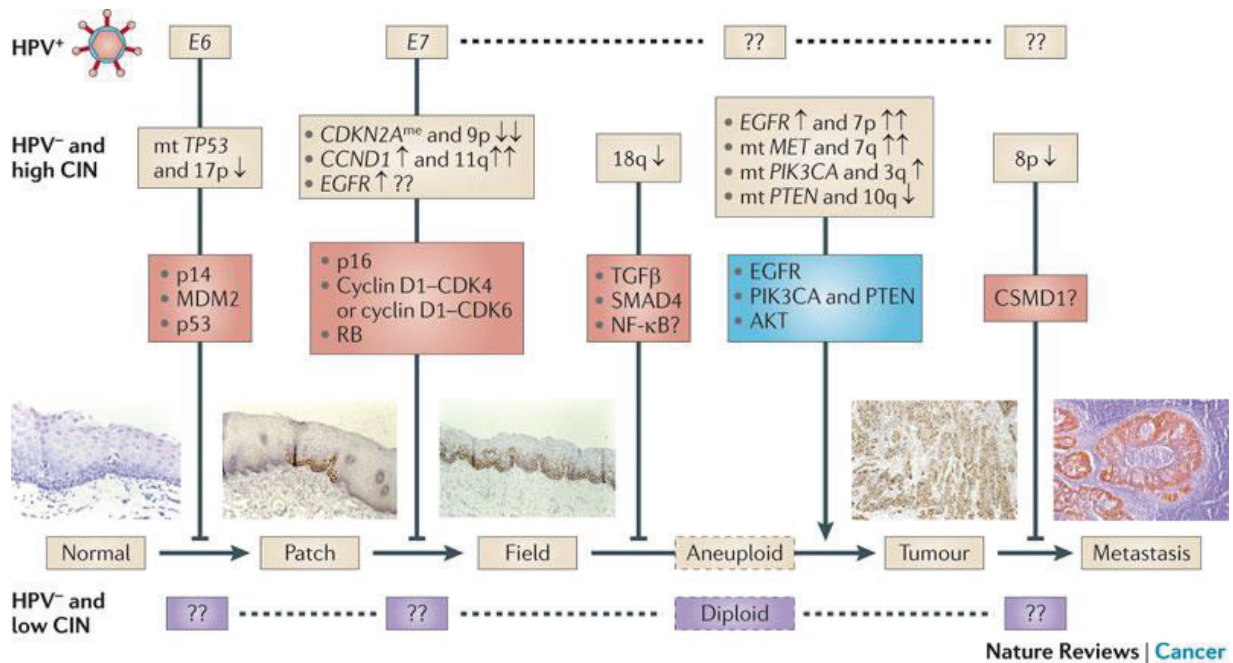
4.2 Carcinogenèse

En 1983, Syrjänen fut le premier à décrire le lien entre le VPH et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou⁹¹. Aujourd'hui, le lien entre les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et le virus du papillome humain (VPH) est bien établi. Nos connaissances actuelles quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse du VPH proviennent en grande partie de la littérature sur le cancer du col de l'utérus. Les mêmes mécanismes moléculaires sont impliqués dans la carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs. Le potentiel oncogénique du VPH est encodé par les oncoprotéines virales E6 et E7⁹², qui agissent en modulant différents gènes, dont les gènes suppresseurs de tumeur p53 et pRb⁹³. Le processus d'inactivation des gènes p53 et de pRb est largement responsable de l'altération des voies de régulation du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN ce qui contribue à une instabilité génomique et une progression vers la transformation maligne des cellules (cf Chapitre II : Papillomavirus). Dans la progression des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH négatifs, les mêmes voies cellulaires sont inactivées précocement par des événements génétiques et épigénétiques¹ (Figure 8). En effet, les voies de signalisation de p16^{INK4A} et de la cycline D1⁵ en aval du pRB sont fréquemment atteintes dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH négatifs. Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté dans environ 50 % des cas^{20,84}.

Le carcinome épidermoïde de la tête et du cou VPH positif est une entité distincte qui se différencie par un profil d'expression moléculaire différent de celui des cancers VPH négatifs. Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs, les événements génétiques et épigénétiques des voies de signalisation de p53 et pRb sont rares. On observe plutôt un p53 sauvage, une régulation à la baisse de l'expression de pRB et une régulation à la hausse de l'expression de p16^{INK4a}⁹⁴⁻⁹⁷. Une surexpression de p53 de type sauvage a été rapportée dans plus de 30 % des cellules tumorales des carcinomes épidermoïdes VPH positives^{90,98}. Le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette surexpression n'a pas encore été élucidé.

Dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs, l'inactivation de pRB par E7 mène à une surexpression de p16^{INK4A} (Figure 5E)^{90,99}. La protéine suppresseur de

tumeur p16^{INK4A} agit comme un régulateur du cycle cellulaire et inhibiteur puissant du complexe cycline D1 et CDK4/CDK6 responsable de la phosphorylation de pRb. Tandis que pRB agit comme régulateur négatif de l'expression de p16^{INK4A} ¹⁰⁰. L'augmentation importante de l'expression de p16^{INK4A}, nous laisse spéculer qu'il existe d'autres mécanismes inconnus qui régulent l'expression de p16^{INK4A} dans les cancers VPH positifs. La surexpression de p16^{INK4A} a été proposé comme marqueur de substitution pour la présence duVPH dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou^{99,101}. La détection du p16^{INK4A} par immunohistochimie représente un bon examen histopathologique avec une sensibilité de 52 % et spécificité de 93 %¹⁰².



Leemans et al. Nature reviews Cancer 2011

Figure 8. Modèle intégré de carcinogenèse des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou
 Deux voies de développement tumoral indépendantes sont présentées en parallèle pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs (HPV+) et VPH négatifs (HPV-). Les deux voies de carcinogenèse multi-étapes présentent une homologie moléculaire quant aux voies de signalisation du p53 et pRb inactivées. Les altérations chromosomiques et génétiques sont indiquées dans les encadrés beiges, les voies oncogéniques sont indiquées dans les encadrés bleus et les voies des suppresseurs de tumeurs sont indiquées dans les encadrés rouges.

↑ : indique une surexpression ou un gain; ↑↑ : indique un haut niveau d'amplification;
 ↓ : indique une perte; ↓↓ : indique une perte homozygote. CCD1 : Cycline D1; CDK : kinase cycline-dépendante; CDKN2A : inhibiteur 2A kinase cycline-dépendante; me : méthylation;
 mt : mutation; NF-κB : facteur nucléaire-κB; PIK3CA : sous-unité-α phosphoinositide-3 kinase; TGF-β : facteur de croissance transformant β.

4.3 Implications cliniques

Malgré une réduction globale de 20 % dans l'incidence des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, on observe une augmentation de l'incidence des cancers de l'oropharynx d'environ 11 % dans les deux dernières décennies¹⁰³. Cette augmentation serait attribuable à l'émergence du VPH comme agent étiologique. Entre 1988 et 2004, l'incidence des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx liés au VPH a augmenté de 225% tandis que l'incidence des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH-négatifs a diminué de 50% aux États-Unis¹⁰⁴. Des études préliminaires ont démontré que similairement aux infections génitales, la plupart des infections à VPH orales et oropharyngées sont transitoires et éliminées en moins d'un an^{105,106}. Les amygdales et la base de langue sont les sous-sites de l'oropharynx les plus fréquemment touchés par le VPH¹⁰⁷. Le tropisme du VPH pour le tissu amygdalien demeure à ce jour inexpliqué. La présence d'invaginations et de cryptes dans l'oropharynx occasionne une vaste surface épithéliale de contact et faciliterait l'accès du VPH aux cellules basales⁸⁵.

Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs se différencient par leur histologie et leur architecture basaloïde non kératinisante^{47,108}. Bien qu'initialement classifiés comme peu différenciés, les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou VPH positifs ont été reclassifiés comme bien différenciés suite à des analyses plus approfondies. Ces analyses ont démontré que la morphologie des carcinomes épidermoïdes VPH positifs était plutôt semblable à celles de l'épithélium réticulaire des cryptes amygdaliennes¹⁰⁹. Les patients VPH positifs atteints de carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou n'ont pas les mêmes facteurs de risques que les patients VPH négatifs. Ils sont de 5 à 10 ans plus jeunes que les patients VPH négatifs. Ils sont généralement non-fumeurs, ni consommateurs d'alcool^{89,108}. Les patients VPH positifs sont associés avec des facteurs de risque de contact sexuel soit, un jeune âge lors de la coïtarche, un nombre de partenaires sexuels élevé, une pratique de sexe oral ou des antécédents de verrues génitales^{88,89,108,110}.

Les patients atteints de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs sont plus souvent diagnostiqués à un stade avancé par la présence d'une maladie locorégionale plus agressive avec des métastases ganglionnaires cervicales volumineuses et kystiques^{111,112}. La radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie constituent l'arsenal de traitements utilisé pour

ces cancers. Un traitement unimodal est recommandé pour les carcinomes épidermoïdes de bas grade (stade I et II). Les grades plus avancés (stade III et IV) nécessitent un traitement à double modalité¹¹³. Compte tenu de la morbidité d'un traitement chirurgical au niveau de l'oropharynx, les experts préconisent les traitements de chimioradiothérapie concomitants aux dérivés de platine, ou les traitements séquentiels de chimiothérapie néoadjuvante suivie d'un traitement de chimioradiothérapie hebdomadaire¹¹³. Les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs ont démontré un meilleur pronostic de survie^{95,96,114-116} et celui-ci serait attribuable en partie à leur plus grande sensibilité aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie^{117,118}. Depuis 1994, plus d'une cinquantaine études rétrospectives ont évalué l'association entre le statut HPV positif et la survie. Vingt-trois de ces études ont évalué la survie pour les carcinomes épidermoïdes VPH positifs de l'oropharynx ou ce sous-site séparément, puisque l'avantage de survie n'a été démontré qu'avec ce sous-site. Une revue de la littérature a été effectuée en 2010 par Allen *et al.* et leurs résultats sont présentés dans un tableau en annexe 1¹¹⁹.

Fakhry *et al.* furent les premiers à réaliser un essai clinique prospectif sur 96 patients atteints de carcinome épidermoïde de l'oropharynx et du larynx de stade avancé (III et IV), mais résecable. La détection de l'ADN du VPH réalisée par technique de PCR multiplex et hybridation *in situ* a permis de séparer les patients en deux groupes : VPH positif et VPH négatif. Une amélioration de la réponse à la chimiothérapie d'induction et chimiothérapie adjuvante a été documentée pour les patients VPH positifs avec une survie globale à 2 ans. De plus, les patients VPH positifs présentaient une diminution du risque de progression tumorale de 62% et une diminution de 61% du risque de décès après ajustement pour l'âge, le stade tumoral et le statut de performance¹¹⁴. Cependant, le pronostic amélioré des carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs n'est pas uniquement limité aux traitements non chirurgicaux. En effet en 2006, Licitra *et al.* ont observé une réduction de la récurrence tumorale, une réduction de la mortalité 61% et une amélioration de la survie globale à 5 ans chez des patients atteints de carcinomes épidermoïdes VPH positifs de l'oropharynx traités primordialement par chirurgie avec ou sans radiothérapie adjuvante¹²⁰. Haughey *et al.* ont démontré une survie globale de 82% à 5 ans dans une étude multicentrique de 204 patients

atteints de carcinomes épidermoïdes des amygdales et de la base de langue de stade avancé (III et IV) traités par microchirurgie transorale¹²¹.

Ang *et al.* ont étudié l'impact du statut VPH positif sur la survie des patients atteints de carcinome épidermoïde de l'oropharynx stade III et IV inscrits dans l'essai clinique randomisé du Radiation Therapy Oncology Group 0129 (RTOG 0129), portant sur la radiothérapie accélérée vs traditionnelle combinée à une chimiothérapie concomitante au cisplatine. Ils ont observé un risque de décès diminué de 58%, un risque de récurrence ou décès diminué de 51%, et une survie globale améliorée ($p < 0.001$) sur un suivi médian de 4.8 ans chez les patients VPH positifs, et ce après ajustement pour l'âge, la race, le statut de performance, le tabagisme, le stade tumoral et ganglionnaire. Une récente méta-analyse réalisée par Petrelli *et al.* en 2013 a démontré une meilleure survie globale (HR= 0.33; $p < 0.0001$), survie spécifique à la maladie (HR= 0.24 $p < 0.00001$) et survie sans maladie (HR= 0.31; $p < 0.00001$) chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs lorsque comparés aux patients VPH négatifs traités par radiothérapie comme seule modalité¹²². Ainsi, le carcinome épidermoïde de l'oropharynx VPH positif est une nouvelle entité clinique différente des cancers VPH négatifs qui présente un meilleur pronostic clinique et une meilleure réponse aux traitements. Les traitements multimodaux conventionnels présentent une importante toxicité¹²³; puisque les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs répondent mieux aux traitements, il a été suggéré que ceux-ci pourraient être potentiellement désintensifiés. Plusieurs études de phase II et III sont présentement en cours afin d'évaluer l'effet de différentes stratégies de désintensification de la dose de radiation et de chimiothérapie chez cette population de patients (tableau 2)¹²⁴.

Ongoing trials for patients with HPV-positive HNC.

| ClinicalTrials.gov identifier | # of patients | Group/institution | Trial design |
|-------------------------------|------------------|--|--|
| NCT01084083 | 83 ^a | ECOG | Phase 2: neoadjuvant chemo and response adapted radiation (54 or 66-70 Gy) + cetuximab |
| NCT01525927 | 50 | North Shore Long Island Jewish Health System | Phase 2: neoadjuvant TPF and response adapted RT (60 Gy) ± concurrent chemo |
| NCT01716195 | 50 | Univ. of California Davis | Phase 2: neoadjuvant chemo followed by paclitaxel + response adapted RT (50 or 60 Gy) |
| NCT01663259 | 36 | Univ. of Michigan | Phase 2: weekly cetux + RT (70 Gy) |
| NCT01530997 | 40 | Univ. of North Carolina | Phase 2: radiation with weekly cisplatin followed by supra-selective neck dissection |
| Pending | 337 | ECOG | Phase 2: transoral resection - risk adapted postop RT (0 vs. 50 vs. 60 vs. 66Gy with weekly cisplatin) |
| NCT01302834 | 706 ^a | RTOG | Phase 3: randomized to cetuximab vs. cisplatin with concurrent RT (70 Gy in 6 weeks) |
| NCT01874171 | 304 | University of Warwick | Phase 3: randomized to cetuximab vs. cisplatin with concurrent RT (70 Gy in 7 weeks) |
| NCT01706939 | 365 | Mount Sinai School of Medicine | Phase 3: weekly carbo/cetuximab + 56 Gy vs. weekly carbo + 70 Gy |
| NCT01687413 | 496 | Washington Univ. | Phase 3: postop RT (60 Gy) ± weekly cisplatin |

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; RT: Radiation therapy.

^a Trial closed to accrual.

Kimble et al. Oral Oncology 2013

Tableau 2 : Essais cliniques présentement en cours de phase II et III sur la désintensification des traitements des cancers VPH positifs

Les études démontrent que les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs sont plus sensibles à la radiothérapie et chimiothérapie. Cette sensibilité augmentée serait attribuable à un phénomène de létalité synthétique qui se produit lorsqu'une perturbation simultanée de deux gènes entraîne la mort cellulaire¹²⁵. Les cellules cancéreuses VPH positives sont plus vulnérables aux dommages à l'ADN puisqu'elles contiennent des lacunes au niveau de leurs mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (RDA)¹²⁶. La RDA, un mécanisme essentiel de contrôle de la réparation des lésions à l'ADN, est responsable de l'arrêt de progression des cellules endommagées au niveau du cycle cellulaire^{126,127}. Les altérations au niveau de la signalisation de la RDA dans les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx VPH positifs sont causées par les oncoprotéines virales E6 et E7 qui inhibent des gènes suppresseurs de tumeurs clés permettant aux cellules infectées d'ignorer certains signaux de dommages à l'ADN. L'inactivation de p53 par E6 permet à la cellule infectée d'échapper à l'apoptose et de continuer à proliférer malgré la présence de dommages à l'ADN, la rendant extrêmement vulnérable à l'instabilité génomique et l'accumulation de mutations. En inhibant le gène suppresseur de tumeur pRb, E7 maintient les cellules endommagées en prolifération active. L'instabilité génomique cellulaire créée par les altérations au niveau de la réparation des lésions à l'ADN (RDA) est une étape clé sur le continuum de progression des

cellules sur le plan tumoral¹²⁷⁻¹²⁹. Les cellules cancéreuses présentent les caractéristiques d'adaptation et de tolérance aux dommages à l'ADN qui leur permettent de maintenir une progression dans le cycle cellulaire malgré la présence de dommages à l'ADN^{8,128}. Grâce à une redondance dans la signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (RDA), les cellules cancéreuses sont capables de maintenir une capacité de réparation de l'ADN et même certains points de contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, les défauts au niveau de la RDA des cancers VPH positifs pourraient être davantage exploités afin de sensibiliser préférentiellement les cellules cancéreuses aux traitements de radiothérapie. Cette stratégie de recherche nécessite l'élaboration d'un modèle cellulaire de carcinogenèse isogénique que nous proposons de caractériser et développer dans ce mémoire.

Chapitre V: Hypothèse & Objectifs

Hypothèse

Nous estimons que l'accumulation de défauts spécifiques au niveau de la réponse aux dommages à l'ADN (RDA) est une étape précoce dans la progression des cancers VPH positifs via l'expression obligatoire et précoce des oncogènes viraux E6 et E7. L'inactivation des voies restantes de la RDA au niveau des cellules cancéreuses devrait entraîner une accumulation importante de dommages à l'ADN incompatible avec la survie des cellules cancéreuses sans toutefois occasionner de conséquences graves au niveau des cellules saines environnantes qui possèdent une redondance robuste au niveau de la RDA (phénomène de létalité synthétique)¹²⁶. Nous croyons que les défauts au niveau de la RDA des cancers VPH positifs peuvent être identifiés et exploités afin de sensibiliser préférentiellement les cellules cancéreuses aux traitements de radiothérapie. Cette stratégie de recherche nécessite l'élaboration d'un modèle cellulaire de carcinogenèse isogénique que nous proposons de caractériser.

Objectifs

Caractériser un modèle de culture cellulaire pour le cancer de l'oropharynx.

Dériver des lignées isogéniques à partir de kératinocytes primaires et cellules épithéliales de l'oropharynx.

Valider la carcinogenèse de notre modèle in vitro & in vivo.

Chapitre VI : Méthodologie

6.1 Système Gateway

6.1.1 Système d'expression lentiviral Gateway et clonage

Les séquences codantes de HPV16-E6 et HPV16-E7 ont été isolées par digestion enzymatique et insérées dans des vecteurs d'entrée (Invitrogen) par ligation entre les séquences codantes et les vecteurs d'entrée linéarisés. Les vecteurs d'entrée contenant des sites de recombinaison attL (Annexe 2) ont été recombinés avec les lentivecteurs destination (Annexe 3) contenant un promoteur (CMV, CMV/TO ou PGK) et une résistance distincte à un agent de sélection soit la néomycine, la blasticidine, l'hygromycine ou la puromycine, afin d'obtenir des lentivecteurs d'expression¹³⁰. La transformation des cellules E.coli chimiquement compétentes One Shot® Stbl3™ a été effectuée selon le protocole du manufacturier (Invitrogen) ce qui a permis d'amplifier nos plasmides pour transfection. Tous les vecteurs recombinés ont été vérifiés par digestion enzymatique et séquençage.

6.1.2 Production de lentivirus et transfection

Les lentivirus ont été produits selon le protocole standard du laboratoire^{130,131}.
Sommairement: Un jour avant la transfection, 14×10^6 cellules d'emballage 293FT (Invitrogen, # R700-07) ont étéensemencées et mises en incubation (Incubateur à oxygène atmosphérique et 5 % CO₂) dans une fiole ventilée de culture cellulaire de 175 cm² (T175) (BD Biosciences) dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (Wisent) additionné de 8 % sérum de veau foetal (FBS), pénicilline 100 IU et streptomycine 100 µg/mL (Wisent). Le lendemain, les cellules 293T ont été cotransfectées en milieu OPTI-MEM (Invitrogen) avec 8 µg de plasmides du lentivecteur recombiné (pLenti 705-E6 ou pLenti 706-E7), les plasmides d'emballage (4 µg de pLP1, 4 µg de pLP2, 4 µg de pVSV-G (Invitrogen Packing Mix)) et 80 µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen). À 24 heures post-transfection, le milieu a été remplacé pour du DMEM avec 8 % FBS et antibiotiques. À 72 heures post-transfection, le milieu de

DMEM contenant les particules lentivirales encapsulées a été recueilli et centrifugé afin de retirer les débris cellulaires. Le surnageant a été filtré à 0,45 µm puis concentré par technique d'ultracentrifugation à 20 000 tr/min durant 2.5 heures dans des contenants à balancier SW 28 (Beckman Coulter). Les lentivirus ont été resuspendus dans une solution tampon saline de Hank (HBSS) (Invitrogen) à une concentration de 100X et ont été conservés à -80 °C.

6.1.3 Gateway lentivirus et transduction

Les cellules ont été transduites à un coefficient de multiplicité d'infection entre 0.5 et 1 et la charge virale a été ajustée pour infecter 90-95 % des cellules¹³⁰. Pendant 12 heures, les cellules et les virus ont été incubés dans un milieu de DMEM additionné de polybrène à 4 µg/mL (Sigma). Après la transduction les virus ont été retirés et les cellules ont été rincées avec une solution tampon phosphate salin (PBS). Le milieu a ensuite été remplacé. À 48 heures post-transduction, les cellules ont été sélectionnées avec un agent de sélection (néomycine, blasticidine, hygromycine ou puromcyine) pour une durée de 1 semaine. Seules les cellules transduites efficacement ont survécu à cette étape.

6.2 Mise en culture de cellules épithéliales humaines normales de l'oropharynx (HNOE)

Après avoir obtenu un consentement écrit auprès des patients (CÉR #09-254), des échantillons de tissus amygdaliens ont été prélevés lors d'amygdalectomie pour des étiologies amygdaliennes bénignes. L'échantillon a été conservé sur glace durant le transport, puis incubé dans 5 mL de proviodine et filtré pendant 5 minutes sur des plaques à 6 puits. L'échantillon a été rincé trois fois au PBS et deux fois avec du milieu minimum essentiel modifié de Spinner (SMEM) (Sigma), puis il a été coupé en morceaux de 3 mm avec un bistouri stérile. Les morceaux tissulaires ont été mis en incubation pendant une heure sur une nouvelle plaque à 6 puits avec les cellules épithéliales placées vers le haut dans une solution

de 5 mL de collagénase-dispase/SMEM filtrée (9,6 mg/6,4 mL) à 37 °C (Annexe 4). Immédiatement après, dans une fiole ventilée de 25 cm² (T25) (BD Biosciences) nous avons mis 2 mL de collagénase queue de rat filtrée (25 mg en 50 mL acide acétique 0,2 N) pour un minimum de 1 heure à 37 °C. Puis, le tissu et le liquide (collagénase-dispase/SMEM) ont été transférés dans un tube de 50 mL auquel, nous avons ajouté 13 mL de SMEM. Le tout a été centrifugé à 1300 tr/min pendant 5 minutes à 4 °C. Le contenu a été vidé doucement avec une pipette de 10 mL, rincé avec 10 mL de PBS, puis centrifugé et vidé. Pour la digestion du tissu, nous avons ajouté 5 mL de trypsine 0,25 % et incubé le tout pendant 4 minutes dans un bain-marie en agitant et en tapant doucement le tube sur la paroi du bain. Pour arrêter la trypsine, nous avons ajouté 2 mL de FBS, centrifugé et vidé le surnageant. Nous avons rincé le contenu avec 10 mL de milieu EpiLife (Invitrogen, # M-EPI-500-CA) puis centrifugé. Pendant la centrifugation, nous avons rincé 3 fois le T25 avec du PBS pour retirer l'acide de la fiole. Nous avons ensuite vidé le tube et resuspendu les cellules et le tissu dans 5 mL de milieu EpiLife. Un décompte cellulaire n'a pas été effectué à cause de la grande quantité de globules rouges flottants. Les cellules et les morceaux tissulaires ont été transférés dans un T25. Nous n'avons pas changé le milieu avant le lendemain afin de prévenir la perte cellulaire. Au premier changement de milieu, le tissu restant a été retiré de la fiole.

6.3 Culture cellulaire

Les cellules ont été maintenues en culture (Incubateur à oxygène atmosphérique et 5 % CO₂) et leur prolifération a été mesurée lors des passages en effectuant un décompte cellulaire (Bio-Rad Automated TC10 Cell Counter) et un calcul de doublement populationnel (DP actuel = dernier DP + log₂ (nombre cellules finales/nombre de cellules départ)¹³¹. Les passages ont été effectués lorsqu'une confluence cellulaire d'environ 80 % était atteinte. Les cellules épithéliales humaines normales de l'oropharynx (HNOE) ont été maintenues en culture dans le milieu EpiLife. Les kératinocytes primaires épidermiques humains isolés de prépuces néonataux (HEKn) (Invitrogen # C-001-5C) ont été maintenus en culture dans le milieu EpiLife additionné de suppléments de croissance pour kératinocytes humains (HKGS) (Invitrogen), pénicilline 100 IU et streptomycine 100 µg/mL. Les cellules 293FT ont été

maintenues en culture dans le milieu DMEM additionné de 8 % FBS, pénicilline 100 IU et streptomycine 100 µg/mL.

6.4 RT-qPCR

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) transcriptase inverse en temps réel (RT-qPCR) a été réalisée avec le kit Platinum qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, 11730-025) en utilisant des volumes de 60 % par rapport à ceux suggérés. L'acide ribonucléique (ARN) a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse (RT). Le système de centrifugation et d'amplification d'ADN en temps réel Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Sydney, NSW, Australia) a été utilisé pour le volet qPCR. Les conditions de températures étaient comme suit : incubation UDG (50 °C, 2 minutes) dénaturation initiale et activation de la polymérase *hot start* Taq (95 °C, 10 minutes), 40 cycles dénaturation (95 °C, 15 secondes), hybridation (60 °C, 60 secondes) et élongation (72 °C, 15 secondes). L'ADN cellulaire des cellules CaSki¹³² positives (Human cervical carcinoma cell line) pour le HPV16 a été utilisé comme contrôle positif. La protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) a été utilisée pour contrôler les niveaux d'ARN totaux (normalisation interne de l'échantillon).

| Gène Cible | Amorce d'amplification | Sonde TaqMan® |
|------------|---|-----------------------------|
| HPV16-E6 | Fw : agcgaccagaaagttaccacagttatg Rev : ctcacgtcgcagtaactgttg | agcgaccagaaagttaccacagttatg |
| HPV16-E7 | Fw : caagcagaaccggacaga Rev: gtctacgtgtgtgctttgta | caagtgtgactctacgcttcgggttg |
| TBP | Fw : acaggagccaagagtgaa Rev : aaaccaacttctgtacaac | acagtccagactggcagcaagaaaata |

Tableau 3. Tableau RT-qPCR

La réaction de RT-qPCR a été réalisée avec les gènes cibles suivant : HPV16-E6, HPV16-E7 et TBP (protéine de liaison à la boîte TATA). Le tableau illustre les amorces d'amplifications gauches (Fw :forward) et droites (Rev : reverse) ainsi que les sondes TaqMan® spécifiques pour chacun des gènes cibles.

6.5 Immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées dans des lames de 4 puits (BD Falcon), puis elles ont été fixées en formaline (4 % paraformaldéhyde) durant 10 minutes à température pièce (TP), lavées au PBS et perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0.5 % Triton X-100 durant 10 minutes à TP. Les lames ont été bloquées pendant 30 minutes à TP avec une solution de PBS, 1 % albumine de sérum bovin (BSA) et 4 % sérum d'âne. Ensuite, les anticorps primaires ont été dilués dans le tampon de blocage et incubés avec les cellules fixées à 4 °C pendant 16 heures. Après, les cellules ont été lavées trois fois au PBS puis incubées avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes dilués dans le tampon de blocage à TP pendant 1 heure. Finalement, les cellules ont été lavées et montées avec un milieu de montage Vectashield (Vector Labs). Des images de la fluorescence ont été prises en haute résolution et ajustées pour analyse et représentation en utilisant Photoshop CS2 (Adobe).

6.6 Western Blot

Les cellules ont été lysées dans une solution de 40 % réactif d'extraction de protéine de mammifère (M-PER), 100mM dithiothreitol (DTT) et 50 % Laemmli 2X (Bio-Rad, #161-0737). Le mélange a ensuite été mis en ébullition. Les échantillons ont été chargés sur des gels de polyacrylamide Any kD (Bio-Rad), et migrés par électrophorèse. Les protéines ont été électrotransférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF) Immobilon-FL bloquée durant 30 minutes à TP dans une solution de lait écrémé 5 % reconstituée. Les anticorps primaires monoclonaux de souris contre Ras (BD Biosciences, #610001) ou de lapin contre la β -actine (Cell signaling, 13E5) dilués à 1 :1000 ont été incubés dans du lait écrémé à 4 °C 16 heures, puis rincés trois fois au PBS. Les anticorps secondaires d'âne anti-souris couplés à des fluorochromes dilués à 1 :20000 ont été incubés dans du lait écrémé 1 heure à TP, puis rincés trois fois au PBS. Les bandes ont été observées au Li-Cor. Comme contrôle de chargement, nous avons détecté le niveau endogène de la protéine β -actine exprimée de façon constitutive dans toutes les cellules eucaryotes.

6.7 Étude d'invasion en matrigel

Nous avons utilisé des chambres d'invasion en matrigel avec des pores de 8 μ m (BD Biosciences, #354480) en utilisant le protocole du fabricant. Chaque puits de la chambre d'invasion (chambres du haut et du bas) a été trempé dans 500 μ l de milieu sans sérum pendant 1 heure, puis le milieu a été retiré. Nous avons ensemencé 7.5×10^4 cellules dans 500 μ l de milieu avec 1 % de FBS dans la chambre du haut (contenant déjà la couche de matrigel) et rempli la chambre du bas avec 500 μ l de milieu avec 10 % de FBS. Après 16-18 heures, les cellules ayant traversé dans la chambre du bas ont été fixées dans la formaline et colorées avec du violet de gentiane 0.05 %. Les cellules attachées dans la chambre du bas ont été comptées en microscopie.

6.8 Croissance sans ancrage en agar mou

Deux concentrations d'agar ultrapure (Wisent) 1X et 2X ont été préparées, autoclavées, puis conservées en bain-marie à 55 °C. Le milieu de culture RPMI (Invitrogen) additionné de FBS et le milieu Epilife additionné de HKGS, DMEM et FBS ont été préparés à 1X, 2X et 3X. Nous avons déposé, dans les plaques à 6 puits, 1mL de solution d'agar 2X et 1 mL de milieu de culture 2X, puis laissé solidifier pendant 1 heure. Dans un tube éprouvette, nous avons mélangé 500 µl de milieu 3X avec 1 mL d'agar 1X à 42 °C. Les cellules ont été comptées et ramenées à une concentration de 2.4×10^4 cellules/mL. Nous avons mélangé le tube d'agar avec 1.5mL de milieu et 500 µl de cellules réchauffées (1.2×10^4 cellules) à 42 °C. Ensuite, nous avons étalé le mélange sur la première couche en puits et laissé solidifier la deuxième couche pendant 30 minutes. Les plaques d'agar mou ont été mises en incubation (Incubateur à oxygène atmosphérique et 5 % CO₂) à 37 °C pendant 10-30 jours et le milieu de culture a été changé 1 à 2 fois par semaine. Finalement, les plaques ont été colorées avec du violet de gentiane 1 % et les colonies ont été comptées au microscope de dissection.

6.9 Xénogreffe en souris

La veille, tout le matériel nécessaire à la manipulation du matrigel (BD Biosciences, #356237) a été mis au réfrigérateur. (Le matrigel se solidifie à 10 °C et doit toujours être conservé au congélateur ou sur glace.) Juste avant les injections, nous avons mélangé un volume égal de matrigel et de cellules resuspendues dans du PBS froid. Nous avons préparé un volume final de 200 µL par injection de ce mélange de cellules en matrigel. Des souris immunodéficientes Rag2/Il2rg et SCID (Taconic) ont été utilisées pour les xénogreffes. Une seule injection sous-cutanée de 200 µL cellules en matrigel (2-4 millions de cellules par injection) a été effectuée dans les flancs de l'animal sous anesthésie générale (isoflurane 2 %) (Annexe 5). Dans le premier flanc nous, avons injecté un contrôle positif, la lignée cellulaire de HeLa¹³³ (Henrietta Lacks cervical cancer cell line). Dans le deuxième flanc, nous avons injecté la lignée cellulaire HEKn hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². Les souris ont été gardées en

élevage et observées aux 48 heures pour mesurer le volume tumoral dans trois dimensions (x, y, z) à l'aide d'un compas numérique (Scienceware) (Annexe 5).

Afin de respecter le code d'éthique de l'animalerie, une anesthésie terminale (somnol) a été administrée lorsque la tumeur a atteint les points limites soit : perte de poids de plus de 20 %, volume tumoral de 2500 mm³ ou plus, présence d'ulcération tumorale, prostration ou tumeur qui entrave aux mouvements libres de l'animal. Une tumorectomie a été réalisée post-mortem à des fins de recherche.

Chapitre VII : Résultats

7.1 Système Gateway

7.1.1 Clonage de la séquence codante de HPV16-E6 HPV16-E7 en vecteur entrée

Les séquences codantes des oncoprotéines HPV16-E6 et HPV16-E7 ont été isolées à partir des lentivecteurs Lenti E6 OAX372-NheI et Lenti E7 OAX372-NheI obtenus de l'équipe de recherche du Dr Christian Beauséjour (Recherche pédiatrique, Hôpital Sainte-Justine). Les lentivecteurs ont subi une digestion aux sites de restrictions Sall/BamHI puis les fragments d'ADN encodant les oncoprotéines HPV16-E6 et HPV16-E7 ont été isolés sur gel d'agarose et purifiés en utilisant un protocole d'extraction d'ADN sur gel d'agarose (Kit d'extraction sur gel QIAquick, Qiagen). Le vecteur d'entrée pENTR4 (Invitrogen) a été linéarisé par digestion aux sites de restrictions BamHI/XhoI, déphosphorylé par le protocole phosphatase Antarctique (New England BioLabs) puis purifié sur colonne (Kit de retrait de nucléotides QIAquick, Qiagen). Le vecteur d'entrée pENTR4 linéarisé a été lié (ratio 3 :1) avec les fragments HPV16-E6 ou HPV16-E7 par protocole de ligation T4 ADN ligase (Invitrogen) créant les vecteurs entrée Gateway recombinants pENTR4-HPV16-E6 et pENTR4-HPV16-E7. L'identité des séquences insérées a été confirmée par séquençage comme étant identiques aux séquences de référence NCBI Human papillomavirus type 16, isolate Z032 (accession HQ644297.1) et Human papillomavirus type 16 E7 gene for early protein E7, isolate : P7-111 (accession AB663821.1).



Figure 9. Production de vecteurs d'entrée recombinants

Les fragments contenant les séquences codantes (HPV16-E6 et HPV16-E7) ont été isolés par digestion enzymatique avec des sites de restrictions spécifiques Sall/BamHI (étape manquante sur le schéma) et ligés avec les vecteurs d'entrée pENTR4-ccdB (sites de restrictions BamHI/XhoI) pour obtenir les vecteurs entrée pENTR4-HPV16-E6 et pENTR4-HPV16-E7.

7.1.2 Production de vecteurs Lentiviraux par recombinaison

7.1.2.1 pLenti CMV Neo/HPV16-E6 & pLenti CMV Blast/HPV16-E7

Les gènes des oncoprotéines virales E6 et E7 ont été transférés de vecteurs d'entrée (pENTR4-HPV16-E6 et pENTR4-HPV16-E7) à des vecteurs destination pLenti CMV Neo (705-1)¹³⁰ (résistance à la néomycine) et pLenti CMV Blast (706-1)¹³⁰ (résistance à la blasticidine) en utilisant la réaction de recombinaison attL-attR (LR) clonase afin d'obtenir des lentivecteurs d'expression (pLenti CMV Neo/HPV16-E6 (705-1), pLenti CMV Blast/HPV16-E6 (706-1), pLenti CMV Neo/HPV16-E7 (705-1) et pLenti CMV Blast/HPV16-E7 (706-1)). Afin d'avoir des résistances différentes pour chaque transduction, nous avons retenu les lentivecteurs d'expression pLenti CMV Neo/HPV16-E6 (705-1) et pLenti CMV Blast/HPV16-E7 (706-1).

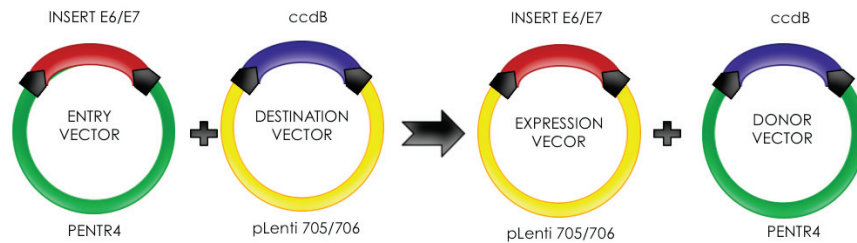


Figure 10. Recombinaison clonase LR

Les vecteurs d'entrée (pENTR4-HPV16-E6 et pENTR4-HPV16-E7) ont subi une recombinaison avec les lentivecteurs destination pLenti CMV Neo (705-1) (résistance à la néomycine) et pLenti CMV Blast (706-1) (résistance à la blasticidine) par clonage traditionnel. Les lentivecteurs d'expression (pLenti CMV Neo/HPV16-E6 (705-1), pLenti CMV Blast/HPV16-E6 (706-1), pLenti CMV Neo/HPV16-E7 (705-1) et pLenti CMV Blast/HPV16-E7 (706-1) sont été obtenus.

7.1.2.2 pLenti CMV Hygro/hTERT

Le vecteur d'entrée (pENTR1A-hTERT) a été recombiné au vecteur destination pLenti CMV Hygro DEST (w117-1)¹³⁰ (résistance à l'hygromycine) obtenu de l'équipe de recherche du Dr Éric Campeau (Program in Gene Function and Expression, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA) par une recombinaison attL-attR (LR) clonase. Le vecteur d'expression recombiné pLenti CMV Hygro/hTERT (w117-1) a été vérifié par digestion enzymatique et séquençage.

7.1.2.3 pLenti CMV/TO Puro RasV12 & pLenti PGK Hygro/RasV12

Le vecteur d'entrée pENTR1A-RasV¹² (w99-1)¹³⁰ a été cloné par une recombinaison attL-attR (LR) clonase dans le lentivecteur destination pLenti PGK Hygro DEST (w530-1)¹³⁰ (résistance à l'hygromycine), tous deux obtenus de l'équipe de recherche du Dr Éric Campeau. La séquence codant de l'oncogène mutant RasV¹² avait été précédemment clonée dans le lentivecteur destination pLenti CMV/TO Puro DEST (670-1)¹³¹ obtenu de l'équipe de

recherche du Dr Éric Campeau. Nous avons utilisé ces deux lentivecteurs exprimant RasV¹² soit, le pLenti CMV/TO Puro/RasV¹² (670-1) avec un promoteur fort inductible du cytomégalo virus (CMV/TO) et le pLenti PGK Hygro/RasV¹² (w530-1) avec un promoteur plus faible constitutivement actif de la phosphoglycerate kinase 1 (PGK).

| Lentivecteur expression | Lentivecteur entrée | Lentivecteur destination |
|---|-----------------------------|---------------------------------|
| pLenti CMV Neo/HPV16-E6 (705-1) | pENTR4-HPV16-E6 | pLenti CMV Neo DEST (705-1) |
| pLenti CMV Blast/HPV16-E6 (706-1) | pENTR4-HPV16-E6 | pLenti CMV Blast DEST (706-1) |
| pLenti CMV Neo/HPV16-E7 (705-1) | pENTR4-HPV16-E7 | pLenti CMV Neo DEST (705-1) |
| pLenti CMV Blast/HPV16-E7 (706-1) | pENTR4-HPV16-E7 | pLenti CMV Blast DEST (706-1) |
| pLenti CMV Hygro/hTERT (w117-1) | pENTR1A-hTERT | pLenti CMV Hygro DEST (w117-1) |
| pLenti CMV/TO Puro/RasV ¹² (670-1) | pENTR1A- RasV ¹² | pLenti CMV/TO Puro DEST (670-1) |
| pLenti PGK Hygro/RasV ¹² (w530-1) | pENTR1A- RasV ¹² | pLenti PGK Hygro DEST (w530-1) |

Tableau 4. Clonage : lentivecteurs d'entrée, destination et recombines d'expression

Le promoteur de chaque lentivecteur d'expression est indiqué en majuscule soit, CMV (promoteur constitutivement actif du cytomégalo virus), CMV/TO (promoteur inductible du CMV) et PGK (promoteur constitutivement actif de la phosphoglycerate kinase 1). La résistance de chaque lentivecteur est indiquée juste après le promoteur soit, une résistance à Blast (blastistidine), Hygro (hygromycine), Neo (néomycine) et Puro (puromycine). La séquence codante exprimée par chaque lentivecteur est indiquée à la fin soit, HPV16-E6 (gène codant pour l'oncoprotéine virale E6 du HPV16), HPV16-E7 (gène codant pour l'oncoprotéine virale E7 du HPV16), hTERT (gène codant pour télomérase humaine reverse transcriptase) et RasV¹² (gène codant pour l'oncogène mutant RasV¹²).

7.2 Génération des lignées cellulaires transduites

Les lentivirus exprimant les gènes codant pour la télomérase humaine transcriptase inverse (hTERT), l'oncoprotéine virale E6 et E7 du HPV16 (HPV16-E6, HPV16-E7) et

l'oncogène RasV¹² (RasV¹²) ont été produits par transfection avec les cellules d'emballage 293FT. Nous avons ensuite infecté de façon successive les cellules primaires HEKn par transduction avec des lentivirus codants pour ces gènes. Nous avons choisi d'utiliser des cellules isogéniques primaires afin de limiter la diversité génétique et les mutations inconnues. Les infections ont été effectuées de façon rapprochée et successive afin de minimiser les délais entre les infections et diminuer le risque de mutations extrinsèques inconnues qui pourraient se produire en culture. Après chaque transduction, les cellules ont été sélectionnées. Seules les cellules transduites efficacement ont survécu à l'étape de sélection. L'introduction de la hTERT a été effectuée à un doublement populationnel (DP) de 6.7, donnant lieu à la lignée cellulaire HEKn hTERT. Les cellules transduites ont été sélectionnées avec l'hygromycine. La deuxième infection a introduit l'oncoprotéine virale HPV16-E6 à un DP de 8.93, donnant lieu à la lignée cellulaire HEKn hTERT-E6. Les cellules ont été sélectionnées avec la néomycine. L'oncoprotéine virale HPV16-E7 a été introduite dans les lignées cellulaires HEKn hTERT et HEKn hTERT-E6 à un DP de 19.19 et 22.46, respectivement. Les lignées cellulaires obtenues post-transduction HEKn hTERT-E7 et HEKn hTERT-E6-E7 ont été mises en sélection à la blasticidine. L'oncogène RasV¹² a été introduit à deux reprises dans la lignée cellulaire HEKn hTERT-E6-E7, la première fois à DP de 23.11 avec un promoteur fort le CMV/TO (promoteur inducible du CMV) et la deuxième fois à un DP de 31.07 avec un promoteur plus faible le PGK (promoteur constitutivement actif de la phosphoglycerate kinase 1). Post-transduction, les cellules ont été sélectionnées à l'hygromycine. Pour toutes les infections réalisées, le taux de survie post-sélection a été estimé à 95 %. Les cellules transduites avec le lentivirus exprimant le promoteur fort CMV/TO de l'oncogène RasV¹² ont présenté un changement morphologique, soit un aspect large, aplati, multinuclé et plutôt réfractile¹³⁴ (Figure 12E), compatible avec une sénescence prématurée induite par l'oncogène RasV¹²^{135,136}. Des études de sénescence associée à la β -galactosidase seront nécessaires pour confirmer la sénescence des lignées cellulaires.

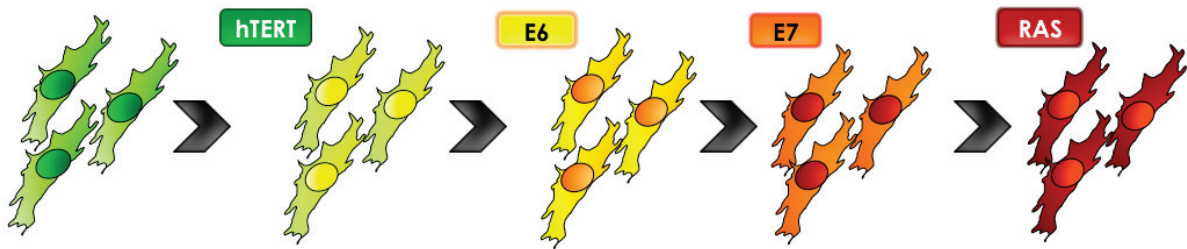


Figure 11. Chronologie des infections successives par transduction.

Infection successive des cellules par transduction avec des lentivirus codants pour les gènes cibles hTERT, HPV16-E6, HPV16-E7, RasV¹². DP : indique le doublement populationnel lors de la transduction.

| Lignée cellulaire | Doublement populationnel (DP) |
|--|-------------------------------|
| HEKn hTERT | 6.7 |
| HEKn hTERT-E6 | 8.93 |
| HEKn hTERT-E7 | 19.19 |
| HEKn hTERT-E6-E7 | 22.46 |
| HEKn hTERT-E6-E7-CMV/TO RasV ¹² | 23.11 |
| HEKn hTERT-E6-E7-PGK RasV ¹² | 31.07 |

Tableau 5. Infections par transduction

L'introduction des transgènes hTERT, E6, E7 et RasV¹² a été effectuée de façon séquentielle. La lignée cellulaire résultante est indiquée dans la colonne de gauche dans le tableau. Le doublement populationnel (DP) lors de la transduction est indiqué à droite dans le tableau. L'oncogène RasV¹² a été introduit à deux reprises, la première fois avec un promoteur fort le CMV/TO (promoteur inducible du CMV) et la deuxième avec un promoteur plus faible le PGK (promoteur constitutivement actif de la phosphoglycerate kinase1).

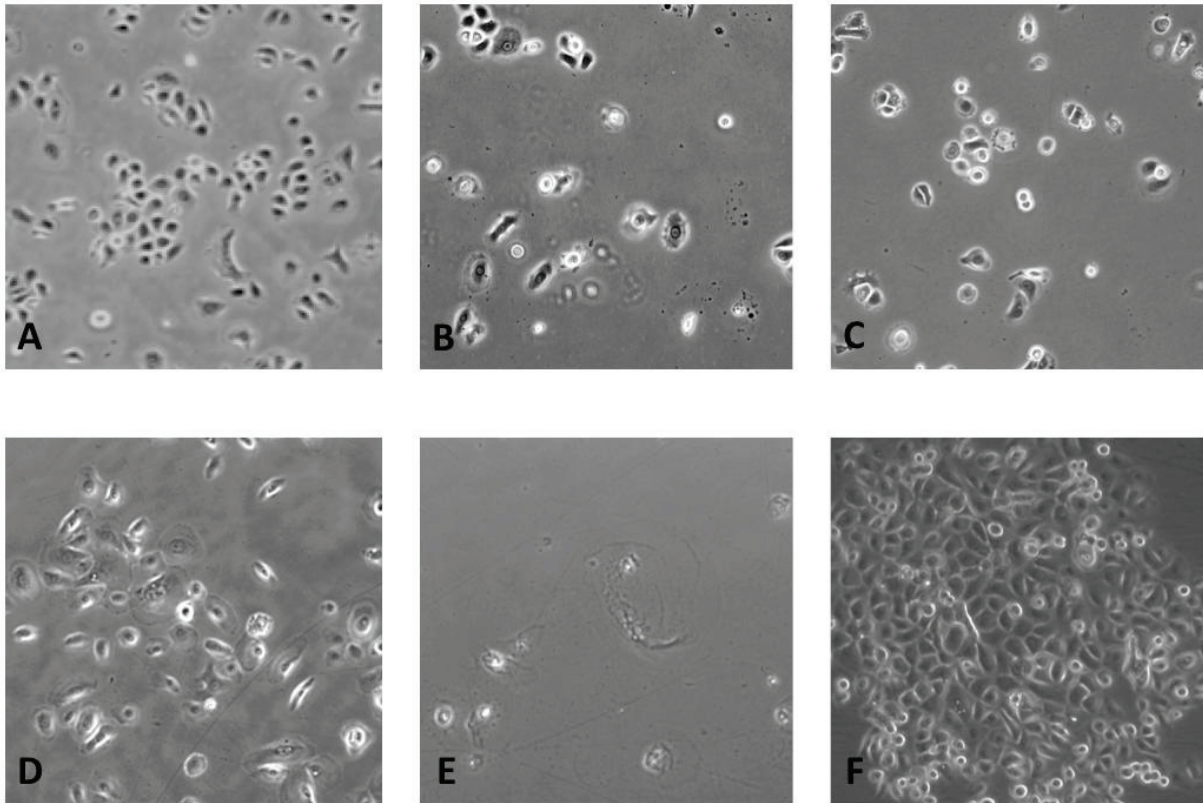


Figure 12. Images des lignées cellulaires

A : Image de la lignée cellulaire primaire HEK_n. B : Image de lignée cellulaire HEK_n hTERT post-sélection à l'hygromycine. C : Image de la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6 post-sélection à la néomycine. D : Image de la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 post-sélection à la blasticidine. E : Image de la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 CMV RasV¹². On observe quelques larges cellules en sénescence avec une morphologie large, aplatie, multinucléée et plutôt réfractile. F : Image de la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² post-sélection à la puromycine.

7.3 Validation expression des transgènes

L'expression des différents transgènes hTERT, HPV16-E6, HPV16-E7 et RasV¹² a été validée par méthode d'immunofluorescence, de Western blot et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).

7.3.1 RT-qPCR

Avant la réaction de l'ARN est rétrotranscrite en ADN. La réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) transcriptase inverse en temps réel (RT-qPCR) permet d'amplifier de façon exponentielle une séquence d'ADN spécifique localisée entre deux amorces et de simultanément la quantifier. L'acide ribonucléique (ARN) a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse (RT). Lors de la réaction PCR, l'ADN amplifié est détecté par fluorescence en temps réel. Alors que la quantité d'ADN augmente, la fluorescence est amplifiée. Plus la quantité d'ADN augmente, plus la fluorescence augmente. L'ADN cellulaire des CaSki positives pour le HPV16 a été utilisé comme contrôle positif¹³⁷ et l'ADN cellulaire des BJ (Forskin Fibroblasts cell line) a été utilisé comme contrôle négatif. La détection de l'ARN de la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) a été utilisée comme référence pour contrôler le niveau d'ARN total puisque ce gène est exprimé de façon égale et constitutive¹³⁸. L'expression de la fluorescence (expression) des gènes cibles a donc été normalisée en fonction de la TBP. Nous avons obtenu des résultats positifs pour l'expression de l'ADN codant pour les oncoprotéines E6 et E7 de la lignée cellulaire transduite HEK293T-hTERT-E6-E7.

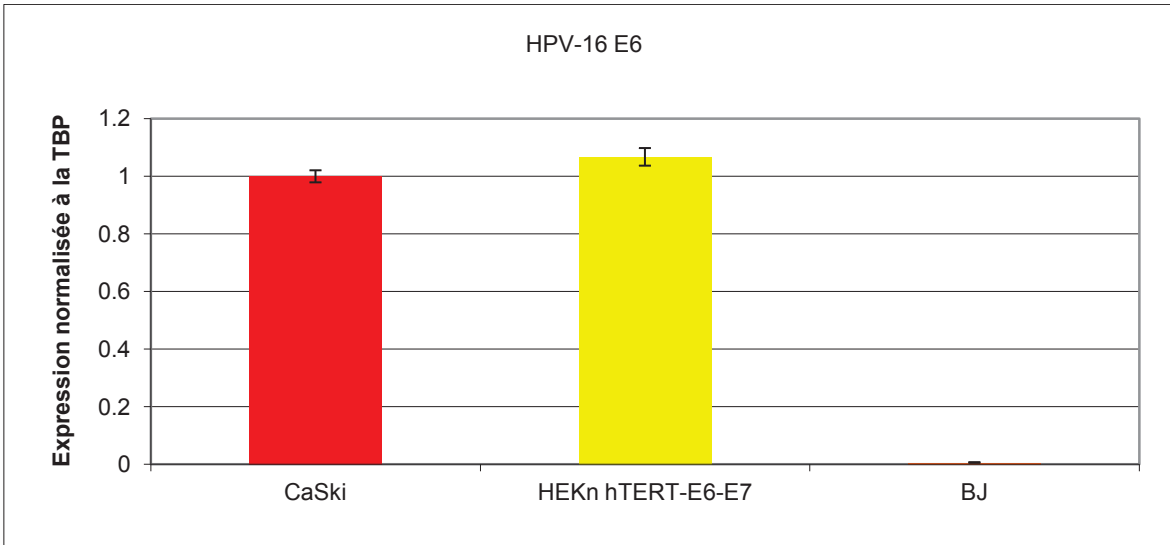


Tableau 6. RT-qPCR HPV16-E6

Axe des X : Lignées cellulaires testées : CaSki (Human cervical carcinoma cell line), BJ (Forskin Fibroblasts cell line) et HEKn hTERT-E6-E7. Axe des Y : Expression de la fluorescence normalisée à la TBP (protéine de liaison à la boîte TATA). Forte expression de l'oncoprotéine E6 dans la lignée HEKn hTERT-E6-E7 et CaSki. Notons l'absence d'expression de l'oncoprotéine E6 dans les BJ. Expérience réalisée en triplicata. Résultats présentés avec déviation standard.

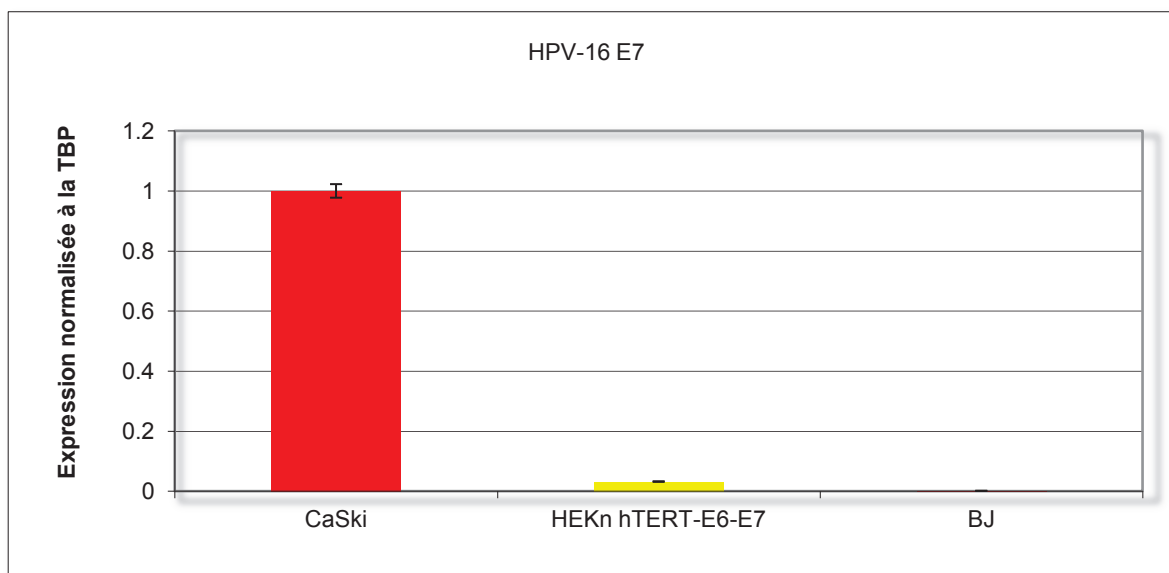


Tableau 7. RT-qPCR HPV16-E7

Axe des X : Lignées cellulaires testées : CaSki (Human cervical carcinoma cell line), BJ (Forskin Fibroblasts cell line) et HEK293T hTERT-E6-E7. Axe des Y : Expression de la fluorescence normalisée à la TBP (protéine de liaison à la boîte TATA). Forte expression de l'oncoprotéine E7 dans la lignée CaSki avec expression basse dans la lignée HEK293T hTERT-E6-E7. Notons l'absence d'expression de l'oncoprotéine E7 dans les BJ et les niveaux d'expression plus faible dans les HEK293T hTERT-E6-E7 en comparaison avec les CaSki. Expérience réalisée en triplicata. Résultats présentés avec déviation standard.

7.3.2 Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet la visualisation d'un antigène ou protéine spécifique dans des cellules ou dans des coupes de tissu grâce à des anticorps spécifiques chimiquement conjugués à des colorants fluorescents. L'immunofluorescence a été réalisée 48 heures post-transduction pour confirmer l'infection efficace de RasV¹² (fluorescence rouge) dans les lignées cellulaires HEK293T hTERT-E6-E7 CMV/TO RasV¹² et HEK293T hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². Comme attendu, nous avons observé une expression plus faible de RasV¹² avec le

promoteur PGK lorsque comparé au niveau d'expression du promoteur fort CMV/TO. Cette différence est aussi mise en évidence par analyse de Western Blot (Figure 14).

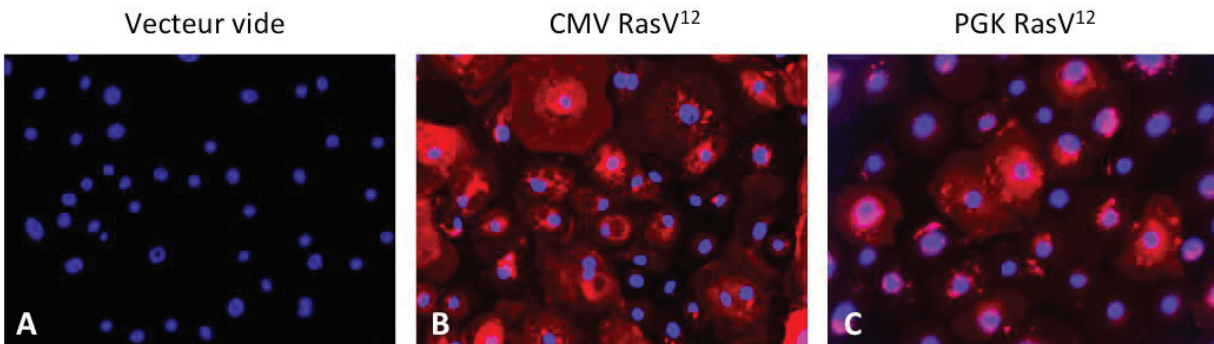


Figure 13. Immunofluorescence

Images microscopiques 48 heures post-infection de la lignée cellulaire HEK293T hTERT-E6-E7 avec les lentivirus codants pour A : Lentivecteur vide L3P, B : Lentivecteur CMV RasV¹², C : Lentivecteur PGK RasV¹². L'ADN et les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (Hoescht). La sonde immunofluorescente spécifique rouge se lie au RasV¹² cytoplasmique. Notons une expression plus faible de RasV¹² cytoplasmique avec le promoteur PGK lorsque comparé au niveau d'expression du promoteur fort CMV/TO.

7.3.3 Western blot

L'étude de Western blot permet de mettre en évidence à partir d'un extrait cellulaire des protéines d'intérêts grâce à des anticorps spécifiques. Les protéines sont séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane. Les anticorps spécifiques viennent se coupler aux protéines d'intérêts sur la membrane. Grâce à un système de détection, un signal est observé lorsqu'une deuxième série d'anticorps de détection vient se coupler aux complexes de protéines-anticorps spécifiques. Le Western blot a été réalisé pour contrôler l'expression de RasV¹² dans les lignées cellulaires transduites HEK293T hTERT-E6-E7 CMV/TO RasV¹² et HEK293T hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². L'étude a été réalisée sur la lignée cellulaire HEK293T hTERT-E6-E7 transduite avec un vecteur vide (contrôle négatif), la lignée cellulaire HEK293T

hTERT-E6-E7 CMV RasV¹² et HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². La protéine β-actine exprimée de façon constitutive dans toutes les cellules eucaryotes a été utilisée comme contrôle de chargement.

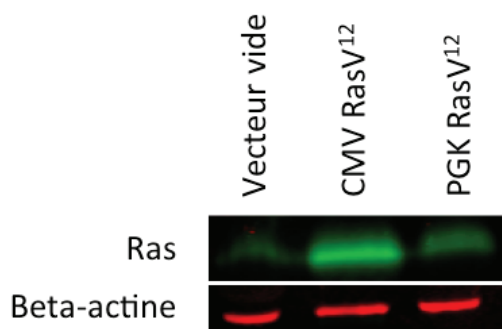


Figure 14. Western Blot avec dosage d'expression de RasV¹²

Lignée cellulaire : HEK_n hTERT-E6-E7 (vecteur vide L3P), HEK_n hTERT-E6-E7 CMV RasV¹² et HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² (de gauche à droite). La protéine β-actine exprimée de façon constitutive dans toutes les cellules eucaryotes a été utilisée comme contrôle de chargement (rouge). Nous avons noté une expression plus faible de RasV¹² cytoplasmique avec le promoteur PGK lorsque comparé au niveau d'expression du promoteur fort CMV/TO (vert).

7.4 Caractérisation des modèles cellulaires de cancer induit par le VPH

Les stratégies de dépistage de radiosensibilisation utilisées dans les lignées cellulaires cancéreuses sont de meilleures qualités lorsque les cellules utilisées sont génétiquement définies¹³⁹. La première option était d'utiliser un panneau de lignées cellulaires caractérisées de cancers ORL provenant de multiples patients¹⁴⁰. Le principal désavantage d'utiliser ce type de panneau découle de l'importante hétérogénéité génomique et des nombreuses mutations inconnues au sein de ces lignées cellulaires. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser une

lignée cellulaire de kératinocytes primaires isogéniques néonataux dérivés d'un seul patient afin d'élaborer notre modèle cellulaire. La grande majorité des cancers de la tête et du cou sont des carcinomes épidermoïdes provenant d'un épithélium non kératinisant¹⁴¹. Cependant, les cellules épithéliales oropharyngées sont difficiles à mettre et à garder en culture et il n'existait pas encore de lignée primaire oropharyngée disponible dans les banques cellulaires commerciales. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser les kératinocytes primaires, des cellules faciles à ensemercer et à garder en culture et qui tout de même demeurent un excellent choix pour notre modèle de cancer induit par le VPH tel que démontré dans d'autres modèles de carcinogenèse du cancer du col cervical^{46,142}. Afin d'augmenter la connexion de notre modèle avec les cancers de l'oropharynx, nous avons également établi un protocole de mise en culture des cellules épithéliales humaines de l'oropharynx (HNOE) (cf Méthodologie).

7.4.1 Courbes de croissance HEKn

Afin de caractériser notre modèle de culture cellulaire, nous avons évalué la prolifération cellulaire des kératinocytes primaires et des lignées cellulaires transduites (HEKn hTERT, HEKn hTERT-E6, HEKn hTERT-E7, HEKn hTERT-E6-E7, HEKn hTERT-E6-E7-CMV/TO RasV¹², HEKn hTERT-E6-E7-PGK RasV¹²). Les cellules humaines normales présentent une durée de vie de réplique limitée en culture qui se termine par un arrêt prolifératif définitif dénommé sénescence (sénescence réplique). La sénescence est un état d'arrêt permanent de la croissance cellulaire dans lequel les cellules peuvent demeurer métaboliquement actives sans prolifération¹⁴³. La capacité proliférative des kératinocytes en culture a été rapportée à approximativement 40-60 doublements populationnels (DP) dans la littérature¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Les kératinocytes primaires (HEKn sauvage) (Figure 15) n'ont pas dépassé un dédoublement populationnel de 40, ce qui représente leur seuil de sénescence réplique. La lignée cellulaire transduite avec la télomérase humaine (HEKn hTERT) (Figure 15) a démontré un arrêt prolifératif comparable à la lignée cellulaire sauvage, soit à 40 DP suggérant que la télomérase n'est pas suffisante pour immortaliser ces cellules. L'introduction de E6 seule ne fut similairement pas suffisante pour l'immortalisation, conférant une capacité de

doublement supplémentaire de 20 DP (Figure 16). Alternativement, l'immortalisation cellulaire des HEK_n a été possible suite à l'inactivation de p53 via l'introduction de E6 combiné à l'expression de hTERT (HEK_n hTERT-E6) (Figure 17). Les lignées cellulaires transduites suivantes : HEK_n hTERT-E6, HEK_n hTERT-E6-E7 et HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² ont démontré des caractéristiques d'immortalisation dépassant le seuil de sénescence répliquative des cellules parentales à plus de 40-60 DP (Figure 17 et 18). Immédiatement après l'introduction du lentivirus exprimant un promoteur fort CMV/TO pour l'oncogène RasV¹², la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 CMV RasV¹² est entrée en sénescence prématurée (arrêt de croissance immédiat) (Figure 18 et Figure 19B) (expérience réalisée en triplicata). Cette sénescence induite par l'oncogène RasV¹² est indépendante de pRB et de p53 puisque l'activité de ceux-ci était déjà inactivée/modulée par les oncoprotéines E6 et E7. Les rares cellules qui ont émergé après l'infection CMV RasV¹² étaient toutes négatives pour RasV¹² (expression contrôlée par immunofluorescence). Les cellules qui ont émergé après l'infection de CMV RasV¹² correspondent aux rares cellules qui ont survécu puisqu'elles n'ont pas été transduites lors de l'infection ou exprimaient des niveaux indétectables du transgène. Une deuxième tentative d'introduire RasV¹² avec un promoteur plus faible PGK à un DP de 31.07 a permis d'obtenir la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² (Figure 18 et Figure 19C).

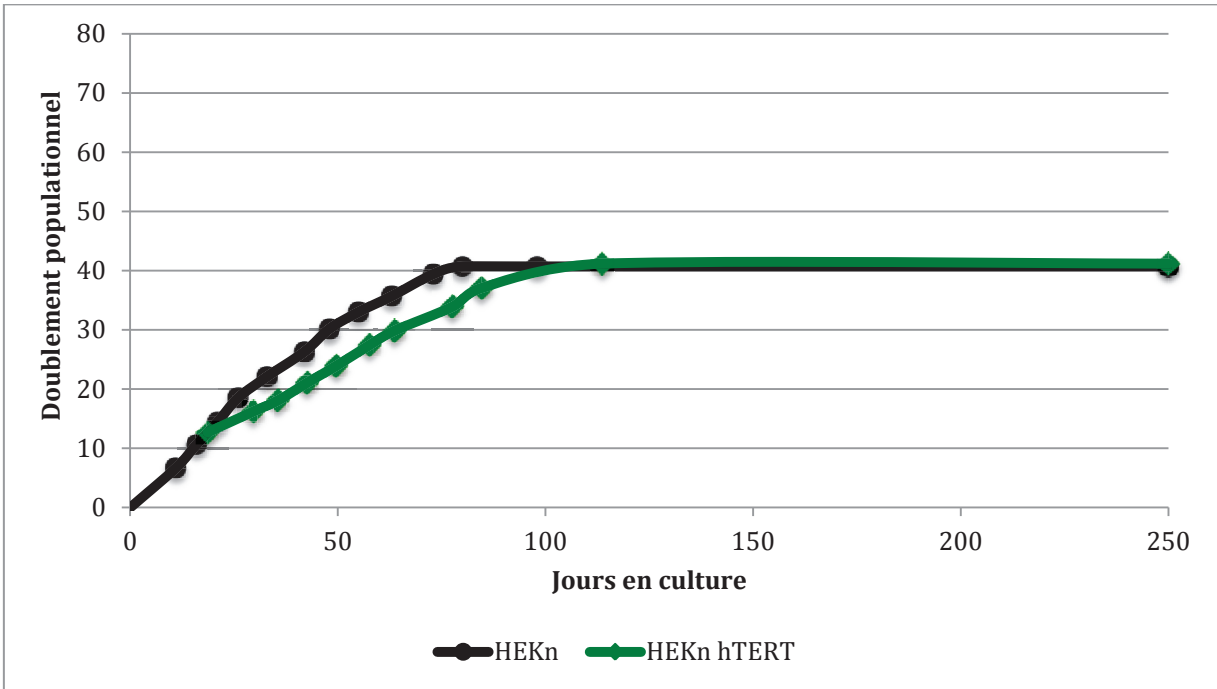


Figure 15. Courbes de croissance des HEKn sauvage et HEKn hTERT

La lignée HEKn hTERT a été créée à partir de la lignée HEKn sauvage en introduisant le transgène hTERT à un DP de 6.7. Les lignées cellulaires HEKn sauvage et HEKn hTERT sont, toutes deux, entrées en sénescence réplivative à un DP de 40. La sénescence réplivative est identifiable par la portion plateau des deux courbes.

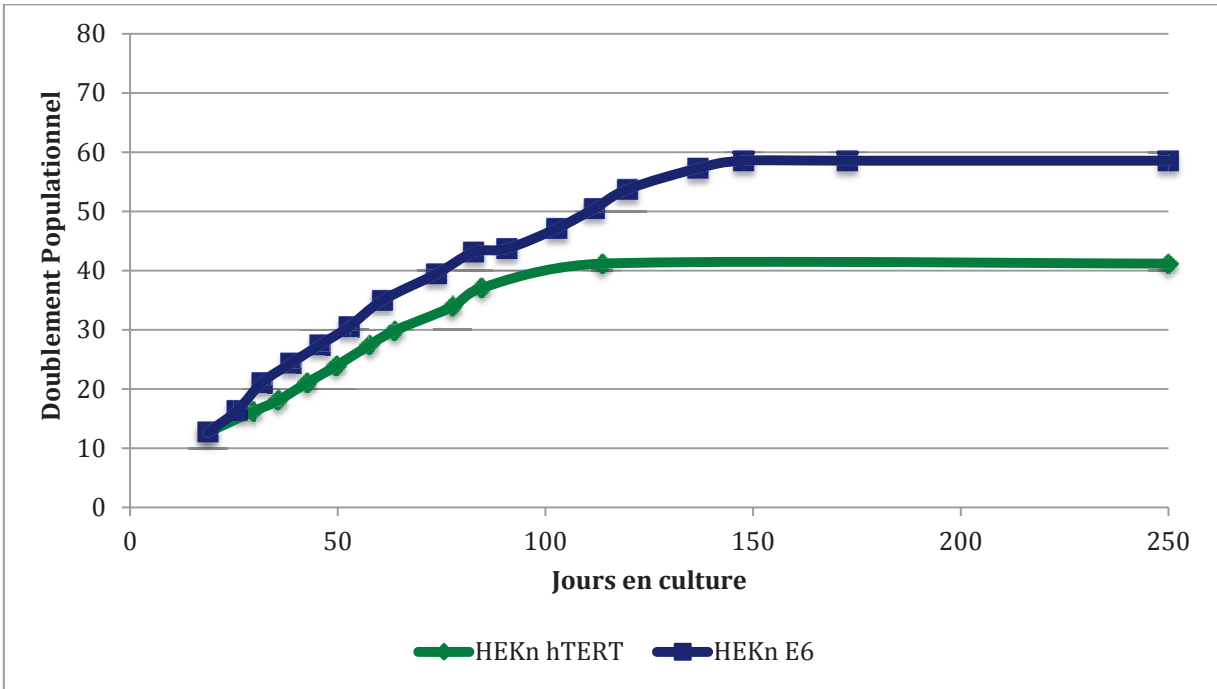


Figure 16. Courbes de croissance des HEK293 hTERT et HEK293 E6

L'introduction du transgène E6 dans la lignée HEK293 sauvage a donné lieu à la lignée HEK293-E6. Une prolifération cellulaire prolongée sans immortalisation a été observée chez la lignée HEK293-E6 jusqu'à un DP d'environ 60. On remarque que les HEK293-E6 subissent un stress de croissance autour d'un DP de 40. La sénescence répliquative (absence d'immortalisation) est identifiable par la portion plateau des deux courbes.

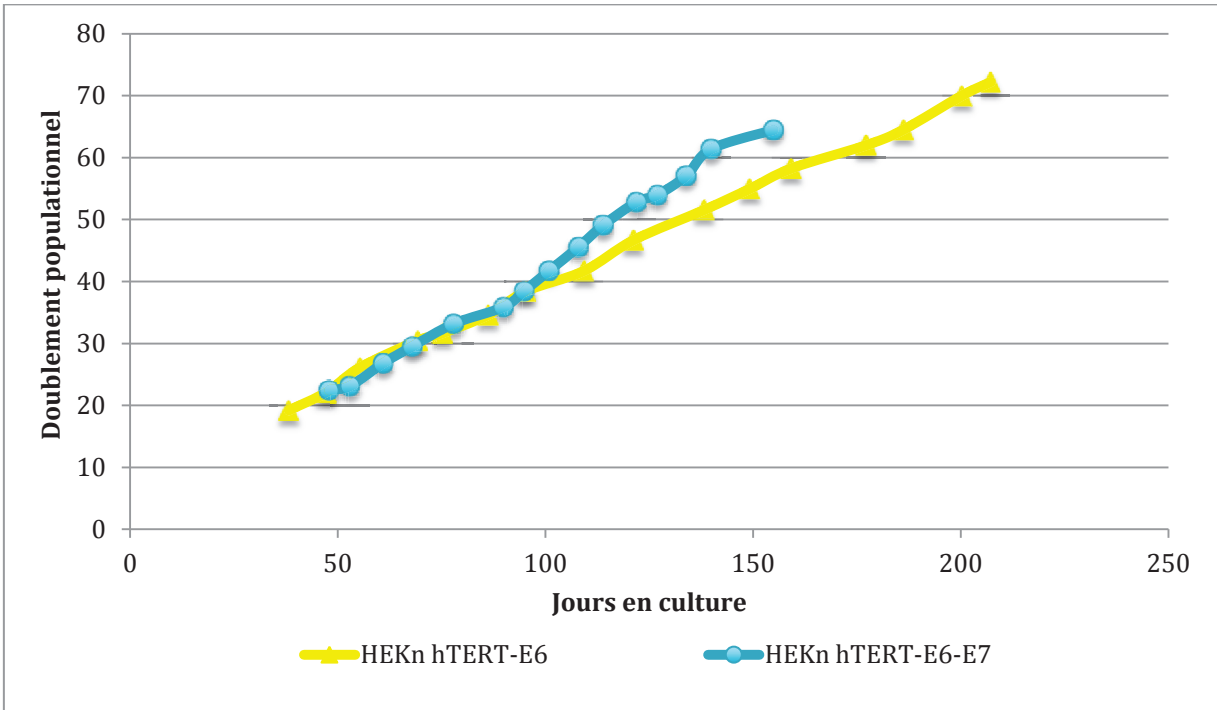


Figure 17. Courbes de croissance des HEKn hTERT-E6 et HEKn hTERT-E6-E7

Les lignées HEKn hTERT-E6 et HEKn hTERT-E6-E7 ont été créées à partir de la lignée HEKn hTERT en introduisant successivement les transgènes E6 puis E7. L’immortalisation de la lignée cellulaire a été possible suite à l’introduction de hTERT et E6 (HEKn hTERT-E6, courbe jaune). Cette immortalisation est identifiée sur la courbe par l’absence de plateau. Une prolifération cellulaire plus rapide est observée avec la lignée HEKn hTERT-E6-E7 (courbe bleue).

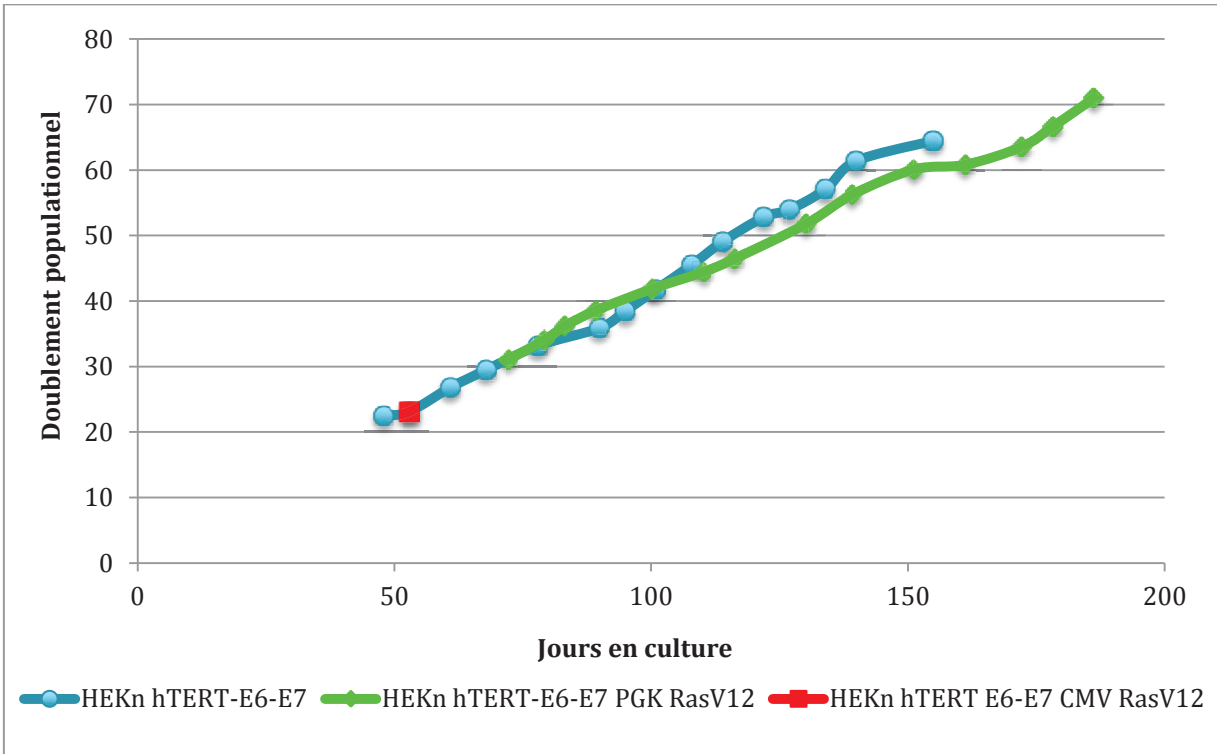


Figure 18. Courbes de croissance des HEK293 hTERT-E6-E7, HEK293 hTERT-E6-E7 CMV RasV¹², HEK293 hTERT-E6-E7 PGK RasV¹²

La lignée cellulaire HEK293 hTERT-E6-E7 CMV RasV¹² (DP 23.11) est immédiatement tombée en sénescence après l'introduction de RasV¹² avec promoteur fort CMV/TO. La lignée cellulaire HEK293 hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² (DP 31.07) exprimant un promoteur plus faible, prolifère approximativement au même rythme que la lignée HEK293 hTERT-E6-E7.

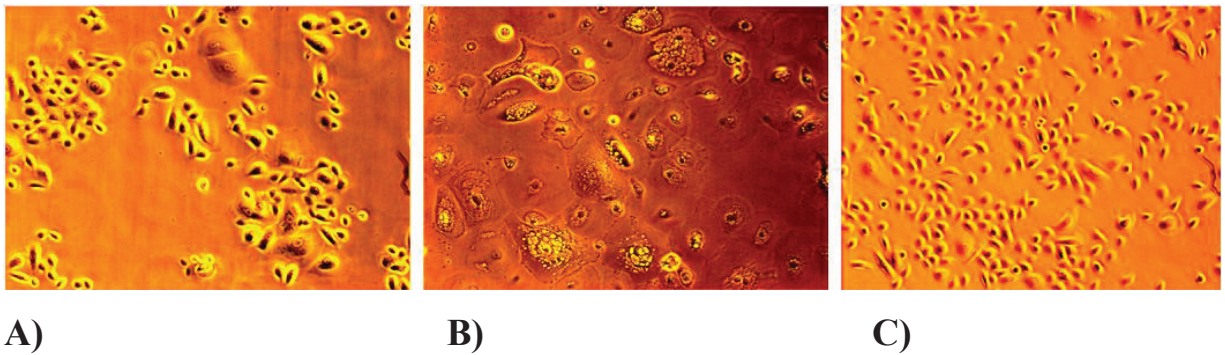


Figure 19. Culture cellulaire suite à l'introduction de RasV¹²

Image A : HEK293 hTERT-E6-E7 (contrôle), Image B : HEK293 hTERT-E6-E7 CMV RasV¹², Image C : HEK293 hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². La lignée cellulaire HEK293 hTERT-E6 E7 n'échappe pas à la sénescence induite par l'introduction de l'oncogène RasV¹² malgré l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 (Image B). En exprimant des quantités plus faibles du RasV¹² mutant, la lignée cellulaire HEK293 hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² a réussi à échapper à la sénescence induite par RasV¹² (Image C). Ces résultats ont été confirmés par triplicata.

7.4.2 Courbes de croissance des cellules épithéliales humaines de l'oropharynx (HNOE)

Nous avons réussi à établir trois lignées cellulaires épithéliales de l'oropharynx humaines (HNOE42, HNOE45 et HNOE46) à partir de cinq échantillons tissulaires de patients prélevés lors d'amygdalectomies. Nous avons évalué la prolifération cellulaire des trois lignées cellulaires épithéliales de l'oropharynx (HNOE42, HNOE45 et HNOE46) sauvages et transduites (HNOE hTERT, HNOE E6, HNOE E6-hTERT et HNOE E6-hTERT-E7). Les résultats sont présentés sous forme de graphique seulement pour la lignée HNOE42 (Figure 20), mais les trois lignées cellulaires (HNOE42, 45 et 46) ont présenté une prolifération comparable. Les HNOE sont plus fragiles et plus difficiles à garder en culture que les kératinocytes. Les cellules épithéliales humaines normales (HNOE42) (Figure 20, courbe bleue) n'ont pas dépassé un dédoublement populationnel de 12, ce qui représente leur seuil de

réplication maximal (sénescence répllicative). La lignée cellulaire transduite avec l'oncoprotéine virale E6 à un DP de 2.0 (HNOE42 E6) a démontré un arrêt prolifératif comparable à la lignée cellulaire sauvage, soit autour d'un DP de 12 (Figure 20, courbe rouge). L'introduction de E6 et hTERT, à un DP de 4.18, a permis à la lignée cellulaire HNOE42 E6-hTERT de proliférer au-delà de son seuil de répllication de croissance. Néanmoins, le stress de culture a mené à une sénescence à un DP d'environ 20 (Figure 20, courbe verte). La lignée cellulaire HNOE42 E6-hTERT a été générée suite à l'introduction de l'oncoprotéine virale E7 à un DP 18.59 (Figure 20, courbe mauve). La lignée HNOE42 E6-hTERT-E7 a continué de proliférer à un rythme inférieur à la lignée HNOE42 E6-hTERT. Les cellules de la lignée HNOE42 E6-hTERT-E7 ont été congelées à un DP de 19.25. Compte tenu de la fragilité des cellules HNOE à la culture et aux congélations, nous avons arrêté les cultures en attendant l'introduction de l'oncogène RasV¹².

| HNOE42 | HNOE45 | HNOE46 |
|--------------------|--------------------|-----------------|
| HNOE42 E6 | HNOE45 E6 | HNOE46 E6 |
| HNOE42 E6-hTERT | HNOE45 E6-hTERT | HNOE46 E6-hTERT |
| HNOE42 E6-hTERT-E7 | HNOE45 E6-hTERT-E7 | |

Tableau 8. Lignées cellulaires HNOE établies HNOE42, HNOE45 et HNOE46

Lignées cellulaires transduites à partir des lignées établies avec les transgènes E6, hTERT et E7.

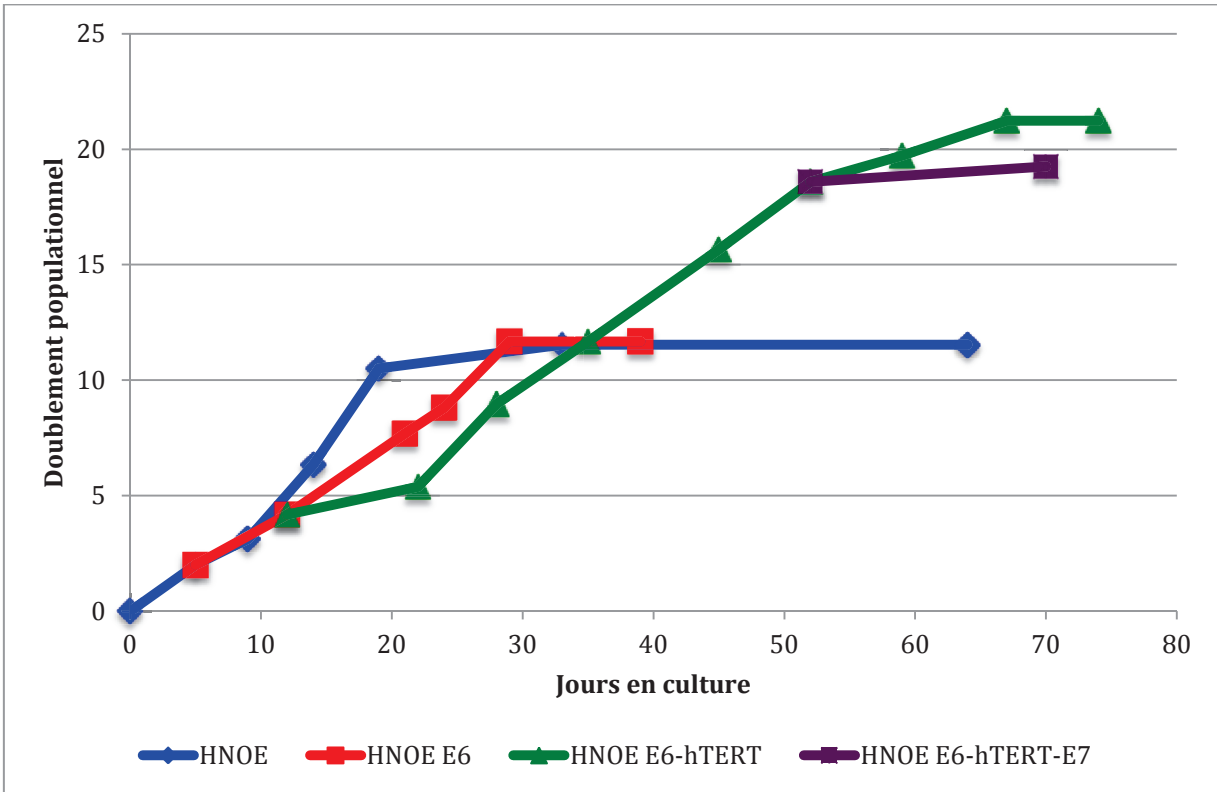


Figure 20. Courbes de croissance des lignées cellulaires HNOE

Chaque courbe représente une lignée cellulaire épithéliale de l'oropharynx humaine : HNOE42 (courbe bleue), HNOE42 E6 (courbe rouge), HNOE42 E6-hTERT (courbe verte), HNOE42 E6-hTERT-E7 (courbe mauve). Les lignées cellulaires HNOE42 et HNOE42 E6 présentent une sénescence réplivative à un DP de 12. La lignée cellulaire HNOE42 E6-hTERT a dépassé le seuil de sénescence réplivative, néanmoins elle est finalement entrée en sénescence à un DP d'environ 20. La lignée cellulaire HNOE42 E6-hTERT-E7 a continué à proliférer à un rythme inférieur à la lignée HNOE42 E6-hTERT.

7.4.3 Étude d'invasion en matrigel

Les cellules épithéliales ayant acquis des caractéristiques tumorales d'agressivité telle la migration et l'invasion cellulaire possèdent la capacité de migrer à travers la membrane basale de matrigel vers un milieu de culture plus favorable¹⁴⁸. La capacité de migration et d'invasion de la membrane basale est une caractéristique de carcinogenèse importante que doivent acquérir les cellules épithéliales en vue d'une progression tumorale. L'étude d'invasion en matrigel a été réalisée avec la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 et HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². Nous avons utilisé la lignée cellulaire HeLa et BJ comme contrôle positif et négatif, respectivement.

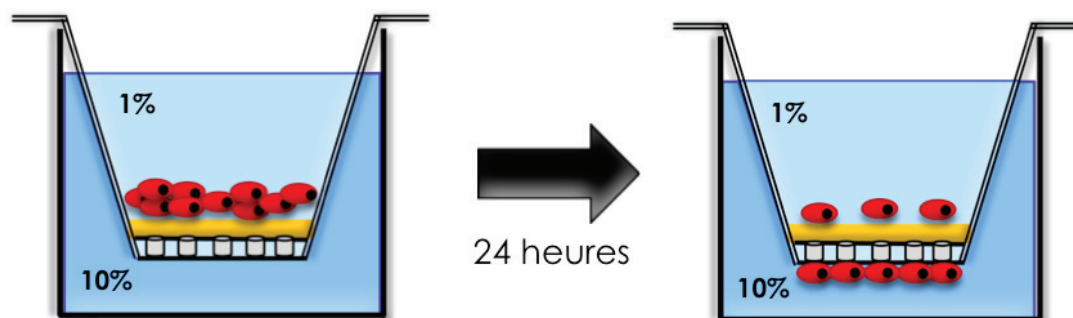


Figure 21. Étude d'invasion en matrigel

La lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² a étéensemencée dans un milieu FBS 1 % dans la chambre du haut. Les cellules sont attirées par le milieu de culture plus favorable de 10 % FBS de la chambre du bas. Les cellules ayant acquis des caractéristiques d'agressivité de migration et d'invasion vont digérer le matrigel et migrer à travers les pores de 8 μ m vers la chambre du bas en réponse aux stimuli chimiotactiques du FBS 10 % sur une période de 24 heures.

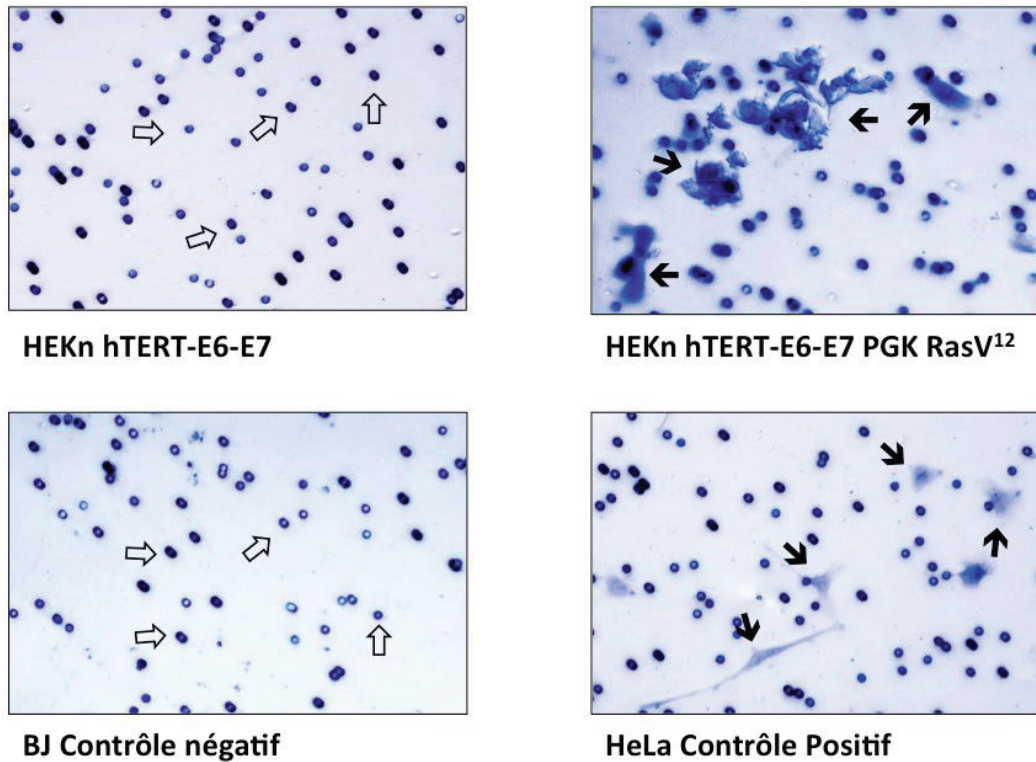


Figure 22. Photographie microscopique des résultats de l'étude d'invasion en matrigel HEKn hTERT-E6-E7, HEKn hTERT-E6-E7 PGK RasV¹², BJ (contrôle négatif), et HeLa (contrôle positif) (de haut gauche à bas à droite). Résultats après 24 heures de culture, les cellules dans la chambre du bas ont été fixées dans la formaline et ont été colorées avec du violet de gentiane 0.05 %. Les cellules attachées dans la chambre du bas ont été comptées en microscopie et photographiées. On observe des cellules attachées (flèches noires) sur l'image de la lignée cellulaire HeLa et HEKn hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². Les flèches blanches indiquent les pores (points/ronds) des chambres dans les puits où les cellules n'ont pas migré. Notez que ces points sont aussi visibles dans les puits où les cellules ont migré, mais n'y sont pas indiqués par des flèches.

7.4.4 Croissance sans ancrage en agar mou

L'étude de croissance en agar mou a comme objectif d'identifier les cellules transformées par leur capacité de croissance sans ancrage. La capacité de croissance sans ancrage corrèle souvent avec la tumorigénicité¹⁴⁹. Les cellules épithéliales non transformées ne peuvent pas pousser en agar mou à cause de l'anoïkis, un mécanisme de mort cellulaire programmée lors de la perte d'ancrage avec la matrice extracellulaire¹⁵⁰. Les cellules transformées sont résistantes à l'anoïkis et peuvent pousser en agar mou et former des colonies¹⁵¹. Cette étude a été réalisée avec la lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹², HEK_n hTERT-E6 (contrôle négatif) et 22RV1 (Prostate carcinoma epithelial cell line) (contrôle positif)¹⁵². La lignée cellulaire HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² n'a pas réussi à former des colonies en agar mou. L'expérience a été répliquée avec un nombre variable de cellules et différent pourcentage d'agar mou avec des résultats finaux similaires. Ces résultats ont été confirmés par des études en triplicata.

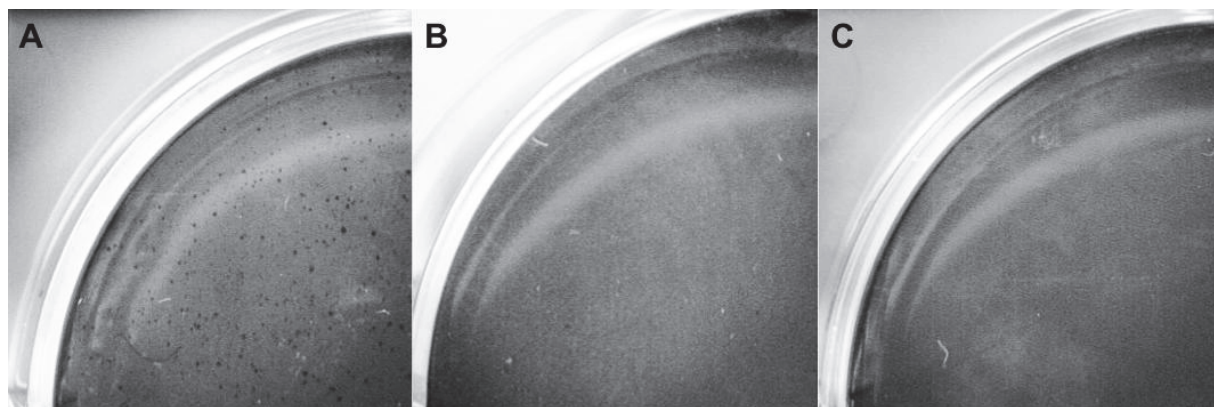


Figure 23. Étude croissance an agar mou

Lignées cellulaires A : 22RV1, B : HEK_n hTERT-E6 (contrôle négatif) C : HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹². Image A : Notons les centaines des colonies identifiées sur le contrôle positif (22RV1). Image B & C : Les lignées cellulaires HEK_n hTERT-E6 et HEK_n hTERT-E6-E7-PGK RasV¹² sont non invasives en agar mou (aucune colonie n'est visible).

7.5 Xénogreffe en souris

L'étude de xénogreffe en souris immunodéficiente a comme objectif d'identifier les cellules transformées par leur capacité de créer des tumeurs suite à une injection dans un tissu. Les lignées cellulaires ont été injectées dans les flancs de l'animal en sous-cutané en présence ou pas d'une matrice de matrigel et avec ou sans fibroblastes. Le matrigel et les fibroblastes procurent un microenvironnement physiologique qui permet d'améliorer la tumorigénicité des cellules injectées^{142,153}. Chaque animal était son propre contrôle puisque dans un flanc, nous avons injecté le contrôle positif (lignée HeLa) (Figure 25) et dans l'autre flanc, la lignée transduite HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² (Figure 24). Chaque courbe du graphique représente une souris unique. Deux sous-types de souris immunodéficientes Rag2/Il2rg et SCID (Taconic) ont été utilisées pour l'étude. Cette étude a été réalisée en triplicata avec des résultats similaires. On s'aperçoit qu'indépendamment de la combinaison de sous-type de souris, de présence de fibroblastes ou matrigel la lignée HEK_n hTERT-E6-E7 PGK RasV¹² ne présente pas de tumorigenèse in vivo (Figure 24). La masse cellulaire sous-cutanée injectée a présenté une régression progressive de volume avec la résorption de la matrice de matrigel et de fibroblastes. Le contrôle positif de HeLa a présenté une croissance tumorale exponentielle lorsqu'injecté dans la souris SCID sans matrigel ni fibroblastes (Figure 25, courbe bleue).

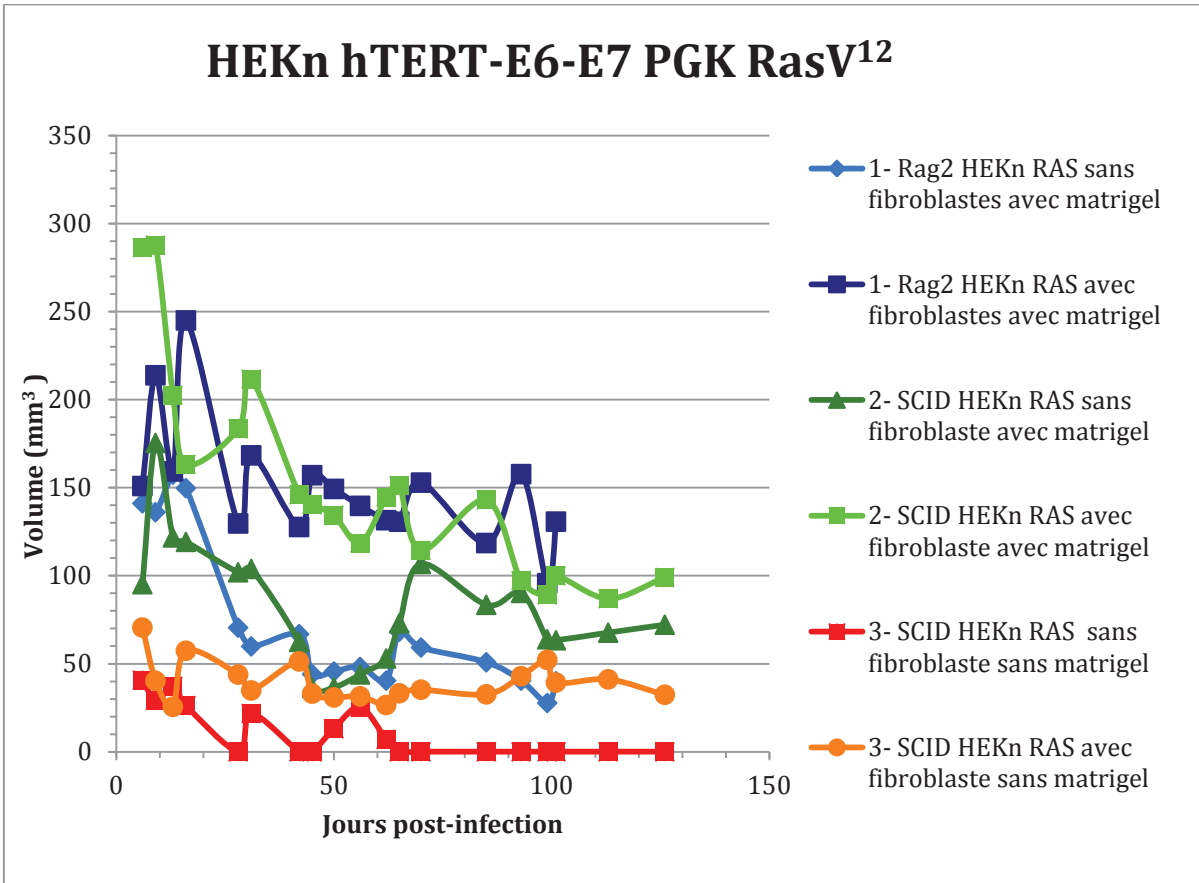


Figure 24. Mesure volumétrique (mm³) des masses tumorales de la lignée HEK_n hTERT E6 E7-PGK RasV¹² en fonction du nombre de jours écoulés post-injection.

Résultats présentés selon le sous-type de souris Rag2/II2rg ou SCID, la présence ou pas de fibroblastes et/ou matrigel dans le milieu d'injection. Chaque courbe représente une souris unique. On remarque une régression progressive du volume tumorale dans toutes les combinaisons. Le pourcentage de régression du volume tumoral le plus important a été documenté en présence de matrigel et fibroblastes (courbes bleue et verte) puisque le volume initial était plus grand. Échelle de volume maximal 350 mm³.

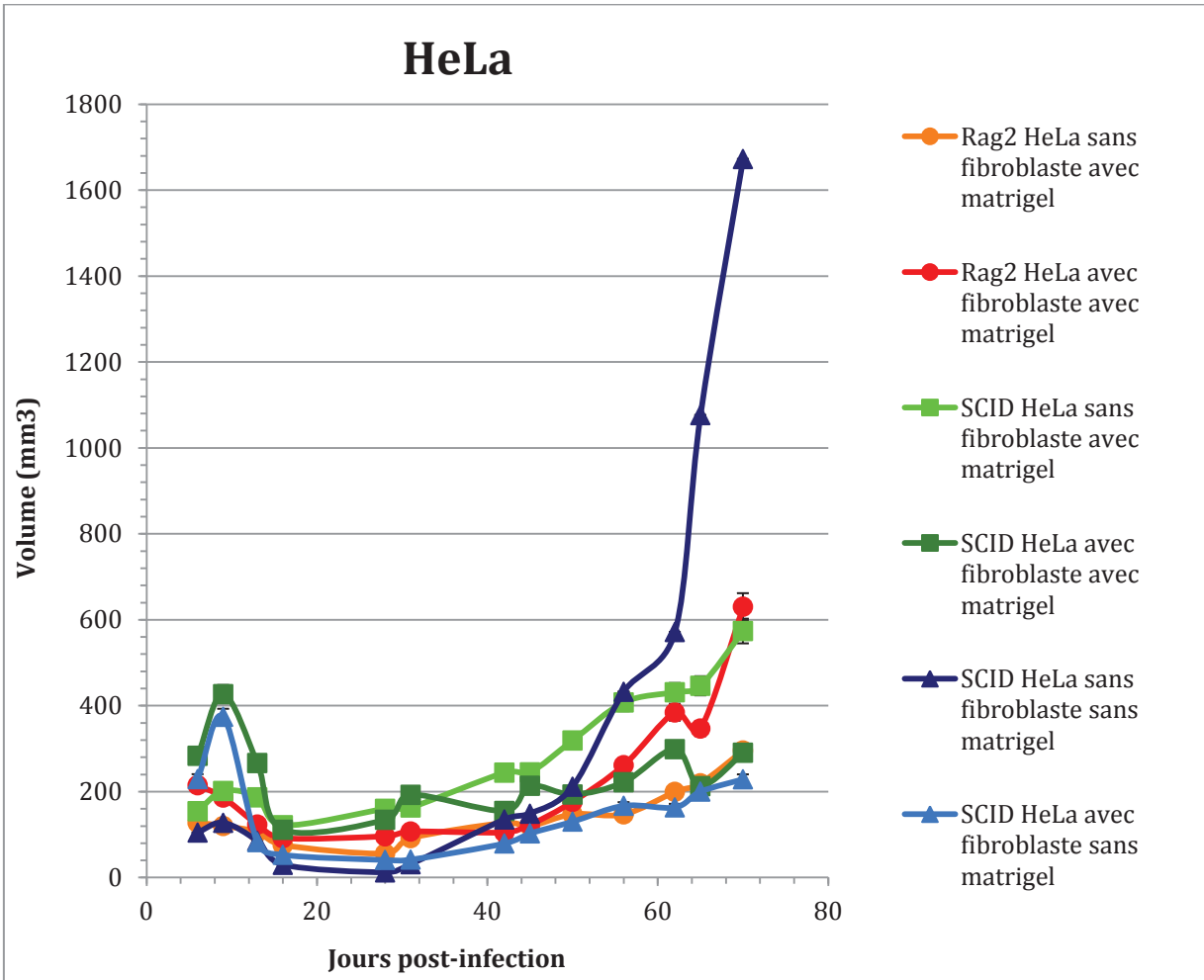


Figure 25. Mesure volumétrique (mm^3) des masses tumorales de la lignée HeLa (contrôle positif) en fonction du nombre de jours écoulés post-injection

Résultats présentés selon le sous-type de souris Rag2/II2rg ou SCID, la présence ou pas de fibroblastes et/ou de matrigel dans le milieu d'injection. Chaque courbe représente une souris unique. Une croissance tumorale exponentielle a été documentée lorsque la lignée HeLa a été injectée dans la souris SCID sans matrigel ni fibroblastes (courbe marine). Échelle de volume maximal 1800 mm^3 .

Discussion

Les objectifs de cette étude étaient de dériver des lignées isogéniques à partir de kératinocytes primaires et cellules épithéliales de l'oropharynx, de caractériser un modèle de culture cellulaire pour le cancer de l'oropharynx induit par le VPH et de valider la carcinogenèse de ce modèle *in vitro* & *in vivo*. Nous avons choisi d'utiliser des lignées isogéniques dérivées d'un seul patient pour diminuer les artefacts causés par la diversité génétique et les mutations inconnues lors de l'utilisation subséquente pour les études de radiosensibilisation. Lors de la génération des lignées transduites, les infections avec les lentivirus codants pour les transgènes ont été effectuées de façon successive et rapprochée avec des temps de culture limités afin de minimiser les délais entre les infections et diminuer le risque de mutations extrinsèques inconnues qui pourraient se produire en culture. Les cellules transduites ont été sélectionnées avec un agent de sélection distinct à chaque étape. Ceci nous a permis d'élaborer un modèle cellulaire de carcinogenèse pur où toutes les mutations sont définies. Nous avons validé l'expression de nos transgènes par méthode d'immunofluorescence, de Western Blot et de PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR).

Les cellules humaines normales présentent une durée de vie répllicative limitée en culture par un processus nommé sénescence qui est un mécanisme suppresseur de tumeur puissant^{154,155}. En absence de la télomérase, il y a érosion et raccourcissement progressif des télomères à chaque cycle cellulaire. Ce raccourcissement des télomères active la voie de signalisation du p53 et initie la sénescence cellulaire induite par le raccourcissement des télomères^{156,157}. La télomérase est une enzyme ribonucleoprotéine responsable du maintien de la longueur des télomères¹⁵⁸. L'activation de la télomérase est un événement important dans l'immortalisation et la transformation maligne des cellules. La durée de vie de réplication cellulaire peut-être allongée indéfiniment, phénomène nommé immortalisation, via l'expression de la télomérase¹⁵⁴. L'activité de la télomérase est détectable dans plus de 90 % des cellules cancéreuses immortalisée¹⁵⁹. L'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) dans les fibroblastes et certains autres sous-types cellulaires suffit pour les immortaliser^{143,157}. Dans notre modèle, malgré l'expression de hTERT, la lignée des kératinocytes primaires HEKn hTERT a démontré un arrêt prolifératif comparable à la lignée

cellulaire sauvage, soit à 40 DP. Ce résultat suggère que l'expression de la télomérase seule (hTERT) n'est pas suffisante pour immortaliser les kératinocytes primaires humains (HEKn). Ainsi, les kératinocytes qui expriment la télomérase échappent probablement au raccourcissement des télomères, mais ne sont pas immortalisés. Dans les kératinocytes et les cellules épithéliales mammaires, la sénescence induite par p¹⁶^{INK4A} a été identifiée comme la voie limitant l'immortalisation^{143,160,161}. Ce type de sénescence de réplication, indépendante du raccourcissement des télomères, est dénommée sénescence induite par le stress ou sénescence prématurée. La sénescence est induite par le stress, mais le mécanisme sous-jacent qui augmente l'expression de p16^{INK4A} et active la voie de signalisation dépendante p16-pRB demeure mal défini¹⁶².

L'implication de E6 dans l'augmentation de la transcription, l'activation de la télomérase et l'immortalisation dans les cellules épithéliales primaires a été proposée dans des études antérieures^{60,61}. Cependant, le mécanisme précis d'activation transcriptionnelle demeure inconnu. Katzenellenbogen *et al.* ont suggéré qu'en présence de E6, une protéine cytoplasmique NFX1-123 serait responsable de l'augmentation de la transcription, de l'activité de la télomérase et de l'immortalisation des cellules⁶². Dans notre modèle, l'introduction de E6 seule dans la lignée de kératinocytes primaires HEKn a permis aux cellules d'acquérir une capacité de prolifération de 20 DP supplémentaires. Cependant, l'expression de E6 seule n'a pas été suffisante pour immortaliser les cellules et celles-ci sont devenues sénescents à un DP d'environ 60. Nos résultats contrastent avec les études antérieures publiées où E6 seule a été décrite comme suffisante à l'immortalisation^{60,61}. Nous avons tenté de produire un modèle cellulaire de carcinogenèse défini et n'avons pas observé l'activité d'immortalisation de E6. Cette observation nous laisse suspecter que des mutations inconnues non identifiées puissent s'être glissées dans les études antérieures et que celles-ci contribueraient à l'activité d'immortalisation de E6. Au seuil de sénescence répliquative de la lignée sauvage (autour DP de 40), les HEKn E6 ont subi un stress de croissance. Le stress de croissance, aussi appelé « crise de culture », à DP 40 des HEKn E6 (Figure 16) correspond à une instabilité génomique secondaire à la perte de fonction de p53 et une crise mitogénique (stade M2). Cette crise mitogénique est caractérisée par une importante instabilité génomique suivie d'une mort cellulaire¹⁶³ d'où a émergé une sous-population cellulaire qui a continué de

proliférer jusqu'à une DP 60. Nous avons réussi à immortaliser les kératinocytes primaires humains (HEKn) seulement après l'introduction des transgènes hTERT et E6 (HEKn hTERT-E6) et ceux-ci ont été gardés en culture plus d'un an et continuent de proliférer.

Nous avons réussi à établir trois lignées des cellules épithéliales de l'oropharynx (HNOE) à partir d'échantillons de patients prélevés lors d'amygdalectomies (HNOE42, HNOE45, HNOE46). Nous avons obtenu les lignées cellulaires transduites HNOE hTERT, HNOE E6, HNOE E6-hTERT et HNOE E6-hTERT-E7. Elles ont présenté un important ralentissement de leur prolifération avec l'accumulation de mutation et le stress de culture a mené à une sénescence à un DP d'environ 20. La dernière lignée établie était HNOE42 E6-hTERT-E7 et elle a présenté un rythme de prolifération inférieur à la lignée HNOE42 E6-hTERT. Ces résultats font fit de la difficulté à mettre et à garder en culture les cellules épithéliales oropharyngées. Lorsque nous avons débuté cette étude, il n'existait pas de lignée primaire oropharyngée disponible dans les banques cellulaires commerciales. Aujourd'hui la Cellogen rend disponible une lignée cellulaire primaire de l'oropharynx¹⁶⁴. Dans notre modèle, les cellules épithéliales humaines normales de l'oropharynx (HNOE) ont été maintenues en culture dans le milieu EpiLife. Il est possible qu'un milieu plus adapté tel le milieu Human Oropharyngeal Normal Primary Cell Culture Media (#M36072-03, Cellogen)¹⁶⁵ aurait permis un environnement de culture plus propice. Une autre option aurait été d'utiliser une culture cellulaire organotypique en radeaux qui permet une différenciation physiologique et morphologique *in vitro*⁵⁴.

La perte d'un gène suppresseur de tumeur anti-mitogénique ou l'activation d'un oncogène à propriété mitogénique peut mener à la sénescence des cellules normales^{154,166}. La sénescence induite par un oncogène est un mécanisme suppresseur de tumeur puissant qui induit un arrêt prolifératif habituellement dépendant des voies de signalisation p53 et pRb¹⁶⁷. De plus, il a été décrit par Serrano *et al.* que la transformation de cellules primaires par Ras nécessite l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb¹³⁵. Dans des cellules qui expriment E6 et E7, la sénescence induite par un oncogène ne devrait pas être active puisque E6 et E7 agissent en inactivant et dégradant les suppresseurs de tumeurs p53 et pRb⁹³. Cependant, l'expression du transgène CMV RasV¹² dans les kératinocytes primaires exprimant hTERT, E6 et E7 (HEKn hTERT-E6-E7) de notre modèle a activé le mécanisme de

sénescence induit par un oncogène. Ceci nous laisse suspecter qu'au moins un autre mécanisme suppresseur de tumeur indépendant de l'activité de p53 et pRb demeure actif dans ces cellules. Ces trouvailles contrastent avec les résultats publiés par Narisawa-Saito *et al.* qui ont démontré une transformation cellulaire efficace et le développement de cancer après introduction de l'oncogène Ras dans des lignées de kératinocytes humains cervicaux exprimant HTERT, E6 et E7 et des lignées exprimant seulement E6 et E7¹⁴². Dans le modèle de Narisawa-Saito *et al.* le mécanisme de sénescence induit par un oncogène était nécessairement inactivé et non fonctionnel lorsque l'introduction de l'oncogène Ras a eu lieu. L'accumulation de mutations inconnues et/ou de changements dans l'expression génique secondaire au temps de culture prolongée (délais à l'adaptation des cellules au sérum, temps écoulé entre les transductions) dans le modèle de Narisawa-Saito *et al.* pourrait être à l'origine des résultats divergents. De plus, l'adaptation des cellules au sérum pourrait également être nécessaire pour augmenter la tolérance des cellules à Ras (nos cellules ont été cultivées dans un milieu défini en absence de sérum).

Au niveau des caractéristiques agressives de nos nouvelles lignées, nos résultats de croissance en agar mou et de xénogreffes vont de pair avec ceux de Hahn *et al.* qui ont démontré que l'expression de Ras n'était pas suffisant à la transformation de cellules humaines exprimant SV40 LT, malgré la présence de hTERT, l'inactivation des voies de signalisation des suppresseurs de tumeurs p53 et pRB dans ces cellules¹⁶⁸. Similairement à l'activité des oncoprotéines E6 et E7, l'oncoprotéine SV40 LT se lie et inactive de nombreuses protéines, dont les suppresseurs de tumeurs p53 et pRB¹⁶⁹. De façon plus intéressante, une substitution de l'activité de la région précoce du SV40 par les oncoprotéines E6 et E7 n'a pas démontré de transformation maligne de kératinocytes humaines¹⁷⁰. L'ajout de l'expression d'une deuxième oncoprotéine st (épissage alternatif de la région précoce du gène SV40) a été nécessaire pour compléter la transformation maligne des cellules^{168,170}. L'oncoprotéine st interagit avec la famille des phosphatases sérine-thréonine PP2A et cette interaction module l'activité de différentes voies de signalisation, dont les voies MEK-ERK et PI3K/AKT^{170,171}. Zhao *et al.* ont démontré que l'oncoprotéine st active la voie de signalisation PI3K et que cette activation mène vers la transformation maligne des cellules mammaires épithéliales humaines. De plus, l'activation constitutive de la voie de signalisation PI3K dans ces cellules peut être

substituée pour la présence de st et mener vers la transformation¹⁵³. Ainsi, le suppresseur de tumeur PTEN de la voie de signalisation PI3K-PTEN-AKT pourrait être un des gènes candidats pour le mécanisme suppresseur de tumeur responsable de la sénescence induite par l'oncogène Ras. Un autre gène candidat pour le mécanisme suppresseur de tumeur est le TGF- β . Cipriano *et al.* ont démontré que l'activation du récepteur de TGF- β indépendante des voies de signalisation du p16/pRB et p53 était nécessaire pour médier la sénescence induite par l'introduction de l'oncogène Ras dans des cellules mammaires épithéliales humaines¹⁷². En effet, la sénescence induite par l'oncogène Ras a pu être surpassée en exprimant un récepteur dominant-négatif du récepteur du TGF- β . Cette inhibition du TGF- β dans des cellules exprimant Ras et ayant perdu les voies de signalisation du p16/pRB et p53 a permis de compléter la transformation maligne¹⁷².

L'expression du transgène RasV¹² avec un promoteur fort inductible du CMV dans les kératinocytes HEK_n hTERT-E6-E7 a activé le mécanisme de sénescence induit par un oncogène. Pour remédier à cette situation, nous avons introduit l'oncogène RasV¹² avec un promoteur faible constitutivement actif de la phosphoglycerate kinase 1 (PGK) dans les kératinocytes HEK_n hTERT-E6-E7. La population cellulaire exprimant HEK_n hTERT-E6-E7-PGK RasV¹² a présenté un phénotype malin en culture et à l'étude d'invasion, mais n'a pas démontré de résultats positifs à l'étude de croissance sans ancrage en agar mou ni en xénogreffe en souris immunodéficientes. Ces trouvailles nous laissent suspecter qu'une faible expression de Ras n'est pas suffisante pour acquérir les caractéristiques tumorales telles la perte d'inhibition de contact de croissance, besoins en sérum diminué et indépendance des mécanismes régulateurs de croissance¹⁴⁹. En effet, Elenbass *et al.* ont montré qu'en présence de SV40 LT et hTERT, des hauts niveaux d'expression de Ras étaient nécessaires pour une transformation tumorale de cellules épithéliales mammaires humaines¹⁷³. Similairement, Cipriano *et al.* ont démontré que les cellules avec une faible expression de Ras demeurent sensibles aux signaux exogènes antiprolifératifs et ne possèdent pas le potentiel de croissance sans ancrage et ne réussissent pas à former des colonies en agar mou. Dans l'étude de Cipriano *et al.* l'inhibition de TGF- β dans les cellules avec faible expression de Ras a permis la transformation maligne de celles-ci¹⁷². Il est donc maintenant évident que l'expression de Ras à haut niveau est nécessaire pour obtenir une progression maligne *in vitro*.

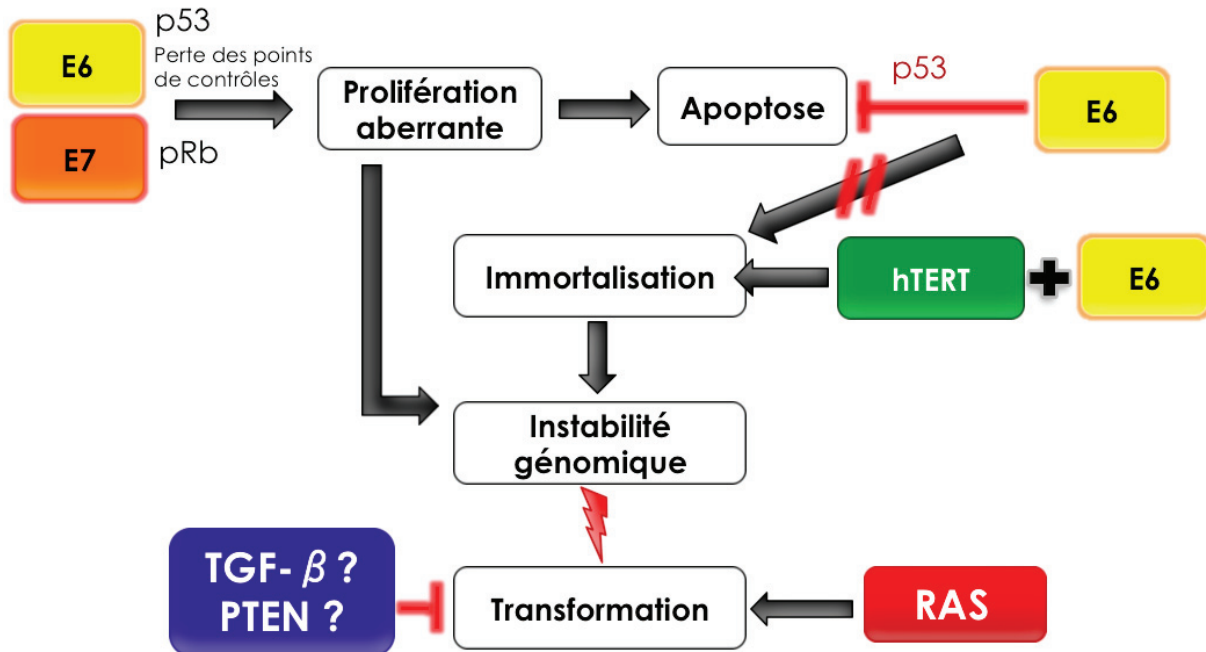


Figure 26: Schéma modifié du notre modèle cellulaire de carcinogenèse isogénique

Les oncoprotéines virales E6 et E7 inhibent les gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb et entraînent une perte des points de contrôles du cycle cellulaire, créant ainsi une prolifération aberrante des cellules et une instabilité génomique. Dans notre modèle, E6 seule et la télomérase humaine (hTERT) seule ne suffisent pas à l'immortaliser les cellules. L'immortalisation cellulaire est seulement possible en présence combinée de télomérase humaine (hTERT) et de l'oncoprotéine E6. Un troisième mécanisme suppresseur de tumeur qui demeure encore inconnu médie la sénescence induite par l'oncogène Ras et empêche la transformation maligne des cellules. Les gènes candidats pour ce mécanisme suppresseur de tumeur sont TGF- β et PTEN.

En conclusion, nos résultats démontrent qu'en présence des oncoprotéines virales E6 et E7, il y a un troisième mécanisme suppresseur de tumeur qui médie la sénescence induite par l'oncogène Ras (Figure 26). De plus, nous avons identifié que la présence de E6 seule ne suffit pas à immortaliser les kératinocytes primaires humains (HEKn). Une expression combinée de hTERT et E6 est nécessaire afin d'immortaliser les HEKn. Nous n'avons pas réussi à créer un modèle in vitro de carcinogenèse pour les cancers de l'oropharynx induits par le VPH puisqu'un troisième mécanisme suppresseur de tumeur médie la sénescence induite par l'oncogène Ras et empêche la transformation maligne des cellules. Des études pour identifier les gènes candidats pour ce mécanisme suppresseur de tumeur sont en développement.

Le carcinome épidermoïde de l'oropharynx VPH positif est une nouvelle entité clinique différente des cancers VPH négatifs qui présente un meilleur pronostic et une meilleure réponse aux traitements. Ce sous-type de cancer présente une plus grande sensibilité aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie et cette sensibilité est attribuable au phénomène de létalité synthétique. Notre modèle actuel peut être utilisé pour des études de radiosensibilisation et pourra servir de plateforme vers la découverte des létalités synthétiques entre E6 et E7 et la radiation.

Bibliographie

1. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research* 1996;56:2488-92.
2. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007;357:2552-61.
3. van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol* 2002;198:476-86.
4. Reed AL, Califano J, Cairns P, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research* 1996;56:3630-3.
5. Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* 2006;25:2558-64.
6. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer* 2011;11:9-22.
7. Sheu JJ, Hua CH, Wan L, et al. Functional genomic analysis identified epidermal growth factor receptor activation as the most common genetic event in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2009;69:2568-76.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
10. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358:502-11.
11. van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer research* 1994;54:1156-8.
12. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, et al. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Head Neck* 2009;31:1544-56.
13. Rocco JW, Li D, Liggett WH, Jr., et al. p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1697-704.
14. Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, et al. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 1997;79:380-9.
15. 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.
16. Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, et al. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1995;76:853-9.
17. Knudsen ES, Knudsen KE. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. *Nature reviews Cancer* 2008;8:714-24.
18. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
19. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999;18:6145-57.

20. Boyle JO, Hakim J, Koch W, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer research* 1993;53:4477-80.
21. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:64-75.
22. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, et al. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:519-29.
23. Chung CH, Ely K, McGavran L, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006;24:4170-6.
24. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:3579-84.
25. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-32.
26. Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994;54:3153-9.
27. 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;354:567-78.
28. William WN, Jr., Kim ES, Herbst RS. Cetuximab therapy for patients with advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Nature clinical practice Oncology* 2009;6:132-3.
29. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006;12:5064-73.
30. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and cellular biology* 1999;19:1-11.
31. Field JK, Spandidos DA, Stell PM, Vaughan ED, Evan GI, Moore JP. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 1989;4:1463-8.
32. Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suarez C. MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:504-7.
33. Porter MJ, Field JK, Leung SF, et al. The detection of the c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 1994;114:105-9.
34. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-62.
35. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009;45:324-34.
36. Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2005;114:242-8.

37. Haddad, R.I., et al., Human papillomavirus-associated head and neck cancer, Uptodate 2010 [2010 Jul 14] ; [9 screens]. Available from:URL: http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=head_can/14379&view=print
38. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 2012;30 Suppl 5:F55-70.
39. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews* 2003;16:1-17.
40. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401:70-9.
41. Hsueh PR. Human papillomavirus, genital warts, and vaccines. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 2009;42:101-6.
42. Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czegledy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *Journal of clinical pathology* 2005;58:51-5.
43. Derkay CS. Task force on recurrent respiratory papillomas. A preliminary report. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 1995;121:1386-91.
44. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine* 2003;348:518-27.
45. Schiffman M, Herrero R, Desalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005;337:76-84.
46. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006;110:525-41.
47. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Seminars in oncology* 2004;31:744-54.
48. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer science* 2007;98:1505-11.
49. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10:550-60.
50. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of virology* 1997;71:2449-56.
51. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* 2001;75:1565-70.
52. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
53. Flores ER, Lambert PF. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *Journal of virology* 1997;71:7167-79.
54. Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF. Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology* 1999;262:344-54.
55. Haddad, R.I, Human papillomavirus-associated head and neck cancer, Uptodate [serial online], 2010 jan; [9 screens]; Available from:URL: http://www.uptodate.com/online/content/topic/topic.do?Key=head_can/14379&print=view

56. Syrjanen SM, Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Annals of medicine* 1999;31:175-87.
57. Rolfe M, Beer-Romero P, Glass S, et al. Reconstitution of p53-ubiquitylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3264-8.
58. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993;75:495-505.
59. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 1998;17:2943-54.
60. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380:79-82.
61. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of virology* 2001;75:4467-72.
62. Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, Galloway DA. NFX1-123 increases hTERT expression and telomerase activity posttranscriptionally in human papillomavirus type 16 E6 keratinocytes. *Journal of virology* 2009;83:6446-56.
63. DeGregori J, Johnson DG. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* 2006;6:739-48.
64. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:684-91.
65. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-7.
66. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & development* 1997;11:2090-100.
67. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:6758-62.
68. Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, et al. Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *Journal of clinical microbiology* 1999;37:3514-7.
69. Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, et al. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *Journal of clinical microbiology* 2002;40:863-7.
70. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91:252-8.
71. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-50.
72. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 1999;49:33-64, 1.
73. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic

- regions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1983;80:3812-5.
74. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer research 1976;36:794.
75. WHO/ICO Information center on HPV and cancer (Accessed December 13, 2013, at <http://www.hpvcentre.net/dataquery.php>.)
76. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. The New England journal of medicine 1998;338:423-8.
77. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. The Journal of pediatrics 1998;132:277-84.
78. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. The Journal of pathology 1999;189:12-9.
79. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. International journal of cancer Journal international du cancer 2004;111:278-85.
80. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.
81. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA: a cancer journal for clinicians 2009;59:225-49.
82. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer research 1988;48:3282-7.
83. Lewin F, Norell SE, Johansson H, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. Cancer 1998;82:1367-75.
84. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. Journal of the National Cancer Institute 2000;92:709-20.
85. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 2005;14:467-75.
86. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010.
87. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010;60:277-300.
88. Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2010;21 Suppl 7:vii243-5.
89. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. Journal of the National Cancer Institute 2003;95:1772-83.

90. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003;107:394-400.
91. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *International journal of oral surgery* 1983;12:418-24.
92. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of virology* 1989;63:4417-21.
93. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101:412-23.
94. Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Current opinion in oncology* 1995;7:229-33.
95. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & neck oncology* 2010;2:15.
96. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007;121:1813-20.
97. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:736-47.
98. 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. *Human pathology* 1999;30:1221-5.
99. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *The American journal of pathology* 2003;162:747-53.
100. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer research* 1994;54:6078-82.
101. Shi W, Kato H, Perez-Ordenez B, et al. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:6213-21.
102. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2011;24:1295-305.
103. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *The Laryngoscope* 2007;117:2115-28.

104. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:4294-301.
105. Pickard RK, Xiao W, Broutian TR, He X, Gillison ML. The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18-30 years. *Sexually transmitted diseases* 2012;39:559-66.
106. Videla S, Darwich L, Canadas MP, et al. Natural history of human papillomavirus infections involving anal, penile, and oral sites among HIV-positive men. *Sexually transmitted diseases* 2013;40:3-10.
107. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31:259-66.
108. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100:407-20.
109. Westra WH. The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head and neck pathology* 2012;6 Suppl 1:S48-54.
110. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 2007;356:1944-56.
111. Koch WM. Clinical features of HPV-related head and neck squamous cell carcinoma: presentation and work-up. *Otolaryngologic clinics of North America* 2012;45:779-93.
112. Corey AS, Hudgins PA. Radiographic imaging of human papillomavirus related carcinomas of the oropharynx. *Head and neck pathology* 2012;6 Suppl 1:S25-40.
113. National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology Head and Neck Cancers (v2.2013) (Accessed August 22, 2013, 2013, at http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf.)
114. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100:261-9.
115. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 2010;363:24-35.
116. Gillison MH, J. Westra, W, et al. Survival outcomes by tumor human papillomavirus (HPV) status in stage III-IV oropharyngeal cancer (OPC) in RTOG 0129 *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:15S (abstract 6003).
117. Gillison ML. Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:5623-5.
118. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003;104:336-44.
119. Allen CT, Lewis JS, Jr., El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *The Laryngoscope* 2010;120:1756-72.

120. Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:5630-6.
121. Haughey BH, Hinni ML, Salassa JR, et al. Transoral laser microsurgery as primary treatment for advanced-stage oropharyngeal cancer: a United States multicenter study. *Head & neck* 2011;33:1683-94.
122. Petrelli F, Sarti E, Barni S. Predictive value of human papillomavirus in oropharyngeal carcinoma treated with radiotherapy: An updated systematic review and meta-analysis of 30 trials. *Head & neck* 2014;36:750-9.
123. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91:2081-6.
124. Kimple RJ, Harari PM. Is radiation dose reduction the right answer for HPV-positive head and neck cancer? *Oral oncology* 2013.
125. Nijman SM. Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS letters* 2011;585:1-6.
126. Jackson SP. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2009;37:483-94.
127. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 2007;35:7475-84.
128. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:220-8.
129. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005;434:864-70.
130. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PloS one* 2009;4:e6529.
131. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* 2009;11:973-9.
132. Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 1977;196:1456-8.
133. Gey G, Coffman W, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer research* 1952;12:264-5.
134. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes & development* 2010;24:2463-79.
135. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593-602.
136. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature cell biology* 2006;8:1053-63.
137. Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowekamp W. Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *The EMBO journal* 1987;6:139-44.

138. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;313:856-62.
139. Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2010;10:241-53.
140. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head & neck* 2007;29:163-88.
141. Cooper JS, Porter K, Mallin K, et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009;31:748-58.
142. Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, et al. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer research* 2008;68:5699-705.
143. Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, et al. Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Molecular and cellular biology* 2000;20:1436-47.
144. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:2619-26.
145. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, et al. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes & development* 2001;15:398-403.
146. Green H, Rheinwald JG, Sun TT. Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Progress in clinical and biological research* 1977;17:493-500.
147. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:9363-7.
148. Albin A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer research* 1987;47:3239-45.
149. Cifone MA, Fidler IJ. Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980;77:1039-43.
150. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Current opinion in cell biology* 1997;9:701-6.
151. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2002;7:247-60.
152. Sramkoski RM, Pretlow TG, 2nd, Giaconia JM, et al. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 1999;35:403-9.
153. Zhao JJ, Gjoerup OV, Subramanian RR, et al. Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer cell* 2003;3:483-95.
154. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005;436:660-5.
155. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in cell biology* 2001;11:S27-31.

156. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990;345:458-60.
157. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279:349-52.
158. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405-13.
159. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997;90:785-95.
160. Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, et al. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Molecular and cellular biology* 2002;22:5157-72.
161. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998;396:84-8.
162. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:729-40.
163. Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochimica et biophysica acta* 1991;1072:1-7.
164. Celprogen Human Oropharyngeal Normal Prim. Cell Culture (Accessed September 24th, 2013, 2013, at http://www.celprogen.com/index.php?route=product/product&product_id=2027.)
165. Celprogen Human Oropharyngeal Normal Cell Culture Serum Free Media. (Accessed September 24th, 2013, 2013, at http://www.celprogen.com/index.php?route=product/product&product_id=2034.)
166. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720-4.
167. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005;120:513-22.
168. Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Molecular and cellular biology* 2002;22:2111-23.
169. Sullivan CS, Pipas JM. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2002;66:179-202.
170. Yuan H, Veldman T, Rundell K, Schlegel R. Simian virus 40 small tumor antigen activates AKT and telomerase and induces anchorage-independent growth of human epithelial cells. *Journal of virology* 2002;76:10685-91.
171. Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 1993;75:887-97.
172. Cipriano R, Kan CE, Graham J, Danielpour D, Stampfer M, Jackson MW. TGF-beta signaling engages an ATM-CHEK2-p53-independent RAS-induced senescence and prevents malignant transformation in human mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:8668-73.

173. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & development* 2001;15:50-65.

Annexe 1 : Études évaluant la corrélation entre le statut VPH et la survie dans les carcinomes épidermoïde de la tête et cou

TABLE II.
Studies Evaluating Correlation Between HPV and Survival in HNSCC.

| Study | Year | N | Tumor Subsite | HPV Positivity (%) | HPV Types Detected | Method Used ¹ | Tissue Prep ² | Treatment ³ | Endpoints studied ⁴ | Survival advantage ⁵ | |
|-----------------------------------|------|-----|----------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----|
| All Site Survival Studies* | | | | | | | | | | | |
| Brandwein ⁽¹¹⁷⁾ | 1994 | 55 | Oral Cavity | 78 | — | PCR | FFPE | — | DSS | No | |
| | | | Oropharynx | 56 | | | | | | | |
| Clayman ⁽¹²¹⁾ | 1994 | 6 | Hypopharynx | 100 | — | PCR | FFPE | S/XRT | DSS | No** | |
| | | | Larynx | 41 | | | | | | LRC | No |
| Chiba ⁽¹⁰⁸⁾ | 1996 | 38 | Oral Cavity | 21 | 16 | PCR | FF | — | DFS | Yes | |
| Hanzl ⁽¹¹⁶⁾ | 1996 | 14 | Oral Cavity | 0 | 16/33 | PCR | FFPE | Mixed | OS | No | |
| | | | Oropharynx | 38 | | | | | | | |
| | | | Hypopharynx | 14 | | | | | | | |
| | | | Larynx | 5 | | | | | | | |
| Snijders ⁽¹¹⁶⁾ | 1996 | 63 | All sites | 21 | 16 | PCR | FFPE | — | OS | No | |
| Reithdorf ⁽¹²⁰⁾ | 1997 | 78 | Oral Cavity | 42 | 6/11/16/18 | PCR | FF | Mixed | OS | No | |
| | | | Oropharynx | 44 | | | | | | | |
| | | | Larynx | 67 | | | | | | | |
| Paz ⁽¹²¹⁾ | 1997 | 15 | Tonsil | 60 | 16/6 | PCR, SB | FF | — | OS | No | |
| | | | Other site | 11 | | | | | DSS | No | |
| Koch ⁽¹²²⁾ | 1999 | 211 | All sites | 18 | 16/33 | PCR | FF | — | OS | No | |
| Pinto ⁽¹²³⁾ | 1999 | 29 | Oral Cavity | 10 | — | PCR, SB | FFPE | — | OS | No | |
| | | | Pharynx | 30 | | | | | DFS | No | |
| | | | Larynx | 15 | | | | | | | |
| Shima ⁽¹²⁴⁾ | 2000 | 46 | Oral Cavity | 74 | 16/18 | PCR, SB | FF | — | OS | No | |
| Schwartz ⁽¹⁰⁹⁾ | 2001 | 254 | Oral Cavity | 16 | 16+ | PCR | FFPE | Mixed | OS | Yes ^{††} | |
| | | | | | | | | | DSS | Yes | |
| Ringstrom ⁽¹¹⁰⁾ | 2002 | 41 | Oral cavity | 5 | 16 | PCR | FF | — | OS | Yes | |
| | | | Oropharynx | 52 | | | | | DSS | Yes | |
| | | | Hypopharynx | 0 | | | | | | | |
| | | | Larynx | 10 | | | | | | | |
| | | | Other site | 0 | | | | | | | |
| Sek ⁽¹¹¹⁾ | 2002 | 32 | Mixed sites | 47 | 16/18 | PCR | FF | — | OS | Yes | |
| Dahlgren ⁽¹¹²⁾ | 2003 | 25 | Tonsil | 60 | 16/118/33 | PCR | FF | S/XRT | DSS | Yes | |
| Koskinen ⁽⁸⁴⁾ | 2003 | 5 | Tonsil | 100 | 6/16/33/51/52 | PCR, ISH | FF | — | OS | No | |
| | | | Tongue | 73 | | | | | | | |
| | | | Oral Cavity | 54 | | | | | | | |
| | | | Hypopharynx | 50 | | | | | | | |
| | | | Larynx | 50 | | | | | | | |
| Ritchie ⁽¹¹³⁾ | 2003 | 94 | Oral Cavity | 11 | 16/18/33 | PCR | FFPE | Mixed | OS | Yes | |
| | | | Oropharynx | 42 | | | | | | | |
| Azzimont ⁽¹²⁵⁾ | 2004 | 25 | Larynx | 56 | 16/18 | PCR | FFPE | — | OS | No | |
| | | | Tonsil | 56 | | | | | | | |
| Baez ⁽¹²⁶⁾ | 2004 | 36 | Oral Cavity | 36 | 16 | PCR | FF | — | OS | No | |
| | | | Oropharynx | 63 | | | | | DFS | No | |
| | | | Hypopharynx | 36 | | | | | | | |
| | | | Larynx | 46 | | | | | | | |
| Dahlgren ⁽¹¹⁴⁾ | 2004 | 85 | Oral Cavity | 2 | 16/18/33 | PCR | FFPE | S/XRT | DSS | Yes | |
| | | | Base of Tongue | 40 | | | | | | | |
| Hoffman ⁽¹²⁷⁾ | 2005 | 20 | Tonsil | 55 | 16/33 | PCR, SB | FF | S/XRT | OS | No | |
| | | | Oropharynx | 26 | | | | | DFS | No | |
| | | | Oral Cavity | 67 | | | | | | | |
| | | | Hypopharynx | 29 | | | | | | | |
| | | | Larynx | 26 | | | | | | | |

(Continued)

TABLE II
(Continued).

| Study | Year | N | Tumor Subsite | HPV Positivity (%) | HPV Types Detected | Method Used ¹ | Tissue Prep ² | Treatment ³ | Endpoints studied ⁴ | Survival advantage ⁵ |
|--|------|-----|---------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Kozomara ⁽¹²⁰⁾ | 2005 | 50 | Oral Cavity | 64 | 6/16/18/31 | PCR | FF/FFPE | S/XRT | OS | No** |
| Machtsb ⁽¹²⁰⁾ | 2005 | 90 | Larynx | 40 | 16/18 | PCR | FF | S/XRT | OS | no |
| Badaracco ⁽¹²⁰⁾ | 2007 | 60 | Oral Cavity | 13 | 16/33/35/38 | PCR | FFPE | — | OS | yes |
| | | 2 | Nasal Cavity | 100 | | | | | DFS | no |
| | | 10 | Oropharynx | 0 | | | | | | |
| | | 8 | Tonsil | 75 | | | | | | |
| | | 5 | Hypopharynx | 20 | | | | | | |
| | | 30 | Larynx | 13 | | | | | | |
| Fumisa ⁽¹¹²⁾ | 2007 | 266 | Oral cavity | 14 | 16 | PCR | FF/FFPE | — | OS | yes |
| | | 78 | Oropharynx | 19 | | | | | | |
| | | 33 | Hypopharynx | 18 | | | | | | |
| | | 90 | Larynx | 16 | | | | | | |
| Na ⁽¹¹⁶⁾ | 2007 | 70 | Oral Cavity | 0 | 16 | PCR | FFPE | Mixed | OS | yes |
| | | 38 | Tonsil | 24 | | | | | | |
| Sugiyama ⁽¹²⁰⁾ | 2007 | 66 | Oral Cavity | 36 | 16 | PCR | FFPE | Mixed | OS | no |
| Jo ⁽¹²⁰⁾ | 2009 | 14 | Oropharynx | 93 | 16 | PCR | FF/FFPE | C, S/XRT | OS | no |
| | | 10 | Other site | 10 | | | | | PFS | no |
| Oropharynx Survival Studies ⁷ | | | | | | | | | | |
| Portugal ⁽¹²²⁾ | 1997 | 58 | Oral Cavity | 7 | — | PCR | FFPE | — | OS tonsil | yes |
| | | 42 | Tonsil | 19 | | | | | OS all sites | no |
| Gillson ⁽⁷⁹⁾ | 2000 | 2 | Nasopharynx | 0 | 16/18/31/33 | PCR/ISH/SB | FF | Mixed | OS all sites | yes |
| | | 84 | Oral Cavity | 12 | | | | | DSS all sites | yes |
| | | 60 | Oropharynx | 57 | | | | | OS oropharynx | yes |
| | | 21 | Hypopharynx | 10 | | | | | DSS oropharynx | yes |
| | | 86 | Larynx | 19 | | | | | | |
| Friesland ⁽¹³⁴⁾ | 2001 | 34 | Tonsil | 41 | 16 | PCR | FFPE | XRT | OS | yes |
| | | | | | | | | | DFS | no |
| Lindel ⁽¹⁴²⁾ | 2001 | 99 | Oropharynx | 14 | 16/33/35/45 | PCR | FFPE | XRT/C | OS | no |
| Mellin ⁽⁶⁰⁾ | 2002 | 22 | Tonsil | 55 | 16/33 | PCR | FF | — | OS | no |
| | | | | | | | | | DSS | no |
| Strome ⁽¹⁴²⁾ | 2002 | 52 | Tonsil | 46 | 16/59 | PCR | FFPE | — | OS | no |
| | | | | | | | | | DFS | no |
| Klussman ⁽⁶²⁾ | 2003 | 34 | Tonsil | 53 | 16/33 | PCR | FFPE | S/C/XRT | OS | no |
| | | | | | | | | | DFS | no |
| LJ ⁽¹²²⁾ | 2003 | 67 | Tonsil | 46 | 16+ | PCR | FFPE | Mixed | DSS | yes |
| Mellin ⁽¹²⁰⁾ | 2003 | 60 | Tonsil | 45 | 16/33 | PCR | FFPE | XRT/S | DSS | yes |
| Wittekindt ⁽¹⁰⁰⁾ | 2005 | 34 | Tonsil | 53 | 16/18 | PCR | FF | — | OS | no |
| De Petri ⁽¹²⁷⁾ | 2006 | 23 | Oral Cavity | 39 | 16 | PCR | FFPE | — | DSS oropharynx | yes |
| | | 21 | Oropharynx | 52 | | | | | DSS oral cavity | no |
| Licitra ⁽⁶⁰⁾ | 2006 | 90 | Oropharynx | 19 | 16 | PCR | FFPE | S/XRT | OS | yes |
| Weinberger ⁽⁶⁴⁾ | 2006 | 79 | Oropharynx | 61 | 16 | PCR | FFPE | Mixed | OS | yes |
| | | | | | | | | | DFS | yes |
| Reiners ⁽²⁰⁾ | 2007 | 106 | Oropharynx | 28 | 16/33 | PCR | FFPE | - | OS | no |
| | | | | | | | | | DFS | no |
| Fakhry ⁽¹⁰²⁾ | 2008 | 62 | Oropharynx | 61 | 16/33/35 | ISH | FFPE | IC, CRT/S | OS all sites | yes |
| | | 34 | Larynx | 0 | | | | | PFS all sites | yes |
| | | | | | | | | | OS oropharynx | yes |
| | | | | | | | | | PFS oropharynx | yes |

(Continued)

TABLE II.
(Continued).

| Study | Year | N | Tumor Site(s) | HPV Positivity (%) | HPV Types Detected | Method Used [†] | Tissue Prep [‡] | Treatment [§] | Endpoints studied [¶] | Survival advantage [¶] |
|---------------------------|------|-----|---------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Hafkamp ⁽¹⁰³⁾ | 2008 | 81 | Tonsil | 41 | 16 | PCR/ISH | FFPE | Mixed | OS DSS | yes yes |
| Worden ⁽¹²⁸⁾ | 2008 | 26 | BOT | 62 | 16 | PCR | FFPE | IC, CRT/S | OS | yes |
| | | 16 | Tonsil | 69 | DSS | | | | | yes |
| Gillson ⁽⁹⁾ | 2009 | 323 | Oropharynx | 64 | 16+ | ISH | - | CRT | OS | yes |
| | | | | PFS | yes | | | | | |
| | | | | LRC | yes | | | | | |
| Haughey ⁽⁹³⁾ | 2009 | 174 | Oropharynx | 72 | — | ISH | FFPE | S, C/XRT | OS | yes |
| | | | | DFS | yes | | | | | |
| Ritta ⁽¹²⁶⁾ | 2009 | 25 | Oral Cavity | 36 | 16/6 | PCR | FFPE | S+ | OS oropharynx | yes |
| | | 22 | Oropharynx | 50 | OS other sites | | | | no | |
| | | 12 | Larynx | 58 | | | | | | |
| Sadaghat ⁽¹⁴²⁾ | 2009 | 49 | Oropharynx | 53 | 16 | ISH | FFPE | CRT | OS | yes |
| | | | | DSS | yes | | | | | |
| | | | | RFS | yes | | | | | |
| Sattler ⁽¹⁴¹⁾ | 2009 | 28 | Oral cavity | 11 | 16 | PCR | FFPE | CRT | OS oropharynx | yes ^{¶¶} |
| | | 119 | Oropharynx | 50 | | | | | | |
| | | 35 | Hypopharynx | 6 | | | | | | |
| | | 55 | Larynx | 7 | | | | | | |
| Shi ⁽⁴²⁾ | 2009 | 111 | Oropharynx | 66 | 16 | RT-PCR, ISH | FFPE | XRT, CRT | OS | Yes ^{¶¶} |
| | | | | DFS | Yes | | | | | |

[†]Studies that evaluate nonoropharynx sites or studies that include oropharynx but do not correlate oropharynx site with survival separately.

[‡]Studies that correlate oropharynx site with survival.

[§]PCR = polymerase chain reaction; ISH = in-situ hybridization; SB = Southern blot.

[¶]FFPE = formalin fixed paraffin embedded; FF = fresh frozen.

[§]S = surgery; XRT = external beam radiotherapy; C = chemotherapy; IC = induction chemotherapy; CRT = concurrent chemoradiotherapy.

[¶]DSS = disease-specific survival; LRC = local-regional control; DFS = disease-free survival; OS = overall survival; PFS = progression-free survival.

^{¶¶}Statistically significant ($P \leq 0.05$) for endpoint listed.

^{¶¶¶}Statistically significant for HPV positivity as a negative prognostic variable.

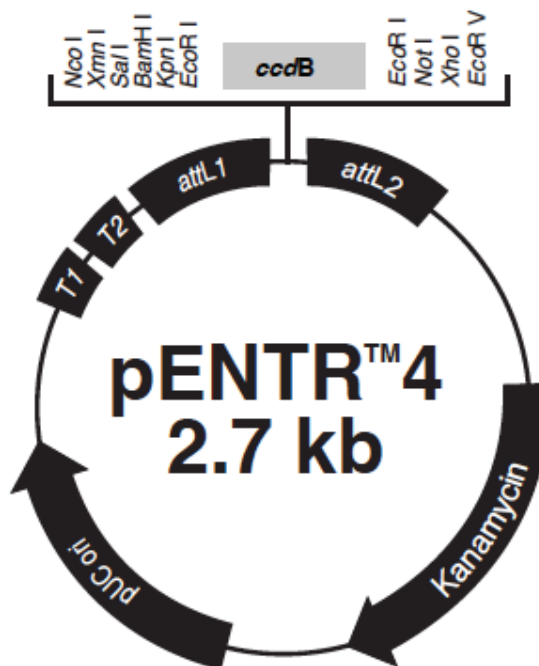
^{¶¶¶¶}Statistically significant for HPV type 16 only.

^{¶¶¶¶¶}Includes patients with tissue available for HPV analysis only.

^{¶¶¶¶¶¶}Significant improvement in overall survival with RT-PCR only on multivariate analysis.

Allen et al, Laryngoscope 2010

Annexe 2 : Carte topographique du vecteur d'entrée pENTR4



Comments for pENTRTM4 2720 nucleotides

rrnB T1 transcription termination sequence: bases 106-149

rrnB T2 transcription termination sequence: bases 281-308

attL1: bases 358-457 (complementary strand)

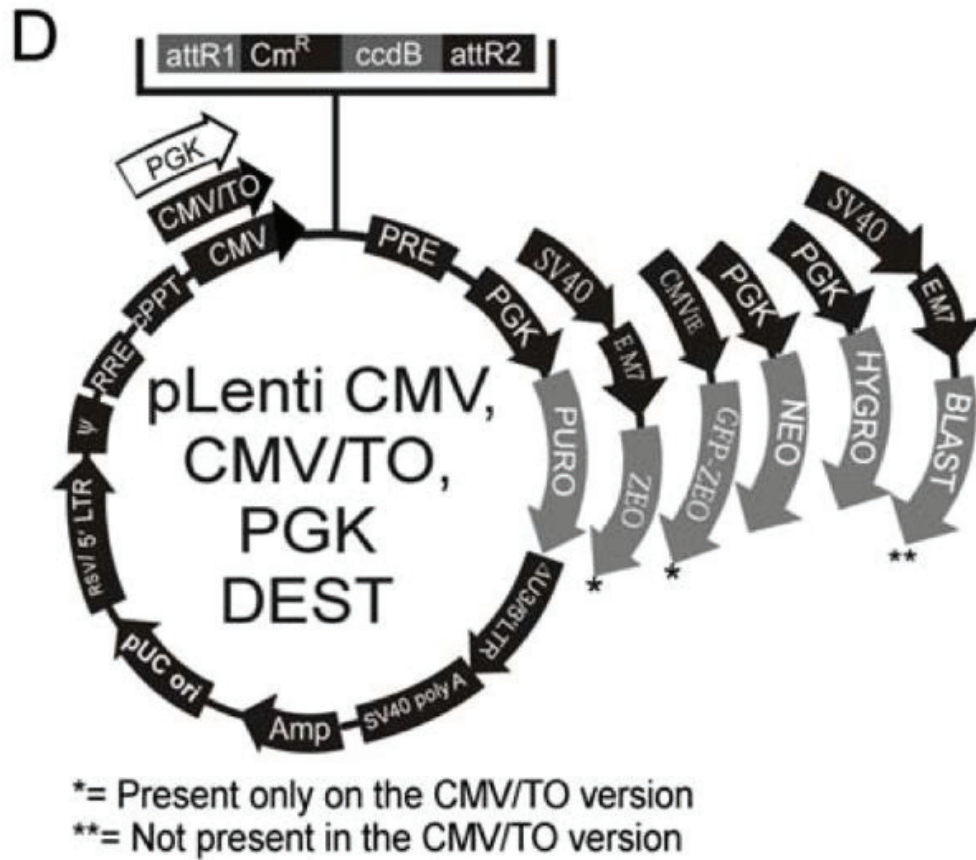
ccdB gene: bases 615-920

attL2: bases 949-1048

Kanamycin resistance gene: bases 1171-1980

pUC origin: bases 2044-2717

Annexe 3 : Carte topographique du vecteur d'entrée pLenti



Annexe 4

Préparation des milieux pour la mise en culture de cellules épithéliales humaines normales de l'oropharynx (HNOE)

- **Collagénase/Dispase** (5 mL pour chaque culture primaire)
Collagénase : 0.003-0.004g (Sigma, cat# C6885)
Dispase : 0.025-0.030g (Roche, cat# 165859)
Placer dans un tube conique de 15mL. Ajouter 10 mL de milieu SMEM sans Ca²⁺.
Filtrer à la seringue dans un tube conique. Ce milieu est bon pour une semaine.

- **SMEM sans Ca²⁺** (Bouteille de 500 mL - Gibco, cat# 21800-081)
Ajouter 5.225 g à 475 mL dH₂O
Autoclaver et refroidir à la température ambiante
Ajouter 3mL de solution de sodium bicarbonate à 7.5 % stérile
À ce milieu, ajouter en filtrant avec une seringue :
 1. 5 mL Anti-PPLO (Gibco, cat# 15220-056)
 2. 5 mL L-glutamine Pen-Srep (Sigma, cat# G6784)
 3. 3X Antibiotiques (750 µl gentamycine)Ajouter 500µl Fungizone (Gibco BRL, #15290-018) sans filtration.
Ajuster le pH à 7.2-7.4

- **KER-SFM Keratinocyte Serum Free Medium** (Invitrogen 10724)
KER_SFM Supplement Kit- (Invitrogen- 37000-15)
Faire des aliquotes de 50mL dans des tubes coniques ou des bouteilles de 100mL.
Ranger à 4 °C pour un mois. Ranger à -20 °C pour 6 mois. Le milieu peut être filtré, mais ceci n'est pas nécessaire. Une refiltration de routine n'est pas recommandée.

Annexe 5



Photographies de manipulations au laboratoire d'animalerie. Injection des lignées cellulaires sous-cutanée sous anesthésie générale.



Photographies de manipulations au laboratoire d'animalerie du suivi post-injection. Mesure du volume tumoral (mm^3) à l'aide d'un compas numérique.