



HAL
open science

IRM de perfusion des tumeurs de l'oropharynx : différenciation p16+/p16- en imagerie fonctionnelle

Anne-Laure Gaultier

► **To cite this version:**

Anne-Laure Gaultier. IRM de perfusion des tumeurs de l'oropharynx : différenciation p16+/p16- en imagerie fonctionnelle. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01113651

HAL Id: dumas-01113651

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01113651>

Submitted on 6 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2014

N°

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par Gaultier Anne-Laure Julie Flore

Née le 6 juillet 1983 à Rouen

Le 21 octobre 2014

IRM de perfusion des tumeurs de l'oropharynx, différenciation p16+/p16- en imagerie fonctionnelle

Directeur de thèse

Monsieur le Professeur Philippe Halimi

Rapporteur

Madame le Docteur Sophie Espinoza

Jury

Monsieur le Professeur Charles-André Cuénod, Président

Monsieur le Professeur Vincent Dousset

Monsieur le Professeur Ollivier Laccourreye

Madame le Docteur Frédérique Dubrulle

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Philippe Halimi, d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir apporté son enseignement au cours du dernier semestre. Je lui suis enfin très reconnaissante de m'accorder à nouveau sa confiance pour la prochaine étape de mon cursus hospitalier.

Je remercie Monsieur le Professeur Charles André Cuénod de me faire l'honneur de présider le jury. La lecture de ses travaux m'a grandement aidée dans la compréhension du sujet ardu qu'est la perfusion en IRM.

Je remercie Monsieur le Professeur Vincent Dousset, de m'avoir accueillie dans son service à Bordeaux et de m'avoir aidé, même à distance, dans mon parcours d'internat.

Je remercie Monsieur le Professeur Ollivier Laccourreye d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie Madame le Docteur Frédérique Dubrulle d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie chaleureusement le Docteur Sophie Espinoza qui a accepté d'être rapporteur, et dont l'aide m'a été précieuse pour m'orienter au cours de ce travail.

Je remercie aussi le Docteur Audray Lacan et le Docteur Idir Khettab de m'avoir apporté leurs connaissances en imagerie ORL. Je me rejouis de pouvoir continuer à travailler à leurs côtés.

Je remercie les Docteurs Cédric Revel et David Bourquard, du CHU La Réunion de m'avoir introduit à la médecine nucléaire ; je veillerai à entretenir mes acquis, en particulier dans le champ de l'ORL.

Enfin, je remercie du fond du cœur mes parents et ma famille de m'avoir soutenue, aidée et encouragée, même à 10000 kilomètres de distance depuis la France et l'Italie, pendant ces longues années d'étude.

SOMMAIRE

GLOSSAIRE	6
------------------------	----------

INTRODUCTION.....	8
--------------------------	----------

1 ANGIOGENESE.....	10
---------------------------	-----------

1.1 HISTORIQUE	10
1.2 DEFINITION.....	11
1.3 VASCULOGENESE, ANGIOGENESE, ARTERIOGENESE	12
1.4 ROLE DES FACTEURS DE CROISSANCE	13
1.5 ANGIOGENESE TUMORALE	15
1.5.1 SWITCH ANTIGENIQUE	15
1.5.2 ARCHITECTURE D'UN RESEAU VASCULAIRE TUMORAL.....	16
1.5.2.1 Morphologie d'un réseau vasculaire tumoral.....	16
1.5.2.2 Classification de Gee	17
1.5.3 ANATOMIE D'UN VAISSEAU TUMORAL	18
1.6 MOYENS D'ANALYSE DE L'ANGIOGENESE	19
1.6.1 HISTOLOGIE.....	19
1.6.2 IMAGERIE	19

2 IMAGERIE DE PERFUSION.....	21
-------------------------------------	-----------

2.1 OBJECTIF	21
2.2 CONTEXTE HISTORIQUE	21
2.3 PRINCIPE.....	21
2.3.1 PERFUSION SANS INJECTION DE PRODUIT DE CONTRASTE	22
2.3.1.1 ASL (Arterial Spin Labelling).....	22
2.3.1.2 BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent).....	23
2.3.2 PERFUSION AVEC INJECTION DE PRODUIT DE CONTRASTE.....	23
2.3.2.1 DSC-MRI	23
2.3.2.2 DCE-MRI	24
2.4 PARAMETRES DE MICROCIRCULATION	26
2.5 ANALYSE DU REHAUSSEMENT TUMORAL.....	27
2.5.1 MODELES D'ANALYSE VISUELLE OU QUALITATIVE	28
2.5.2 ANALYSE SEMI QUANTITATIVE SANS MODELE A VISEE PHYSIOLOGIQUE.....	29
2.5.2.1 Paramètres semi-quantitatifs sans modèle	29
2.5.2.2 Aire sous la courbe	30
2.5.2.3 Paramètres avec modèle heuristique.....	30
2.5.2.4 PARAMETRES SEMI QUANTITATIFS RELATIFS	31
2.5.3 ANALYSE QUANTITATIVE AVEC MODELE A VISEE PHYSIOLOGIQUE	31
2.5.3.1 Historique.....	31
2.5.3.2 Modèle bicompartimental.....	31
2.5.3.2 Les modèles de perfusion tissulaire.....	33
2.5.3.3 Les modèles de perméabilité	33
2.5.3.4 Les modèles dits complets.....	34
2.6 TECHNIQUE IRM.....	34
2.6.1 TYPE DE MESURE	34
2.6.2 PHASE DE PRE-INJECTION.....	34
2.6.3 PHASE D'INJECTION DE PRODUIT DE CONTRASTE	35
2.6.4 ETUDE DYNAMIQUE.....	35

2.6.5	CRITERES D'EVALUATION PRIMAIRES.....	35
2.6.6	EXIGENCES DE MESURE POUR DETERMINER KTRANS ET IAUGC.....	36
2.6.7	LES CRITERES SECONDAIRES	36
2.6.8	LA CONCEPTION DES ESSAIS.....	36
2.6.9	NOMENCLATURE	37
2.6.10	ANALYSE	37
2.6.11	ROI.....	37
2.7	INTERPRETATION DES PARAMETRES CINETIQUES	38
2.7.1	VALEUR DE PREDICTION DU STATUT HPV	38
2.7.2	VALEUR DIAGNOSTIQUE.....	39
2.7.3	VALEUR PREDICTIVE PRONOSTIQUE	40
2.8	EN PRATIQUE, L'EXPERIENCE DE L'HEGP.....	42
2.8.1	CHOIX DU MODELE.....	42
2.8.2	CHOIX DU PRODUIT DE CONTRASTE	43
2.8.3	PROTOCOLE IRM.....	43
2.8.4	POST TRAITEMENT AVEC OLEA SPHERE™	44

3 CARCINOMES EPIDERMOIDES OROPHARYNGES ET DE LA CAVITE BUCCALE ..46

3.1	INTRODUCTION	46
3.2	EPIDEMIOLOGIE	46
3.3	ETIOLOGIE.....	51
3.3.1	ALCOOL	51
3.3.2	TABAC.....	52
3.3.3	BINDI.....	54
3.3.4	MARIJUANA	54
3.3.5	HPV.....	54
3.3.6	HIV	54
3.3.7	GENETIQUE	54
3.3.8	TAILLE.....	55
3.3.9	AMIANTE	55
3.4	PHYSIOPATHOLOGIE – PATHOGENESE.....	55
3.4.1	CANCERISATION LOCOREGIONALE	55
3.4.2	TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE.....	56
3.4.3	MODIFICATIONS EPIGENETIQUES.....	56
3.4.4	VOIES DES SIGNAUX MOLECULAIRES POUR LA CARCINOGENESE	56
3.5	DIAGNOSTIC.....	56
3.5.1	IMAGERIE	56
3.5.2	CLASSIFICATION TNM.....	58
3.5.2.1	Classification tumorale.....	58
3.5.2.2	Classification ganglionnaire	59
3.5.3	ANATOMO-PATHOLOGIE	59
3.6	PRONOSTIC	60
3.7	TRAITEMENT	60

4 HPV ET HNSCC.....62

4.1	PAPILLOMAVIRUS HUMAINS.....	62
4.1.1	HISTORIQUE.....	62
4.1.2	TAXINOMIE	63
4.1.3	STRUCTURE DU VIRION.....	64
4.1.4	STRUCTURE DU GENOME VIRAL	65
4.1.5	FONCTIONS DES PRODUITS GENOMIQUES :	65
4.1.6	CYCLE VIRAL.....	66

4.1.6.1	Entrée.....	66
4.1.6.2	Etablissement d'un état infectieux non productif.....	66
4.1.6.3	Maintenance d'un état infectieux non productif.....	66
4.1.6.4	Etapas de production	67
4.2	EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION PAR HPV	67
4.2.1	POPULATION SAIN.....	68
4.2.2	POPULATION ATTEINTE PAR UN CANCER ORL.....	70
4.2.2.1	Carcinomes oropharyngés	70
4.2.2.2	Carcinomes ORL hors oropharynx.....	72
4.2.3	CLAIRANCE VIRALE	72
4.3	FACTEURS DE RISQUE	73
4.3.1	COMPORTEMENT SEXUEL ET PORTE D'ENTREE.....	73
4.3.2	GENRE.....	74
4.3.3	INTOXICATIONS ALCOOLIQUE ET TABAGIQUE	74
4.3.4	NIVEAU SOCIO-ECONOMIQUE	74
4.4	MECANISMES DE CARCINOGENESE SPECIFIQUES A HPV.....	75
4.5	CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES TUMEURS ORL LIEES A HPV	76
4.6	CARACTERISTIQUES ANATOMOPATHOLOGIQUES DES TUMEURS ORL LIEES A HPV	77
4.7	BIOMARQUEURS	77
4.7.1	HPV	77
4.7.2	p16.....	78
4.7.3	p53.....	78
4.7.4	ASSOCIATIONS DE MARQUEURS	78
5	<u>ETUDE HEGP</u>	<u>79</u>
5.1	OBJECTIF.....	80
5.2	MATERIEL ET METHODES	82
5.2.1	POPULATION.....	82
5.2.2	PLANIFICATION DE L'EXAMEN	83
5.2.3	PROTOCOLE IRM.....	83
5.2.4	POST-TRAITEMENT DES DONNEES DE PERFUSION.....	85
5.2.5	STATUTS p16 ET HPV	86
5.2.6	ANALYSE STATISTIQUE	87
5.3	RESULTATS	87
5.4	DISCUSSION.....	92
	<u>CONCLUSION</u>	<u>95</u>
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>96</u>

GLOSSAIRE

ADC	Apparent Coefficient Diffusion
AIF	Arterial Input Function
ASL	Arterial Spin Labeling
AUC	Area under the Curve
BAT	Bolus Arrival Time
BOLD	Blood Oxygenation Level Dependent
DCE-MRI	Dynamic Contrast Enhanced-MRI
DSC-MRI	Dynamic Susceptibility Contrast-MRI
Gd-DTPA	Gadopentétate Dimeglumine de gadolinium
EES	Extravascular Extracellular Space
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ETM	Extended Tofts Model
EVS	Extravascular Space
FOV	Field of View
F _T	Perfusion tissulaire
HPV	Human Papilloma Virus
hrHPV	high risk Human Papilloma Virus
HR	Hazard Ratio
IAUC	Initial Area under the Curve
IAUGC	Initial Area under the Gadolinium Curve
IC	Intervalle de Confiance
INHANCE	International Head and Neck Cancer Epidemiology
K _{ep}	Constante de vitesse
K ^{trans}	Constante de transfert
MVD	Micro Vascular Density
OR	Odds Ratio

ORF	Open Reading Frame
PA	Paquets-années
PACS	Picture Archiving and Communication System
PCI	Proliferating Capillary Index
PS	Perméabilité x Surface
ROI	Region of Interest
RR	Relative Risk
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SR	Sex Ratio
TME	Time to Maximal Enhancement
TPF	Taxotère Platine 5FU
TTM	Temps de Transit Moyen
TTP	Time to Peak
UCNT	Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type
URR	Upstream Regulatory Region
v_e	Fraction volumique interstitielle
v_s	Fraction volumique sanguine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

Les cancers de la sphère ORL sont les sixièmes cancers les plus communs dans le monde¹ et leur incidence est en augmentation constante quand on limite l'étude à la cavité orale et à la paroi oropharyngée². Il s'agit d'un problème de santé publique, cette localisation tumorale étant amenée à dépasser en nombre celle du col de l'utérus en 2020.³

Basés sur l'histologie, le siège et le stade de la lésion, les protocoles thérapeutiques sont lourds, aussi bien en radio-chimiothérapie qu'en chirurgie, à l'origine d'une morbi-mortalité non négligeable.

Or, les études récentes notent l'importante progression de l'incidence de l'infection par le virus HPV, facteur étiologique des carcinomes épidermoïdes⁴ au sein d'une fraction plus jeune des patients⁵, indépendamment de la consommation alcoolique⁶ et du tabagisme^{6,7}. Les caractéristiques pronostiques de ces tumeurs en sont modifiées, avec une survie plus longue, en partie par une meilleure réponse au traitement.⁸

De ce fait, il apparaît nécessaire de pouvoir stratifier précocement les patients quant à leur pronostic, en particulier face à la réponse thérapeutique attendue, afin d'adapter les protocoles thérapeutiques à chaque patient et limiter les complications dues à un traitement trop intensif.

L'imagerie fonctionnelle par IRM est une technique relativement récente permettant de caractériser les tumeurs en fonction de leurs paramètres microcirculatoires. L'IRM est non invasive et reproductible, réalisée en routine clinique pour le bilan initial des lésions ORL ; il apparaît donc pratique, rapide et peu coûteux de compléter l'analyse morphologique par une séquence de perfusion.

Le but de cette étude est de chercher une corrélation entre des biomarqueurs de perfusion et perméabilité en IRM et les marqueurs biologiques de bon pronostic liés à l'infection par le virus HPV, pour des patients diagnostiqués avec un carcinome épidermoïde oropharyngé.

Nous reprendrons dans un premier temps les mécanismes de l'angiogenèse, qui joue un rôle central dans le développement local et à distance des tumeurs. Elle entre aussi en jeu dans la réponse thérapeutique, du fait des nouvelles molécules antiangiogéniques.

Comprendre la physiopathologie de la vascularisation tumorale a en outre permis de développer des outils performants d'imagerie tumorale, tant sur le plan diagnostique, pronostique que de surveillance. Nous les détaillerons dans un deuxième temps, avec le cas de l'IRM de perfusion. Elle a bénéficié d'avancées techniques majeures améliorant dans un premier temps ses performances morphologiques. Plus récemment, les progrès se sont concentrés sur le volet fonctionnel, à la recherche de biomarqueurs pronostiques

permettant une caractérisation quantitative des tumeurs, ce qui a constitué un bouleversement notable dans la façon de penser l'imagerie.

Nous rappellerons ensuite les caractéristiques des carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL, avant de voir en quoi diffèrent ceux qui sont liées à HPV, sur le plan démographique, de la clinique, de l'imagerie et quels en sont les biomarqueurs spécifiques retenus dans la littérature.

Enfin, nous décrirons l'étude rétrospective menée dans l'établissement à l'occasion des bilans d'IRM diagnostiques de tumeurs oropharyngées. Elle consistait en la recherche de biomarqueurs d'IRM de perméabilité qui soient corrélés au statut p16 des patients, marqueur indirect mais reconnu de l'infection par HPV, et donc marqueur de bon pronostic.

1 ANGIOGENESE

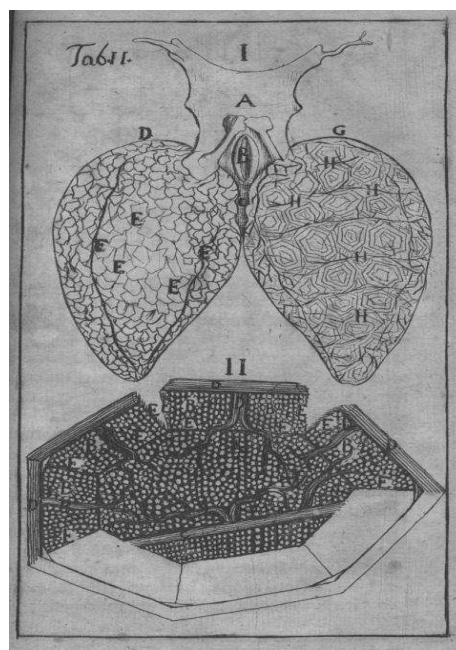
1.1 Historique

En 1242, un médecin arabe du nom de Ibn Nafis, formé à Damas puis exerçant au Caire, décrivait dans son ouvrage *Al-Shamil fi al-Tibb*⁹ (*Commentaires sur l'Anatomie du Canon de la médecine d'Ibn Sina*) le principe de la circulation sanguine et celui de la circulation pulmonaire, réfutant pour la première fois les théories avancées par Galien 1000 ans plus tôt et celles retenues par Avicenne au XI^{ème} siècle.

L'idée d'une circulation pulmonaire est redécouverte pour la première fois en Occident par le médecin et théologien espagnol Michael Servetus, mais ne diffuse pas parmi ses contemporains car il la publie en 1553 dans *Christianismi Restitutio*, ouvrage de théologie et non de médecine, par ailleurs jugé hérétique par l'Inquisition.⁹

Elle est ensuite redéveloppée successivement par Vésale dans la seconde édition de son traité *De humani corporis fabrica* en 1555, puis par son confrère et rival Realdo Colombo, chirurgien italien, dans *De Re Anatomica* (1559), pour être finalement reprise, complétée et détaillée par William Harvey en 1628 dans son œuvre *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*.⁹

En 1661, celui qui est considéré comme le père de l'histologie, le médecin italien Marcello Malpighi, décrit le réseau capillaire dans son ouvrage *De pulmonibus observationes anatomicae*.¹⁰



Bien plus tard, en 1865, le mot « endothélium » est introduit par le professeur de physiologie et d'anatomie Wilhelm His, Sr. dans son essai *Die Häute und Höhlen des Körpers* (*Les membranes et cavités du corps*), poursuivant les travaux de Xavier Bichat. Il y décrit une membrane perméable au sérum :

*« Il y a une autre différence frappante entre l'épithélium et l'endothélium: le sérum peut passer librement au travers de ce dernier, en n'importe quel endroit ; parfois il filtre à travers l'endothélium et quitte les vaisseaux afin d'aller nourrir les tissus périphériques ; parfois il passe des tissus au système lymphatique ou au sein de cavités séreuses, suivant une simple pression de gradient. Ceci implique que l'endothélium ne constitue pas une barrière stricte entre les cavités et le milieu intercellulaire du mésoderme ».*¹¹

Les travaux de l'anatomiste allemand Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz précisent la nature de l'endothélium, mais sa fonction admise reste celle d'un revêtement passif du système circulatoire.¹²

Le caractère actif de la membrane est introduit en 1884 par le pathologiste George Hare Philipson :

*“Alterations in the amount of transudation may thus be referable, not to disturbance of the circulation, but to changes in the vessel-wall, and especially in the endothelial lining. The vessel-wall may, in fact, be made more permeable for the corpuscles, as well as for the liquid constituents of the blood, by various causes.”*¹³

En 1927, Eugene Landis détaille les mécanismes du flux au travers des parois capillaires, proportionnel aux forces osmotiques et hydrostatiques de part et d'autre de la membrane.¹⁴

L'arrivée de la microscopie électronique permet aux scientifiques de préciser l'anatomie de la couche endothéliale. George Emil Palade présente la structure fine des capillaires sanguins en 1953, en marge de ses travaux sur le ribosome qui lui vaudront plus tard un prix Nobel. Il ne peut toutefois mettre en évidence les pores dont la présence était préalablement postulée par les physiologistes afin d'expliquer les flux transmembranaires qu'ils constataient.¹⁵

Il faudra enfin attendre de pouvoir cultiver les cellules endothéliales dans les années 1980 avant de démontrer le lien entre inflammation et modifications structurales de l'endothélium, connu sous le terme d'activation endothéliale.¹⁶

1.2 Définition

L'angiogénèse est un processus biologique complexe de formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant ; ce phénomène est le plus souvent

physiologique, tout d'abord lors de l'embryogénèse avec la croissance des organes, puis lors des phénomènes de réparation tout au long de la vie.

Mais l'angiogénèse peut aussi survenir dans des conditions pathologiques très variables, au cours de la formation des tumeurs malignes comme au cours de processus infectieux, inflammatoires ou ischémiques.

Dans certains cas, elle fait défaut, aboutissant à un arrêt ou à l'absence de croissance ou de maintenance des vaisseaux, comme on peut le retrouver en pathologie cardiaque, neurovasculaire ou neurodégénérative.

Dans d'autres cas, c'est au contraire une absence de régulation de la croissance des vaisseaux qui est à l'origine d'un développement disproportionné et anarchique de leur réseau : les cancers ou les états inflammatoires en sont les exemples les plus caractéristiques.

Depuis les quinze dernières années, la communauté scientifique a entrepris d'exploiter cette voie physiopathologique afin de trouver de nouveaux types de traitements, aussi bien dans le sens de la thérapie proangiogénique que dans celui des antiangiogéniques.

1.3 Vasculogénèse, angiogénèse, artériogénèse

A partir des angioblastes, précurseurs partageant des origines avec les progéniteurs des lignées hématopoïétiques, les vaisseaux se forment chez l'embryon afin d'apporter aux organes l'oxygène et les médiateurs de trophicité nécessaires pour guider leur morphogénèse (figure 1.1).

Le réseau primitif, labyrinthe de capillaires constitué de novo à partir des progéniteurs, est le produit de la vasculogénèse.

La différenciation et l'organisation de ce plexus vasculaire primitif en un réseau de vaisseaux de calibre progressivement décroissant avec la ramification de ses branches constitue la phase angiogénique.

La fixation de péricytes et de cellules musculaires lisses à l'endothélium des capillaires permet leur maturation et leur stabilisation, en synergie avec le facteur pro-angiogénique VEGF (Vascular Endothelial cell Growth Factor) que les péricytes laissent passer ; c'est la phase d'artériogénèse.¹⁷

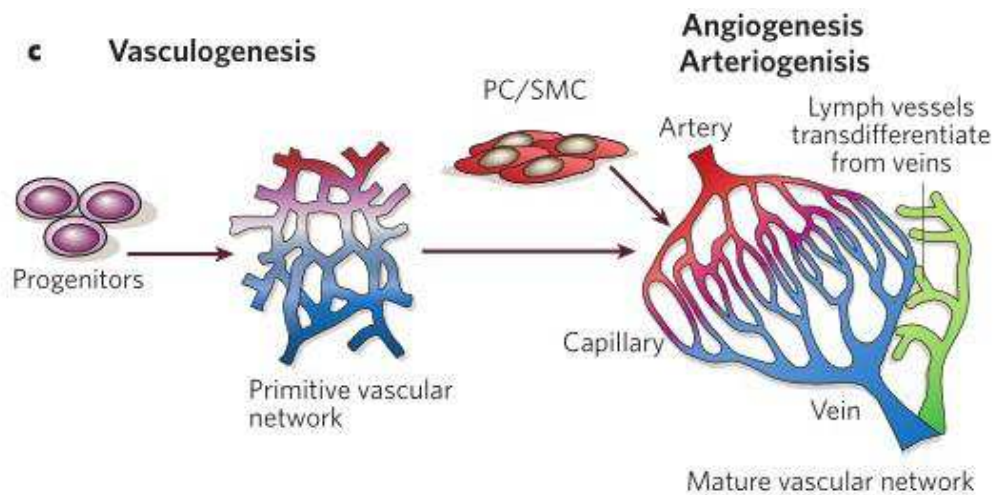


Figure 1.1 Vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse, Carmeliet 2005

1.4 Rôle des facteurs de croissance

L'organisation du plexus vasculaire primitif par la germination, la prolifération, la migration, la division et la régression de nouveaux vaisseaux est programmée génétiquement, obéissant à des facteurs intrinsèques que constituent trois familles de facteurs de croissance (figure 1.2):

- les VEGFs, qui sont promoteurs de la prolifération cellulaire endothéliale et d'une hyperperméabilité capillaire en conditions pathologiques (tumeurs, inflammation, rétinopathies, etc.).¹⁸
- les angiopoïétines « Ang », dont certaines (Ang1) maintiennent en quiescence et stabilisent les vaisseaux, d'autres (dont Ang2) pouvant être antagonistes et déstabiliser l'équilibre du système vasculaire, à l'origine du remodelage endothélial.¹⁹
- les éphrines, qui jouent un rôle dans la différenciation artère-veine.²⁰

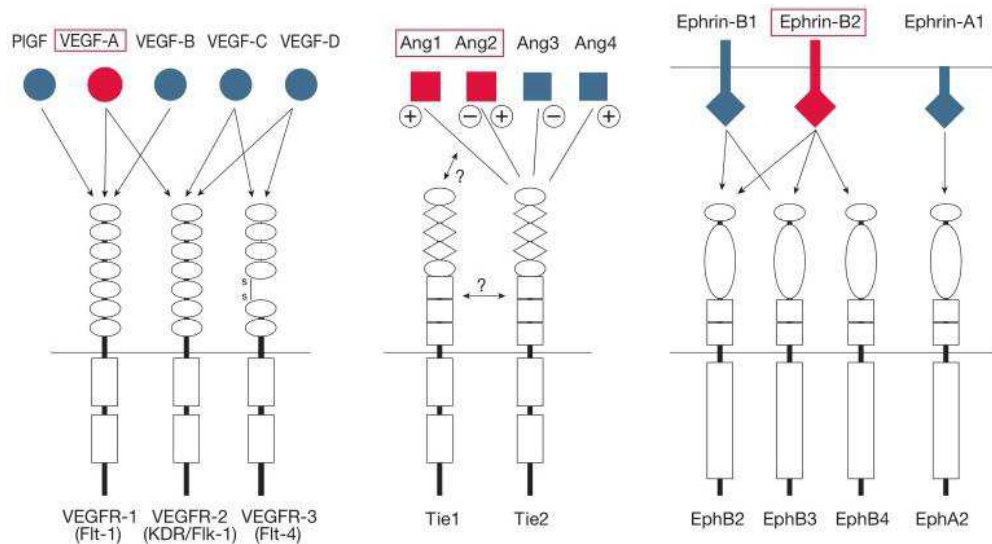


Figure 1.2 Facteurs de croissance de l'angiogénèse, Yancopoulos 2000 ²¹

VEGF et Ang1 ont des rôles cruciaux mais qui s'opposent sur les interactions entre l'endothélium et le milieu extravasculaire. La surexpression de VEGF aboutit à une augmentation du nombre de vaisseaux qui apparaissent immatures, à l'origine de fuites au travers de l'endothélium. Au contraire, la surexpression de Ang1 engendre une augmentation du calibre des vaisseaux et une maximisation des interactions entre les cellules endothéliales et leur matrice de soutien, les rendant résistant aux fuites.²²

Ang1 contre ainsi les effets de VEGF sur la perméabilité (figure 1.3).

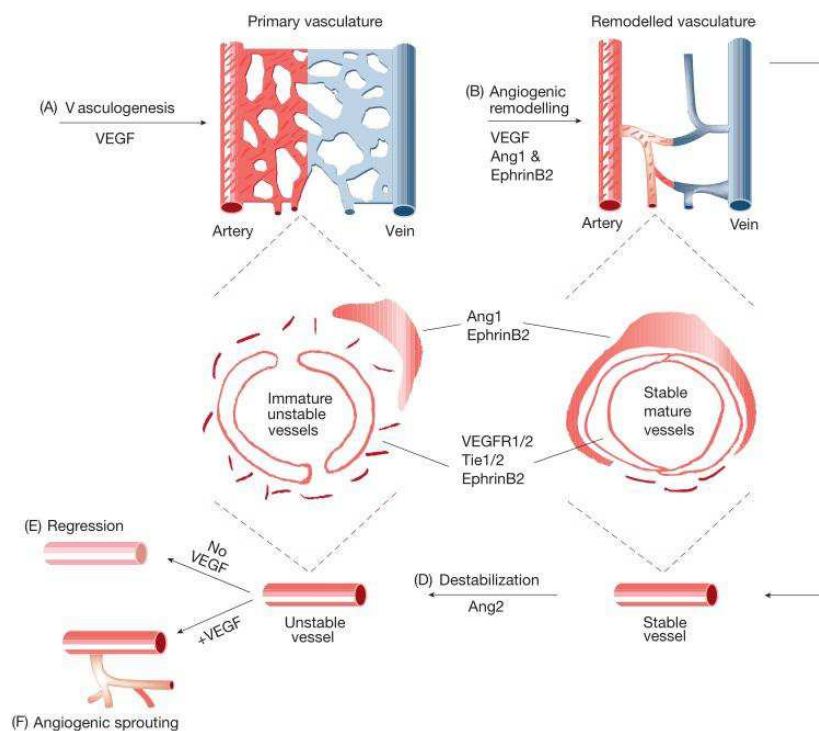


Figure 1.3 Action des facteurs de croissance sur l'angiogénèse, Yancopoulos 2000

1.5 Angiogenèse tumorale

Après la naissance, passée la phase d'organogenèse, l'angiogenèse se poursuit durant la phase de croissance des organes.

A l'âge adulte, les vaisseaux restent quiescents, exception faite au cours du cycle ovarien et pour le placenta au cours de la grossesse.

Les cellules endothéliales gardent toutefois leur capacité d'activation et de division rapide face à un stimulus physiologique comme l'hypoxie.

D'autres conditions pathologiques aboutissent à la déstabilisation et à la réactivation des cellules endothéliales : cancers, pathologies inflammatoires, ophtalmologiques, auto-immunes, obésité, asthme, diabète.

Nous nous intéresserons par la suite aux mécanismes de l'angiogenèse entrant dans le cadre tumoral, ainsi qu'aux moyens d'exploration à notre disposition.

1.5.1 Switch antigénique

Une tumeur de taille inférieure à 2-3 millimètres peut rester en environnement avasculaire, les mécanismes de diffusion lui suffisant à assimiler les nutriments nécessaires à sa survie.

Au-delà de cette taille, le développement d'une vascularisation est nécessaire par réactivation de l'angiogenèse chez son hôte en utilisant les facteurs de croissance déjà décrits.²³ Il se produit un déséquilibre entre les processus proangiogéniques et antiangiogéniques, en faveur de la néoangiogenèse : c'est le switch angiogénique. Le mécanisme est complexe, faisant intervenir, outre les agents angiogéniques, les cellules du stroma tumoral, les progéniteurs endothéliaux et les acteurs de l'immunité cellulaire.²⁴

Dans le cadre de la croissance tumorale, deux situations doivent être distinguées : les tumeurs originellement avasculaires et celles se développant en terrain vascularisé (figure 1.4).

Dans le premier cas, les tumeurs ne bénéficient pas d'apports vasculaires à la phase précoce de leur développement, comme c'est le cas de tumeurs épithéliales qui doivent franchir la membrane basale pour atteindre les vaisseaux sous-jacents. Ces tumeurs sont donc initialement en environnement hypoxique et sécrètent des facteurs de croissance endothéliaux (VEGF) afin de permettre leur croissance à distance du réseau vasculaire systémique.²⁵

Dans le deuxième cas, les tumeurs se développent en environnement vascularisé. Divers mécanismes de défense immunitaire vont entraîner une régression des vaisseaux de l'hôte, en partie par apoptose endothéliale, rendant la tumeur secondairement

avasculaire. Face à cette nouvelle situation d'hypoxie, la tumeur se nécrose en son centre ; mais par la surexpression de facteurs de croissance endothéliaux (VEGF, Ang2), elle peut développer une néo-angiogenèse robuste en périphérie, survivre aux mécanismes de défense de l'hôte, voire poursuivre sa croissance.²⁶

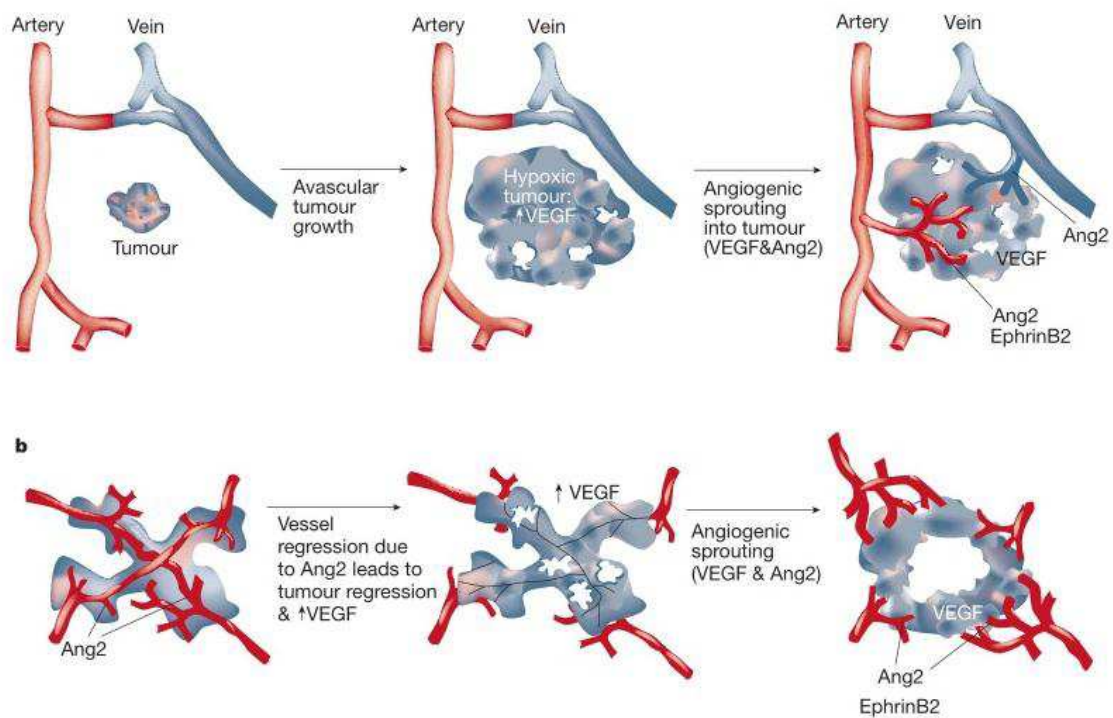


Figure 1.4 a. Tumeur en environnement hypoxique ; b. Tumeur en environnement vascularisé, Yancopoulos 2000

1.5.2 Architecture d'un réseau vasculaire tumoral

Contrairement à un réseau vasculaire physiologique, la vascularisation tumorale est de type « immature », désorganisée, aux vaisseaux fragiles et de perméabilité excessive.

1.5.2.1 Morphologie d'un réseau vasculaire tumoral

Le réseau vasculaire tumoral est chaotique (figure 1.5), avec des vaisseaux présentant des trajectoires irrégulières et tortueuses ; rarement, leurs trajets sont plus complexes et forment des boucles. Ils forment souvent des shunts artério-veineux.

Le schéma de répartition du réseau dans l'espace est déséquilibré, la plus grande densité de vaisseaux se trouvant en formation circconférentielle sur le front tumoral, en particulier pour les tumeurs peu différenciées.

Les vaisseaux sont préférentiellement disposés en périphérie des îlots de prolifération carcinomateuse, en manteau, d'où ils envoient des branches perforantes de direction centripète.

En zone d'inflammation du stroma tumoral, leur densité est aussi augmentée.²⁷

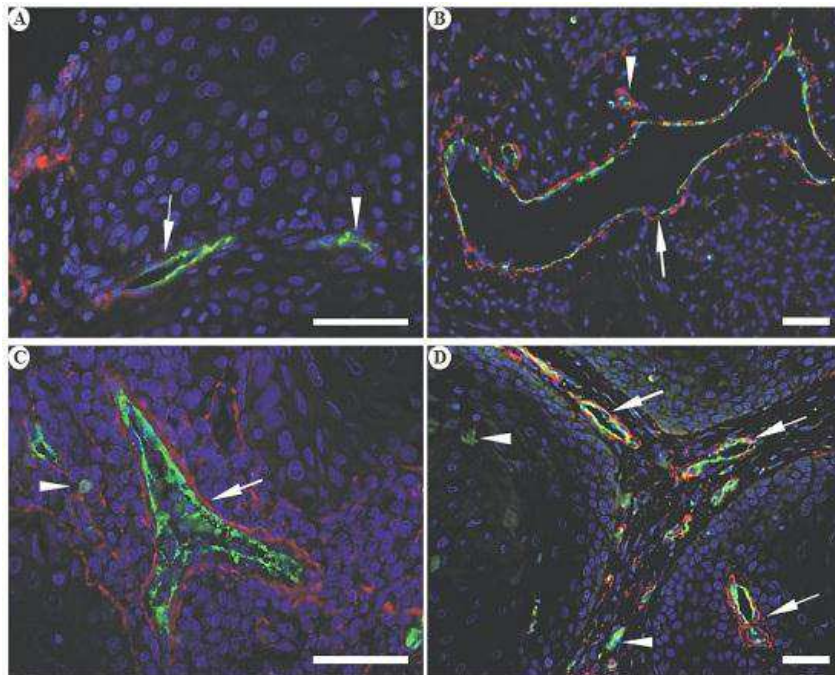


Figure 1.5 Microscopie optique : coupes de vaisseaux de tumeur oropharyngée après coloration de CD105 (vert) et du collagène type IV (rouge). A. Vaisseaux sans membrane basale (MB) (flèche), pousses endothéliales (tête de flèche) ; B. MB discontinue (flèche) ; C. MB épaisse et continue détachée de l'endothélium (flèche), cellule endothéliale isolée (tête de flèche) ; D. vaisseaux à MB de qualité variable, Mărgăritescu 2008

Par ailleurs, considérant l'index de prolifération capillaire (PCI – Proliferating Capillary Index), rapport du nombre de capillaires avec endothélium prolifératif sur celui du nombre total de capillaires, il est le plus élevé dans les tumeurs faiblement différenciées.²⁷

Les marqueurs de la néoangiogenèse comme l'endogline ou CD105, spécifique des cellules endothéliales en phase angiogénique, sont le plus souvent marqués dans ces secteurs de forte densité microvasculaire.²⁸

Plusieurs classifications des vaisseaux tumoraux ont été décrites en fonction des anomalies rencontrées. La plus récente, simplifiée, est présentée par Gee en 2003, selon la taille, la perfusion, la prolifération endothéliale et la présence de péricytes.

1.5.2.2 Classification de Gee

- Type immature : bourgeons non perfusés constitués de cellules endothéliales, sans membrane basale, sans péricyte, hautement prolifératifs, émanant pour plus de 95% de l'extrémité distale (sans péricytes) de vaisseaux fonctionnels

- Type intermédiaire : petits vaisseaux (section 35-185 μm^2) perfusés avec membrane basale d'épaisseur variable et corpuscules de Weibel-Palade, mais sans couverture péricytaire (33-43%)
- Type mature : larges vaisseaux (section 215-645 μm^2) avec prédominance de péricytes, cellules endothéliales quiescentes avec corpuscules de Weibel-Palade et quelques bourgeons associés. (33-43%).²⁹

Les types de vaisseaux immatures et intermédiaires prédominent au sein des tumeurs. En région centro-tumorale, les vaisseaux sont d'autant plus immatures, non fonctionnels, sans péricyte, sans membrane basale, et au taux de prolifération le plus élevé.²⁷

Il a été démontré que les caractéristiques de la vascularisation se modifient avec la taille tumorale, une masse très volumineuse présentant moins de bourgeons et une plus grande proportion de vaisseaux matures. Le degré de maturation d'un vaisseau est lié à son envahissement péricytaire, qui marque un arrêt de sa plasticité.²⁹

En revanche, plus la croissance de la tumeur est rapide, plus la proportion de vaisseaux immatures est élevée, permettant un remodelage et une adaptation du réseau à la masse tumorale.

1.5.3 Anatomie d'un vaisseau tumoral

Les vaisseaux adoptent des trajets désordonnés et présentent de nombreuses atypies anatomiques ; leur lumière est de calibre très variable, au plus large et de section ovale sur le front tumoral, plus réduite en région centro-tumorale, parfois absente.

Le diamètre global des vaisseaux est variable mais les capillaires de petite taille (moins de 15 microns) sont surreprésentés.

Les cellules endothéliales peuvent être largement espacées entre elles.

Du fait de la distribution chaotique du réseau, les flux sont instables³⁰, voire réversibles en raison de l'augmentation de la pression interstitielle, qui va s'équilibrer avec la pression intra vasculaire, aboutissant finalement à une réduction du flux intra vasculaire.³¹

La masse tumorale exerce une pression sur les vaisseaux dont les parois peuvent s'effondrer, réduisant le flux vasculaire à la tumeur, favorisant l'hypoxie et l'acidose.³²

Il a par ailleurs été montré que les tumeurs en environnement hypoxique et acide sont plus agressives : l'acidose promeut les mutations et l'échappement aux mécanismes apoptotiques, tandis que l'hypoxie favorise la production de cytokines facilitant la survenue de métastases.³³

1.6 Moyens d'analyse de l'angiogenèse

1.6.1 Histologie

La mesure de densité des vaisseaux, pour l'étude de la néo-angiogenèse, est la méthode de référence pour de nombreuses localisations tumorales. Elle consiste en l'opération de décompte du nombre de vaisseaux par unité de surface donnée sur une coupe histologique.³⁴

Après coloration visant des marqueurs membranaires de l'endothélium, les vaisseaux sont en général comptés par champs de grossissement à x200, après sélection des zones de densité vasculaire maximale « hot spot » à plus faible grossissement (x40 et x100).

La sélection de marqueurs spécifiques de la néoangiogenèse, comme CD105, plutôt qu'un anticorps plus universel comme l'antigène anti-facteur VIII, améliore la spécificité de la méthode.

Cette méthode est cependant peu reproductible, car sujette à une forte variation intra et inter-observateur, en raison d'une absence de standardisation des protocoles et de l'absence de seuils reconnus.

Par ailleurs, bien qu'il soit supposé que les tumeurs présentant une forte densité microvasculaire répondent mieux aux thérapies antiangiogéniques, les résultats des études testant la validité de ce marqueur face à l'efficacité des traitements et au pronostic de la maladie sont contradictoires.³⁵ Une méta-analyse récente par Yu (2014) ne retrouve pas de corrélation entre la survie globale au carcinome épidermoïde ORL et la valeur de MVD (RR = 1.23; IC95% [0.99-1.52]).³⁶

1.6.2 Imagerie

L'imagerie est une méthode d'étude la microcirculation qui a gagné une place prépondérante en médecine du fait de sa disponibilité, de sa reproductibilité et qu'elle permet l'étude in vivo, de façon non invasive des tissus.

Elle permet dans le cas de l'imagerie en coupe, outre l'analyse fonctionnelle de la circulation lésionnelle, de réaliser l'étude morphologique des organes.

Les techniques d'imagerie de la microcirculation ont d'abord été développées en médecine nucléaire avec la tomographie par émission de positon (TEP - PET) désormais couplé au scanner pour une étude morphologique précise, et la tomographie d'émission monophotonique (TEMP - SPECT).

Dans le domaine de la radiologie, l'analyse de la microcirculation a concerné le scanner, l'échographie, puis l'IRM plus tardivement.

Nous verrons que L'IRM fonctionnelle de perfusion peut devenir un biomarqueur du pronostic et de la réponse thérapeutique. Afin d'évaluer l'efficacité des traitements antiangiogéniques, la DCE-MR pourrait permettre d'analyser de façon non invasive et quantitative la vascularisation tumorale. Cette méthode est sensible aux modifications fines de la vascularisation par l'analyse des paramètres de perméabilité et de perfusion, des fractions volumiques vasculaires et extracellulaires.³⁷

2 IMAGERIE DE PERFUSION

2.1 Objectif

L'imagerie de perfusion a pour objectif d'étudier la microcirculation au sein des capillaires sanguins et permet d'obtenir des données morphologiques et fonctionnelles sur ce milieu.

L'intérêt porté aux informations à l'échelle du capillaire tient au fait que les modifications liées aux pathologies y sont visibles plus précocement qu'à l'échelle de l'organe, comme on peut les explorer en imagerie morphologique.

Les paramètres de perfusion, en tant que marqueurs du métabolisme tumoral, pourrait donc être plus sensibles et spécifiques que les caractéristiques volumiques habituellement prises en compte dans l'évaluation des tumeurs (par exemple : critères RECIST).

Dans les essais thérapeutiques en phase précoce, pour l'évaluation des agents antiangiogéniques ou cytotoxiques, le critère de volume tumoral n'est pas suffisamment sensible pour évaluer la réponse biologique de leur activité. L'imagerie fonctionnelle peut fournir des informations spécifiques plus pertinentes que l'imagerie conventionnelle pour l'évaluation des thérapies visant la vascularisation tumorale.

2.2 Contexte historique

Les physiologistes Angelo Mosso en 1881³⁸ et Roy et Sherrington en 1890³⁹ sont les premiers scientifiques à évaluer les variations quantitatives de la microcirculation dans le domaine de la neurologie.

Les techniques d'imagerie de perfusion ont été développées en médecine nucléaire avant de l'être en radiologie, tout d'abord avec le scanner, avec l'échographie, puis avec l'IRM après une phase d'amélioration des techniques morphologiques.

L'intérêt et le développement récent de l'imagerie quantitative par IRM réside dans la possibilité d'extraire des données quantitatives des images acquises afin de juger du degré des modifications apportées par un état pathologique comparativement à la norme connue. C'est une technique non invasive et non irradiante analysant les données pharmacodynamiques d'un produit de contraste de faible poids moléculaire qui, en traversant un tissu pathologique, permet de déduire les altérations locales de la perméabilité vasculaire.

2.3 Principe

Il s'agit d'analyser le schéma de rehaussement d'un tissu, c'est-à-dire la cinétique du passage au travers des parois capillaires d'un produit de contraste après son injection dans le système vasculaire.

Il faut pour cela réaliser, à rythme rapide, l'acquisition de séries d'images centrées sur le volume étudié, débutée pendant l'injection, avant même l'arrivée du produit de contraste sur la région d'intérêt (ROI - Region of Interest) et poursuivie pendant un temps donné après l'arrivée du produit de contraste.

Il est alors possible de générer, pour un voxel ou une ROI donnés, une courbe d'intensité de signal en fonction du temps pour le tissu considéré (figure 2.1)

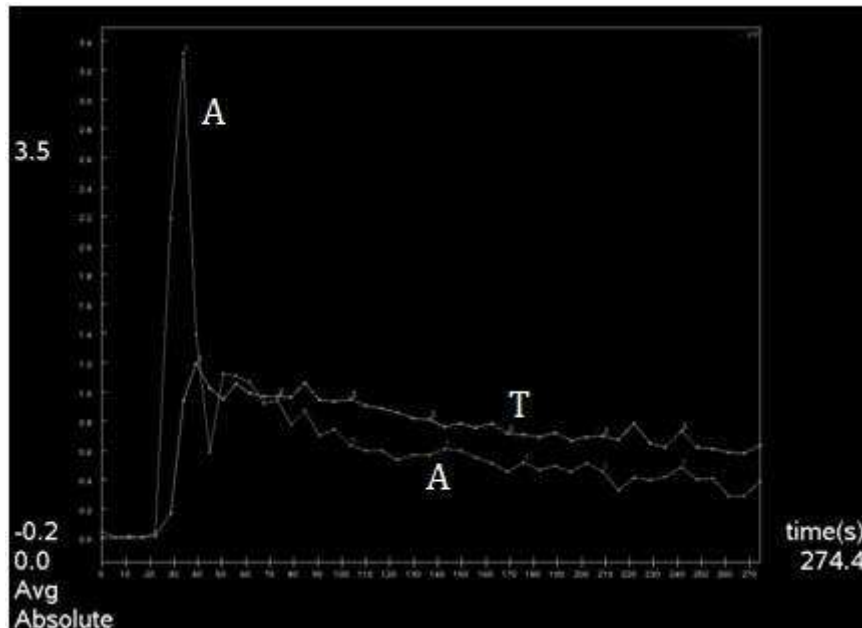


Figure 2.1 Courbe de rehaussement artériel (A) : pic précoce, deuxième pic de recirculation et lavage ; courbe de rehaussement tumoral (T) avec prise de contraste rapide et intense et lavage (plateau descendant).

2.3.1 Perfusion sans injection de produit de contraste

Réaliser un examen en contraste spontané présente l'intérêt de s'affranchir de l'utilisation d'un produit potentiellement allergène, et d'éviter les risques de fibrose systémique néphrogénique.

2.3.1.1 ASL (Arterial Spin Labelling)

L'ASL fait appel à un « traceur » endogène par marquage du sang circulant, à l'aide d'impulsions de radiofréquence qui vont inverser les spins des protons: le sang saturé en amont de la coupe d'intérêt devient traceur magnétique, en provoquant une variation du signal recueilli par rapport à une acquisition sans saturation préalable. L'étude comparative de ces deux signaux permet de quantifier en absolu et de façon reproductible des paramètres hémodynamiques locaux, mais qui restent du domaine de la perfusion (débit sanguin, vitesse), sans information sur la perméabilité.

Cette technique est principalement utilisée en neuroradiologie dans le champ de l'imagerie des accidents vasculaires cérébraux ; quelques études se sont toutefois intéressées à son apport dans la caractérisation des tumeurs intracrâniennes ⁴⁰ et urinaires.

2.3.1.2 BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent)

La technique dite BOLD en IRM utilise les propriétés paramagnétiques de la déoxyhémoglobine dont le taux est abaissé en zones d'activation neuronale, se traduisant par une hausse faible et transitoire du signal en pondération T_2^* . Son application clinique concerne la neurologie et la neurochirurgie, notamment dans les bilans préopératoires afin de déterminer les régions fonctionnelles.⁴¹

2.3.2 Perfusion avec injection de produit de contraste

Les IRM de perfusion peuvent enfin utiliser les propriétés paramagnétiques du gadolinium, injecté sous la forme chélatée de bas poids moléculaire, sans spécificité d'organe. Le produit le plus utilisé est le gadopentétate de dimeglumine (Gd-DTPA). Il exerce un effet puissant sur le temps de relaxation longitudinale (T_1) des protons des atomes d'hydrogène, ce qui se traduit par une augmentation du contraste dans les images par résonance magnétique.

2.3.2.1 DSC-MRI

La DSC-MRI (Dynamic Susceptibility Contrast-MRI) est un type d'IRM de perfusion avec injection. Elle permet l'étude de la microvascularisation cérébrale, dans le cadre des pathologies vasculaires (AVC ischémique, vasospasmes) et tumorales. Les paramètres étudiés sont le volume sanguin régional, le temps de transit moyen, le débit sanguin régional.

Il s'agit d'une technique de premier passage, mesurant de façon relative et/ou absolue l'effet de susceptibilité magnétique des chélates de Gadolinium en pondération T_2 soit en pondération T_2^* . La chute du signal liée au passage du produit de contraste permet, après post-traitement, d'extraire les paramètres de la perfusion (figure 2.2).⁴²

Cette technique n'est performante qu'en pathologie cérébrale, où la barrière hémato-encéphalique, lorsqu'elle est intègre, empêche le passage de produit de contraste au travers des parois capillaires.

Au contraire, dans le cadre d'une tumeur cérébrale, le produit de contraste diffuse en dehors des vaisseaux pathologiques et de ce fait, le gradient intra/extra vasculaire diminue, responsable d'une dégradation du signal et d'un retour plus rapide à la ligne de base des courbes, faussant le calcul des paramètres. Par ailleurs, il existe un effet « T1 shine-through » du gadolinium faussant dans le même sens les résultats des mesures effectuées.⁴³

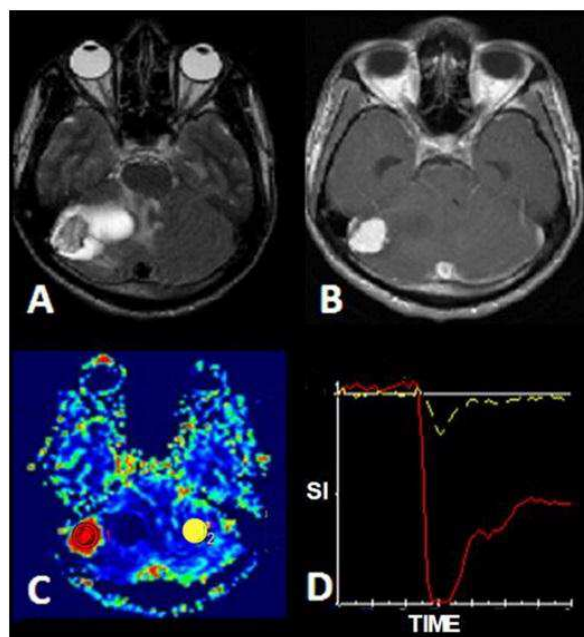


Figure 2.2 Courbe de rehaussement tumoral d'un hémangioblastome : chute du signal T2* (rouge) comparativement au signal en zone saine (jaune) Chinchure 2011 ⁴⁴

2.3.2.2 DCE-MRI

La DCE-MRI (Dynamic Contrast Enhanced-MRI) est un autre type d'IRM de perfusion avec injection. Il s'agit d'une technique d'analyse du schéma de rehaussement d'un tissu lorsqu'il existe une fuite interstitielle périvasculaire du produit de contraste paramagnétique, afin de pallier aux limites rencontrées avec la DCS-MRI pour l'évaluation des paramètres de perfusion. Elle permet par ailleurs de mesurer des paramètres de perméabilité capillaire. Elle est donc particulièrement utile en oncologie (figure 2.3).⁴⁵

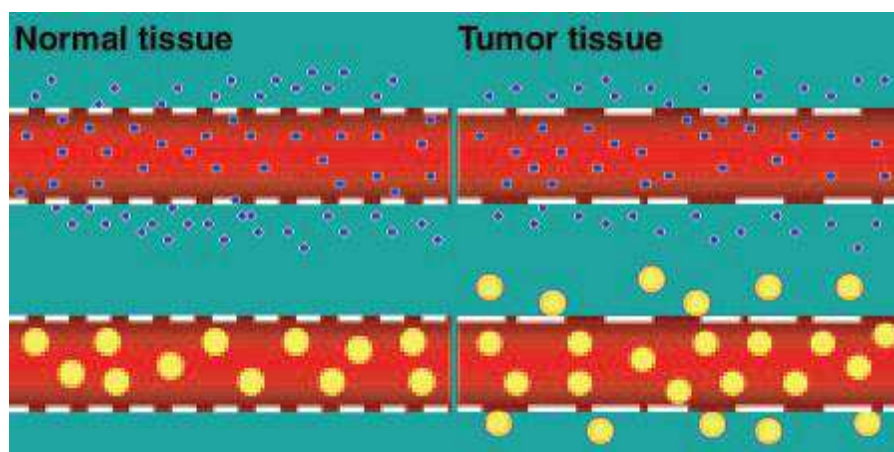


Figure 2.3 Différence de perméabilité entre un vaisseau normal (gauche) et un vaisseau tumoral (droite) ; les agents de contraste extra cellulaires passent dans l'interstitium dans les deux cas du fait de leur faible poids moléculaire ; les agents de contraste vasculaires de plus large poids moléculaire ne passent pas la barrière endothéliale dans les vaisseaux normaux, au contraire des vaisseaux tumoraux, plus perméables, qui autorisent leur fuite interstitielle. Van Vliet 2005

Dans le principe, les chélates de gadolinium, agents de contraste paramagnétiques ont un effet T1 prédominant : ils diminuent le temps de relaxation longitudinale ou temps de repousse du signal de base après l'excitation du tissu imprégné. L'effet sur les séquences pondérées T1 sera donc un rehaussement du signal. En tissu tumoral, l'efficacité sur le signal en T1 est considérée proportionnelle à la concentration en gadolinium, mais il existe en fait de nombreux facteurs influençant le signal en IRM : il est composite, faisant intervenir le T1, le T2 et les paramètres d'acquisition (figure 2.4). Par exemple, à haute concentration de produit de contraste, comme on peut le trouver dans la vessie, l'effet sur le signal devient négatif par effet T2*. Par ailleurs, la connaissance de l'angle de bascule est nécessaire afin de mesurer précisément la concentration en gadolinium et son optimisation (angle court de l'ordre de 20° car le TR est court pour générer une pondération T1) est cruciale pour améliorer la reproductibilité des paramètres cinétiques évalués.⁴⁶

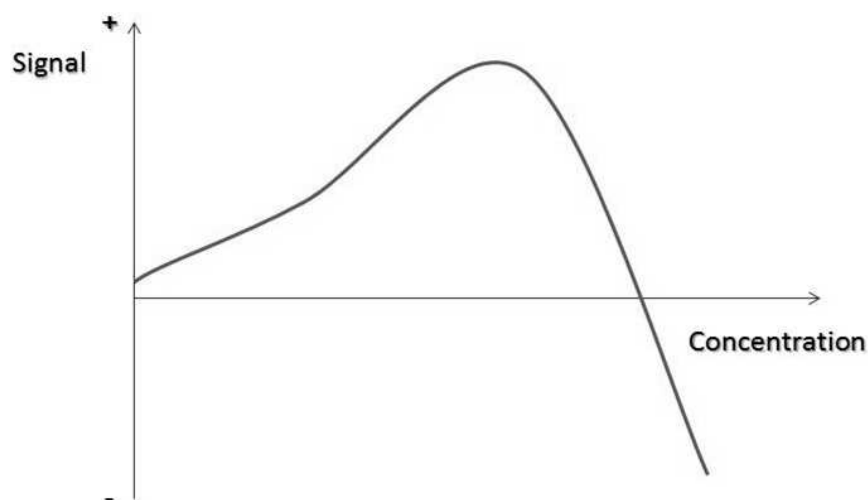


Figure 2.4 La relation de conversion entre la concentration de chélate de gadolinium et le signal mesuré n'est pas linéaire : à faible et moyenne concentrations, la relation est considérée comme linéaire, l'effet T1 prédomine et le signal est augmenté en pondération T1 ; à forte concentration, l'effet T2* entre en jeu et le signal chute en pondération T1.

En pratique, on réalise l'acquisition de plusieurs séries d'images (phases) centrées sur le volume d'intérêt immédiatement après le début de l'injection du produit de contraste afin de mesurer le signal T1 de base du tissu sans contraste, puis l'acquisition de multiples phases se poursuit pendant et après l'arrivée du chélate de gadolinium.

L'échantillonnage temporel du signal permet de générer une courbe d'intensité de concentration pour le tissu, traduisant la cinétique du passage du produit de contraste au travers de la région d'intérêt. Cette courbe varie en fonction des caractéristiques microcirculatoires du tissu étudié, qui peuvent ainsi être définies.

Dans le cadre des tumeurs de la sphère ORL, nous ne considérerons donc que la technique de DCE-MRI dans la suite de cet exposé.

2.4 Paramètres de microcirculation

Plusieurs paramètres permettent d'évaluer la microcirculation en DCE-MRI.³⁷

K^{trans} , la constante volumique de transfert, est un paramètre de base physiologique introduit par Tofts en 1999. Il s'agit d'un paramètre calculé dépendant de PS, débit de la diffusion au travers de la paroi capillaire du traceur de bas poids moléculaire vers le compartiment interstitiel (perméabilité), et du débit sanguin intra-capillaire (perfusion) au sein du tissu d'intérêt. Elle s'exprime par minute (min^{-1}). C'est une donnée pratique quand la distinction entre perméabilité et perfusion ne peut être faite pour des raisons techniques (perméabilité rapide et précoce et résolution temporelle trop faible). Son interprétation varie selon que la vascularisation est limitée par le flux ou par la perméabilité. En cas de limitation de flux sanguin ou quand la perméabilité dépasse celui-ci, la perfusion détermine la cinétique du contraste et K^{trans} se rapproche du flux sanguin par unité de volume. Au contraire, si la perfusion tissulaire est suffisante, K^{trans} est plus proche de PS, le produit de la perméabilité par la surface.

Des modèles permettant d'estimer séparément les données de perméabilité de celle de la perfusion (St Lawrence, Brix, Larsson) nécessiteraient une résolution temporelle plus élevée (de l'ordre de la seconde) et un meilleur rapport signal/bruit : quand ces conditions optimales ne peuvent être réunies, le paramètre K^{trans} apparaît comme un compromis intéressant.⁴⁶

K_{ep} est la constante de vitesse du reflux de l'EES vers le plasma sanguin soit K^{trans} / v_e . Sa valeur est toujours plus élevée que celle de K^{trans} (2 à 5 fois en fonction de K_{ep}). Elle s'exprime par minute (min^{-1}).

F_T , la perfusion tissulaire, est le débit de sang dans la lumière des capillaires. Il est exprimée en $\text{ml}/\text{min}/100 \text{ ml}$ de tissu).

PS, la perméabilité fois la surface, est le débit des molécules traversant les parois capillaires dans un volume tissulaire donné (voxel); il varie avec les propriétés pariétales du vaisseau et celles du produit de contraste utilisé. Elle s'exprime en $\text{ml}/\text{min}/100 \text{ ml}$ ou g de tissu.

v_e , la fraction volumique interstitielle, est le volume interstitiel extravasculaire et extracellulaire (EES : extravascular extracellular space) contenu dans le volume tissulaire considéré, où s'accumule le traceur ayant franchi l'endothélium. Elle peut s'exprimer en pourcentage.

v_s , la fraction volumique sanguine, est le volume de sang capillaire contenu dans un volume de tissu ou celui du sang contenu dans le voxel rapporté au volume du voxel. Elle est exprimée en pourcentage ou en ml de sang/100 ml de tissu.

TTM, le temps de transit moyen intra capillaire, est le délai moyen mis par le sang pour traverser le capillaire, entre l'entrée artérielle et la sortie veineuse ; soit v_s / F_T . Il est exprimé en secondes.

2.5 Analyse du rehaussement tumoral

L'arrivée du produit de contraste dans les capillaires tumoraux dépend du débit sanguin en amont et du nombre de capillaires : plus la perfusion et la quantité de vaisseaux sont élevées, plus le rehaussement est rapide et intense.

Les vaisseaux tumoraux présentant une perméabilité élevée, le produit de contraste peut diffuser dans l'espace extravasculaire-extracellulaire (EES - Extravascular Extracellular Space) ou interstitium.

Le rehaussement constaté à l'image est donc en partie dû, outre le gadolinium intravasculaire, à la fuite interstitielle du produit de contraste.⁴⁷

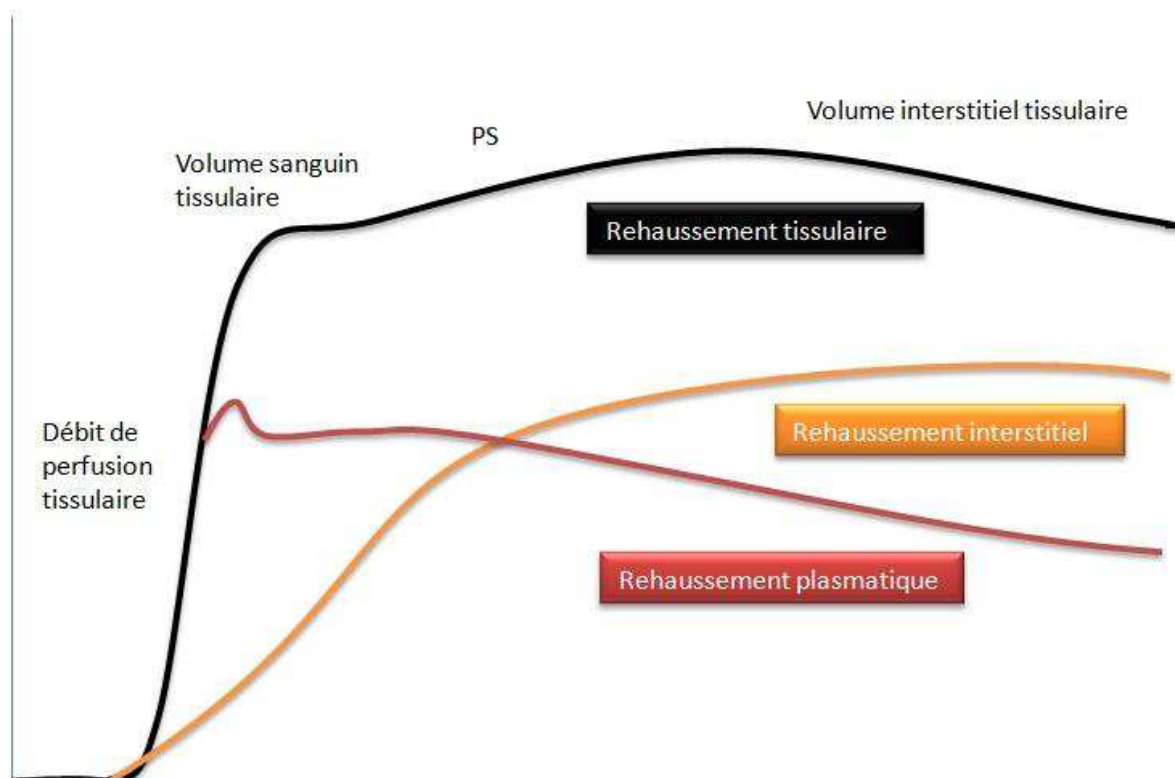


Figure 2.5 Courbes de rehaussement, d'après CA Cuenod, J Radiologie 2013

L'analyse de la courbe de rehaussement montre deux phases (figure 2.5) :

La première, brève (<20 secondes), traduit la perfusion dans le réseau capillaire, avant la fuite interstitielle. La pente de rehaussement est élevée, reflétant des modifications rapides et nécessite une vitesse d'acquisition rapide des images (< 3-5 secondes/image) afin d'en faire une évaluation fiable.

La seconde, plus tardive et plus lente, correspond à la fuite dans l'interstitium du produit de contraste de faible poids moléculaire ; la vitesse d'acquisition des images peut donc être ralentie (10-20 secondes/image) mais la durée d'acquisition doit être suffisamment longue (4-8 minutes).

2.5.1 Modèles d'analyse visuelle ou qualitative

La méthode visuelle est celle dont la réalisation est la plus facile et la plus répandue : la cinétique de rehaussement est analysée sur les images natives ou après leur traitement par soustraction.

Elle consiste en la recherche de zones de rehaussement tissulaire précoce et intense, parfois suivies d'un lavage ou « wash-out », en fonction de la pathologie tumorale considérée. Ce type d'analyse reste subjectif et peu reproductible.⁴⁸

La méthode qualitative par analyse de courbe de rehaussement est une étude plus fine de l'évolution du signal au cours du temps. En imagerie ORL, un exemple typique est la caractérisation des tumeurs de la glande parotidienne par IRM. La séquence de perfusion aboutit à trois courbes possibles⁴⁹ :

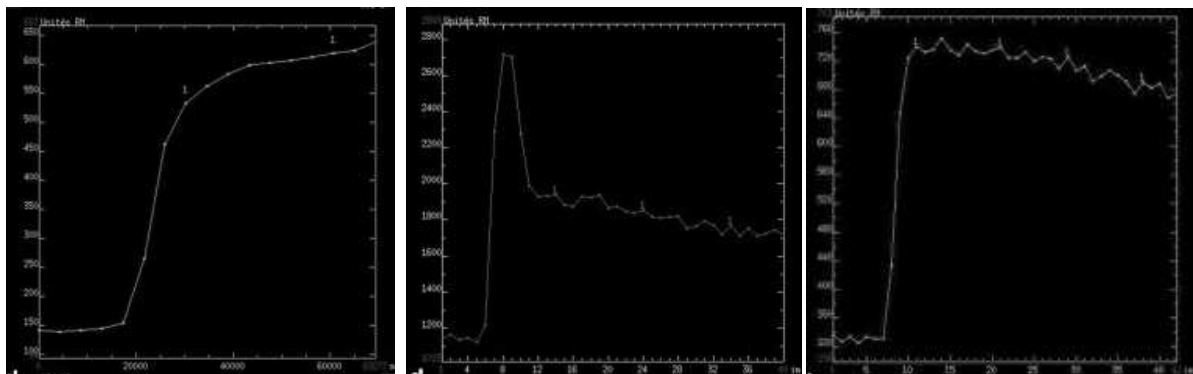


Figure 2.6 Variété des courbes de rehaussement des tumeurs parotidiennes
Pic tardif ou plateau ascendant, évoquant une tumeur bénigne de type adénome pléomorphe
Pic précoce avec wash-out supérieur à 30% évoquant une tumeur de Warthin
Plateau descendant avec wash-out inférieur à 30% évoquant une tumeur maligne.

L'interprétation de ces courbes (figure 2.6) est bien entendu à corréliser aux données morphologiques et au signal en pondération T2 sans saturation du signal de la graisse et pondération de diffusion avec calcul du rCDA. L'algorithme de lecture des tumeurs

parotidiennes intégrant les données de perfusion T1 permet d'approcher dans 80% des cas le diagnostic histologique. ⁴⁹

2.5.2 Analyse semi quantitative sans modèle à visée physiologique

Il s'agit de l'étude des paramètres directement mesurables sur la courbe. L'analyse peut être réalisée de façon automatique et reproductible par un logiciel de post-traitement.

2.5.2.1 Paramètres semi-quantitatifs sans modèle

Les paramètres descriptifs de la courbe (figure 2.7) sont les suivants :

- pente maximale de remplissage (maximale slope) ou wash-in (temps⁻¹)
- hauteur du pic de rehaussement maximal (arbitraire, %)
- temps pour atteindre le pic (TTP - Time To Peak) (temps)
- pente de lavage (wash out) (temps⁻¹)
- temps d'arrivée du bolus dans l'artère (BAT - Bolus Arrival Time) (temps)

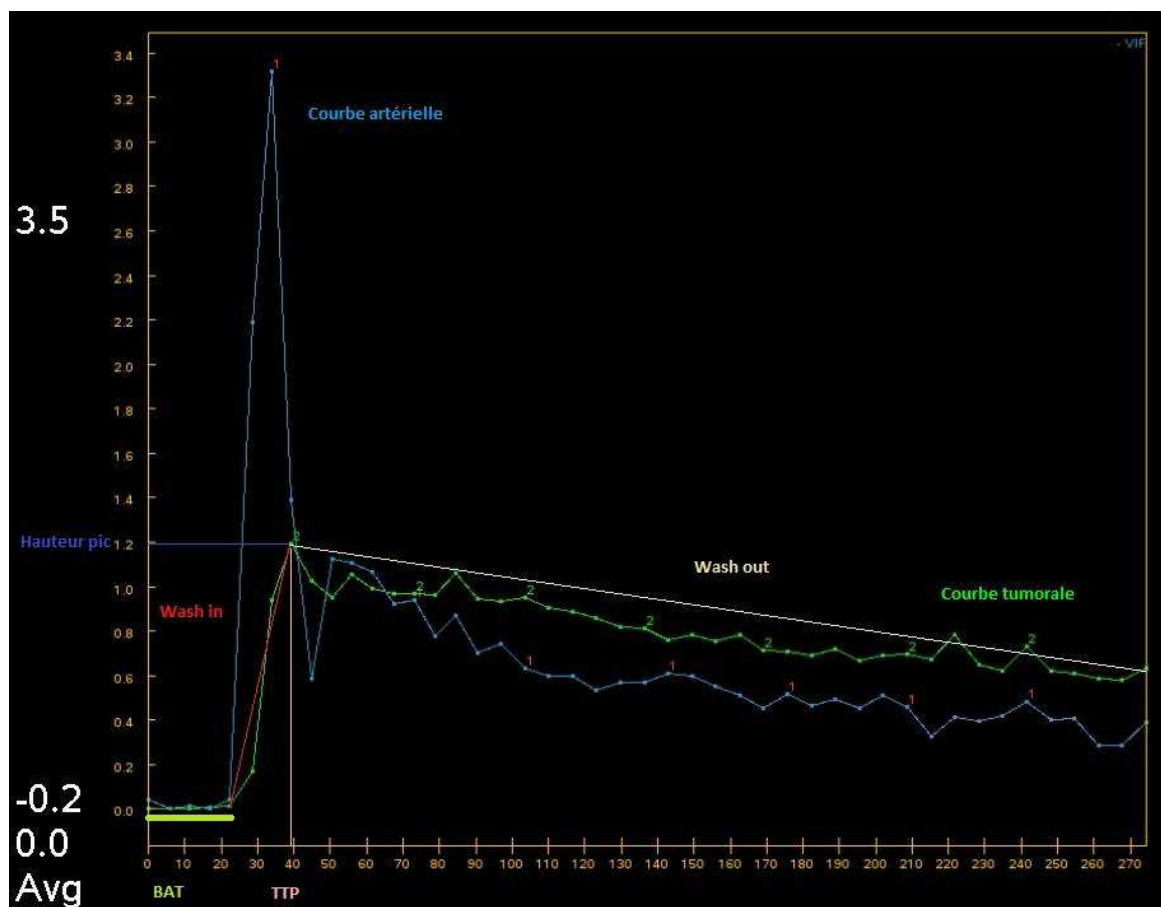


Figure 2.7 Exemple de rehaussements tumoral et artériel

2.5.2.2 Aire sous la courbe

L'aire sous la courbe (AUC : Area Under the Curve) est robuste au bruit sans nécessiter l'utilisation d'un modèle mathématique : il s'agit de l'intégrale sous la courbe de rehaussement (unité arbitraire x temps). (figure 2.8)

En se limitant à la partie initiale du rehaussement, souvent à 60 ou 90 secondes, on mesure l'aire initiale sous la courbe (IAUC - Initial Area Under the Curve). C'est un paramètre utilisé en routine dans les essais thérapeutiques, considéré comme critère primaire.⁵⁰

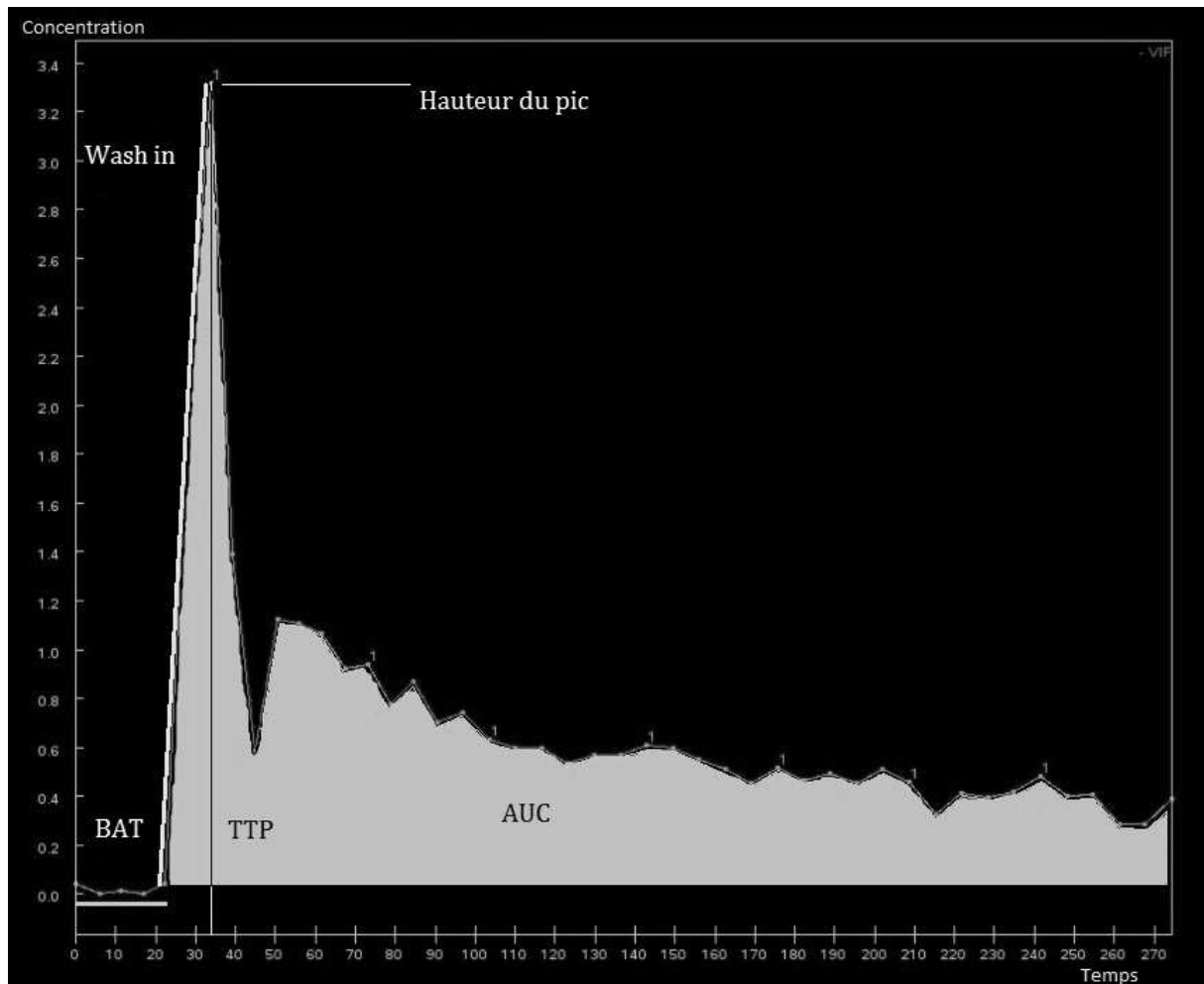


Figure 2.8 Exemple de rehaussement au sein d'une artère

2.5.2.3 Paramètres avec modèle heuristique

Le but est d'ajuster la courbe et de s'affranchir des instabilités en rapport avec le bruit et le mouvement dans les images par l'utilisation d'un modèle mathématique. Il apporte de la précision aux paramètres calculés.⁵¹

2.5.2.4 Paramètres semi quantitatifs relatifs

Ils sont normalisés à un tissu de référence (muscle, tissu connu comme non pathologique dans le champ d'acquisition) pour tenir compte de la cinétique intra-artérielle. Les paramètres sont notés AUCr (AUCt/AUCa).

2.5.3 Analyse quantitative avec modèle à visée physiologique

Ce type d'analyse vise à refléter au plus près la physiologie du réseau microcirculatoire et utilise pour cela un modèle mathématique qui intègre dans ses calculs la fonction d'entrée artérielle.

Ceci permet en théorie de s'affranchir des variations liées au mode d'injection et au mode circulatoire du patient. On obtient ainsi des paramètres quantitatifs pouvant être comparés d'un patient à l'autre ou pour un même patient au cours du temps (avant et après traitement par exemple), sous réserve de reproduire fidèlement les conditions d'acquisition.

La quantification est basée sur les courbes de concentration du produit de contraste, qu'il faut commencer par calculer en référence aux données T1 avant injection.

Différents modèles existent, certains étudient la perfusion, d'autres la perméabilité, et plus récemment, certains prennent en compte les deux.

2.5.3.1 Historique

Les premiers modèles, uni-compartmentaux, ont été développés dès 1948 en médecine nucléaire afin de pouvoir quantifier les paramètres circulatoires cérébraux en scintigraphie : Kety et Schmidt⁵², Renkin et Crone^{53,54}.

Le premier modèle exploitable en IRM a été décrit en 1991 par Tofts et Kermode^{55,56} toujours dans le domaine des neurosciences. C'est un modèle robuste, très répandu et recommandé par les consensus d'experts.⁵⁷

Plusieurs autres modèles ont été développés depuis, variant le nombre de compartiments, introduisant la normalisation à l'apport artériel et multipliant les paramètres étudiés.

2.5.3.2 Modèle bicompartimental

Le modèle bicompartimental (figure 2.9) est le plus largement utilisé en DCE-IRM.

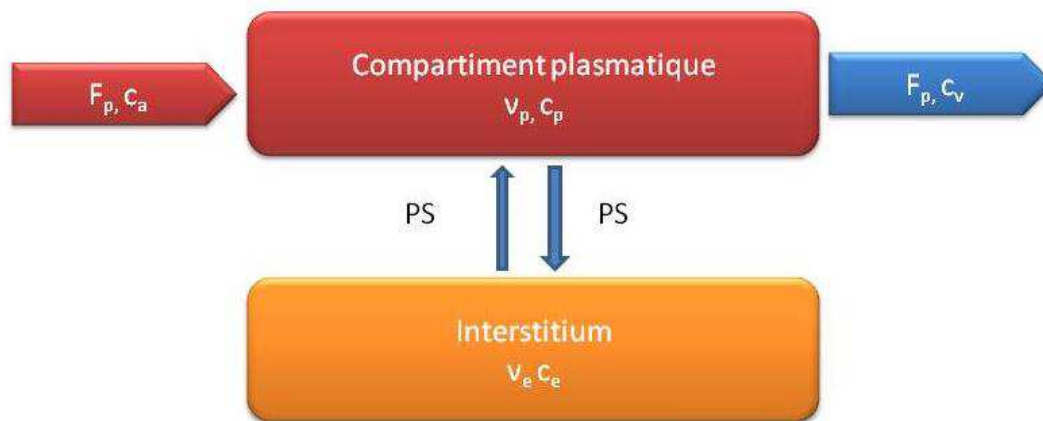


Figure 2.9 Représentation schématique du modèle bicompartimental : un compartiment plasmatique de volume V_p et de concentration C_p , est en échange bidirectionnel de constante PS avec le compartiment interstitiel de volume V_e et de concentration C_e . L'artère afférente présente un débit F_p et une concentration C_a ; la veine, un débit F_p et une concentration C_v .

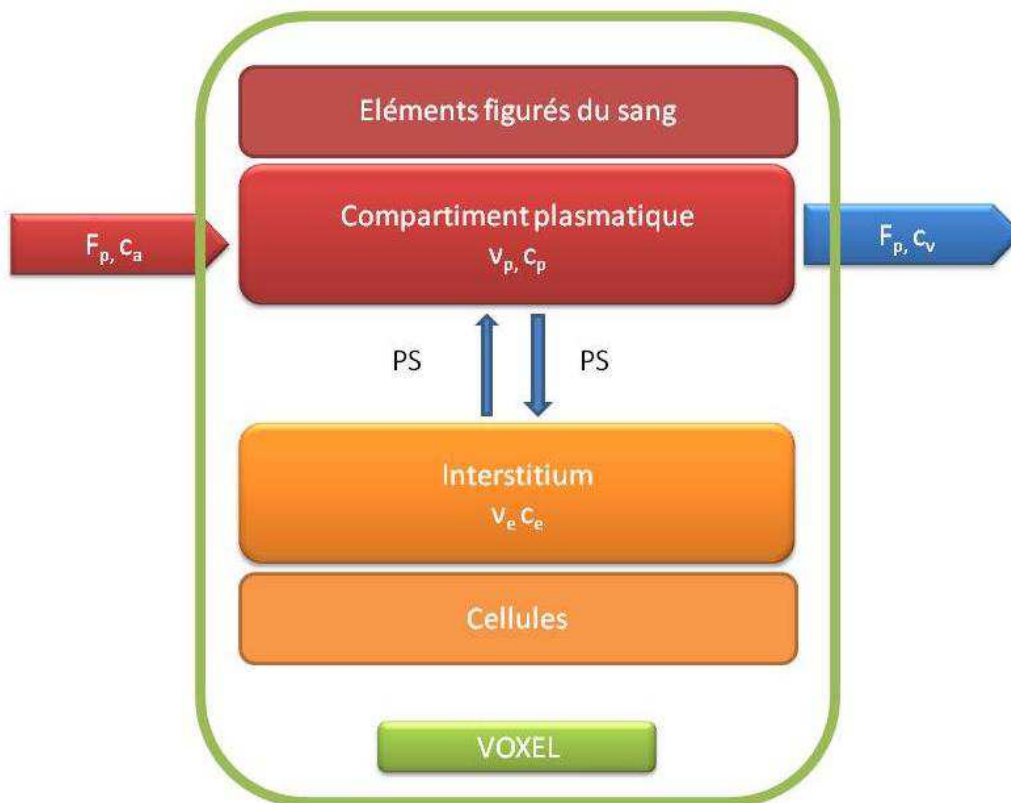


Figure 2.10 Représentation schématique du voxel : prise en compte des volumes des éléments figurés du sang et des cellules

Le voxel (figure 2.10) comprend, outre les compartiments plasmatique et interstitiel où peuvent diffuser le produit de contraste, les éléments figurés du sang représentés essentiellement par les globules rouges et les cellules, deux « entités » non rehaussées mais dont le volume doit être pris en compte dans les calculs.

Par ailleurs, on considère que les échanges du produit de contraste entre les deux compartiments sont bidirectionnels et symétriques, que sa distribution intra-compartimentale est homogène et que le débit d'entrée est retrouvé constant à la sortie.

2.5.3.2 Les modèles de perfusion tissulaire

Le modèle par déconvolution est décrit en 1980 par Axel avec la détermination du flux cérébral au scanner.⁵⁸ Il est repris en 1996 par Ostergaard en IRM.⁵⁹

Miles adopte la méthode au scanner multicoupes en 1991 pour l'étude de la perfusion tumorale.⁶⁰

2.5.3.3 Les modèles de perméabilité

L'un des premiers modèles de perméabilité proposés est celui de Tofts⁵⁵, inspiré du modèle de Kety qui est son équivalent hors IRM.

Ce modèle étant développé pour l'étude du cerveau où les vaisseaux ne représentent que 2 % du volume cérébral total, il néglige le rehaussement capillaire pour ne retenir que le rehaussement tumoral interstitiel. Il s'agit donc d'un modèle unicompartmental.

Il s'applique aux études réalisées en basse résolution temporelle (1 image/30 secondes) et permet de mesurer la perméabilité capillaire (K^{trans}) et la fraction volumique interstitielle (v_e).

De la même façon, les modèles de Brix^{61,62,63}, Larsson⁶⁴ et Patel⁶⁵ s'affranchissent de la fraction volumique sanguine.

Négliger la fraction sanguine v_s est possible dans l'étude du cerveau mais pas dans l'étude des tumeurs où elle peut peser de 30 à 50% du volume total.

Les modèles prenant en compte v_s présentent deux variantes⁴⁷ :

Ceux qui ne prennent pas en compte le retour (EES-capillaire) : il s'agit des modèles de Patlak⁶⁶, Miles⁶⁷ et Shames-Brash⁶⁸

Au contraire, l'évolution du modèle de Tofts, dit « Tofts étendu »^{69,37} (ETM – Extended Tofts Model) intègre le retour de molécules de l'interstitium vers la lumière des capillaires (prise en compte de K_{ep}).

Le nouveau modèle de Tofts s'applique là encore aux études réalisées en basse résolution temporelle (une image/30 secondes) et permet de mesurer la fraction sanguine (v_s) en plus du paramètre de perméabilité capillaire (K^{trans}) et de la fraction volumique interstitielle (v_e).

2.5.3.4 Les modèles dits complets

Les modèles complets prennent en compte à la fois la perfusion et la perméabilité ; ils sont aussi appelés modèles physiologiques. Sont considérés les espaces artériel, plasmatique et interstitiel, et là encore deux variantes, selon que le retour EES – capillaire est pris en compte ou non.^{70,71}

2.6 Technique IRM

Les dernières recommandations, concernant les méthodes de mesure sur IRM 1,5 Tesla et les critères à utiliser au cours des essais thérapeutiques affectant la fonction vasculaire de la tumeur, ont été émises en 2004 par le National Institute of Cancer. Elles sont reprises pour l'évaluation des thérapies antiangiogéniques et antivasculaires dans un article du British Journal of Cancer de 2005.⁵⁷ Des précisions et adaptations concernant l'acquisition sur les tumeurs de la sphère ORL sont apportées.

2.6.1 Type de mesure

- La conception de l'étude devrait inclure l'assurance de qualité du système de l'IRM, des séquences, la mise en place de procédures standardisés (par exemple : précision de la séquence T1, stabilité du système, homogénéité du champ B1).
- L'évaluation pharmacodynamique devrait utiliser des études pondérées en T1 avec des chélates de gadolinium de bas poids moléculaire (moins de 1000 Daltons) permettant une fuite endothéliale réversible entre les capillaires et l'interstitium.⁵⁶
- Si possible, des données tumorales précliniques devraient être utilisés pour déterminer le protocole d'acquisition de DCE-imaging dans l'évaluation des médicaments à nouveaux mécanismes d'action.
- Il faut ajuster l'orientation de sorte que le mouvement soit dans le plan d'acquisition lorsque les artéfacts de mouvements ne peuvent être évités (par exemple, le foie, les poumons), afin d'en réduire l'intensité.
- De même, il convient de s'affranchir au mieux des artéfacts dentaires en inclinant le patient.⁴⁹

2.6.2 Phase de pré-injection

- Acquérir des images morphologiques de haute qualité de l'ensemble de la région anatomique (de préférence en deux plans orthogonaux)
- Acquérir des images pondérées T1 et T2 dans les mêmes plans que la séquence dynamique

- Si possible, acquérir T1 avec la même résolution et le même champ de vue que pour les données dynamiques.⁵⁷

2.6.3 Phase d'injection de produit de contraste

- Il vaut mieux utiliser un injecteur automatique pour minimiser les variations.
- La dose d'injection doit être normalisée au poids du patient.
- Il faut respecter une durée totale de 15 à 30 sec pour l'injection, complétée par un rinçage d'au moins 20 cc de sérum physiologique.
- Il faut documenter le site d'injection afin d'utiliser le même site pour les études ultérieures chez le même sujet.
- Il est recommandé de respecter un délai minimum de 24 h entre les études.⁵⁷

2.6.4 Etude dynamique

- Dans les 150 premières secondes après l'injection du bolus, il faut utiliser l'échantillonnage le plus rapide possible en restant conforme au rapport résolution spatiale / exigences de couverture anatomique, mais sans dépasser le maximum de 5 secondes de résolution temporelle (à noter: la fonction d'entrée artérielle ne pourra être échantillonnée et K_{trans} sera abaissée artificiellement en cas de résolution temporelle trop lente, supérieure à 5 secondes, à moins que l'injection de produit de contraste soit elle aussi ralentie).⁴⁹
- La durée d'acquisition des données doit être longue, entre 5 et 8 min, pour une évaluation fiable de l'EES et de v_e .⁴⁶
- Si possible, inclure une fonction de normalisation dans le volume d'acquisition (par exemple, artérielle ou tissulaire).
- Pour les études en série, le volume d'imagerie d'intérêt devrait être ajusté sur la même région tumorale.⁵⁷

2.6.5 Critères d'évaluation primaires

- Le critère principal devrait être la constante de transfert (K^{trans} , en min^{-1}) et/ou l'aire initiale sous la courbe de temps-concentration de gadolinium (IAUGC, en mMGd.min , au-delà des 90 premières secondes après l'arrivée de contraste).
- Les mesures de K^{trans} ou IAUGC devraient être rapportées au voxel.
- Dans les tissus avec artéfacts de mouvement significatif, la moyenne des mesures sur la région d'intérêt peut être appropriée.

- Un minimum de 3 coupes est préféré aux mesures effectuées sur coupe unique qui pourraient en théorie être sujettes à des biais.
- Les dimensions de la tumeur (trois axes orthogonaux) pour l'ensemble de la tumeur et de la région analysée doivent être notées.
- Le volume de la tumeur vascularisée peut être obtenu en additionnant les voxels ayant des valeurs supérieures à un seuil prédéterminé (noter la définition du seuil).
- Toutes les données y compris la définition et l'analyse ROI doivent être enregistrées afin de pouvoir être réévaluées en externe.⁵⁷

2.6.6 Exigences de mesure pour déterminer K_{trans} et IAUGC

- K_{trans} et IAUGC nécessitent le calcul de la concentration instantanée de gadolinium intra-tumorale, sur la base des variations $\Delta R1$ du temps de relaxation dues à la prise de contraste.

Cela nécessite:

- Une estimation de la relaxation de l'agent de contraste
- Une acquisition en pondération T1 sur la tumeur immédiatement avant la prise de contraste
- Une acquisition en pondération T1 précise, vérifiée dans l'espace, pour chaque antenne et chaque machine utilisées
- De connaître le débit cardiaque (ou autre fonction de normalisation)
- De pouvoir reproduire fidèlement les injections.⁵⁷

2.6.7 Les critères secondaires

- Les autres paramètres dérivés de modèles à compartiments et DCE-Imaging tels que v_b , v_e , K_{ep} peuvent présenter un intérêt.
- Les méthodes simplifiées basées sur les modifications de l'intensité du signal pourraient être moins sensibles que K_{trans} ou IAUGC et plus difficiles à comparer entre les centres.
- Les modèles pharmacocinétiques plus élaborées pourraient améliorer l'évaluation des données dynamiques mais il n'existe pas à l'heure actuelle de preuves suffisantes pour justifier leur utilisation comme critère primaire d'évaluation.⁵⁷

2.6.8 La conception des essais

- Les critères d'admission devraient prendre en compte la taille de la tumeur par rapport aux mécanismes pharmacologiques, à la résolution de l'image, à la sensibilité au

mouvement et aux facteurs de confusion potentiels liés aux traitements antérieurs (par exemple, radiothérapie) ou au taux de croissance rapide de la tumeur.

- Les tumeurs de topographie superficielle devraient au moins mesurer 2 cm de diamètre; les autres tumeurs devraient au moins faire 3 cm de diamètre.⁵⁷

2.6.9 Nomenclature

- Des termes standardisés devraient être utilisés tels que ceux définis dans Tofts et al (1999).^{37,57}

2.6.10 Analyse

- L'analyse du modèle doit être fondée sur celui de Tofts ou équivalents, mais avec l'inclusion de la fonction d'entrée artérielle (ou fonction de normalisation équivalente), du volume sanguin, et de la classification des échecs d'ajustement.
- Les estimations d'incertitude devraient prendre en compte le type de modèle et l'erreur de chi-carré, être tracées et incluses dans l'analyse des erreurs.
- L'analyse de la ROI, sur la base des valeurs moyennes de la tumeur dans sa globalité, pourrait ne pas évaluer l'hétérogénéité tumorale; même robuste au mouvement, elle pourrait ne pas refléter certaines petites zones présentant des modifications rapides et donc manquer de sensibilité.
- La cartographie par voxel permet d'évaluer l'ensemble des données, ce qui permet la description et l'évaluation des modifications régionales; les voxels individuels auront un faible rapport signal sur bruit.
- Les techniques d'analyse, telles que l'histogramme et l'analyse des composants principaux, pourraient conduire à une évaluation sensible des modifications.⁵⁷

2.6.11 ROI

- Le positionnement de la ROI doit s'appuyer sur une méthode préalablement définie et doit être enregistré afin de permettre une réévaluation.
- Avant le placement de la ROI, les images doivent être examinées à la recherche de mouvements du patient, qui seront mieux vu sur les images de soustraction.
- Des images de soustraction précoces (60-120 sec après injection) et tardives (plus de 5 min après injection) devraient être générées.
- Idéalement, les images de soustraction précoces pourraient guider le positionnement de la ROI (ceci pourrait ne pas s'appliquer dans certaines régions : ex. foie), et il faudrait également tenir compte des images avant rehaussement (tumeur non rehaussée comprise).

- Si le rehaussement précoce est faible, les données de soustraction tardives devraient être utilisées.
- Si aucun rehaussement n'est visible, les données pré-rehaussement doivent être utilisées à l'aide des données morphologiques conventionnelles pour le placement de la ROI.
- La limite extérieure de la lésion devrait représenter la limite de la ROI afin de minimiser les effets de volume partiel.
- Les vaisseaux sanguins adjacents ou régions avec d'autres sources d'artefact devraient être exclus.
- La ROI devrait présenter un positionnement et une taille constants pour chaque image des séries analysées; en cas de mouvement significatif entre les séries, il pourrait être nécessaire d'ajuster la position de la ROI sur chaque image, en ne tenant ensuite compte que de la valeur moyenne.
- La position des ROI, les graphiques et le tableau des valeurs de rehaussement correspondants devraient être enregistrés, idéalement sous forme numérique et papier pour référence future.
- L'analyse devrait tenir compte de volumes partiels potentiels et de la forme de la ROI.
- La définition de la ROI devrait être statuée explicitement dans tous les rapports de données.⁵⁷

2.7 Interprétation des paramètres cinétiques

2.7.1 Valeur de prédiction du statut HPV

A notre connaissance, une seule étude, par Nakahira et ses collaborateurs en 2014, s'intéresse à l'utilisation des biomarqueurs quantitatifs en IRM de diffusion afin de prédire le statut HPV de patients atteints d'un carcinome épidermoïde oropharyngé. Ils ont mis en évidence une différence significative sur le minimum et sur la moyenne d'ADC sur ROI tumorale (b_0 et b_{1000}) selon que les patients sont de statut HPV positif ou négatif, en dosant comme biomarqueur substitutif la protéine p16 par immunohistochimie. Une valeur moyenne seuil (figure 2.11) de l'ADC a été établie à $1,027 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ pour le statut HPV+ (p16+) avec une sensibilité de 83.33% et une spécificité de 78.57% (figure 2.12).⁷² Dans cette étude, le statut HPV a été déterminé par l'immunohistochimie de p16 avec une valeur de positivité fixée à 25% d'immunoréactivité, alors qu'une méta-analyse évaluant la corrélation HPV-p16 estime que la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité s'établissent pour un seuil de plus de 75%.⁷³

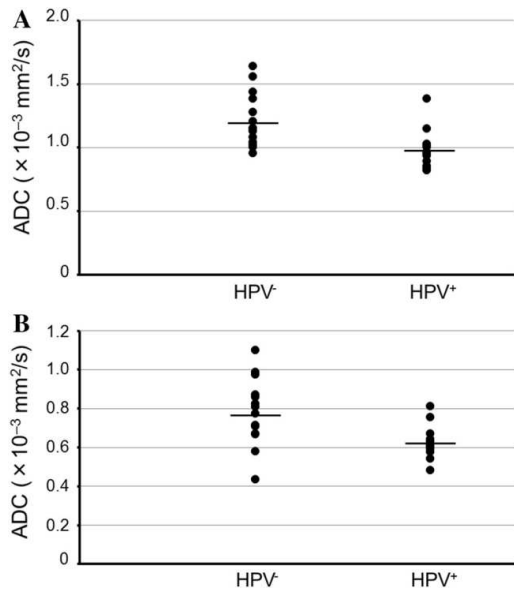


Figure 2.11 Diagramme de dispersion des valeurs moyennes d'ADC selon le statut HPV (A) et des valeurs minimales (B). Barres : moyenne de chaque groupe, colonnes de gauche HPV-, de droite HPV+ Nakahira 2014

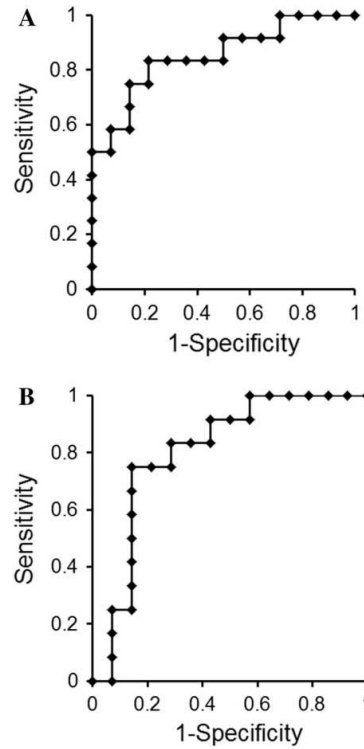


Figure 2.12 Courbes ROC des valeurs moyennes d'ADC (A) et des valeurs minimales d'ADC (B) pour différencier les tumeurs HPV+ et HPV-, Nakahira 2014

2.7.2 Valeur diagnostique

Lee et al., par l'étude en DCE-IRM des paramètres de perméabilité selon le modèle de Tofts et Kermode et de l'aire sous la courbe (AUC), ont pu différencier des carcinomes épidermoïdes, des carcinomes indifférenciés et des lymphomes (figure 2.13): l'AUC moyenne à 90 secondes montrait les résultats les plus fiables (sensibilité 68% spécificité 88%) pour le carcinome indifférencié et le carcinome épidermoïde, et le 75^{ème} percentile de l'AUC à 90 secondes (sensibilité 100%, spécificité 88,5%) pour le carcinome indifférencié et le lymphome. ⁷⁴

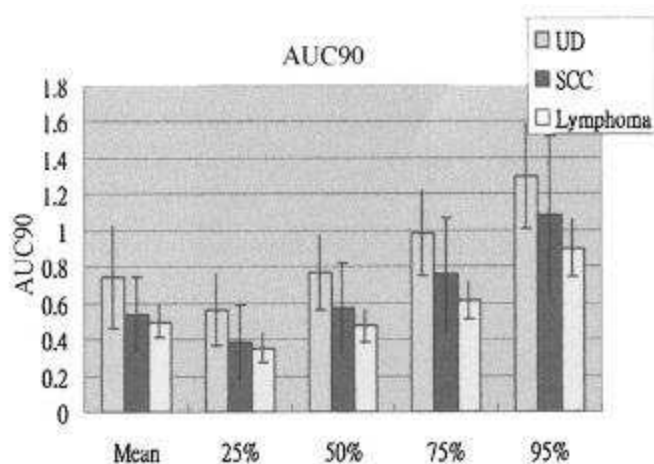
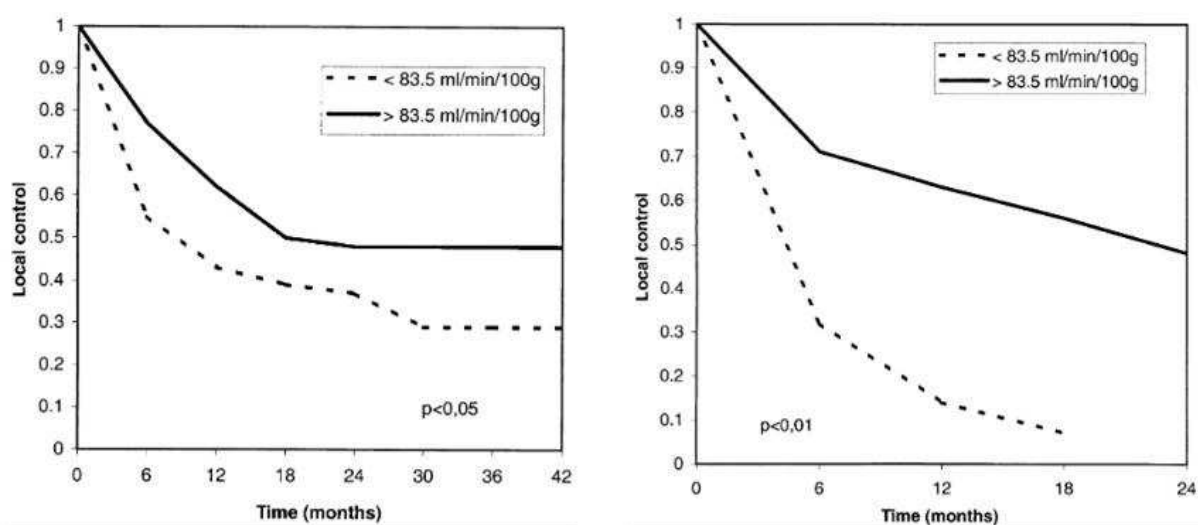


Figure 2.13 Diagramme des valeurs de l'AUC 90 selon l'histologie, Lee 2012

Il a été montré que les caractéristiques de perméabilité en scanner de perfusion permettent de différencier le tissu sain de plages de carcinome épidermoïde ; ainsi Gandhi et al. retrouvent une hausse significative ($p < 0.005$) des valeurs moyennes de perméabilité-surface, de flux et de volume sanguin et une réduction ($p < 0.005$) du TTM dans les carcinomes épidermoïdes ORL comparativement au tissu sain adjacent.⁷⁵

2.7.3 Valeur prédictive pronostique

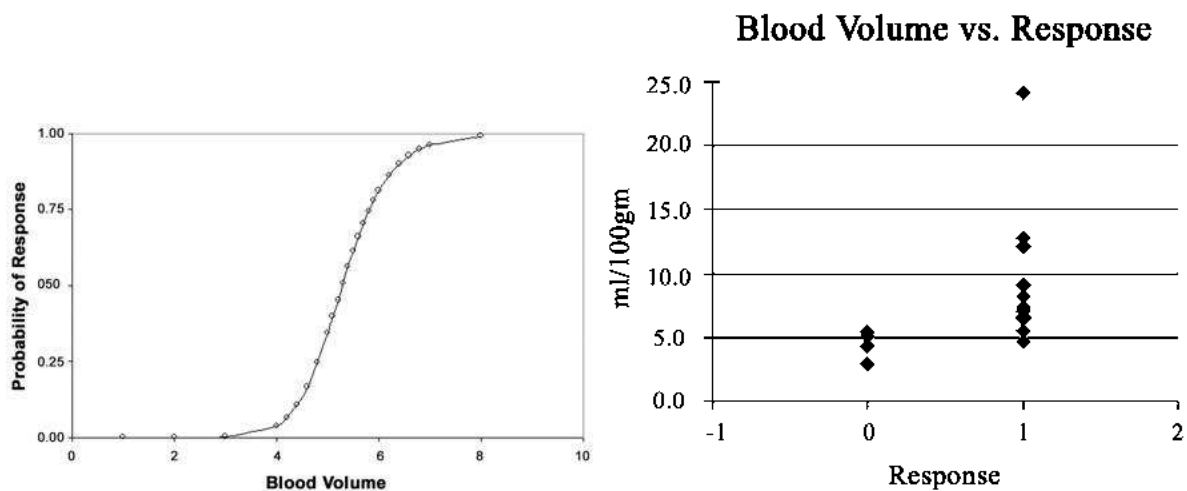
Des études préalables sur les cancers ORL ont été réalisées par TDM de perfusion et montrent que la constante de perfusion F_T peut être un facteur prédictif indépendant du pronostic régional après radiothérapie, les tumeurs les moins bien perfusées étant celles qui répondent le moins au traitement (figure 2.14).⁷⁶



Figures 2.14 Diagramme de l'évolution du contrôle local (volume tumoral et adénopathies) en fonction du degré de perfusion de la tumeur avec un seuil fixé à 83.5 ml/min/100g (valeur de perfusion médiane), les

mesures étant effectuées avant et après 2 semaines de traitement par radio chimiothérapie. A gauche : ensemble des patients (n=105), à droite : patients T4 (n=34), Hermans 2003.

De même pour le traitement par chimiothérapie d'induction, l'étude de Zima et al., en scanner de perfusion, suggérait que le volume sanguin et le flux étaient associés de façon significative à la réponse thérapeutique (figure 2.15) : un flux et un volume sanguin élevés étaient corrélés à plus de 50% de réduction du volume tumoral après chimiothérapie (sensibilité 91.7, spécificité 80%). L'imagerie pourrait permettre de passer directement aux autres options thérapeutiques chez les patients aux paramètres de perfusion peu élevés, puisqu'ils suggèrent un défaut de réponse à la chimiothérapie.⁷⁷



Figures 2.15 Courbe de la probabilité de réponse thérapeutique en fonction du volume sanguin tumoral ; diagramme de répartition des valeurs du volume sanguin initial mesurées selon la réponse thérapeutique (seuil 50% de réduction du volume tumoral), Zima 2007

Comme indiqué précédemment, les tumeurs en milieu hypoxique sont de mauvais pronostic car elles sont plus agressives, et par la sécrétion de cytokines favorisent les métastases³³ ; Donaldson et ses collaborateurs ont cherché à corréler les marqueurs d'hypoxie à ceux de la perfusion et de la perméabilité en DCE-IRM. Sur une petite série de patients, il en ressort que les tumeurs pauvrement perfusées portent des signes d'hypoxie (niveaux élevés de pimonidazole, marqueur d'hypoxie administré quelques 16 à 12 heures avant la résection tumorale) et en réponse à cela, un taux élevé de VEGF, dans le but de développer une néovascularisation tumorale. Par ailleurs, ils constatent une corrélation entre un faible PS et une hypoxie marquée, et entre l'élévation du niveau d'hypoxie et celui de VEGF.⁷⁸

Il apparaît donc que les marqueurs en DCE-IRM sont inversement corrélés à l'hypoxie et au taux de VEGF : plus le PS est bas, plus la tumeur est agressive et le pronostic abaissé.⁷⁹

Dans le même esprit, une revue de la littérature a été effectuée par Bernstein en 2014 afin de déterminer si des biomarqueurs de DCE-IRM pouvaient guider le traitement. La

revue des six séries retenues (figure 2.16) permet de montrer que plus le K^{trans} est élevé, ou plus bas était le coefficient d'asymétrie du K^{trans} , meilleur était la réponse à la radiochimiothérapie.⁸⁰

Study	Tumour site	AJCC stage	No. patients	Assessed	Quantitative or semi-quantitative modelling	Treatment	Association of parameter with outcome
Hoskin et al. [22]	OP (<i>other sites not given</i>)	III-IV (4 cases TX)	13	Whole primary tumour or lymph node metastasis	Semi-quantitative	Accelerated RT	Higher post-treatment mean maximum tumour enhancement in local or regional disease failure group
Cao et al. [40]	L, HP, OC, OP	IV	14	Whole primary tumours and lymph node metastases	Quantitative (<i>Tofts model</i>)	CRT	Lower change in tumour BV correlated with local disease failure
Kim et al. [25]	L, OC, OP	I-IV	33	Largest lymph node metastasis (average parameters across voxels)	Quantitative (<i>SSM</i>)	ICT (17) and CRT (32)	Lower pretreatment K^{trans} in PR group (with residual disease confirmed by ND) than in CR group
Chawla et al. [42]	OP, L, NP, HP, UKP	II-IV (13 cases TX)	57	Largest lymph node metastasis (median parameters across voxels)	Quantitative (<i>SSM</i>)	CRT ± post-operative ND	Lower pretreatment K^{trans} correlated with shorter DFS
Agrawal et al. [41]	OC, OP, HP	II-IV	21	Mean parameters in primary tumours and lymph node metastases	Quantitative (<i>Tofts model</i>)	CRT	Lower pretreatment BF and BV in primary tumours of non-responders
Shukla-Dave et al. [33]	OP, OC, UKP	III-IV	74	Histogram analysis of lymph node metastases	Quantitative (<i>Tofts model</i>)	CRT (61) ± surgery (13)	Large skewness of pretreatment K^{trans} associated with poor PFS and OS

Abbreviations: BF, blood flow; BV, blood volume; CRT, chemoradiotherapy; DFS, disease-free survival; HP, hypopharynx; ICT, induction chemotherapy; L, larynx; ND, neck dissection; OC, oral cavity; OP, oropharynx; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; RT, radiation therapy; SSM, shutter speed model (based on the Tofts model); UKP, unknown primary.

Figure 2.16 Etudes sur les marqueurs de DCE-IRM pronostiques pour les carcinomes épidermoïdes ORL, Bernstein 2014

2.8 En pratique, l'expérience de l'HEGP

2.8.1 Choix du modèle

Un modèle sert à traduire mathématiquement la physiologie d'un tissu, de façon plus ou moins complexe selon le degré de fidélité aux mécanismes physiologiques recherchés. Le choix du modèle repose sur la méthode d'acquisition.

Le modèle de Tofts est celui qui est le plus souvent utilisé dans les études publiées dans ces dernières années. Sa simplicité et l'expérience de nombreuses études font qu'il est recommandé en termes de caractérisation tumorale (Padhani⁴⁸ en 2002, National Institute of Cancer en 2004, Leach et al.⁵⁷ en 2005).

Il existe cependant des limitations à son utilisation : il a été montré que c'est un modèle fiable pour les tissus peu vascularisés permettant de négliger le compartiment intra vasculaire.

Le modèle dit « de Tofts étendu » est d'utilisation plus large, valable soit si le tissu est faiblement vascularisé, soit s'il est fortement perfusé.

Dans les conditions du modèle de Tofts, à compartiment vasculaire négligé, K^{trans} est pondéré à la fois par la perméabilité et par le flux.

En revanche, pour le modèle de Tofts étendu, quand il est nécessaire de prendre en compte les deux compartiments, K^{trans} dépend purement de la perméabilité.

Dans le cadre des tissus fortement vascularisés, les modèles de Tofts aboutissent à des erreurs d'interprétation, que l'on peut minimiser en optimisant le rapport signal/bruit, en augmentant la cadence image et en évitant autant que possible les artéfacts.⁸¹

Nous avons donc choisi le modèle de Tofts étendu pour cette étude.

2.8.2 Choix du produit de contraste

Les produits de contraste bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en pratique clinique courante sont de faible poids moléculaire, à délivrer en général à la dose de 0.1 mmol Gd/kg (soit 0,2 ml par kg de poids corporel).

Ils sont à diffusion extracellulaire, pouvant passer dans l'interstitium même au travers d'un endothélium non pathologique. Leur diffusion est majorée lorsque l'endothélium est plus perméable, comme dans le cas des tumeurs.⁸²

Dans le cadre de la recherche, l'utilisation de produits de contraste de plus gros poids moléculaire (macromolécules⁸³ et particules⁸⁴), plus spécifiques de l'endothélium endommagé et perméable, est autorisée ; l'analyse du compartiment vasculaire en tissu sain et de la fuite interstitielle en tissu lésé est plus robuste.

Pour l'étude présente, le choix s'est porté sur le produit de contraste utilisé en routine clinique : Dotarem (Gadoterate meglumine, Laboratoires Guerbet, Villepinte, France), agent de contraste de faible poids moléculaire (753.86 g/mol), d'osmolalité 1350 mOsm/kg H₂O. Il est administré à l'aide d'un injecteur automatique (3mL/s) avec lavage au moyen d'une solution de chlorure de sodium à 0,9% immédiatement après.

2.8.3 Protocole IRM

Le schéma du protocole de routine d'exploration des tumeurs de la sphère ORL du service est celui qui a été appliqué pour la réalisation de l'étude. La réalisation de plans orthogonaux en pondération T2-FSE, T1 FSE et T1 FSE avec saturation du signal de la graisse après l'injection de produit de contraste constituaient les séquences pour l'analyse morphologique.

Une séquence de diffusion (à b_0 et b_{600}) était par ailleurs réalisée systématiquement sur toute la région.

L'étude de la perfusion est réalisée en routine, selon un protocole standardisé, par des séquences rapides de type SPGR3D dans le plan axial transverse en coupes jointives de 4

mm, regroupées en 55 phases de 8 coupes avec une résolution temporelle de 4 secondes, une matrice de 192x192 et un FOV de 28cm. Le volume d'acquisition (standardisé) est centré sur la tumeur afin de la couvrir au maximum en privilégiant les plages tissulaires (exclusion des zones nécrotiques et des vaisseaux sur la base du signal T1 et T2).

Les séquences 3D en écho de gradient T1 avec destruction de l'aimantation transversale sont souvent utilisées car elles permettent une couverture rapide du volume d'intérêt.

Afin d'en réaliser le post-traitement, les données acquises sont stockées sur le système de PACS (Picture Archiving and Communication System, soit système d'archivage et de transmission d'images) de l'établissement et sur CD.

2.8.4 Post traitement avec Olea Sphere™

OLEA Sphere Revision 1.0 OS 2.2 sp1 (Olea Medical USA, Cambridge, MA) est un logiciel, indépendant de l'IRM servant à l'acquisition des données, permettant l'analyse des courbes de rehaussement tumoral.

Le logiciel accédait aux données par l'intermédiaire des Cdroms préalablement gravés. La procédure de post traitement était standardisée pour l'ensemble des cas traités.

Il a été choisi de mesurer l'AIF pour chaque cas, par opposition à une AIF théorique afin de ne pas mésestimer PS⁸⁵, en plaçant la ROI artérielle manuellement (figure 2.17).

Le tracé des ROI sur les tumeurs était manuel, en évitant au mieux les vaisseaux et les zones nécrotiques, après analyse des différentes séquences à notre disposition (figures 2.18 et 2.19).

Le modèle de Tofts étendu apparaissait être le plus adapté parmi les quatre qui étaient proposés.

L'ensemble des résultats, numériques et graphiques, étaient enregistrés sur support numérique externe.



Figure 2.17 Impression d'écran du logiciel Olea Sphere : données relatives à l'AIF et aux paramètres choisis pour le post-traitement

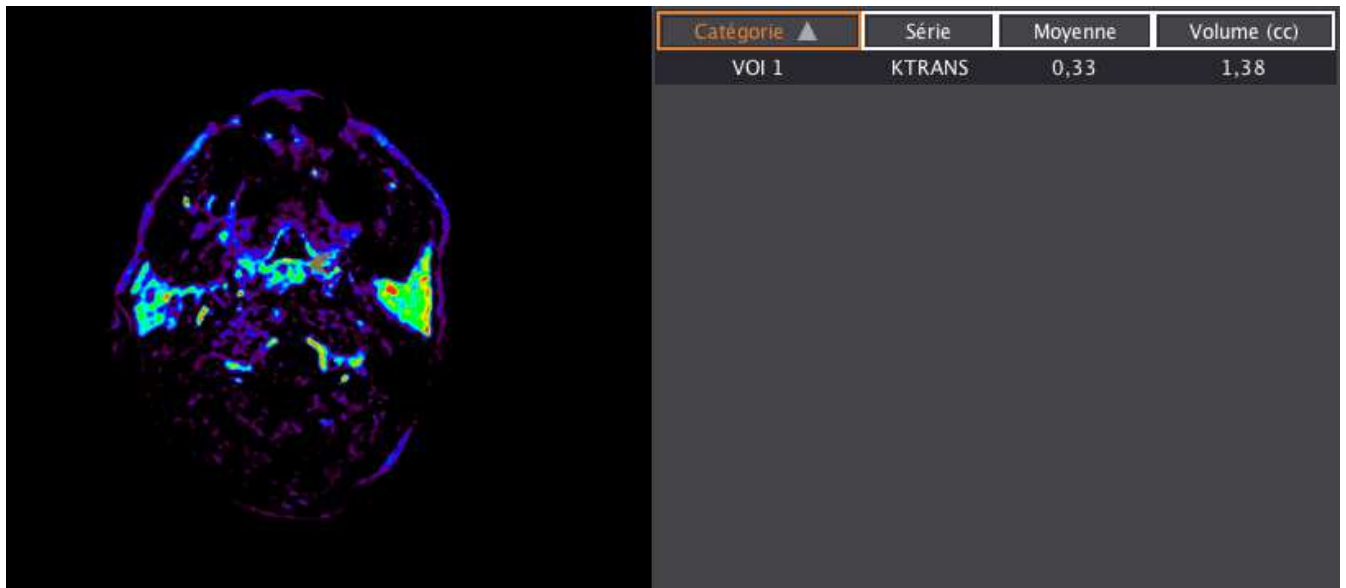


Figure 2.18 Impression d'écran : résultats fournis pour Ktrans sur le volume choisi (représenté par la ROI placée sur l'amygdale gauche)

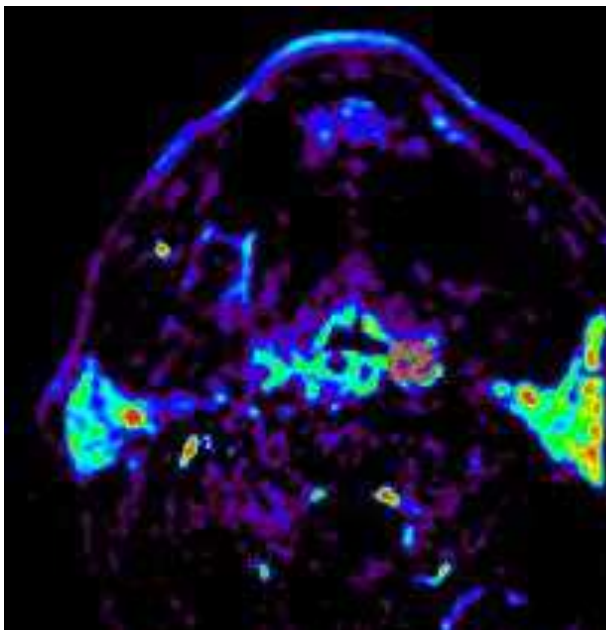


Figure 2.19 Détail du placement de la ROI sur tumeur amygdalienne gauche

3 CARCINOMES EPIDERMOIDES OROPHARYNGES ET DE LA CAVITE BUCCALE

3.1 Introduction

Les cancers dits de la sphère ORL englobent des tumeurs touchant une vaste région anatomique, comprenant les cavités sinusiennes de la face, les fosses nasales, le pharynx, la cavité buccale, et le larynx. Ils présentent, en fonction de leur site, des caractéristiques cliniques, radiologiques et de prise en charge très variées, bien qu'ils soient pour 95 % d'entre eux des carcinomes épidermoïdes.

L'âge médian au diagnostic de la maladie est situé au début de la sixième décennie.

Les hommes sont nettement plus touchés que les femmes, avec un ratio de 3 :1 pour l'ensemble des tumeurs ORL, un ratio de 2.5 :1 pour les localisations buccales et oropharyngées et près de 7.5 :1 pour le larynx.

Alors que l'on constate une diminution de l'incidence des cancers de la sphère ORL depuis les 20 dernières années, ceux de la cavité orale et de la paroi oropharyngée, qui représentent près de 50% des cancers ORL, présentent une augmentation constante de leur incidence.²

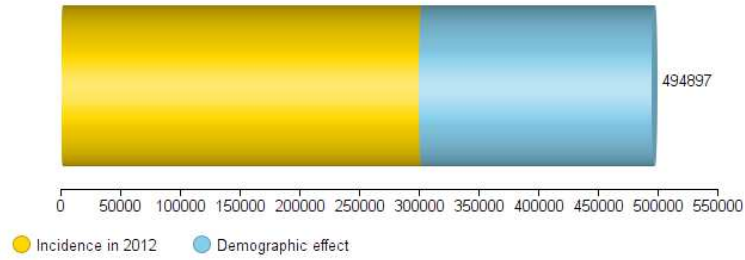
Il s'agit d'un problème de santé publique, cette localisation tumorale étant amenée à dépasser en nombre celle du col de l'utérus en 2020, si l'on intègre aux taux de progression ceux de l'infection par HPV, dont nous verrons par la suite le rôle étiologique dans la maladie.³

3.2 Epidémiologie

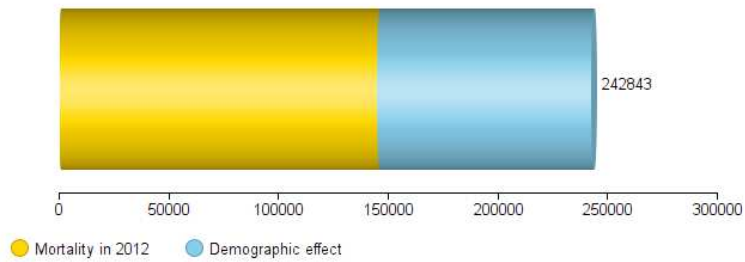
Les cancers de la sphère ORL sont les sixièmes cancers les plus communs dans le monde et représentent 6% de leur nombre total.¹

Les projections effectuées par le CIRC concernant les cancers de la cavité orale, se référant aux chiffres de 2012 et tous sexes confondus, tablent sur une progression de son incidence de 8% pour 2015, de 21% pour 2020 et de près de 65% pour 2035. Concernant les prévisions de mortalité de cette pathologie, les chiffres sont respectivement de 8%, 21% et 67%.⁸⁶

World
Lip, oral cavity
 Number of new cancers in 2035 (all ages) - Both sexes



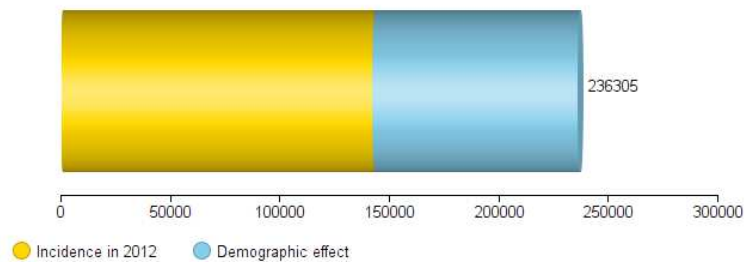
World
Lip, oral cavity
 Number of cancer deaths in 2035 (all ages) - Both sexes



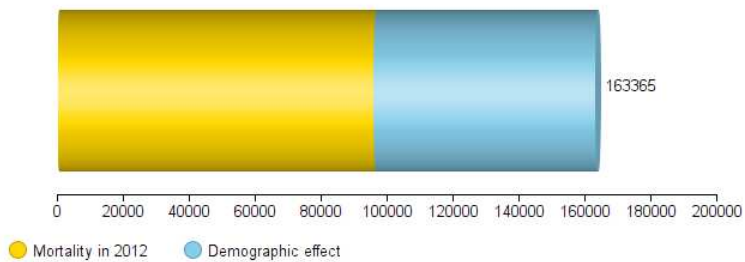
GLOBOCAN 2012 (IARC) (31.8.2014)

De même pour les cancers oropharyngés, pour lesquels une progression de 65% des chiffres d'incidence est prévue.

World
Other pharynx
 Number of new cancers in 2035 (all ages) - Both sexes



World
Other pharynx
 Number of cancer deaths in 2035 (all ages) - Both sexes



GLOBOCAN 2012 (IARC) (13.8.2014)

D'après les registres du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), concernant les données de 2012, l'incidence des cancers de localisation ORL est maximale chez les patients de 55 à 59 ans (figure 3.1), excepté pour le larynx, où le pic est plus tardif, après 75 ans. ⁸⁶

Selon plusieurs études récentes, on constate une augmentation de l'incidence chez les patients plus jeunes, notamment en Europe et aux États-Unis. ^{87,88,89,90}

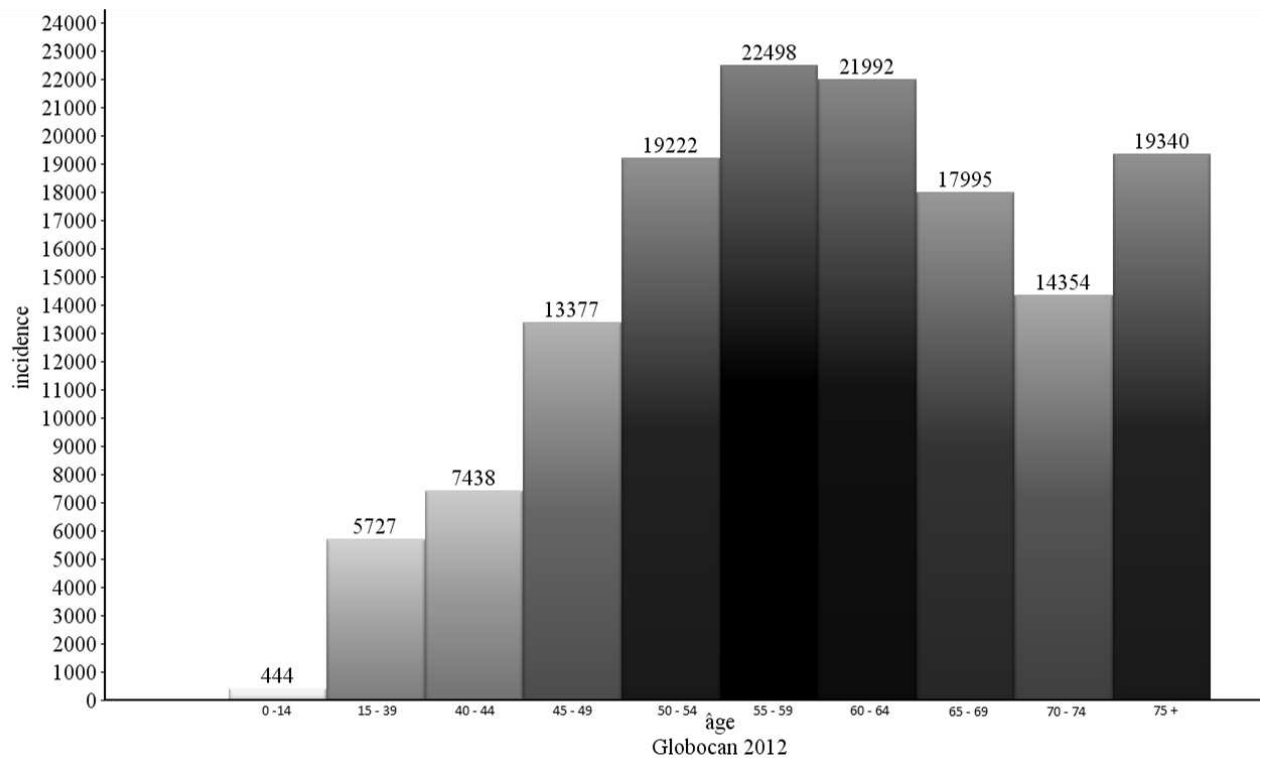


Figure 3.1 Histogramme de répartition des incidences des cancers oro et hypopharyngés selon la tranche d'âge – Réalisé à partir des données Globocan, CIRC 2012

En particulier, il existe une augmentation du nombre de cancers oropharyngés et de la cavité buccale chez les 18-45 ans.^{91,92} Comparativement à la population préalablement touchée par les carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL, ces patients sont moins fréquemment exposés au tabagisme et le ratio femme/homme est abaissé.

Par l'étude la population du SEER, il est estimé que le nombre de cancers oropharyngés (tous sexes confondus) dépassera celui des cols utérins avant 2020 (figure 3.2).³

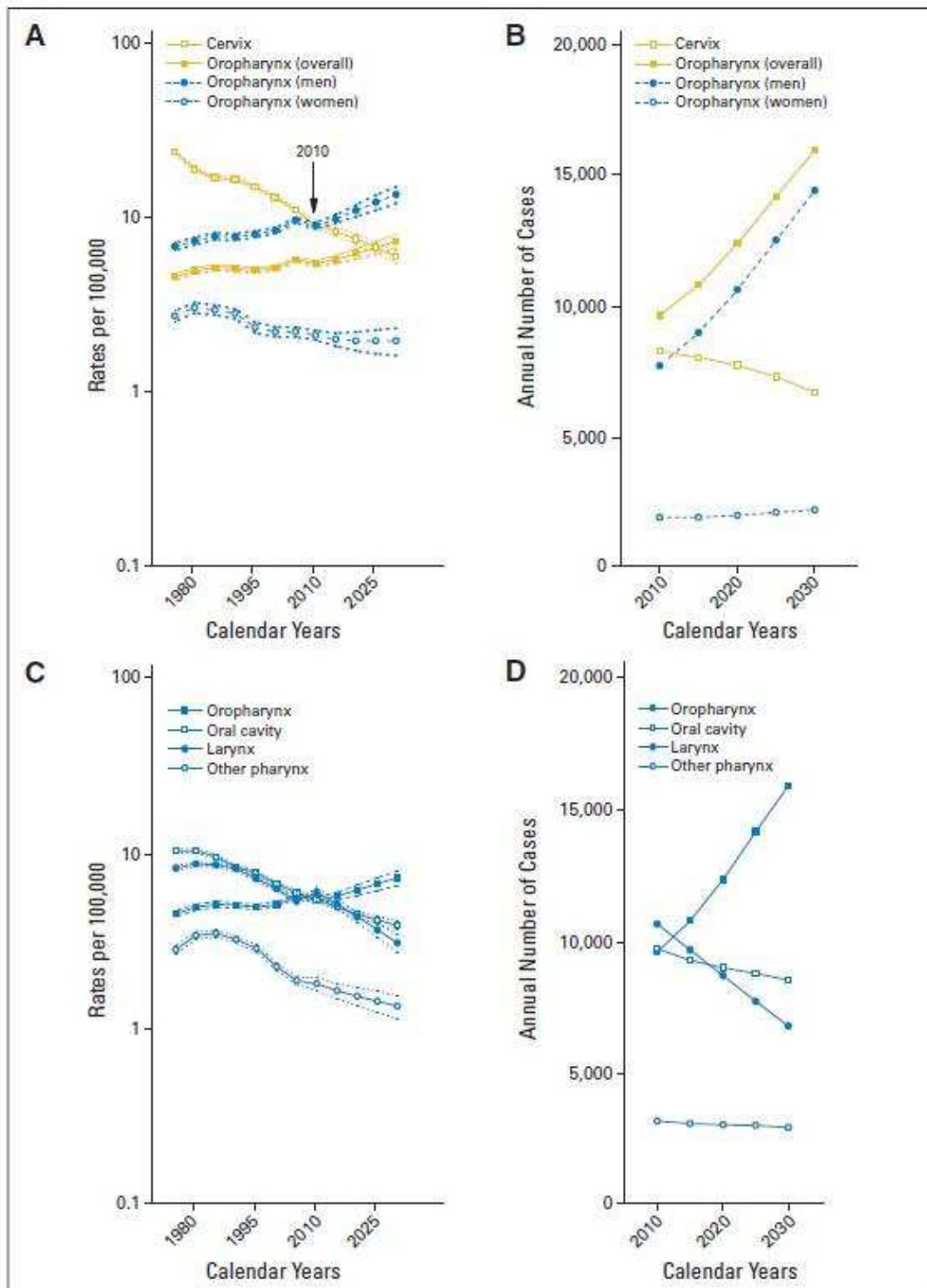


Figure 3.2 Incidence observée et projetée des cancers oropharyngés, de la cavité buccale selon le sexe, et du col utérin, données SEER 2008

Enfin, l'incidence varie grandement dans le monde : l'Asie du Sud-est, l'Europe, le Brésil et les Etats-Unis présentent les chiffres les plus élevés. Les moins exposés sont la Chine et l'Afrique de l'Ouest (figures 3.3 et 3.4).⁸⁶

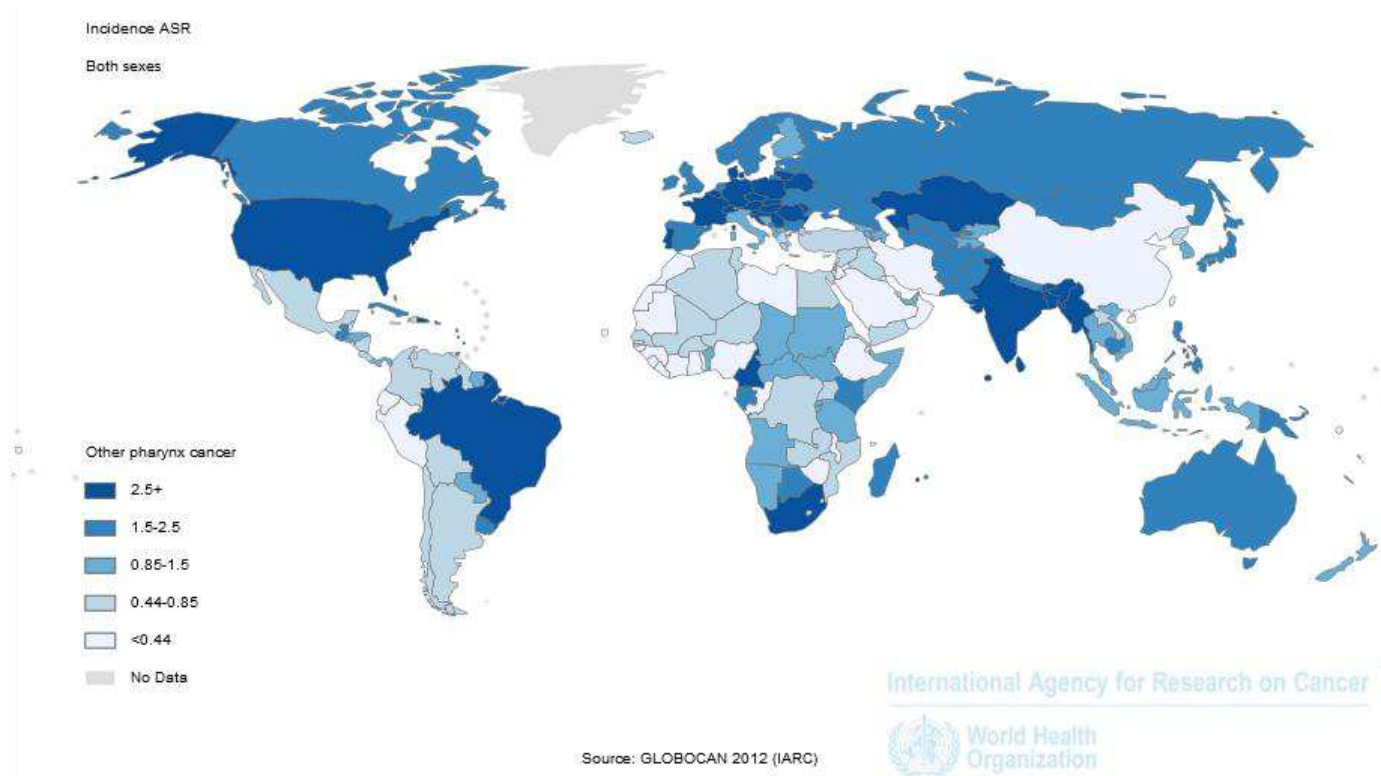


Figure 3.3 Carte de l'incidence des cancers hypo et oropharyngés tous sexes confondus par pays en 2012, Globocan CIRC

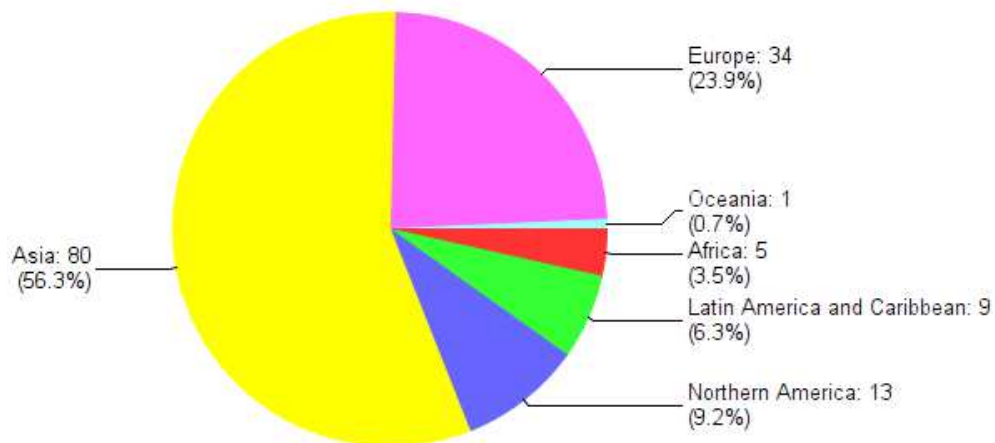


Figure 3.4 Diagramme circulaire de l'incidence des cancers hypo et oropharyngés tous sexes confondus par continent en 2012, Globocan CIRC

3.3 Etiologie

3.3.1 Alcool

Il constitue, quel que soit l'âge, tout comme le tabac, un des facteurs de risques environnementaux dits traditionnels. C'est un facteur indépendant, en particulier du tabagisme ; le risque de cancer ORL est associé à une consommation chronique d'alcool à partir de 25 g d'alcool par jour.

Une méta-analyse, réalisée en 2004 sur 15 études, retrouvait une augmentation du risque relatif des cancers de la cavité orale et du pharynx à 1.86 (1.76 -1.96) pour 25g par jour, 3.11 (2.85- 3.39) pour 50 g/ jour et 6.45 (5.76 -7.24) pour une consommation de 100g/jour, comparativement aux sujets contrôle abstinentes (figure 3.5).⁹³

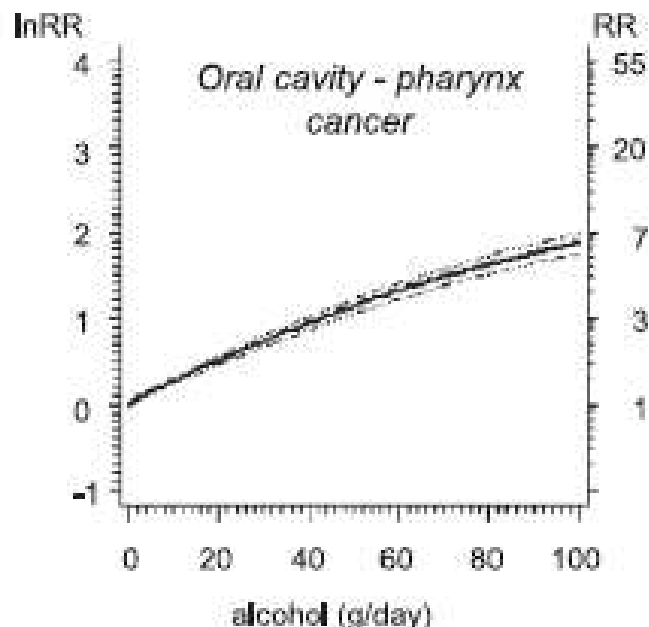


Figure 3.5 Evolution du risque relatif de cancer de la cavité buccale et pharyngé en fonction de la consommation alcoolique journalière, Corrao 2004

La faible consommation d'alcool est elle aussi associée au risqué de cancer de l'oropharynx (RR = 1.17; [1.06-1.29]) et à l'origine de 5000 morts environ dans le monde, selon les chiffres de 2004.⁹⁴

Des facteurs génétiques entrent en jeu dans la susceptibilité aux effets carcinogènes de l'alcool, par le biais de variantes concernant le métabolisme éthylique, le métabolisme des folates et celui de la méthionine et les mécanismes de réparation de l'ADN. Leur dysfonctionnement peut aboutir à la prolifération d'agents toxiques, à une action carcinologique directe des métabolites ou de leurs dérivés, à l'induction d'enzymes

activatrices de pro-carcinogènes, ou au contraire à la réduction du taux de rétinoïdes protecteurs.

Ils permettent enfin d'expliquer en partie les hétérogénéités dans la répartition géographique de la maladie.⁹⁵

L'alcool et le tabagisme ont un effet multiplicatif.⁹⁶

L'analyse par site anatomique suggère un plus fort risque pour ceux qui sont en contact direct avec le passage d'alcool, soient la base de langue et l'hypopharynx.⁹⁷

La consommation alcoolique est en croissance dans le monde, en particulier en Asie du Sud-est, expliquant au moins en partie la hausse d'incidence des cancers oropharyngés; ce n'est pas le cas aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, où la hausse des cas de tumeurs est constatée malgré la diminution de la consommation éthylique.⁹⁸

3.3.2 Tabac

Le tabagisme est donc, comme l'alcool, un facteur de risque environnemental dit traditionnel, indépendant, lui aussi, de l'âge et de la consommation alcoolique.

La prévalence de ce facteur de risque prédomine chez les hommes ; concernant l'âge de début, il devient plus précoce dans l'ensemble des pays, en revanche, on constate un arrêt de l'intoxication à plus jeune âge dans les pays développés.⁹⁹

Les cofacteurs de risque principaux dans la relation entre tabagisme et cancers des voies aéro-digestives hautes sont la consommation alcoolique et celle de consommation de tabac non fumé.⁶

Une méta-analyse, basée sur les données du Consortium international pour l'épidémiologie des cancers de la tête et du cou (INHANCE: International Head and Neck Cancer Epidemiology) comprenant 13,935 cas et 18,691 sujets contrôles issus de 19 études (1981-2007), retrouve une augmentation du risque de cancers ORL chez les fumeurs, comparativement aux non-fumeurs et après ajustement pour les autres facteurs de risque : OR=3.46 [IC 95%, 3.24, 3.70], majoré avec la fréquence, la durée et le nombre de paquets-années fumés ($p < 0.0001$).

Le risque existe dès une faible consommation cumulée et croît régulièrement, allant d'un Odds ratio de 1.29 [IC 95%, 1.16-1.43] pour 1-10 paquets-années (PA) à celui de 6.81 [IC 95%, 6.24-7.44] pour une consommation supérieure à 50 PA.

Il en est de même pour les fumeurs de pipe et de cigare, lorsqu'ils sont comparés aux sujets contrôles n'ayant jamais fumé ($p \leq 0.0001$), mais sans différence significative si la comparaison concerne les fumeurs de cigarettes.

Le risque lié à la cigarette augmente avec l'âge, plus élevé après 45 ans.¹⁰⁰

La consommation tabagique est en croissance dans les pays en voie de développement, en particulier en Asie du Sud-est où la prévalence atteint près de 75% de la population au Vietnam, expliquant au moins en partie la hausse d'incidence des cancers oropharyngés ; ce n'est pas le cas aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, où la hausse des cas de tumeurs est constatée malgré la diminution de la consommation de tabac (figures 3.6 et 3.7).^{96,99}

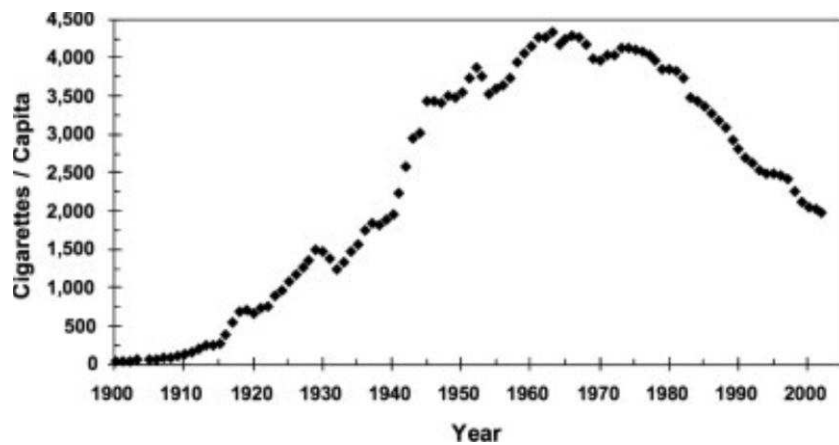
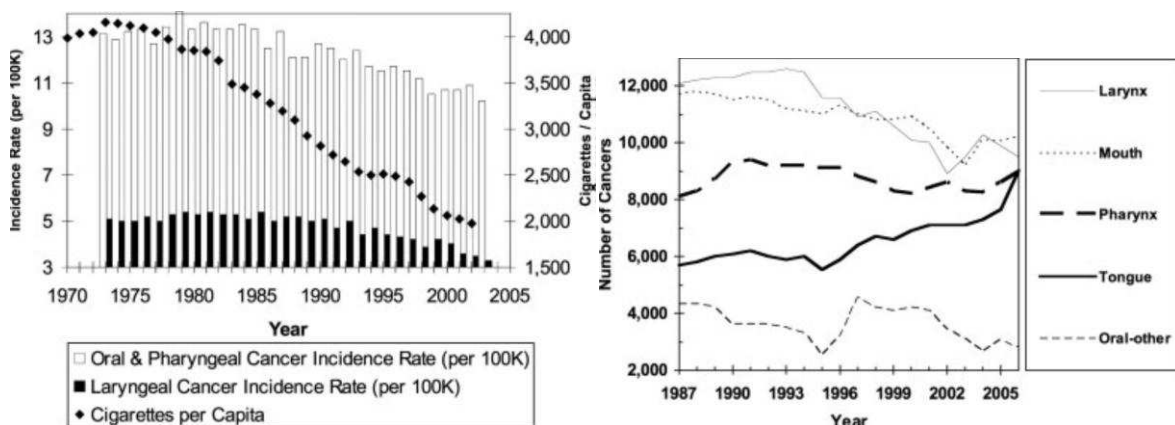


Figure 3.6 Diagramme de la consommation de cigarette par personne aux USA au XXème siècle, Sturgis 2007



Figures 3.7 Histogramme et courbes d'évolution de la consommation tabagique comparativement à celle de l'incidence des cancers ORL aux USA, Sturgis 2007

Les facteurs étiologiques de la carcinogenèse liés au tabagisme se retrouvent dans la composition de sa fumée, qui comprend jusqu'à 6000 produits dont certains sont connus comme cytotoxiques, mutagènes, carcinogènes, générés par le tabac brûlé.⁹⁷

L'exposition chronique aux composés inhalés déclenche des cascades à la fois pro et anti-inflammatoires, via les cytokines, les TNF- α , interleukines et les macrophages.¹⁰¹

3.3.3 Bindi

Il s'agit d'un type de cigarette fortement consommée en Inde contenant des brins de tabac hachés, séchés et non traités. Comparativement aux non-fumeurs, l'odds ratio est évalué à 3.1 [2.0-5.0] dans une méta-analyse récente.¹⁰²

Le risque prédomine pour l'hypopharynx (OR=6.8 [4.6-10.0]).¹⁰³

3.3.4 Marijuana

Une étude basée sur les données du consortium INHANCE met en évidence, après ajustement à la consommation tabagique, une augmentation du risque de cancer oropharyngé chez les consommateurs de marijuana OR=1.24 [1.06-1.47] mais une réduction du risque de carcinome lingual OR=0.47 [0.29-0.75], suggérant différents mécanismes pro- et anti-carcinogènes des cannabinoïdes.¹⁰⁴

3.3.5 HPV

Son incidence dans le monde est en très nette hausse dans les 20 dernières années, en particulier dans le monde occidental.

Les amygdales et la base de langue sont les localisations associées le plus fortement à l'infection par HPV dans le contexte du carcinome épidermoïde.

Parmi les HPV, le sous type HPV 16 prédomine dans les deux groupes anatomiques, qu'il soit isolé ou associé à d'autres types de virus. HPV 18 est un autre sous type plus rarement représenté dans le contexte tumoral ORL.³

La relation entre HPV et carcinome épidermoïde sera développé dans le prochain chapitre.

3.3.6 HIV

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) augmente la susceptibilité aux infections opportunistes et aux cancers liés aux virus, mais il n'existe pas d'étude concluante sur la relation entre les deux pathologies. Plusieurs études retrouvent une augmentation de la proportion du site laryngé chez les patients VIH + présentant un cancer ORL, mais ces études ne concernent que des effectifs très réduits.¹⁰⁵

3.3.7 Génétique

Les mécanismes physiopathologiques retrouvés dans certains syndromes génétiques (syndrome de Cowden, anémie de Fanconi, syndrome de Bloom, ataxie télangiectasique homozygote, Xeroderma pigmentosum) pourraient expliquer des particularités

épidémiologiques, génétiques, étiologiques et clinico-pathologiques que l'on retrouve dans la fraction des patients les plus jeunes touchés par les cancers de la sphère ORL.¹⁰⁶

3.3.8 Taille

Des résultats contradictoires ont été publiés concernant la relation entre la taille du sujet et le risque de cancers de l'oropharynx et de la cavité buccale. Une méta-analyse INHANCE récente, conduite en 2014, a repris 17666 sujets et 28198 contrôles et conclut à une relation inversement proportionnelle entre la taille du sujet et le risque de carcinome ORL, rapporté au niveau d'éducation, aux consommations tabagique et d'alcool. Les auteurs rapportent cette relation au fait que la taille peut être un marqueur de santé dans l'enfance, et constatent que les résultats sont concordants avec les études préalables liant cancers ORL et sujets dénutris.¹⁰⁷

3.3.9 Amiante

Une étude conduite en France (base ICARE) a montré une association positive entre l'exposition à l'amiante et les carcinomes épidermoïdes oropharyngés (OR=1.6 CI=1.3-2.1) et de la cavité buccale (OR=1.9 CI 1.4-2.6).

Cette même étude, après ajustement pour l'exposition à l'amiante, ne retrouve pas de relation significative entre cancers ORL et exposition aux laines minérales et à la silice.¹⁰⁸

3.4 Physiopathologie – pathogénèse

Trois étapes sont classiquement décrites dans la carcinogénèse : initiation, promotion et progression, au cours desquelles une accumulation d'altérations génétiques survient¹⁰⁹.

3.4.1 Cancérisation locorégionale

La théorie d'un substrat tissulaire précancéreux, constitués par la présence de remaniements histologique en rapport avec des aberrations génétiques, et faisant le lit de tumeurs primitives ORL a été évoqué dès 1953 par Slaughter et al.¹¹⁰ Les bases moléculaires sous-jacentes ont depuis été mises en évidence par plusieurs travaux dont ceux de Califano et al.¹¹¹

La fréquence des lésions synchrones et métachrones pourrait être expliquée par ce concept de cancérisation multifocale de la région ORL, par l'exposition prolongée aux carcinogènes (alcool, tabac, HPV). Deux théories existent : la première retient que de multiples tumeurs distinctes peuvent naître en plusieurs sites ; l'autre que l'évènement

de transformation maligne est rare, mais que le clone, une fois formé, peut être à l'origine, par migration de cellules filles dans la muqueuse, de plusieurs tumeurs géographiquement distinctes mais génétiquement liées.¹¹²

3.4.2 Transition épithélio-mésenchymateuse

Cette transition est retrouvée au cours de l'embryogenèse, des syndromes inflammatoires et des processus de cicatrisation, et consiste en la transformation de cellules épithéliales en des cellules mésenchymateuses par remodelage de sa structure et des jonctions extra cellulaires avec perte d'adhérence et de polarité, leur permettant de migrer. Cet événement pourrait expliquer les processus d'envahissement tumoral et de localisations secondaires à distance.^{113,114,115}

3.4.3 Modifications épigénétiques

En marge des altérations du génome, des modifications touchant aux protéines de soutien et à l'architecture de l'hélice d'ADN peuvent entrer en jeu dans l'émergence de carcinomes, par exemple par l'inactivation de gènes suppresseur de tumeur.¹¹⁶

3.4.4 Voies des signaux moléculaires pour la carcinogenèse

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor) est surexprimé dans près de 90% des carcinomes épidermoïdes de la sphère ORL, jouant un rôle dans les phases précoces de la carcinogenèse. Un taux élevé d'EGFR est corrélés à un plus mauvais pronostic et à une résistance accrue aux agents cytotoxiques.¹¹⁷

3.5 DIAGNOSTIC

3.5.1 Imagerie

Les symptômes amenant le patient à consulter et à réaliser un bilan d'imagerie pour la recherche d'un processus évolutif de la sphère ORL sont une douleur pharyngée, notamment une odynophagie, une ulcération, une otalgie, une toux ou un stridor, l'apparition d'adénopathies cervicales voire aux stades plus avancés et selon la localisation, des troubles de la mobilité (protraction) de la langue ou un trismus.

C'est l'IRM qui est privilégiée à la TDM pour l'exploration de la cavité buccale et de l'oropharynx.^{118,119}

Elle doit être réalisée avec une antenne dédiée pour la région tête et cou et toujours comprendre des plans orthogonaux en pondération T1 et T2 sans saturation du signal

de la graisse. Puis, après injection du produit de contraste, le rehaussement s'analyse en pondération T1 avec saturation du signal de la graisse.⁴⁹

Il existe un bénéfice à étudier les tumeurs localisées sur la ligne médiane (base de langue, vallécule, paroi pharyngée postérieure) dans le plan sagittal.

L'apport de l'IRM est supérieur au scanner, autant sur les parties molles que sur l'analyse des pièces osseuses, permettant de détecter les atteintes médullaires précoces, liées aussi bien à l'envahissement tumoral qu'aux effets secondaires des traitements entrepris (radionécrose). La grande sensibilité de l'IRM à distinguer parmi les tissus et sa capacité à générer des images contrastées facilitent l'étude de cette région anatomique complexe.

Son analyse précise au chirurgien, dans le cadre du bilan préthérapeutique, les limites de la tumeur et son extension, ainsi que les rapports anatomiques aux vaisseaux. Les ganglions cervicaux sont cartographiés afin de décider de l'étendue du curage nécessaire.

Elle permet d'appliquer la classification TNM, de participer à poser une indication thérapeutique et de discuter des meilleurs voies d'abord en cas de prise en charge chirurgicale, puis de surveiller et juger de l'évolution pendant et après le traitement.

L'IRM peut être associée à la réalisation d'une TEP-FDG couplée au scanner, dans la recherche de lésions synchrones ou métachrones ainsi que dans la recherche de métastases à distance (figure 3.8). A noter toutefois que les amygdales présentent très souvent un métabolisme marqué, comme l'ensemble de l'anneau de Waldeyer, symétrique, pouvant masquer de petites tumeurs. Cet examen peut donc manquer de spécificité et ne remplace pas l'imagerie de coupe. Elle est cependant très utile pour détecter des récidives en zone remaniée après traitement.¹²⁰

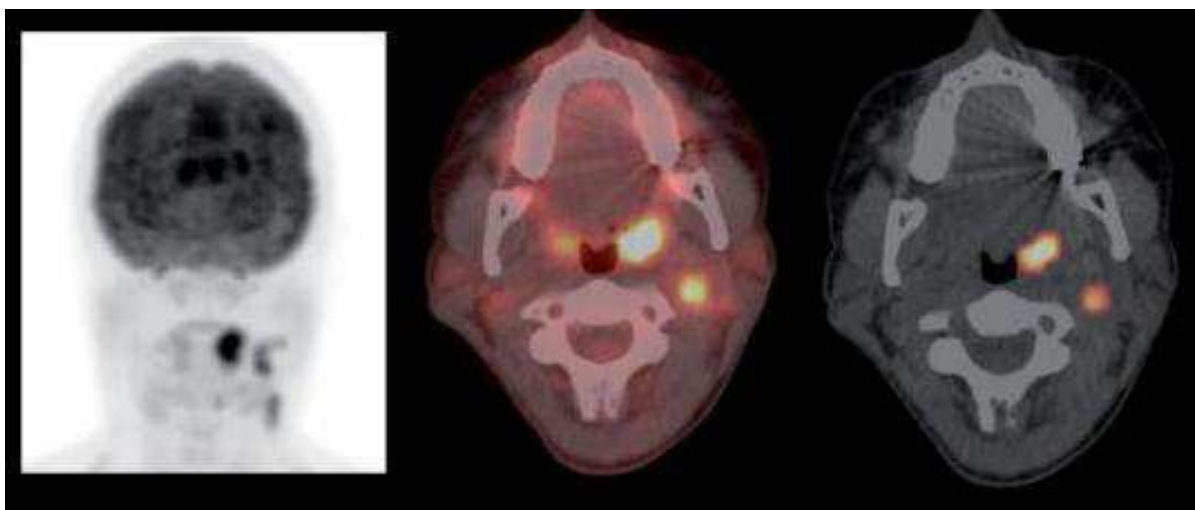


Figure 3.8 TEP d'un carcinome de l'amygdale gauche T2N2bM0, Paidpally 2012

La recherche des ganglions de drainage de la tumeur peut aussi se faire, quand la tumeur est accessible (cavité buccale), par la technique du ganglion sentinelle en médecine nucléaire : injection, aux points cardinaux de la masse tumorale, d'un isotope radioactif afin de détecter le premier relai ganglionnaire et ainsi guider le curage. Cela permet de limiter la morbidité opératoire et de focaliser l'analyse histologique sur un nombre réduit de ganglions à risque.¹²¹

Les cancers oropharyngés sont plus lymphophiles (60% N+ au diagnostic) que ceux de la cavité buccale, même si cliniquement l'atteinte peut passer inaperçue (34% dans la série de Greenberg et al.).¹²²

- Cavité buccale : groupe I, IV (sans atteinte des groupes II et III)

- Oropharynx : Groupes II, III, IV, V, rétropharyngés (voile, amygdale, paroi pharyngée postérieure)

Les tumeurs de la ligne médiane pourront donner des adénopathies bilatérales.

Les adénopathies cervicales inférieures et récurrentielles feront rechercher une extension ganglionnaire thoracique.¹²³

3.5.2 Classification TNM

La classification est basée sur le plus grand diamètre de la lésion et sur ses rapports anatomiques régionaux, l'envahissement de certaines structures anatomiques déterminant la conduite thérapeutique à tenir.¹²³

3.5.2.1 Classification tumorale

Tumeur	OROPHARYNX
Tx	Non évaluée
T0	Pas d'évidence de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur ≤ 2 cm
T2	2 cm < Tumeur ≤ 4 cm
T3	Tumeur > 4 cm
T4a	Atteinte du larynx, des muscles de la langue, du ptérygoïdien médial, du palis dur ou de la mandibule
T4b	Muscle ptérygoïdien latéral, ptérygoïdes, nasopharynx, base du crâne ou englobant l'artère carotide interne

Tumeur	CAVITE BUCCALE
Tx	Non évaluée
T0	Pas d'évidence de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur \leq 2 cm
T2	2 cm < Tumeur \leq 4 cm
T3	Tumeur > 4 cm
T4a	Atteinte de l'os cortical, des muscles profonds de la langue, du sinus maxillaire ou de la peau
T4b	Fosse infra temporale, ptérygoïdes, nasopharynx, base du crâne ou englobant l'artère carotide interne

3.5.2.2 Classification ganglionnaire

Ganglions	OROPHARYNX ET CAVITE BUCCALE
Nx	Non évaluée
N0	Absence de ganglion métastatique régional
N1	Unique homolatéral \leq 3 cm (grand axe)
N2a	Unique homolatéral 3 – 6 cm
N2b	Multiplés homolatéraux \leq 6 cm
N2c	Controlatéral ou bilatéraux \leq 6 cm
N3	> 6cm

3.5.3 Anatomopathologie

L'analyse des pièces biopsiques ou opératoires pour confirmer la nature maligne de la lésion est obligatoire avant de débiter le traitement d'un cancer de la sphère ORL. Parfois, le diagnostic est posé sur l'analyse de ganglions envahis, quand la lésion primitive n'est pas accessible, par cytoaspiration à l'aiguille fine ou adénectomie. La

cytoaspiration doit être complétée par une biopsie ou une adénectomie avant de pouvoir débiter le traitement.

La description microscopique renseigne sur le caractère infiltratif de la tumeur, sur son type histologique, sur le degré de différenciation et sur la présence ou non d'engainement nerveux et/ou d'emboles vasculaires.

95% des tumeurs de la sphère ORL sont constituées par des carcinomes épidermoïdes invasifs, de degré de différenciation variables. Différents variants existent : basaloïde, papillaire, adénosquameux, acantholytique.¹²⁴

Les autres types histologiques sont représentés par les carcinomes verruqueux (cavité buccale), les UCNT (formations lymphoïdes palatines et de base de langue), les lymphomes non hodgkiniens de l'anneau de Waldeyer, les tumeurs malignes des glandes salivaires accessoires (carcinomes adénoïdes kystiques), les tumeurs de Kaposi, les mélanomes, etc.¹²³

3.6 Pronostic

Le statut ganglionnaire est un facteur pronostique indépendant : la survie spécifique et la survie globale à 5 ans sont significativement ($p < 0.001$) plus élevées sans envahissement ganglionnaire (57.1% et 40.3% respectivement) qu'avec envahissement avéré (26.9% et 14.5% respectivement).

La rupture capsulaire et le statut R+ à l'issue du traitement chirurgical diminuaient les chances de survie spécifique ($p < 0.011$ et $p = 0.001$ respectivement) et de survie globale ($p < 0.052$ et $p = 0.003$ respectivement) à 5 ans.¹²⁵

3.7 Traitement

Le traitement de référence est la chirurgie, mais son recours en première intention s'est raréfié dans les deux dernières décennies pour les tumeurs de localisation pharyngée. Sa place est restée plus marquée dans le traitement des tumeurs de la cavité buccale et pour la réalisation des curages ganglionnaires cervicaux.

En effet, au cours des dernières décennies, l'incidence des cancers de la sphère ORL avaient tendance à décroître avec la diminution de la consommation éthylique et tabagique.¹²⁶ D'autre part, de grands progrès ont été faits dans les autres domaines thérapeutiques que sont la radiothérapie et la chimiothérapie. Enfin, un autre type de chirurgie, moins invasive, parfois guidée par robot ou imagerie, ou utilisant de nouveaux outils (lasers) a vu le jour.

La chirurgie carcinologique pharyngée peut être très mutilante en fonction du stade de la maladie ; c'est pourquoi, afin de minimiser les conséquences fonctionnelles parfois lourdes de la chirurgie et d'en éviter de potentielles séquelles, il a été développé des protocoles dits de préservation d'organe, principalement pour minimiser les pertes de volume lingual et les mutilations de la mandibule.

Ils consistent souvent en une chimiothérapie d'induction de type Taxotère Platine 5FU (TPF), seul protocole néo-adjuvant ayant montré un gain dans la survie (5% à 5 ans).¹²⁷ Dans le cadre d'une chimiothérapie concomitante à la radiothérapie, les platines seules sont souvent utilisées.

Une méta-analyse sur près de 11000 patients entre 1965 et 2000 a montré que la radiochimiothérapie concomitante est à l'origine d'un gain de survie significatif (6.5% à 5 ans chez les patients de moins de 70 ans) comparativement à la chimiothérapie néoadjuvante, avant l'association du taxotère au platine 5FU.¹²⁸

Actuellement, il semblerait qu'il n'existe plus de différence significative sur la survie entre la chimiothérapie néoadjuvante de type TPF et la radiochimiothérapie concomitante.¹²⁹

Ils permettent de préserver plus longtemps la fonction des organes du carrefour aérodigestif.

Toutefois, comme la chirurgie, ces protocoles de préservation d'organe sont en fait des traitements lourds, à l'origine d'une mortalité non négligeable (4% de décès en essais) et d'une morbidité (toxicités hématologique, rénale, digestive, dermatologique, etc.) imposant de sélectionner les patients et de les surveiller étroitement.

Ils sont par ailleurs à l'origine d'importants remaniements locorégionaux (œdème, fibrose), gênant la surveillance (interprétation clinique en endoscopie et des images au cours des bilans IRM de surveillance) et rendant plus difficile voire impossible des chirurgies de rattrapage en cas de reprise tumorale ou d'échec thérapeutique.

A l'inverse, du fait de l'amélioration des techniques au cours des dernières années, on a vu émerger une chirurgie moins mutilante, moins invasive, multipliant les voies d'abord afin de préserver au mieux les organes.

Une étude a repris un protocole privilégiant en première ligne la chirurgie non mutilante, avec des résultats encourageants, mais les tumeurs étaient de stades précoces, ce qui ne représente qu'environ un tiers des patients.¹³⁰

Les cancers liés à HPV apparaissant comme une entité distincte, de meilleur pronostic et répondant mieux aux traitements par radio-chimiothérapie de moindre intensité, il apparaît intéressant dans le futur de stratifier ces patients dans les études thérapeutiques, afin d'adapter les modalités et doses des traitements.¹³¹

4 HPV et HNSCC



“Mr. Lely, I desire you would use all your skill to paint your picture truly like me, and not flatter me at all; but remark all these roughness, pimples, warts, and everything as you see me; otherwise I will never pay a farthing for it.” Walpole’s Anecdotes of Painting in England, publié en 1764

4.1 Papillomavirus humains

4.1.1 Historique

Cromwell paraissait être particulièrement attaché aux difformités cutanées que lui avait infligées une infection virale, comme en ont pu faire l’expérience nombre d’humains depuis plusieurs millénaires. En effet, les verrues, tumeurs bénignes, provoquée par le papillomavirus, sont bien connues depuis l’Antiquité, et les noms grec *Κόνδυλος* [à l’origine de condylome] et latin *verruca* sont restés dans la terminologie actuelle.

Il faut cependant attendre 1823 avant d’évoquer un lien entre les lésions et leur origine infectieuse, selon une observation de Sir Cooper¹³².

A la fin du XIX^{ème} siècle, diverses expériences tentées par Payne¹³³, Variot¹³⁴ et Jadassohn¹³⁵ confirment la nature infectieuse des tumeurs cutanées et muqueuses.

En 1907, Ciuffo¹³⁶ précise la nature virale de l'infection en s'auto-inoculant un extrait de lésion passé au travers d'un filtre excluant bactéries et champignons.

1934 : Rous¹³⁷ incrimine HPV dans le mécanisme de carcinogénèse. Il évoque la présence du virus dans les tumeurs, mais elle est finalement démontrée par Strauss¹³⁸ en 1949.

En 1962, Melnick¹³⁹ classe le virus incriminé dans le groupe des papovavirus.

Le lien entre HPV et carcinome cervical est fait par Zur Hausen¹⁴⁰ en 1976.

L'année suivante, il identifie les sous types HPV16 et 18 au sein de carcinomes épidermoïdes.¹⁴¹

Dans les années 1980, les techniques de clonage des séquences d'ADN appliquées au papillomavirus montreront qu'il comporte à la fois des séquences retrouvées chez les humanoïdes et chez les singes et qu'il s'est donc diversifié avant la séparation de ces taxons¹⁴²; il a présenté une évolution très lente, de plusieurs centaines¹⁴³ à millions d'années¹⁴⁴, évoluant avec l'homme pour en devenir un parasite très bien adapté et défini, avec une divergence génomique maximale de 5% entre les variants géographiques¹⁴⁵.

En 1983, Syrjänen et ses collaborateurs émettent l'hypothèse du rôle participatif de HPV dans l'émergence des carcinomes épidermoïdes oraux.¹⁴⁶

La caractérisation de carcinomes oraux par la recherche de l'ADN du papillomavirus est décrite pour la première fois en 1985 par Löning, sous la direction de Zur Hausen.¹⁴⁷

En 1995, le Centre International de Recherche sur le Cancer reconnaît les sous types HPV16 et HPV18 comme carcinogènes chez les humains.¹⁴⁸

Enfin, en 2008, le prix Nobel de médecine récompense les travaux de Zur Hausen sur le lien entre HPV et mécanismes de carcinogénèse humaine.

4.1.2 Taxinomie

Il s'agit d'un virus de la famille des Papillomaviridae et incluant 16 genres différents (figure 4.1). Il existe près de 200 types de papillomavirus classés par site anatomique de préférence (cutané/muqueux) et qui peuvent être différenciés selon leur risque oncogénique. Ainsi HPV 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82 sont de haut grade, tandis que HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 et 89 sont de bas grade, à faible potentiel oncogénique. Le genre alpha est à l'origine des tumeurs à

développement muqueux chez l'Homme, le genre bêta à l'origine des tumeurs à développement cutané.¹⁴⁹

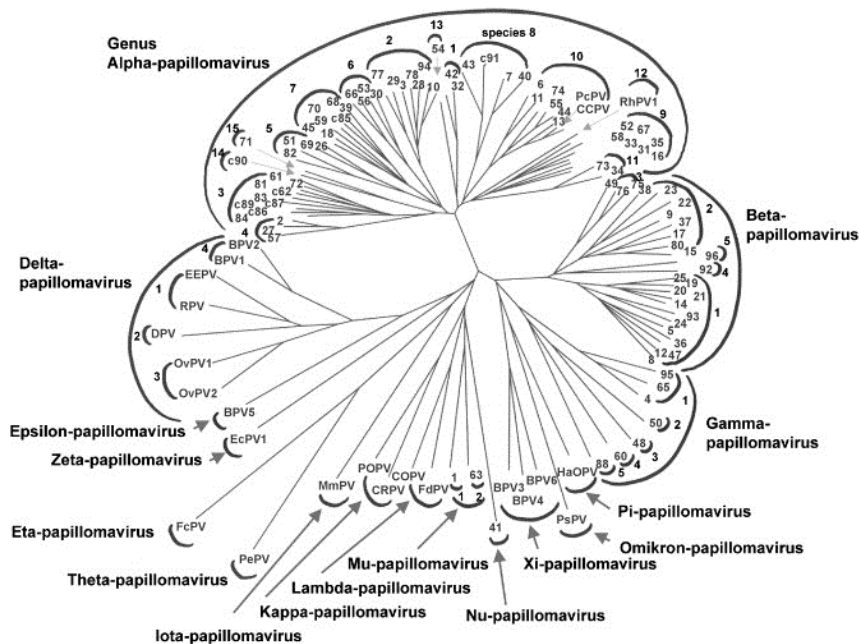


Figure 4.1 Arbre phylogénétique de 118 papillomavirus, De Villiers 2004.

4.1.3 Structure du virion

HPV est un virus nu de petit diamètre (52-55 nm) à capsidie icosaédrique (figures 4.2 et 4.3). Les virus de la famille HPV ne présentent pas d'enveloppe lipidique.

La capsidie présente 72 capsomères pentamériques. Elle est formée de deux protéines structurales L1 et L2, codées par le virus lui-même. Sa double hélice d'ADN le classe dans le groupe I de la classification de Baltimore ; il s'agit d'une chaîne circulaire courte, à l'état de chromatine, contenant 7000 à 8000 bases.¹⁴⁸

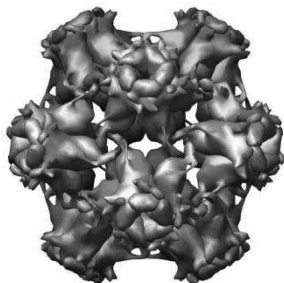


Figure 4.2 Reconstruction 3D du virion, Viperdb¹⁵⁰

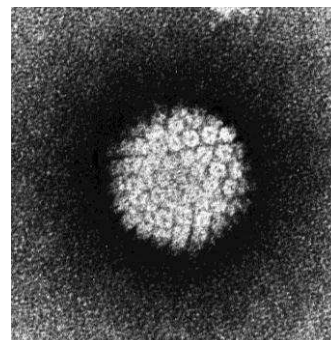


Figure 4.3 Photographie par microscopie électronique du papillomavirus humain – National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services

4.1.4 Structure du génome viral

Le génome du papillomavirus contient huit phases ouvertes de lecture (ORF – Open Reading Frame), codant pour huit protéines (figure 4.4) qui peuvent être regroupées en trois régions :

1/ région promotrice précoce (early ou E) pour les protéines non structurales E1, E2, E4, E5, E6 et E7

2/ région promotrice tardive (late ou L) pour L1 et L2

3/ région régulatrice.

La région cis-régulatrice de 1000 bases ne code pas pour des protéines mais est nécessaire à l'activation (enhancers) ou l'inhibition (silencers) de l'expression génomique, à sa réplication, et à la formation des particules virales.¹⁵¹

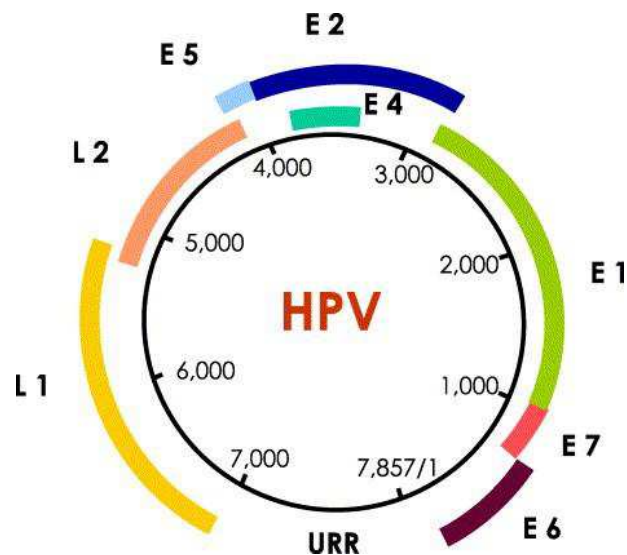


Figure 4.4 Représentation schématique du génome d'HPV avec gènes structuraux de la capside, les gènes non structuraux E et la région régulatrice. (URR : Upstream Regulatory Region, région cis-régulatrice)
Adapté de Fehrmann 2003

4.1.5 Fonctions des produits génomiques :

E1 : Seule enzyme possédant une activité sur double hélice d'ADN. Elle recrute la machinerie nécessaire à la réplication de l'ADN viral.

E2 : Protéine à trois rôles majeurs au cours du cycle viral : 1) régulation du niveau d'expression des autres produits génomiques, 2) recrutement d'E1 pour amorcer la réplication de l'ADN viral, 3) rôle dans le transfert du génome viral aux cellules filles.

E4 : Protéine virale la plus abondante, mais sa fonction reste mal connue, liée à l'amplification de l'ADN viral et à la libération virale hors de la cellule hôte

E5 : Oncoprotéine à mode d'action encore partiellement incompris, contribuant quantitativement à la production virale et entrant en jeu dans les voies de régulation des facteurs de croissance et de l'échappement à l'immunité. Elle coopère avec E7 pour stimuler la prolifération cellulaire et augmenter l'expression du génome viral. ¹⁵²

E6 : Oncoprotéine qui entre en coopération avec E7 pour fournir un environnement favorable à la réplication de l'ADN viral (court-circuite par exemple le mécanisme d'apoptose cellulaire) ; sa cible la plus caractéristique est la protéine suppresseur de tumeur p53, dont elle entraîne la dégradation. Elle permet la survie de cellules mêmes fortement mutées en empêchant leur apoptose¹⁵³.

E7 : troisième et dernière oncoprotéine codée par le virus HPV ciblant les voies de régulation du cycle cellulaire contrôlée par les protéines pRb, p107 et p130, à l'origine d'un environnement favorable pour la réplication de l'ADN viral (via le maintien de la phase S dans les kératinocytes différenciés), promoteur de la croissance de la réplication de l'ADN et de la croissance cellulaire¹⁵⁴.

L1 et L2 : sont respectivement les constituants majeur et mineur de la capside (sont utilisés dans la conception du vaccin prophylactique contre HPV).

4.1.6 Cycle viral

Ce virus est épithéliotrope avec un cycle de développement au sein de l'épithélium stratifié squameux. Les virus de groupe I de Baltimore à chaîne bicaténaire doivent habituellement entrer dans le noyau de la cellule l'hôte avant de pouvoir se répliquer.
^{155,156}

4.1.6.1 Entrée

Le virus pénètre initialement par microtraumatismes dans l'épithélium puis il atteint, par un mécanisme incomplètement compris, les cellules basales qui sont la cible de l'infection par HPV.

4.1.6.2 Etablissement d'un état infectieux non productif

Une fois HPV au sein de la cellule cible, il commence par utiliser la machinerie de la cellule hôte pour répliquer son ADN en un petit nombre de plasmides nucléaires (seuls les produits génomiques précoces sont exprimés à ce stade).

4.1.6.3 Maintenance d'un état infectieux non productif

Il persiste à l'état latent pendant plusieurs années, étape préalable au développement du cancer, nécessaire pour les types à haut risque carcinogène. Cela requiert le maintien du génome viral au cours de multiples divisions cellulaires au cours du temps, de mécanisme non élucidé.

4.1.6.4 Etapes de production

Elle débute quand une cellule fille entame sa différenciation. Le virus retarde la différenciation de la cellule hôte et redirige ses capacités de réplication de l'ADN vers son propre matériel, ce qui permet l'amplification du génome viral et l'expression des gènes tardifs nécessaires à la production de particules virales et à leur expansion (figures 4.5 et 4.6).

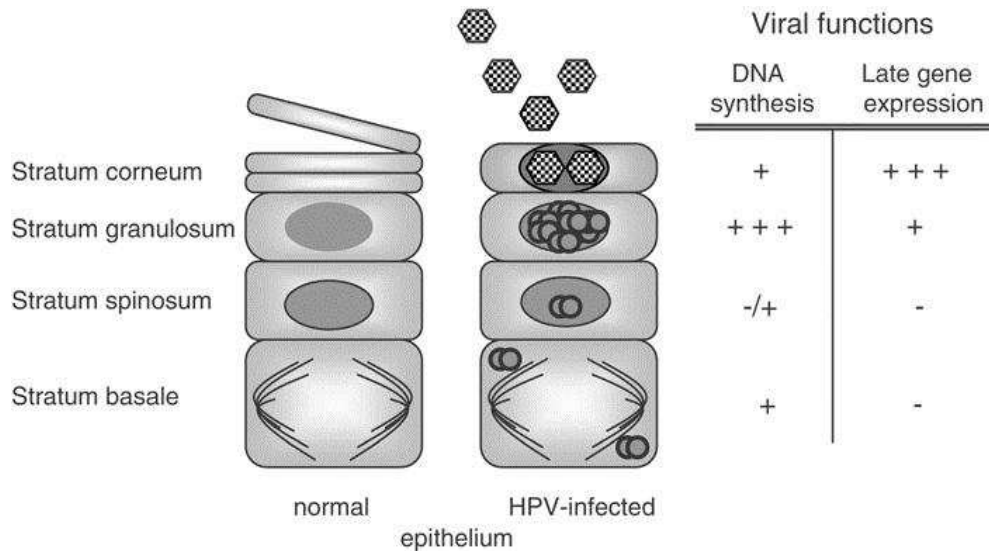


Figure 4.5 Fonctions virales dans le cycle épithélial d'HPV, Fehrmann 2003

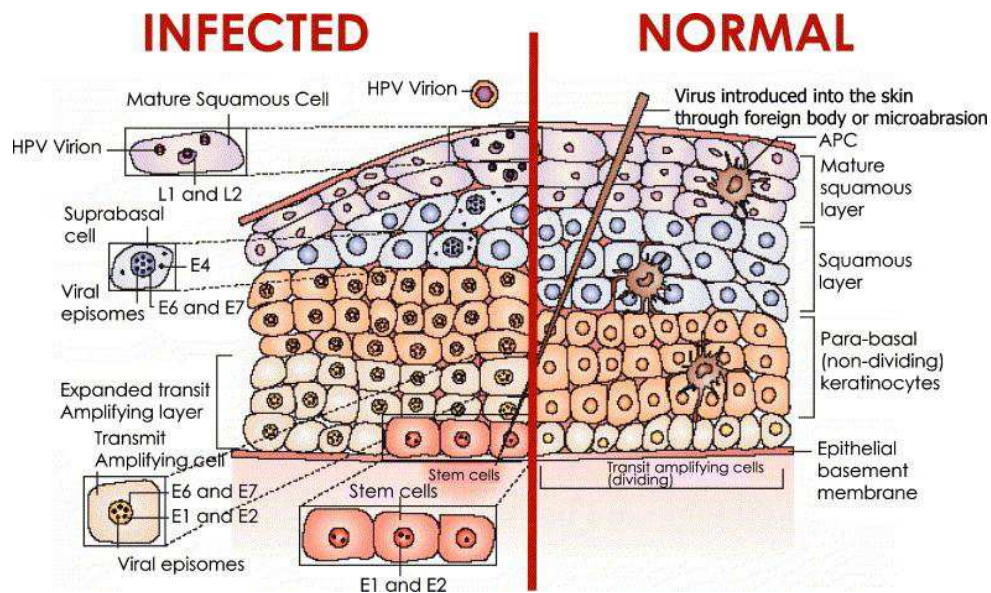


Figure 4.6 Etapes du cycle dans épithélial d'HPV, Frazer 2004

4.2 Epidémiologie de l'infection par HPV

L'infection par le virus HPV concerne une population sexuellement active.

La majorité des individus de cette population sont destinés à être infectés par au moins un type d'HPV ano-génital au cours de leur existence.

4.2.1 Population saine

Une méta-analyse internationale¹⁵⁷ reprenant les données recueillies auprès de 150000 femmes, après ajustement de l'âge et de la méthode de détection, met en évidence environ chez environ 10% d'entre elles l'ADN du virus.

Les taux de prévalence les plus élevés apparaissent en Afrique et Amérique Latine (20-30%).

Les études de prévalence des infections des voies aérodigestives supérieures rapportent des chiffres très variables, mais on pourra retenir que l'infection par HPV de l'oropharynx est présente dans un peu moins de 10% des cas :

- une méta-analyse chez une population saine retrouvait des taux de 4.5% quel que soit le type d'HPV, 3.5% pour les HPV de haut risque, et 1.3% pour HPV 16¹⁵⁸
- cohorte mixte 7.3% (95% CI : 6.0, 8.9) dans une population des USA avec un taux trois fois plus élevé chez les hommes que chez les femmes¹⁵⁹
- dans une cohorte réalisée chez des étudiants masculins, on retrouvait une prévalence de 7.5%¹⁶⁰
- une cohorte de femmes, à haut risque d'infection (prostitution), retrouvait un taux de 7.9%, moindre comparativement à ce qui était observé au niveau du col de l'utérus (27.8%) ou de l'anus (15%).¹⁶¹

La combinaison de l'infection par HPV et du tabagisme apparaît additive ou synergique.¹⁶²

Dans une étude réalisée aux Etats Unis en 2009, les taux de séroprévalence étaient significativement ($p < 0.001$) plus élevés parmi les femmes (32.5%) que pour les hommes (12.2%), aussi bien pour les types à haut risque (HPV 16 et 18 : 15.6% et 6.5% versus 5.1% et 1.5% respectivement) que pour les types à faible risque carcinogène (HPV 6 et 11 : 17.0% et 7.1% versus 6.3% et 2.0% respectivement).¹⁶³

La séroprévalence progressait avec l'âge, atteignant un pic au cours de la quatrième décennie chez les femmes (42%), plus tard chez les hommes au cours de la sixième décennie (18%).¹⁵⁹

Au contraire de la séroprévalence virale, les taux de prévalence de l'infection orale par HPV, tous types confondus, apparaissent nettement plus élevés chez les hommes (OR = 3.2) que chez les femmes (figure 4.7) après ajustement aux autres facteurs de risque (éducation, tabagisme, comportement sexuel).¹⁵⁹

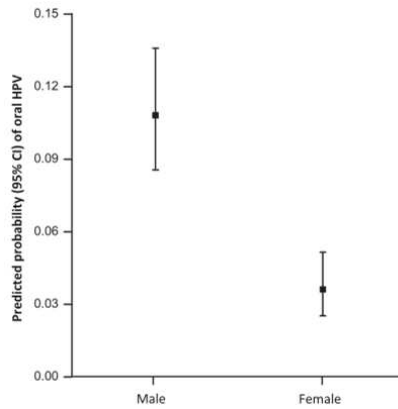


Figure 4.7 Diagramme de probabilité de détection de l'ADN viral dans des échantillons de rince-bouche chez des 3899 hommes et femmes sains aux USA entre 2009 et 2010, ajusté à l'âge, à l'ethnie, au niveau d'éducation, au taux sérique de cotinine, à l'âge des premiers rapports sexuels et au nombre de partenaires sexuels – Sanders 2011

La présence du virus varie fortement en fonction des régions considérées dans le monde. D'après une méta analyse de 2007, la prévalence de l'infection virale chez plus de 150000 femmes sans pathologie tumorale, quel que soit le sous type considéré, est de 10% au niveau mondial, maximale en Afrique (22.9%), discrètement moins marquée en Amérique du Sud (18.6%) et du Nord (13.8%), enfin moindre en Asie (8.3%) et en Europe (6.6%). Le sous type viral HPV16 est toujours prédominant, suivi par le sous type 18 (figure 4.8).¹⁵¹

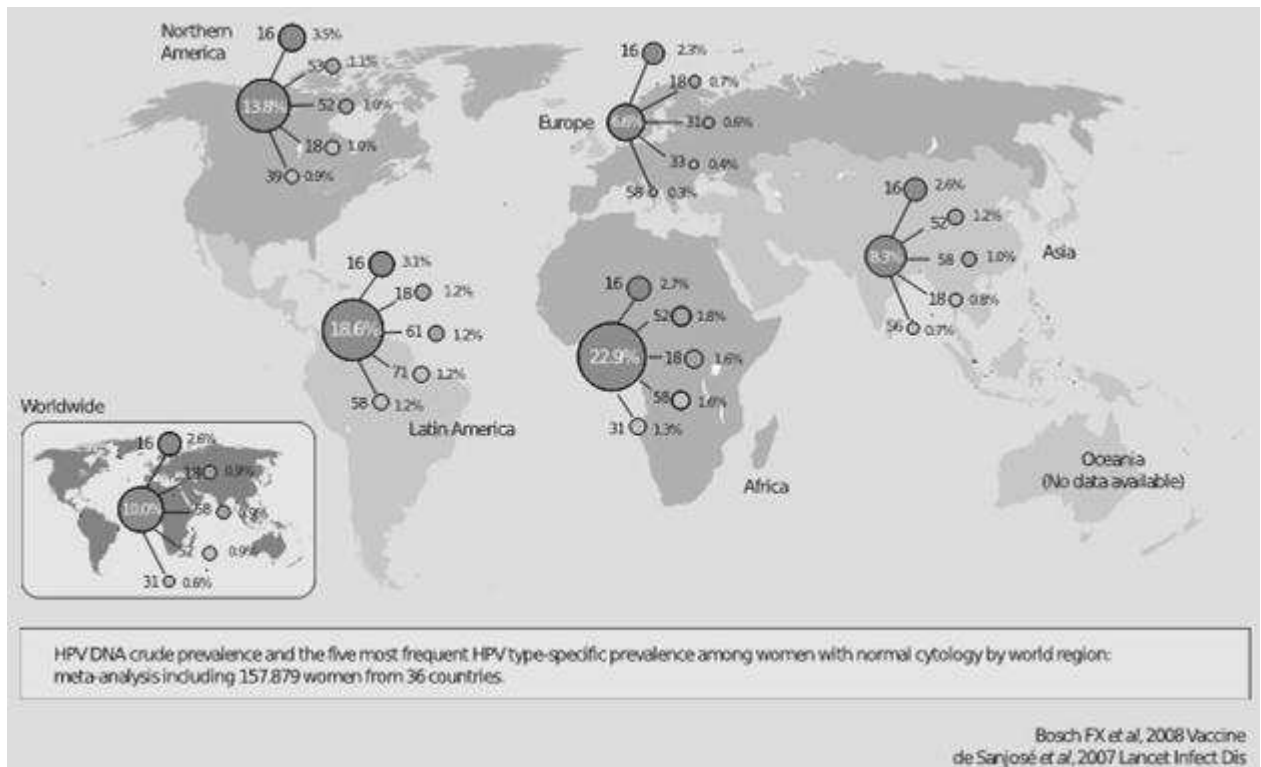


Figure 4.8 Prévalence de l'infection par HPV dans une population de femmes saines, IARC 2012

4.2.2 Population atteinte par un cancer ORL

4.2.2.1 Carcinomes oropharyngés

Une méta-analyse traitant les données de près de 20000 patients (dont plus de 5000 cancers oropharyngés) entre 1966 et 2010¹⁶⁴ a permis de mettre en évidence une progression régulière et significative ($p < 0.001$) de la prévalence virale dans le cadre des carcinomes oropharyngés; la prévalence mesurée de 1966 à 2010 est de 47.7% en moyenne [IC 95%, 42.9-52.5 %], mais si l'on s'intéresse aux années les plus récentes, on note d'importantes variations sur une période courte :

- avant 2000 : 40.5% [IC 95%, 35.1-46.1 %]
- 2000-2004 : 64.3% [IC 95%, 56.7-71.3 %]
- 2005-2009 : 72.2% [IC 95%, 52.9-85.7 %]

Ce qui correspond à une hausse de plus de 70% entre 2000 et 2010.

Cette hausse a été plus marquée en Europe comparativement aux USA ; avant 2000, la prévalence européenne était significativement moindre, mesurée à 35.3% contre 50.7% aux USA ($p=0.008$) alors que désormais, elle est de 73.1% contre 69.7% respectivement ($p=0.8$) : l'écart entre les deux continents n'est plus significatif.¹⁶⁴

Entre 1970 et 2002, par l'étude du registre suédois des cancers, l'augmentation des chiffres d'incidence des cancers amygdaliens apparaît parallèle à la hausse du nombre de cancers oropharyngés liés à HPV, en faveur d'une « épidémie virale » de ces tumeurs.¹⁶⁵

Dans le même sens, une analyse épidémiologique³ centrée aux Etats Unis par l'étude du registre SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) entre 1988 et 2004, retrouve une hausse de 225% [IC 95%, 208-242 %] de l'incidence de l'infection virale par HPV dans les cancers oropharyngés, alors qu'il est noté une diminution significative de 50% [IC 95%, 47-53 %] du nombre de cancers oropharyngés non liés à HPV (figure 4.9).

L'augmentation des cas incidents de cancers oropharyngés a concerné de façon plus marquée les hommes, une population de plus en plus jeune, comme en témoignent ces graphiques (figure 4.10) issus de l'étude de Marur, du même registre de population américaine, mais entre 1973 et 2006.¹³¹

Concernant l'évolution par site anatomique, on note une progression régulière de la base de langue (+1.3% par an) et de l'aire amygdalienne (+0.6% par an), alors que les cancers de la cavité orale (absence d'association au papillomavirus) ont régressé (-1.9% par an).⁹¹

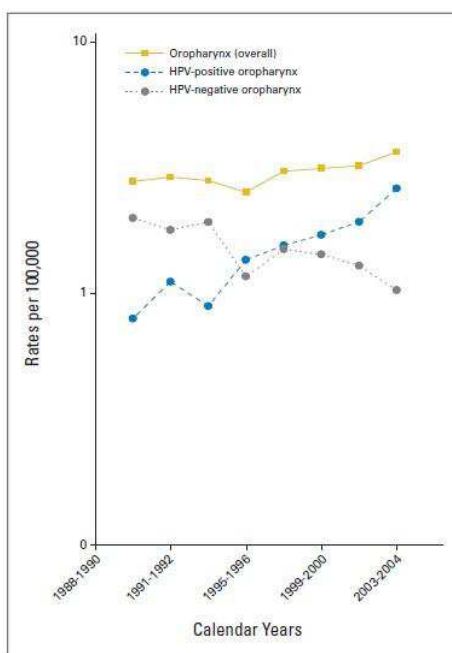


Figure 4.9 Incidence des cancers oropharyngés : total, HPV+ et HPV- entre 1988 et 2004 à Hawaï, Iowa et Los Angeles, Chaturvedi 2011

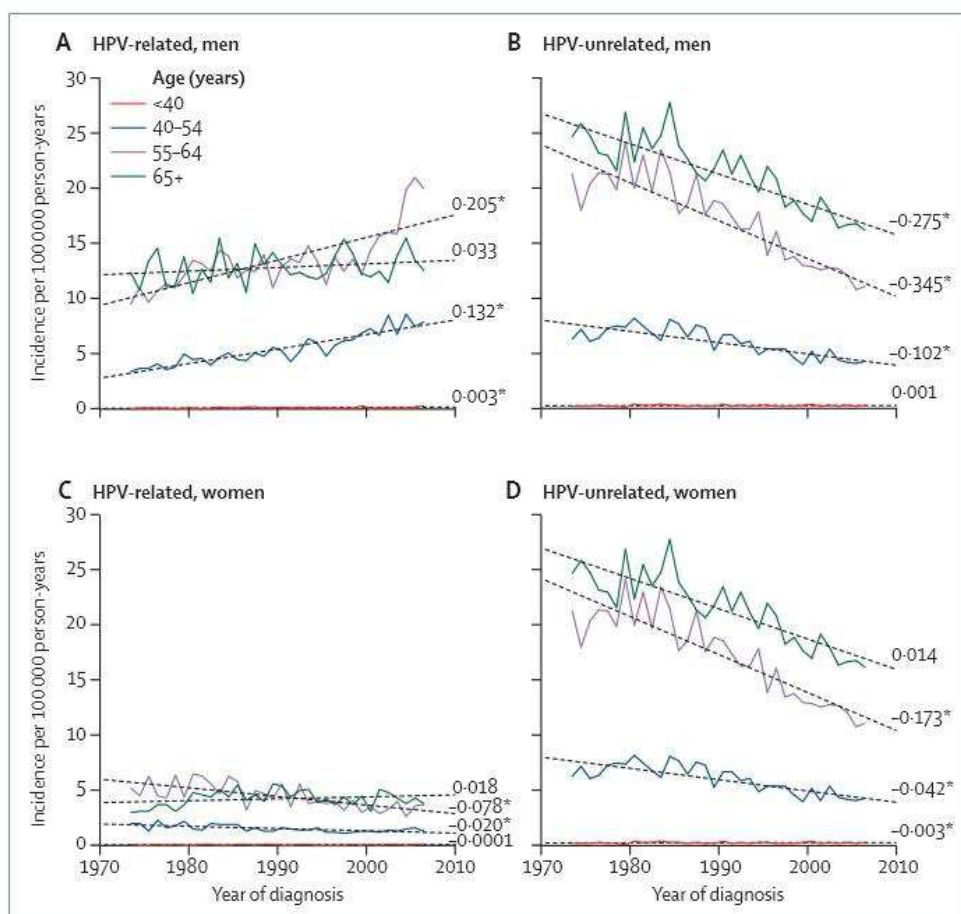


Figure 4.10 Incidence ajustée à l'âge des cancers ORL entre 1973 et 2006, Marur 2010

4.2.2.2 Carcinomes ORL hors oropharynx

Si l'on s'intéresse aux carcinomes en dehors de la sphère oropharyngée, on note que la prévalence virale par HPV est nettement moins marquée avec une moyenne de 21.8% [IC 95%, 18.9-25.1 %] de 1966 à 2010. Et contrairement au site oropharyngé, il existe une diminution, toutefois non significative ($p=0.97$), de cette prévalence¹⁶⁴ :

- Avant 2000 : 22.2 % [IC 95%, 18.4-26.4 %]
- 2000-2004 : 17.2 % [IC 95%, 11.9-24.4 %]
- 2005-2009 : 6.1 % [IC 95%, 0.7-39 %]

La méta-analyse de Kreimer en 2005 retrouvait une prévalence de HPV de 23.5% des tumeurs de la cavité buccale, dont 68% d'HPV16.¹⁶⁶ Cependant, selon les études, les chiffres restent très variables, évalués entre 4 et 80 %.¹⁵⁶

Nous ne disposons pas de données récentes sur les populations africaines, asiatiques, et sud-américaines dans le contexte tumoral ORL.

4.2.3 Clairance virale

L'infection virale par HPV est typiquement de courte durée, mais souvent récurrente, et il paraît donc intéressant de préciser les schémas épidémiologiques de la clairance virale.

Il a été observé dans certaines populations à fort risque d'infection par HPV (dont une étude longitudinale à Guanacaste sur 8545 femmes à 5-7 ans d'intervalle¹⁶⁷), une variation « en U » de la prévalence au cours du temps, montrant deux pics de fréquence : l'un chez les femmes jeunes, ici de moins de 25 ans, l'autre, moins marqué, chez les femmes de plus de 65 ans. Ce rebond de l'infection après 65 ans serait plutôt le fait d'infections persistantes que de nouvelles infections, comme le montrent ces courbes (figures 4.11, 4.12 et 4.13).¹⁶¹

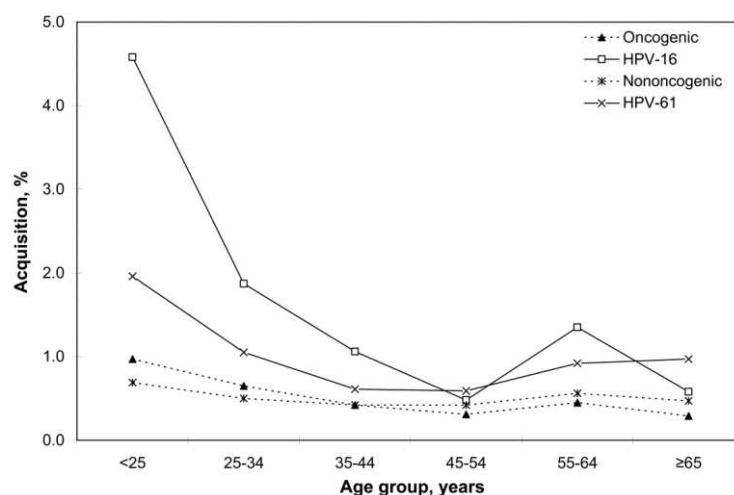


Figure 4.11 Taux d'incidence d'HPV par type en fonction de l'âge, Paz Cañadas 2004

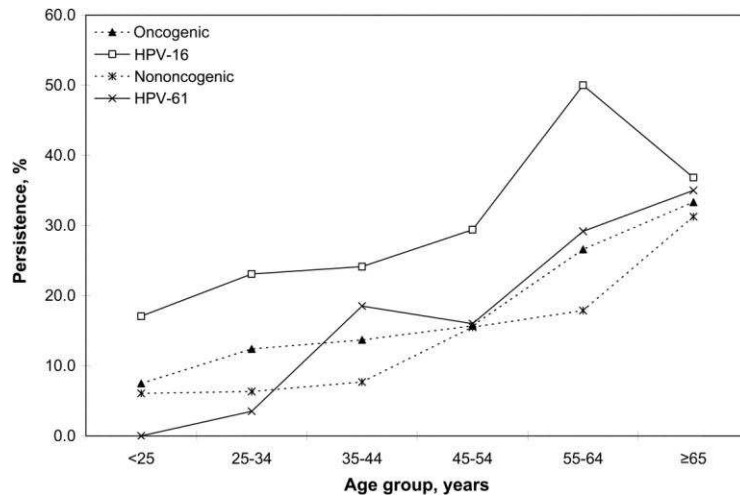


Figure 4.12 Taux de persistance d'HPV par type en fonction de l'âge, Paz Cañadas 2004

La tendance à la persistance du virus, plutôt que la nouvelle acquisition chez les femmes plus âgées était significative ($p < 0.0001$) pour les HPV de haut risque comme de faible risque oncologique.

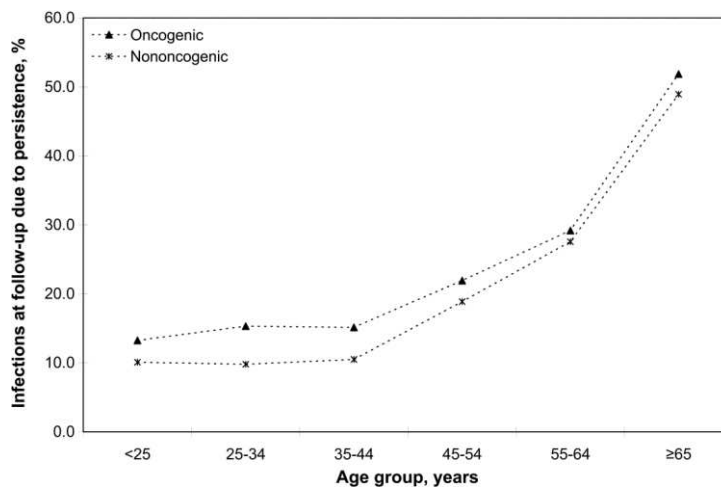


Figure 4.13 Taux de prévalence d'HPV par type en fonction de l'âge, Paz Cañadas 2004

4.3 Facteurs de risque

4.3.1 Comportement sexuel et porte d'entrée

La porte d'entrée est cutanée ou muqueuse en fonction des sous types viraux considérés, ceux-ci présentant un tropisme variable ; les virus impliqués dans les carcinomes épidermoïdes ORL appartiennent au groupe alpha, pour qui la porte d'entrée est majoritairement muqueuse.

Le mécanisme d'entrée est probablement le fait de lésions superficielles, de micro-abrasions, par une transmission de nature sexuelle. Déjà démontré pour les cancers du col de l'utérus¹⁶⁸, cela semble aussi être le cas pour les carcinomes oropharyngés⁴.

L'étude de la cohorte HIM a montré que le comportement sexuel (hétéro/homo/bisexualité) était fortement lié à l'infection orale par HPV avec un risque augmenté pour la bisexualité.¹⁶⁹

En revanche, leurs résultats et ceux de plusieurs autres études préalables sont divergents et ne permettent pas de conclure sur le rôle précis des rapports oraux.^{160,170}

L'infection par HPV est très rare avant les premières relations sexuelles. Nous avons par ailleurs déjà noté une distribution bimodale, chez les jeunes adultes en relation avec de nouvelles infections et chez les personnes les plus âgées, plutôt du fait d'un défaut de clairance virale.¹⁶¹

Le nombre de partenaires sexuels est un facteur de risque si l'on ne se restreint pas aux sous types viraux de haut risque, mais il est moins prédictif que le statut marital pour la prévalence d'infection orale par HPV.¹⁵⁹

4.3.2 Genre

Alors que les femmes présentent plus d'infection HPV en général (séroprévalence et infection vaginale), les hommes présentent une prévalence plus forte¹⁷¹ de l'infection de la sphère ORL (PR = 2.8, [95% CI: 2.02, 3.88]) ; ceci pourrait en partie être expliqué par la pratique de sexualité oro-vaginale^{159,131}. Des causes hormonales (œstrogènes entre autres)¹⁷² ou une possible immunisation par séroconversion en réponse aux infections du col utérin chez les femmes¹⁷³ pourrait entrer en jeu.

4.3.3 Intoxications alcoolique et tabagique

Le tabagisme actif (OR=2.7) ou sévré (OR=1.6) est un facteur de risque qui augmente le risque d'une infection par HPV^{171,174,175} comparativement à la population n'ayant jamais fumé. De plus, le tabac semble potentialiser les effets de l'infection par HPV dans le développement des cancers ORL.¹⁷⁶

4.3.4 Niveau socio-économique

Le carcinome épidermoïde ORL lié à HPV est corrélé à un niveau socio-économique plus élevé¹⁷⁷ qu'en l'absence d'infection, en particulier chez les hommes jeunes et blancs.¹⁷⁸

4.4 Mécanismes de carcinogénèse spécifiques à HPV

Les carcinomes oropharyngés liés à HPV présentent un profil moléculaire plus proche des carcinomes du col utérin que des carcinomes oropharyngés non liés à HPV.¹⁷⁹

Ainsi, les modifications précancéreuses régionales décrites dans les mécanismes de carcinogénèse des carcinomes épidermoïdes ORL ne semblent pas entrer en jeu dans ceux qui sont liés au virus HPV, pouvant expliquer le plus faible nombre de tumeurs synchrones et métachrones dans ce cadre.¹⁸⁰ Ce risque de récurrences locorégionales a d'ailleurs chuté en même temps que la prévalence virale ORL progressait.¹⁸¹

Il a été trouvé des différences dans les modifications chromosomiques et de transcription génomique entre les cancers liés à HPV et ceux qui ne le sont pas, particulièrement liées au rôle des oncoprotéines E6 et E7, potentielles cibles de futures thérapies spécifiques.¹⁸²

Le papillomavirus pourrait avoir une action indirecte sur l'angiogénèse tumorale par l'action de son oncoprotéine E6 sur p53¹⁸³ ; la dégradation de p53 entraînerait, via des voies physiopathologiques complexes¹⁸⁴ et en condition d'hypoxie durable¹⁸⁵, une perte de la régulation de VEGF, dont le taux croissant aboutirait à la formation de réseaux vasculaires immatures, chaotiques et de perméabilité excessive. La dégradation de p53 aboutit par ailleurs à un défaut d'arrêt des cellules en phase G1, permettant habituellement de procéder à des réparations de l'ADN de l'hôte, et à un défaut d'apoptose, les rendant susceptibles à une instabilité génomique.

Parallèlement, E7 inactive la voie du rétinoblastome, suppresseur de tumeur, permettant le passage en phase S dans les cellules, et à terme leur prolifération.¹⁸⁶

Le virus, via les oncoprotéines E6 et E7, peut en outre induire une immortalisation des kératinocytes oraux et des amygdales palatines, comme l'ont montrés les travaux de Dürst¹⁸⁷, Woodworth¹⁸⁸ et Spanos¹⁸⁹ (figure 4.14).

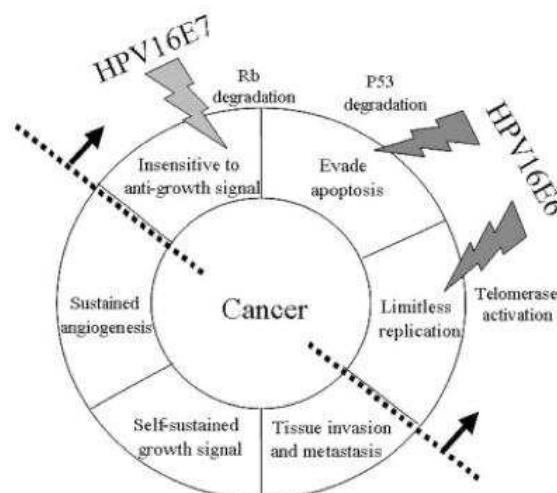


Figure 4.14 Mécanismes de carcinogénèse des carcinomes épidermoïdes, Spanos 2008

Le système immunitaire ne réagit que très peu à l'infection par HPV car sa réplication n'entraîne pas de cytolysse, de nécrose ou de virémie.¹⁹⁰

En particulier, HPV inhibe la production d'interféron d'où une réponse antivirale minimale.^{191,154} Les cellules de Langerhans ne sont pas activées par le virion ni le vaccin prophylactique.¹⁹² Des études ont montré qu'il existait une absence de réponse fonctionnelle des lymphocytes T CD4+ à la présence de HPV16¹⁹³, des lymphocytes T CD8+ et des lymphocytes B.

Les modifications sur les histones, l'hypométhylation de l'ADN et l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs font partie des autres mécanismes du papillomavirus pour prévenir la réponse immunitaire de l'hôte.¹⁹⁴

Après une infection par HPV, la séroconversion est rare (60% chez les femmes, moins de 30% chez les hommes), non durable, limitée aux protéines de capsid L1 et L2 et non avec les antigènes précoces de réplication et de persistance virales.¹⁶³

Les anticorps développés naturellement dans les suites d'une infection ne protègent pas de la réinfection^{195,196}, au contraire du vaccin (particules virales sans génome) prophylactique¹⁹⁷. (figure 4.15)

4.5 Caractéristiques cliniques des tumeurs ORL liées à HPV

Il est désormais reconnu que les tumeurs oropharyngées, selon qu'elles sont associées ou non à l'infection par un papillomavirus, sont deux entités distinctes ayant chacune des caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires différentes.^{198,199}

Les tumeurs de la sphère ORL liées à HPV naissent le plus souvent de l'oropharynx et de la base de langue.^{200,201} L'atteinte oropharyngée est tout particulièrement marquée au niveau de l'aire amygdalienne, significativement corrélée à la présence du génome d'HPV dans les cellules, et indépendante du grade tumoral et de la consommation alcoolique.²⁰²

Les autres sites ORL (cavité orale, larynx, hypopharynx) sont plus rarement atteints²⁰³, et le rôle du virus dans l'émergence du carcinome et sur le pronostic est moins évident.²⁰⁴

4.6 Caractéristiques anatomopathologiques des tumeurs ORL liées à HPV

Les tumeurs ORL sont en général modérément différenciées et kératinisées. Les tumeurs liées à HPV s'écartent de ce modèle²⁰⁵: elles sont peu différenciées mais peuvent garder un stade T faible. Elle sont parfois de présentation basaloïde, et souvent le siège d'une infiltration par des lymphocytes.²⁰⁶ Les relais ganglionnaires régionaux sont plus souvent envahis que lorsque HPV n'est pas impliqué. Ils sont par ailleurs volontiers cystiques et de grande taille, classant la tumeur en stade III à IV dès sa découverte.²⁰⁷

4.7 Biomarqueurs

Il a été montré que la positivité du statut HPV était associée à une amélioration du pronostic des carcinomes épidermoïdes oropharyngés. D'autres biomarqueurs sont candidats pour être combinés au statut HPV afin d'en améliorer la puissance pronostique. Les résultats des différentes études sont toutefois parfois contradictoires.

4.7.1 HPV

La méta-analyse récente de Rainsbury et ses collaborateurs retrouvait un risque relatif de 0.43 (0.37-0.50) de survie globale dans les carcinomes oropharyngés à HPV positif.²⁰⁸ Au contraire, Liang ne retrouvait pas de lien entre la présence d'ADN d'HPV16 et une survie globale significative (HR 0.9 ; 0.95% [0.3-2.9]) à l'étude de 179 tumeurs.²⁰⁹

Ang et al. retrouvent aussi une amélioration du pronostic pour les patients HPV+ plutôt que pour les patients HPV- avec une meilleure survie globale à trois ans (82.4%, vs. 57.1%, $P < 0.001$). Après ajustement aux différents facteurs démographiques, environnementaux et aux traitements, la réduction de la mortalité était de 58% (HR 0.42; 95% CI [0.27 - 0.66]). L'effet positif de l'infection par HPV sur le taux de mortalité se réduisait avec le nombre de paquet de cigarette fumés.⁵

Pour Fakhry et al., l'amélioration du pronostic lié à HPV semble en rapport avec une meilleure réponse à la chimiothérapie d'induction (82% vs 55%, différence = 27%, IC95% [9.3% - 44.7%], $P = .01$) et après la radio chimiothérapie (84% vs 57%, différence = 27%, IC95% [9.7% - 44.3%] $P = .007$).²¹⁰

Dans la même cohorte, l'amélioration de la survie globale à deux ans était significative pour les patients du groupe HPV+ : 95% (IC95% [87% - 100%]) vs 62% (IC95% [49% - 74%]) soit une différence de 33% (IC95% [18.6% - 47.4%] $P = .005$) ; ils présentaient par ailleurs un moindre risque de progression [HR] = 0.27, IC95% [0.10 - 0.75] et une mortalité globale réduite (HR = 0.36, IC95% [0.15 - 0.85]).²¹⁰

4.7.2 p16

Le statut p16+ est lui aussi considéré comme un facteur de meilleur pronostic. Pour Lassen en 2009, le contrôle locorégional à 5 ans était de 58% versus 28% dans les tumeurs p16- ($p=0.0005$) ; il en était de même pour la survie spécifique (72% versus 34% ; $p=0.0006$) et la survie globale (62% versus 26%, $p=0.0003$). En analyse multivariée, p16 était un facteur pronostic indépendant et robuste dans l'évaluation de la rechute locorégionale (HR=0.35 IC95% [0.19-0.64]), de la mortalité spécifique (HR=0.36 IC95% [0.20-0.64]) et de la mortalité globale (HR=0.44 IC95% [0.28-0.68]).²¹¹

Pour Rainsbury, le statut p16+ est associé à un risque relatif de 0.43 (0.35-0.53) de survie globale pour les cancers oropharyngés.²⁰⁸

Le statut p16+ a lui aussi été montré comme un facteur de meilleur pronostic pour les cancers de l'oropharynx.²¹²

Le statut p16+ tend vers une meilleure survie spécifique ($p=0.126$) que p16-.¹²⁵

Cependant d'autres études ont des résultats contradictoires, ne montrant pas d'association avec une meilleure survie : Liang, en 2012, ne met en évidence de différence significative entre les groupes p16+ et p16- (HR 0.3 ; 95% [0.1-1.1]).²⁰⁹

Enfin, de nombreuses études ont montré une forte corrélation (jusqu'à 92%) entre la présence du virus (vérifié par PCR ou hybridation in situ) et l'expression de p16 par immunohistochimie.^{3,213,214}

4.7.3 p53

Il n'a pas été trouvé de résultat significatif sur l'ensemble des études reprises dans la méta-analyse de Rainsbury (2013) entre p53, HPV et p16.²⁰⁸

4.7.4 Associations de marqueurs

Liang n'a pas mis en évidence de caractère pronostique significatif pour les statuts HPV ou p16 pris isolément, mais la combinaison de la positivité pour l'ADN d'HPV et des sérologies E6 ou E7 était associée à une meilleure survie globale pour les carcinomes oropharyngés : HR (ADNHPV+/E6/E7+) = 0.1, IC 95% [0.02-1.0]) ; comparativement aux patients négatifs pour E6 et E7 : HR (ADNHPV+/E6-/E7-) = 3.4, IC 95% [0.6-18.1]. Considérant p16 et non plus HPV, la survie était améliorée seulement si E6 et E7 étaient positifs : HR (p16+/E6/E7+) = 0.1, IC 95% [0.02-0.4] versus HR (p16+/E6-/E7-) = 3.1, IC 95% [1.2-7.7].²⁰⁹

Le dosage des oncoprotéines E6 et E7 pourrait donc constituer une nouvelle piste pour caractériser le pronostic tumoral, en association avec les biomarqueurs déjà testés (HPV

et p16). En effet, la surexpression de p16 n'est pas pathognomonique d'une infection par HPV; ainsi, une exposition aux carcinogènes OH et tabac peut entraîner une mutation somatique du gène Rb, à l'origine, indépendamment de toute infection par HPV, d'une surexpression de p16. De plus, il pourrait s'agir, dans le cas d'un profil p16+/HPV-, d'un manque de spécificité de la détection du virus.²¹⁵

D'autres études ont montré une supériorité du pronostic des patients p16+/HPV- sur les patients p16-/HPV-, faisant de p16 un facteur prédictif important du pronostic.²¹⁶

Plusieurs stratégies existent donc, allant du test en routine des HPV oncogènes¹³¹, à des schémas plus complexes intégrant p16 et HPV. L'interprétation en immunohistochimie (figure 4.15) pour la détection de p16, afin de détecter les patients HPV+, peut ainsi suivre le cadre suivant²¹⁵ :

- Un marquage uniforme et intense, comprenant le cytoplasme et le noyau de la quasi-totalité de cellules cancéreuses de type basaloïde, non ou partiellement kératinisées peut se substituer à un test d'HPV
- Un marquage intense de cellules métastatiques de carcinome épidermoïde oropharyngé dans des ganglions cervicaux pourrait se substituer à la recherche d'HPV
- Un marquage faible ou absent pour p16 sur cellules basaloïdes demande une recherche d'HPV supplémentaire
- Le marquage de p16 sur carcinome conventionnel kératinisé demande à tester aussi pour HPV.

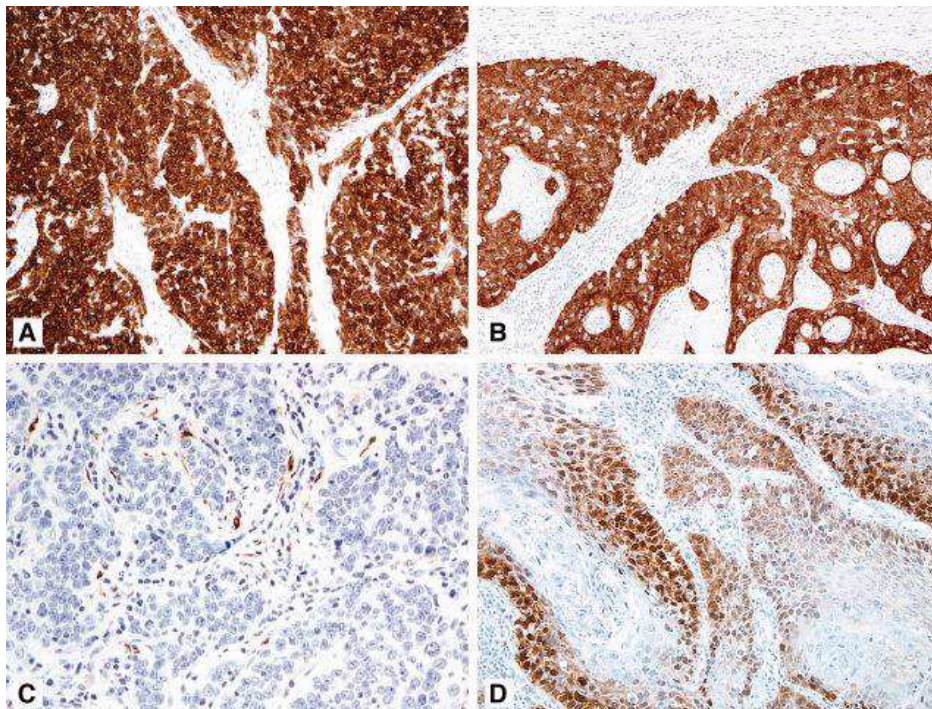


Figure 4.15 Immunomarquage p16 A. Fort et uniforme sur HNSCC peu différencié B. Similaire sur métastase ganglionnaire C. Négatif D. Variable sur HNSCC conventionnel, El-Naggar 2012

5 ETUDE HEGP

5.1 OBJECTIF

Les cancers de la sphère ORL sont les sixièmes cancers les plus communs dans le monde et représentent 6% de leur nombre total.¹

Autant on constate une diminution de l'incidence des cancers de la sphère ORL dans les 20 dernières années, autant il existe une augmentation constante de l'incidence quand on limite l'étude à la cavité orale et à la paroi oro-pharyngée².

Les projections effectuées par le Centre International de Recherche sur le Cancer concernant les cancers de la cavité orale tablent, se référant aux chiffres de 2012 et tous sexes confondus, sur une progression de son incidence de 8% pour 2015, de 21% pour 2020 et de près de 65% pour 2035. Concernant les prévisions de mortalité de cette pathologie, les chiffres sont respectivement de 8%, 21% et 67%.⁸⁶ Il s'agit donc d'un problème de santé publique, cette localisation tumorale étant amenée à dépasser en nombre celle du col de l'utérus en 2020.³

Outre la consommation alcoolique⁶ et le tabagisme^{6,7}, causes clairement reconnues des cancers des voies aéro-digestives hautes mais dont l'incidence diminue, de nombreuses études et méta-analyses récentes établissent qu'il existe des éléments de preuve suffisants quant au caractère oncogénique du virus HPV⁴ notamment en l'absence d'exposition aux carcinogènes précédemment cités^{217,99}. Les études réalisées évaluent le taux d'infection par HPV oncogéniques jusqu'à 50-70% dans le cadre des carcinomes de l'aire amygdalienne.⁵

Ces tumeurs liées au papillomavirus voient leur incidence et leur prévalence progresser régulièrement au sein d'une fraction plus jeune des patients des deux sexes. En effet, la transmission étant de nature sexuelle, la clairance virale rapide et le nombre de partenaires sexuels étant le principal déterminant de l'infection, le pic d'incidence est atteint à l'adolescence et chez les adultes jeunes. Il existe cependant un deuxième pic chez des patients plus âgés pour qui la clairance a été plus longue ou inexistante.¹⁶⁷

C'est dans ce contexte d'infection persistante à HPV de haut risque oncogénique que les lésions précancéreuses de haut grade se développent.

Les cancers oropharyngés liés à la présence de ce virus ont des caractéristiques cliniques, moléculaires²¹⁸ et pronostiques⁸ radicalement différentes comparativement aux tumeurs liés aux autres facteurs de risque, à tel point que les biomarqueurs directs (ADN/ARN HPV) et indirects (p16) de l'infection, en faveur d'un meilleur pronostic^{219,220}, seraient idéalement à rechercher avant de débiter le traitement, afin d'adapter celui-ci au profil tumoral de chaque patient, favoriser les stratégies de

préservation d'organe et limiter les complications liés à des protocoles de radiochimiothérapie trop intensifs.

Les patients dont le carcinome épidermoïde oropharyngé est positif pour un HPV de haut risque (hrHPV), HPV16 étant le plus représenté, jusqu'à 90% dans les séries^{99,169} ont une meilleure survie globale et une meilleure survie spécifique comparativement aux patients négatifs pour un hrHPV^{4,199}. Ils présentent aussi une moindre récurrence tumorale²¹¹ indépendamment de leur consommation tabagique, du sexe, de l'âge, du stade de la maladie et de l'histologie.²¹⁸ Ces tumeurs sont en général moins différenciées, non kératinisées et d'apparence basaloïde.^{199,221,222}

L'expression de p16 est corrélée au statut HPV de la tumeur. Ce n'est pas une protéine virale, mais l'élévation de son taux est corrélée à la présence du virus. L'inactivation de la protéine du rétinoblastome (Rb), au moyen de l'oncoprotéine E7 exprimée par les hrHPV (high risk HPV), lève l'inhibition de la transcription du gène CDK4N2A de p16 et aboutit à sa surexpression. Les tumeurs hrHPV+ sont ainsi caractérisées par leur surexpression de p16 détectable en immunohistochimie avec d'excellentes sensibilité et spécificité²¹⁴, au point que le statut p16 peut être considéré comme un bon biomarqueur des tumeurs liées à l'infection par papillomavirus.^{153,223,224} La détection de p16 apparaît une bonne alternative à la détection directe de HPV^{225,212,215,226-227} ; elle est à 100% sensible pour la détection d'HPV sans pouvoir en discerner le type, mais spécifique à 79%, pouvant justifier la recherche simultanée des deux statuts p16 et HPV.²¹⁴ Elle est d'interprétation plus aisée que la PCR et l'hybridation in situ, plus disponible et moins onéreuse.²²⁴

La DCE-MR est une technique d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle qui permet de caractériser les propriétés microcirculatoires des tumeurs, car elles sont différentes de celles des tissus sains. Des études ont préalablement montré que les paramètres de perfusion au scanner varient avec le traitement, permettant une surveillance et la recherche précoce de récidives.²²⁸

Il s'agit d'une technique de recueil du rehaussement positif permettant d'analyser la microcirculation au sein de la tumeur à l'arrivée du bolus de chélate de gadolinium, et plus encore sa fuite des capillaires vers l'espace extracellulaire-extravasculaire.³⁷ La cinétique observée est dépendante du régime circulatoire local, du mode d'injection et du type de produit de contraste. Elle peut s'étudier qualitativement par critères visuels, de façon semi-quantitative ou quantitative en intégrant des paramètres physiologiques traduisant la perfusion tissulaire et la perméabilité vasculaire.⁴⁷

Elle a permis, dans le cadre de cancer du col de l'utérus notamment, d'identifier des biomarqueurs d'imagerie pertinents pour la prévision de la réponse thérapeutique et de la survie.²²⁹ Nous souhaiterions, par cette étude, objectiver des paramètres quantitatifs de perfusion et perméabilité à l'IRM permettant de distinguer les tumeurs liées à un

hrHPV de celles qui ne le sont pas, afin d'orienter et d'adapter la prise en charge thérapeutique chez ces patients.

5.2 MATERIEL ET METHODES

5.2.1 Population

Cette étude, réalisée avec l'aval du Comité d'Ethique de la Recherche de l'institution, était rétrospective, portant sur 24 patients effectuant le bilan d'imagerie initial d'une tumeur oropharyngée.

Le groupe d'étude était composé de 5 femmes (moyenne 60.8 ans – 19%) et 19 hommes (moyenne 62 ans – 81%), SR=3.8.

Les critères d'inclusion étaient les suivants : première tumeur de la cavité buccale ou oropharyngée (site : plancher buccal, langue, aire amygdalienne, paroi oropharyngée) avec histologie de carcinome épidermoïde prouvée par biopsie ou sur pièce opératoire en cas de traitement chirurgical.

Etaient exclus les patients ayant une contraindication à l'IRM ou à l'injection de produit de contraste, ayant déjà présenté une tumeur et/ou ayant préalablement bénéficié d'un traitement conservateur ou chirurgical de la sphère ORL, les tumeurs laryngées et du cavum, les examens artéfactés par du matériel métallique à proximité du site tumoral.

Les patients étaient répartis en 2 groupes selon leur statut p16, indépendamment du statut HPV : p16+ n= 11 ; p16- n=13.

Les groupes de patients p16+ et p16- avait la même distribution selon le sexe (p=1 ; OR= 1.3476 [0.1257 ; 19.3038]), test exact de Fisher)

Les groupes de patients p16+ et p16- avait la même distribution selon l'âge (p=0.32 [-3.4023 ; 9.9975], test de Student).

Caractéristiques	Valeur (%) [σ]
Démographie	
Nombre de patients	24
Age moyen (années)	61 [45.8 – 77.8]
Sexe ratio	3.8 (H 79%)
Localisation tumorale	
Amygdale	9 (37%)
Oropharynx (autre)	11 (46%)
Cavité buccale	4 (17%)
Statut p16	
P16 +	11 (46%)
P16 –	13 (54%)

5.2.2 Planification de l'examen

Les patients étaient adressés en imagerie pour exploration initiale devant la suspicion de tumeur de la sphère ORL, dans les suites d'une consultation ORL et avant biopsie sous endoscopie, afin de ne pas être gênés par les remaniements liés au traumatisme du geste.

Les prélèvements obtenus par biopsie ou après chirurgie carcinologique étaient tous envoyés pour analyse anatomo-pathologique dans le service de l'établissement, comprenant une caractérisation histologique et la recherche systématique des statuts HPV16 et p16.

L'ensemble des données d'imagerie, anatomo-pathologiques et cliniques étaient analysées a posteriori par un radiologue.

Le dossier de chaque patient faisait l'objet d'une réunion de concertation multidisciplinaire (RCP) afin de décider de la prise en charge thérapeutique (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie, palliatif) et de surveillance.

5.2.3 Protocole IRM

L'ensemble des données était acquis à l'aide d'une IRM 1.5 Teslas GE (General Electric, Milwaukee, WI) avec antenne neurovasculaire de 8 canaux dédiée.

Le schéma d'acquisition était similaire pour les 24 patients, basé sur le protocole de routine d'exploration des tumeurs de la sphère ORL du service : après les séquences de repérage, réalisation de 2 à 3 plans orthogonaux en pondération T2-FSE (sagittal en cas de lésion médiane), de plans transverses en pondération T1 FSE et de diffusion (b0 et b600) ; la séquence spécifique à l'étude de la perfusion était réalisée 5 secondes après le début d'une injection au moyen d'un cathéter veineux au pli du coude de 2 cc/kg à 3mL/s de chélate de gadolinium (Dotarem ; Laboratoires Guerbet, Aulnay-sous-Bois, France).

L'acquisition SPGR3D se faisait dans le plan axial transverse en coupes jointives de 4 mm, regroupées en 55 phases de 8 coupes avec une résolution temporelle de 4 secondes, une matrice de 192x192 et un FOV de 28 cm. La boîte d'acquisition était centrée sur la tumeur afin d'en couvrir le volume maximal, en privilégiant les plages tissulaires non nécrotiques (basé sur le signal T1 et T2).

Enfin, deux à trois séries (plan sagittal si lésion médiane) en plans orthogonaux étaient réalisées en pondération T1 FSE avec saturation du signal de la graisse après l'injection de produit de contraste (figure 5.1).

La série en pondération T2 couvrait l'ensemble de la sphère ORL de la crosse aortique à la base du crâne ; les autres séries axiales transverses (hors perfusion) étaient étendues de l'os hyoïde à la base du crâne.

Il était demandé au patient de respecter les consignes de réalisation de l'examen (ne pas bouger, ne pas déglutir, respirer calmement pendant l'examen) afin de réduire au maximum les artéfacts de mouvements.

L'ensemble des données ont été archivées sur le système informatique de l'établissement de type PACS et gravées sur CD en vue du post-traitement.

Protocole IRM perfusion	
Antenne	Neurovasculaire
Pondération	SPGR 3D
Plan	Axial transverse
Résolution spatiale	Coupes jointives 4mm FOV 28 cm Matrice 192 x 192
Résolution temporelle	4 secondes
Injection	Bolus 3mL/sec - 0.2mmol/kg 5 secondes après injection
Acquisition	55 phases de 8 coupes Durée 5 minutes



Figure 5.1 Coupe axiale T1FS après injection de gadolinium montrant une tumeur de l'amygdale gauche

5.2.4 Post-traitement des données de perfusion

Les données de perfusion stockées sur CD étaient analysées, en aveugle de la clinique et des statuts p16 et HPV, à l'aide du logiciel OLEA Sphere Revision 1.0 OS 2.2 sp1 (Olea Medical USA, Cambridge, MA) par un relecteur radiologue.

Un algorithme de correction des mouvements était appliqué sur les données natives de perfusion. Le filtrage spatial et temporel de lissage proposé par le logiciel n'était pas appliqué.

L'AIF était placée manuellement pour chaque patient, prenant en compte 4 pixels dont la moyenne était calculée par le logiciel (figure 5.2).

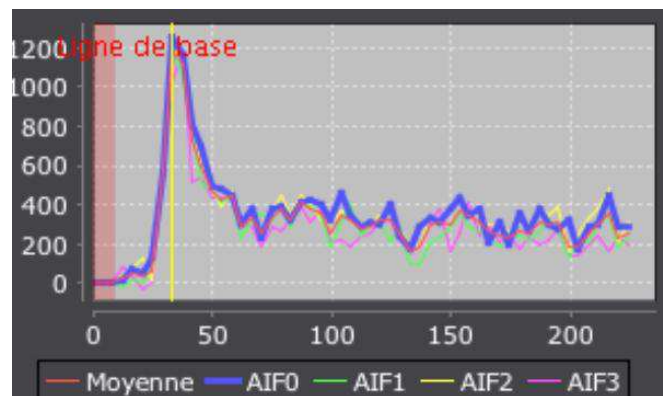


Figure 5.2 Graphique de l'AIF placée manuellement

Un volume d'intérêt (VOI) était réalisé manuellement afin d'inclure l'ensemble du tissu tumoral couvert par l'acquisition, en traçant successivement une ROI sur chacune des 8 coupes d'une phase de la série de perfusion (figure 5.3).

Le volume tumoral était calculé à partir des ROI dessinés sur chaque coupe.

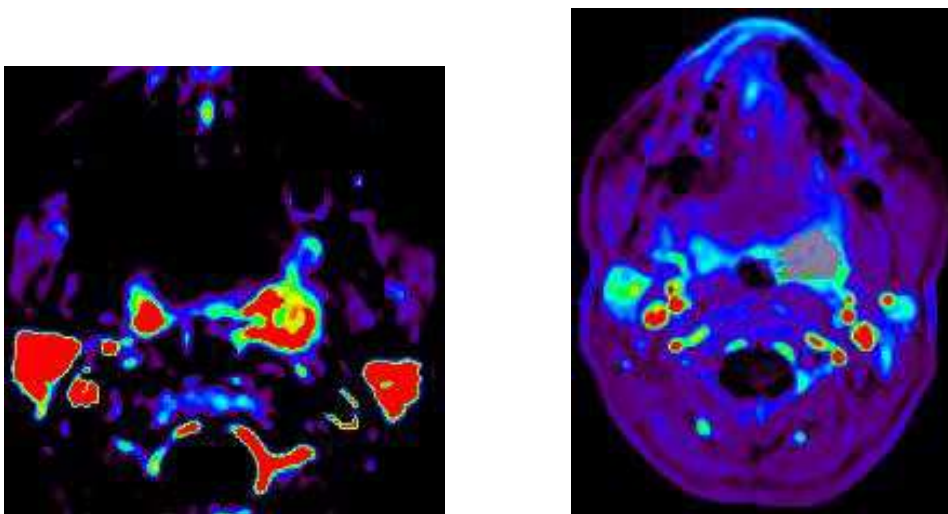


Figure 5.3 Cartographie K^{trans} générée par le logiciel après analyse du rehaussement avec placement de la ROI en regard de la tumeur amygdalienne gauche

Le modèle d'analyse quantitative choisi était celui de « Tofts étendu », modèle mathématique qui prend en compte l'apport artériel et permet donc une comparaison interindividuelle et intra-individuelle de différents examens. Les paramètres mesurés sont le Ktrans – coefficient de transfert volumique et paramètre de perfusion en domaine tumoral, ve, Kep (=Ktrans/ve), IAUGC (aire initiale sous la courbe), TME (figure 5.4).

Catégorie ▲	Série	Moyenne	Min	Max	Sd	Volume (cc)	Numération
VOI 1	PEAK	1525,13	849,32	2269,10	211,23	4,58	956
VOI 1	KTRANS	0,82	0,19	1,25	0,26	4,58	956
VOI 1	VE	0,39	0,15	0,70	0,08	4,58	956
VOI 1	AUC	293361,03	173227,84	487072,98	47438,77	4,58	956
VOI 1	T1_GADO	3650,52	1453,94	6308,99	542,53	4,94	9089
VOI 1	CHI2	17431,05	4654,69	33733,12	5398,72	4,58	956
VOI 1	VP	0,06	-0,00	0,15	0,03	4,58	956
VOI 1	TME	75,85	30,78	208,63	30,64	4,58	956
VOI 1	KEP	2,14	0,52	3,32	0,77	4,58	956
VOI 1	WASHIN	28,82	4,57	46,23	10,62	4,58	956
VOI 1	PERMEABILITY	533,25	127,25	1041,19	135,88	4,58	956
VOI 1	WASHOUT	2,91	0,44	4,29	0,57	4,58	956

Figure 5.4 Tableau généré par le logiciel reprenant l'ensemble des paramètres quantitatifs calculés pour la ROI placée

5.2.5 Statuts p16 et HPV

Les statuts p16 et HPV étaient déterminés sur biopsies tumorales effectuées après l'imagerie ou sur pièce opératoire après traitement chirurgical, en fonction du protocole thérapeutique adopté au cours de la RCP de l'établissement.

Le statut HPV (figure 5.5) était déterminé selon la méthode par Hybridation In Situ (HIS) et celui de p16 par immunohistochimie (figure 5.6), après fixation et inclusion en paraffine, selon le protocole de l'établissement.

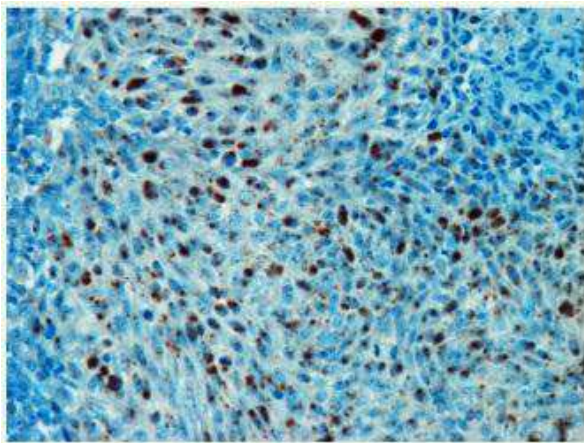


Figure 5.5 Marquage des noyaux des cellules tumorales d'un carcinome épidermoïde par hybridation in situ avec sonde HPV, Badoual 2013

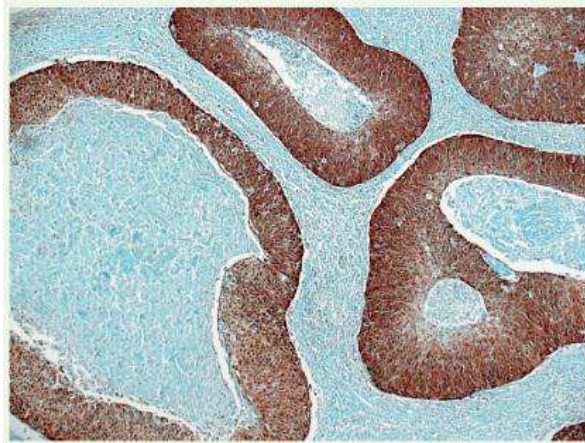


Figure 5.6 Marquage uniforme nucléaire et cytoplasmique de la majorité des cellules tumorales d'un CE basaloïde par immunohistochimie avec anticorps anti p16, Badoual 2013

5.2.6 Analyse statistique

L'expression de p16 était confrontée aux données démographiques des patients et aux caractéristiques cliniques et résultats de l'IRM de chaque tumeur. Les données démographiques étaient analysées au moyen du test exact de Fisher, bilatéral. Les paramètres de perfusion et perméabilité K^{trans} , PS, K_{ep} , v_e , IAUGC étaient évalués de façon quantitative en fonction du statut p16 des patients (groupes non appariés) au moyen du test paramétrique de Student. Les analyses ont été effectuées à l'aide des logiciels Excel et R, et $P < 0.05$ était considéré comme significatif.

5.3 RESULTATS

Les 24 patients inclus ont bénéficié d'une IRM diagnostique initiale comprenant la séquence de perfusion précédemment décrite, avec relevé des paramètres de perméabilité K^{trans} , PS, v_e , K_{ep} , TME, IAUGC lors de la phase de post-traitement sur logiciel OLEA, selon le modèle mathématique dit de « Tofts étendu ».

La totalité des patients ont par ailleurs été testés concernant leur statut p16 et HPV16, sur biopsies ou pièces opératoires selon le schéma thérapeutique choisi.

Dans notre série de 24 patients, 83% des tumeurs sont de site oropharyngé ($n=20/24$) avec une positivité pour p16 dans 55% des cas ($n=11/20$). Si l'on considère les 9 tumeurs oropharyngées de site amygdalien, elles sont 100% p16+ ($n=9/9$), alors que les 4 tumeurs de cavité buccale sont à 100% p16-.

P16 était surexprimé, tous sites confondus, chez 46% des patients. 100% des sujets HPV16+ (6/6) surexprimaient la protéine p16.

Il n'existait pas de différence significative dans le volume mesuré des tumeurs par le contourage des ROI ($p = 0.271$) dans les deux groupes.

En accord avec les données de la littérature, les tumeurs p16+ sont moins différenciées de façon significative ($p=0.02$). De même, elles ont tendance à être de siège oropharyngé ($p=0.09$).

Leurs caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques sont reportées dans le tableau suivant.

	P16 +	P16 -	P value
Nombre	11	13	
Sexe			1 (Fisher exact test)
- Masculin	9	10	
- Féminin	2	3	
Age de diagnostic			
Moyenne (ET)	63.7 (44.7-82.3)	59.5 (47.1-71.9)	0.31 (Student t test)
Site			0.09 (Fisher exact test)
Oropharyngé	11	9	
Cavité buccale	0	4	
Taille			1 (Fisher exact test)
T1-T2	4	4	
T3-T4	8	10	
N			0.22 (Fisher exact test)
0	0	3	
1-3	11	10	
Stade			0.48 (Fisher exact test)
I II	0	2	
III IV	11	11	
Différenciation			0.02 (Fisher exact test)
Peu-moyen	9	4	
Bien	2	9	

Les patients surexprimant p16 présentent un PS significativement plus élevé que les patients ne surexprimant pas p16 ($P=0.008$). Il n'a pas été mis en évidence d'autres différences significatives concernant les autres paramètres de perméabilité, en particulier de K^{trans} ($p=0.55$).

Paramètres	P16+ n=11	P16-n=13	P value
PS	716.137	526.708	0.008 [57.9356 ; 343.6762]
K^{trans}	0.756	0.605	0.55 [-0.261 ; 0.4655]
v_e	0.34	0.47	0.92 [-0.2399 ; 0.219]
K_{ep}	2.13	1.58	0.44 [-0.5412 ; 1.1846]
IAUGC	225494	207587	0.86 [-97611.7515 ; 82328.872]
TME	90.122	96.85	0.41 [-32.4351 ; 13.968]
WI	20.901	17.075	0.63 [-8.0323 ; 12.8523]
WO	2.066	1.829	0.86 [-0.9554 ; 1.1283]

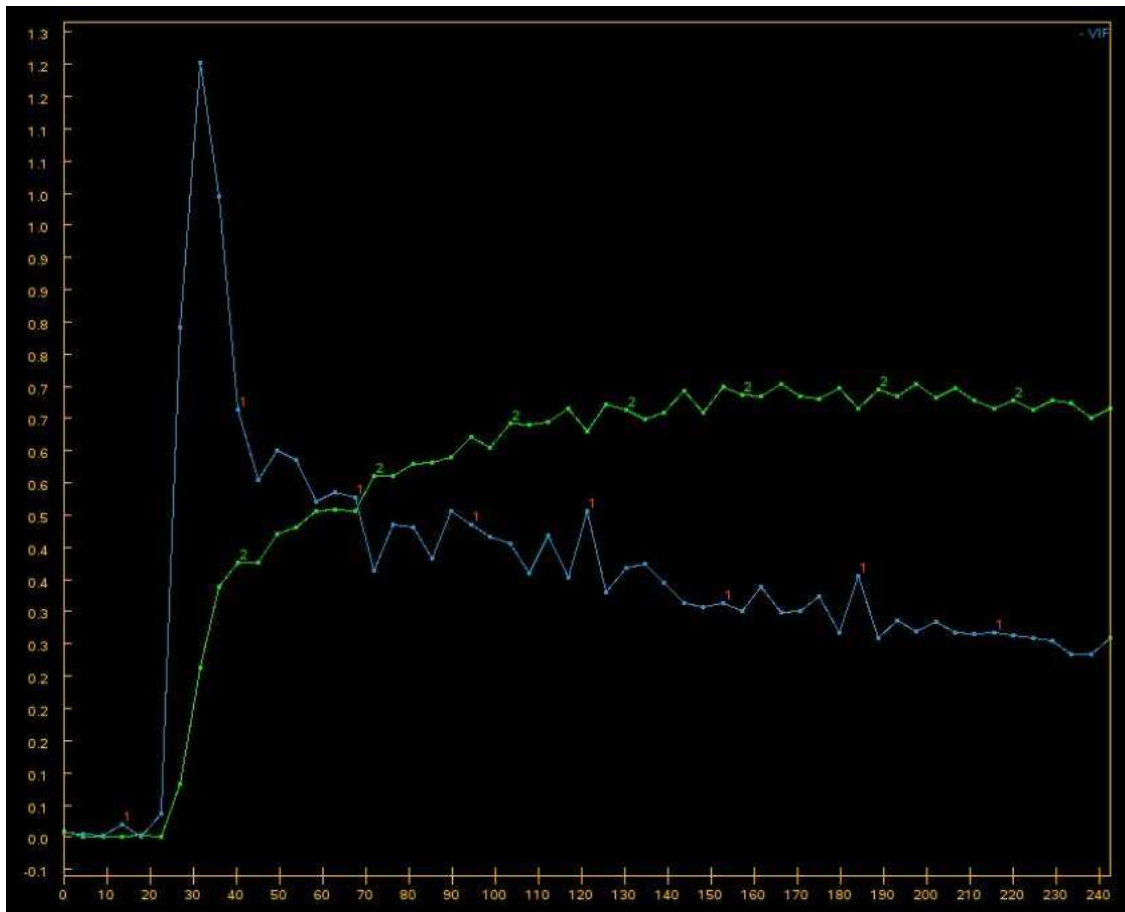
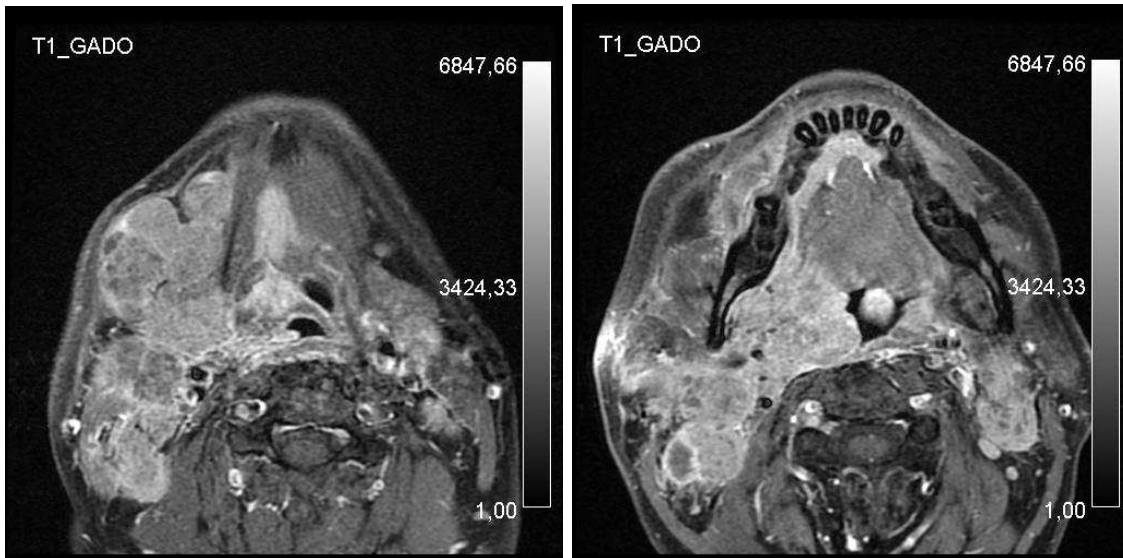


Figure 4.17 Chez un patient p16+, coupes axiales transverses en pondération T1 après injection de gadolinium et saturation de la graisse : tumeur de l'air amygdalienne droite, associée à de volumineuses adénopathies partiellement nécrotiques avec continuum T-N. Courbe de rehaussement tumoral (verte) aux côtés de la courbe de l'AIF (bleue) montrant un segment de perméabilité ascendant, suivi par un plateau dans le volume interstitiel tissulaire.

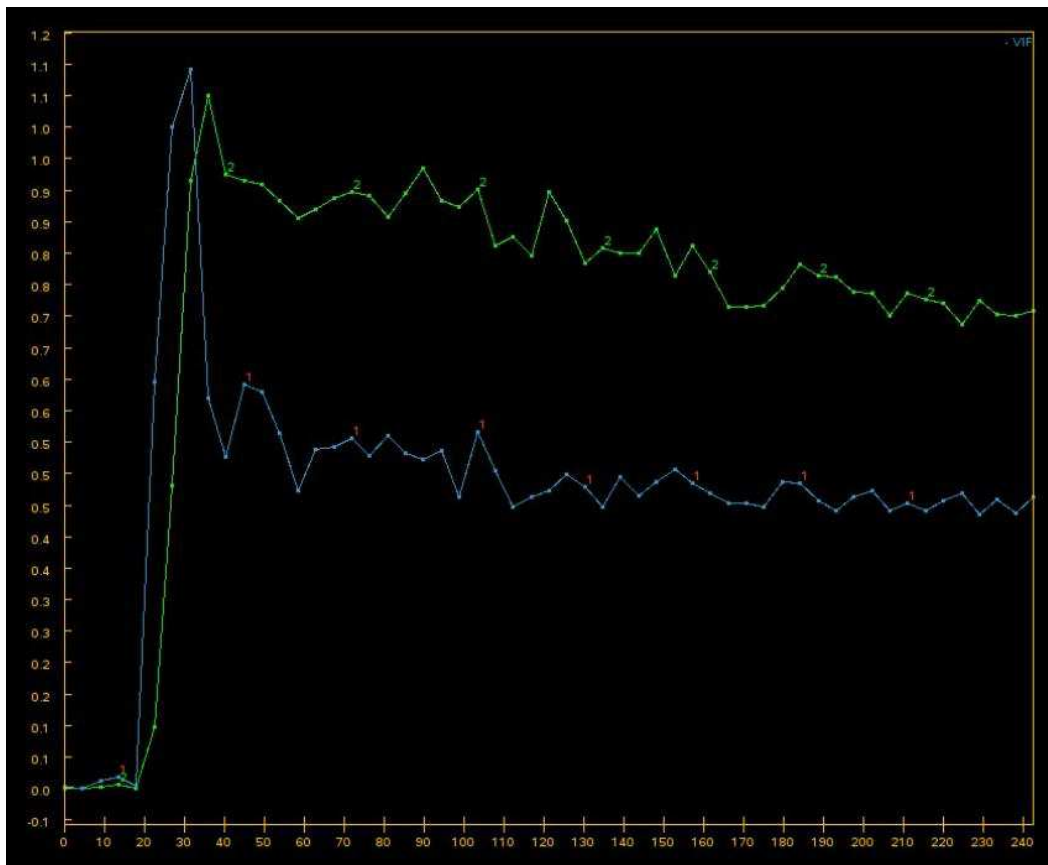
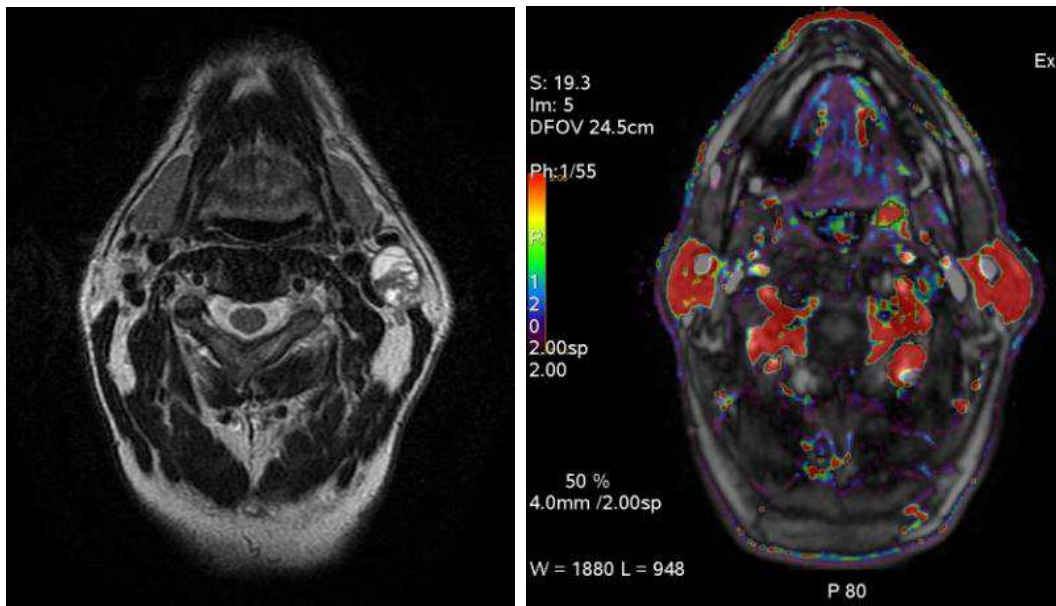


Figure 4.18 Coupes axiales transverses en pondération T2 et fusion T2-cartographie du k^{trans}) avec présence d'une petite tumeur de l'amygdale gauche et d'adénopathies nécrotiques. Le codage de la carte paramétrique K^{trans} montre une tumeur rouge, pour une valeur élevée de K^{trans} . Courbe de rehaussement tumoral (verte) montrant une phase de perméabilité supérieure à la courbe de l'AIF (bleue) chez un patient p16+.

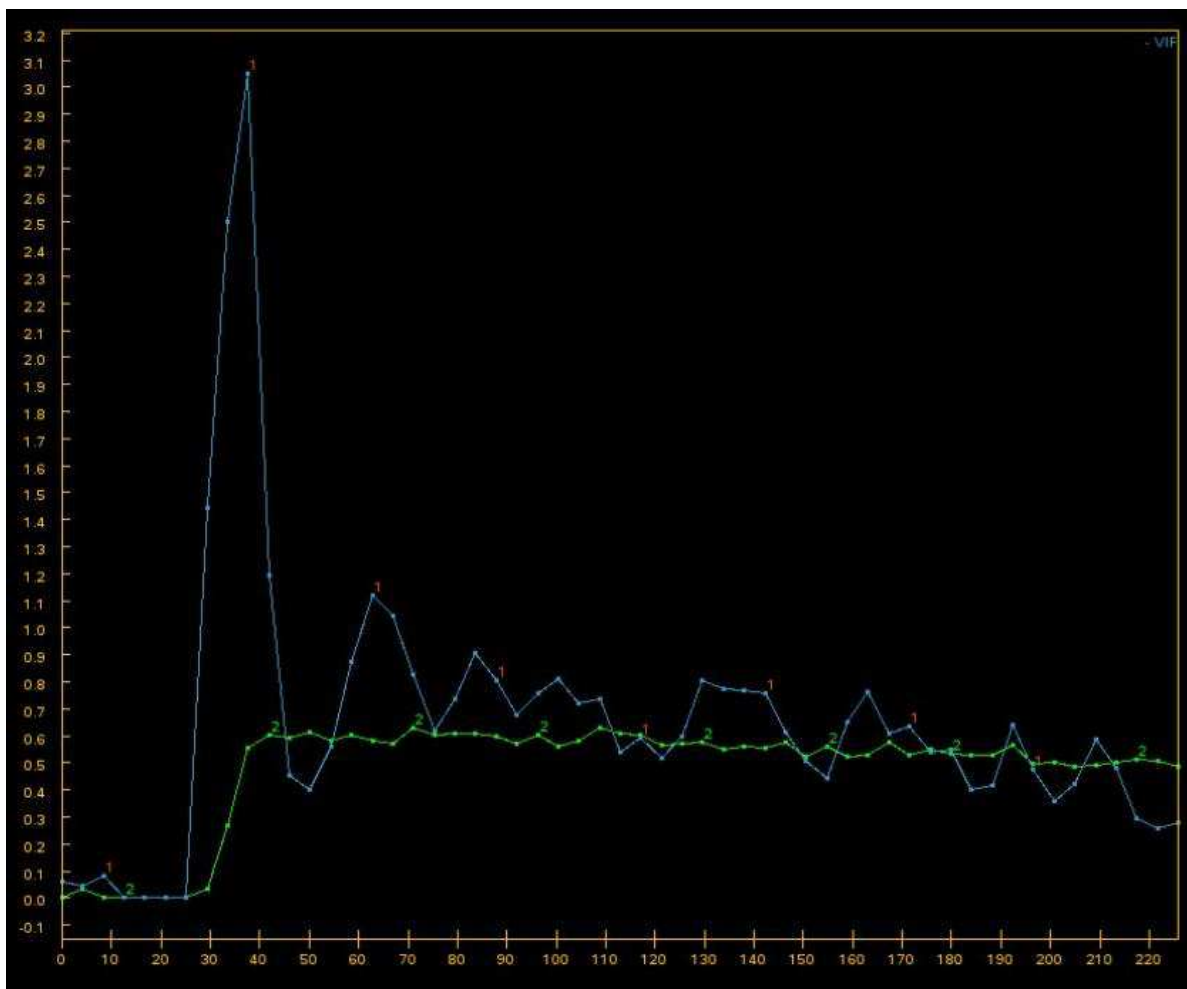
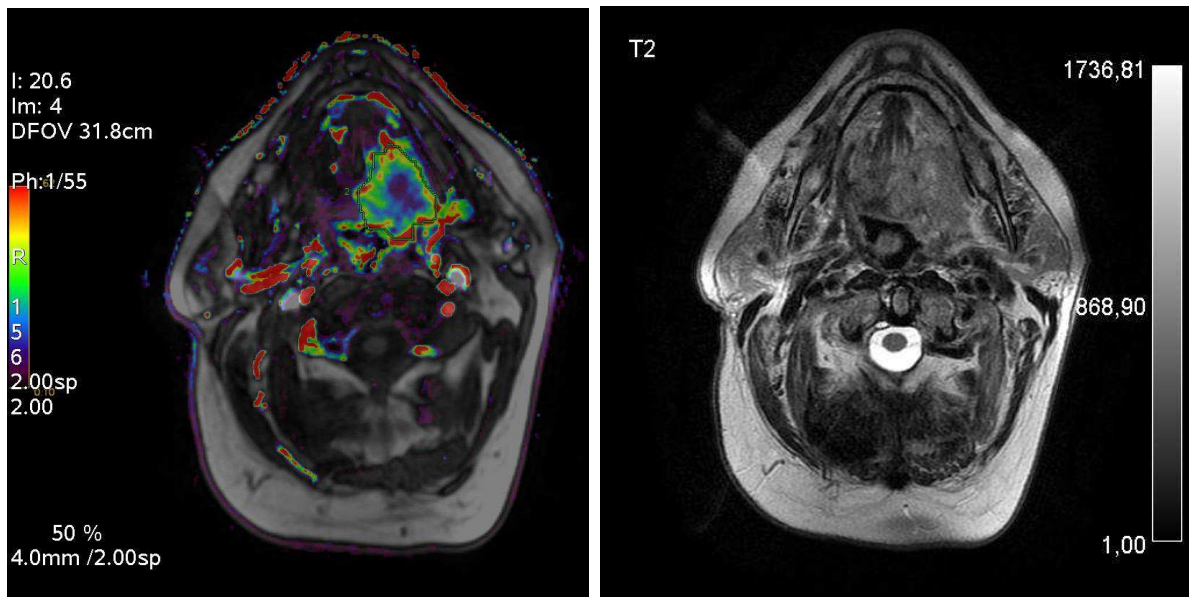


Figure 4.19 Coupes axiales transverses en pondération T1 après injection de gadolinium fusionnée au données de perfusion K^{trans} et T2 : tumeur du plancher buccal latéralisée à gauche, codée en bleu, pour un K^{trans} faible. Courbe de rehaussement tumoral (verte) aux côtés de la courbe de l'AIF (bleue) chez un patient p16-, montrant un segment de courbe de perméabilité descendant et sous la courbe de l'AIF.

5.4 DISCUSSION

Notre étude montre la capacité à distinguer par la séquence de perfusion de l'IRM, au cours du bilan d'extension initial des tumeurs oropharyngées, des caractéristiques de microcirculation qui diffèrent selon le statut p16 ; PS, abaissé dans les tumeurs plus hypoxiques et sécrétant plus de VEGF⁷⁸, dans ce cas marqueur d'agressivité tumorale et de mauvais pronostic⁷⁹, est ici significativement plus élevé chez les patients du groupe p16+(figures 4.17, 4.18 et 4.19), marqueur de bon pronostic^{125,208,211,212}.

Une étude préalable, menée par Hoefling et al. en 2013, a mis en évidence une corrélation significative entre les mesures de perfusion au scanner et la surexpression d'EGFR dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, suggérant une association entre des données d'imagerie et des biomarqueurs moléculaires.²³⁰

Une étude récente, par Nakahira et al. en 2014, a mis en évidence des différences significatives de mesures d'ADC sur les sites tumoraux en fonction du statut HPV de patients pris en charge pour carcinomes épidermoïdes oropharyngés.⁷²

La proportion de tumeurs p16+ de notre série, évaluée à 45.8%, correspond aux chiffres retrouvés dans la littérature : 22 à 46.2 %^{3,211} selon site ORL étudié, avec un maximum pour l'oropharynx et en particulier les aires amygdaliennes (100% des tumeurs de cette série) et un minimum pour la cavité buccale (aucun cas positif pour l'étude présente). Par ailleurs, HPV16 prédomine parmi les types carcinogènes du virus, retrouvé jusqu'à dans 95% des cas, ce qui explique pourquoi nous avons limité notre étude à la recherche d'HPV16.^{166,231}

Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude analysant les rapports entre les paramètres de perfusion à l'IRM et les biomarqueurs HPV et p16 dans le cadre des tumeurs oropharyngées.

Ces résultats confortent la place importante de l'imagerie comme méthode non invasive dans la stratégie d'identification des patients bon ou mauvais répondeurs aux thérapeutiques de préservation d'organe pour les carcinomes épidermoïdes oropharyngés et de la cavité buccale.

Elle présente l'intérêt d'une technique combinant analyse morphologique au cours du bilan d'extension de routine et étude de la microcirculation tumorale dans le même temps, sans surcoût, avec un inconfort minimal pour le patient, reproductible entre les patients et chez un même patient au cours du temps, avant et après traitement, dans des conditions de réalisation précises et standardisées.

Il existe plusieurs limites à notre étude. Le nombre de patients était limité, du fait de la relative rareté des cas incidents de la maladie, même au sein d'un établissement de référence. Il apparaît nécessaire de reproduire l'étude avec des effectifs plus importants, aussi bien dans les bras p16- que p16+, afin d'améliorer la puissance des résultats.

Par ailleurs, concernant le traitement statistique, le choix a été fait d'un test paramétrique, en raison de la taille de la population et sur l'hypothèse d'une non violation de la normalité de la distribution, afin de ne pas surestimer p et de disposer d'un test plus puissant qu'un test non paramétrique. Mais ce type de test manque de robustesse. Il faudrait donc contrôler les résultats sur un plus grand échantillon de population afin d'améliorer la robustesse de l'étude et sa puissance.

Plusieurs localisations tumorales étaient indifféremment considérées, majorant de ce fait la largeur des écart-types des résultats. En homogénéisant les résultats, par la réalisation d'études centrées par aires anatomique (cavité buccale, oropharynx, larynx), leur puissance s'en verrait améliorée. Ainsi, une étude réalisée en 2011 sur 124 carcinomes épidermoïdes ORL observait que les cancers de localisation amygdalienne présentaient de façon significative un taux plus élevé de l'expression de p16 comparativement à l'oropharynx (amygdales exclues) et à la cavité buccale, pouvant introduire un biais lié à la localisation tumorale.²³²

La technique par immunohistochimie (ISH) est utilisée en routine dans l'établissement. Elle nécessite une charge virale plus élevée que la PCR pour détecter HPV, et est donc moins sensible mais très spécifique²²⁵. Au contraire, la PCR est très sensible voire trop sensible, sans possibilité de distinguer une simple contamination par HPV de son intégration dans le génome hôte. L'expression de p16 par immunohistochimie était par ailleurs systématiquement évaluée, puisque de nombreuses études ont montré une forte corrélation (jusqu'à 92%) avec la présence du virus (vérifié par PCR ou hybridation in situ).²¹³ Cependant, d'autres travaux montrent des résultats contradictoires sur les performances pronostiques de p16. Il semblerait que la caractérisation tumorale par marqueurs multiples soit plus spécifique, comme suggéré dans l'étude de Liang : la positivité des oncoprotéines E6 et E7 semble plus déterminante pour le bon pronostic que p16 et HPV.²⁰⁹ Il faudrait donc chercher une corrélation des biomarqueurs d'imagerie avec cette configuration de marquage biologique.

L'AIF était choisie manuellement pour chaque cas, permettant de tenir compte des paramètres hémodynamique de chaque patient. Le contrôle de la qualité de l'AIF était visuel (courbe évaluée sur la qualité du pic maximal, non écrêté). Cette méthode permet de tenir compte des variabilités interindividuelles.²³³ Néanmoins, le fait de mesurer individuellement l'AIF pour chaque patient peut conduire à des erreurs dans le calcul des paramètres de perméabilité et induire des variabilités dans les résultats.⁴⁷ Le traitement des dossiers a été effectué par un radiologue, et il semble nécessaire de contrôler les résultats et leur reproductibilité interindividuelle en incluant plusieurs lecteurs radiologues dans les études futures.

Concernant le choix de la ROI, le volume total de la tumeur était inclus dans la ROI (VOI), conformément aux études préalablement menées.²³⁴ Mais l'étude par ROI ne permet pas

de s'affranchir de l'hétérogénéité des tumeurs, contrairement à une analyse voxel par voxel.

Le modèle d'analyse quantitative choisi était celui de « Tofts étendu », modèle mathématique qui prend en compte l'apport artériel et permet donc une comparaison inter individuelle et intra individuelle de différents examens. Cependant, les résultats obtenus restent dépendants des conditions d'acquisition des images, et donc la reproductibilité pour des études à plus grande échelle, multicentriques, nécessiterait une homogénéisation parfaite tant des protocoles que des paramètres des machines.⁶⁹

Au cours de cette étude, il a été choisi de s'intéresser aux paramètres physiologiques de la microcirculation. Il est à noter cependant que PS (perméabilité x surface) est dépendant du produit de contraste utilisé : en fonction de la taille de la molécule, elle passera plus (petite taille, lipophile) ou moins (volumineuse, hydrophile) facilement au travers de la paroi endothéliale capillaire.⁴⁷ De même, K^{trans} , constante volumique de transfert, est liée au débit sanguin et à PS, et donc variable selon les conditions circulatoires.⁸¹

Enfin, il pourrait être intéressant de renouveler les études avec analyse de la perfusion après traitement conservateur, afin d'observer comment se comportent les tumeurs des bons répondeurs en termes de biomarqueurs de perfusion. Existerait-il des différences significatives avec les mauvais répondeurs ? Pourrait-on mettre en évidence de façon fiable des résidus tumoraux ou des récives au sein des tissus traités ? Pourrait-on comparer les résultats entre les modalités d'imagerie par IRM, par TEP et par spectroscopie par résonance magnétique (avec l'étude de la choline, témoin de prolifération cellulaire) ?

CONCLUSION

Les cancers oropharyngés liés à HPV, plus nombreux que ceux liés à l'alcool et au tabac, sont désormais considérés comme une entité à part, car leurs caractéristiques démographiques, moléculaires et cliniques sont différentes et leur pronostic est meilleur. Ils pourraient bénéficier d'une thérapie moins agressive du fait de leur meilleur taux de réponse à la radio-chimiothérapie et de leur moindre taux de récurrence locorégionale.

Cette stratégie de désintensification thérapeutique doit s'appuyer sur des essais cliniques rigoureux afin de ne pas courir le risque de perdre en efficacité chez des patients plus jeunes et toujours plus nombreux.

La recherche de biomarqueurs en IRM de perfusion, dans le but de stratifier précocement les patients selon leur pronostic et la réponse thérapeutique attendue, va dans le sens d'une médecine personnalisée, afin d'améliorer l'efficacité de la prise en charge et d'en diminuer la toxicité.

La présente étude montre une association significative entre un biomarqueur de perméabilité, PS, et un biomarqueur moléculaire de bon pronostic du carcinome épidermoïde oropharyngé, p16. C'est, à notre connaissance, la première analyse de corrélation entre les paramètres de perfusion à l'IRM et l'expression des biomarqueurs HPV et p16 dans le cadre des tumeurs oropharyngées. Des études à plus grande échelle seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74–108.
- 2 Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, *et al.* Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope* 2007; 117: 2115–28.
- 3 Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, *et al.* Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4294–301.
- 4 D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 1944–56.
- 5 Ang KK, Harris J, Wheeler R, *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 24–35.
- 6 IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2012; 100: 1–538.
- 7 Tobacco smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1986; 38: 35–394.
- 8 Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, *et al.* Combined P16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer* 2014. doi:10.1002/ijc.28876.
- 9 Haddad SI, Khairallah AA. A forgotten chapter in the history of the circulation of the blood. *Ann Surg* 1936; 104: 1–8.
- 10 Malpighi M. De pulmonibus observationes anatomicae. 1661.
- 11 His WS. Die Häute und Höhlen des Körpers. Basel, Schweighauser, 1865.
- 12 Waldeyer W. Kittsubstanz und Grünsustanz, Epithel und Endothel. *Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik* 1901; 57: 1–8.
- 13 Philipson GH. The Bradshawe Lecture on the Pathological Relations of the Absorbent System. *Br Med J* 1884; 2: 353–7.
- 14 Landis E. The relation between capillary pressure and the rate at which fluid passes through the walls of single capillaries. *Am J Physiol* 1927; 82: 217–38.
- 15 Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1953; 1: 188–211.
- 16 Aird WC. Endothélium in history. In: *Endothelial Biomedicine*. Cambridge University Press, 2007.
- 17 Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932–6.
- 18 Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 97–132.
- 19 Suri C, Jones PF, Patan S, *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171–80.
- 20 Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93: 741–53.
- 21 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242–8.
- 22 Thurston G, Suri C, Smith K, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511–4.
- 23 Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011; 17: 1359–70.
- 24 Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009; 19: 329–37.
- 25 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353–64.
- 26 Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356–62.
- 27 Mărgăritescu C, Simionescu C, Pirici D, Mogoantă L, Ciurea R, Stepan A. Immunohistochemical characterization of tumoral vessels in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49: 447–58.

- 28 Mărgăritescu C, Simionescu C, Mogoantă L, *et al.* Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49: 321–6.
- 29 Gee MS, Procopio WN, Makonnen S, Feldman MD, Yeilding NM, Lee WMF. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am J Pathol* 2003; 162: 183–93.
- 30 Kamoun WS, Chae S-S, Lacorre DA, *et al.* Simultaneous measurement of RBC velocity, flux, hematocrit and shear rate in vascular networks. *Nat Methods* 2010; 7: 655–60.
- 31 Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 3731–6.
- 32 Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 2004; 427: 695.
- 33 DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010; 15: 213–25.
- 34 Weidner N, Folkman J, Pozza F, *et al.* Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875–87.
- 35 Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008; 23: 601–7.
- 36 Yu M, Liu L, Liang C, *et al.* Intratumoral vessel density as prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis of literature. *Head Neck* 2014; 36: 596–602.
- 37 Tofts PS, Brix G, Buckley DL, *et al.* Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *J Magn Reson Imaging* 1999; 10: 223–32.
- 38 Sandrone S, Bacigaluppi M, Galloni MR, *et al.* Weighing brain activity with the balance: Angelo Mosso's original manuscripts come to light. *Brain* 2014; 137: 621–33.
- 39 Roy CS, Sherrington CS. On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol (Lond)* 1890; 11: 85–158.17.
- 40 White CM, Pope WB, Zaw T, *et al.* Regional and voxel-wise comparisons of blood flow measurements between dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging (DSC-MRI) and arterial spin labeling (ASL) in brain tumors. *J Neuroimaging* 2014; 24: 23–30.
- 41 Mulder MJ, van Maanen L, Forstmann BU. Perceptual decision neurosciences - A model-based review. *Neuroscience* 2014; 277C: 872–84.
- 42 Calamante F. Perfusion MRI using dynamic-susceptibility contrast MRI: quantification issues in patient studies. *Top Magn Reson Imaging* 2010; 21: 75–85.
- 43 Sourbron S, Heilmann M, Biffar A, *et al.* Bolus-tracking MRI with a simultaneous T1- and T2*-measurement. *Magn Reson Med* 2009; 62: 672–81.
- 44 Chinchure S, Thomas B, Wangju S, *et al.* Mean intensity curve on dynamic contrast-enhanced susceptibility-weighted perfusion MR imaging--review of a new parameter to differentiate intracranial tumors. *J Neuroradiol* 2011; 38: 199–206.
- 45 Van Vliet M, van Dijke CF, Wielopolski PA, *et al.* MR angiography of tumor-related vasculature: from the clinic to the micro-environment. *Radiographics* 2005; 25 Suppl 1: S85–97; discussion S97–8.
- 46 Jahng G-H, Li K-L, Ostergaard L, Calamante F. Perfusion Magnetic Resonance Imaging: A Comprehensive Update on Principles and Techniques. *Korean J Radiol* 2014; 15: 554–77.
- 47 Cuenod CA, Balvay D. Perfusion and vascular permeability: basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. *Diagn Interv Imaging* 2013; 94: 1187–204.
- 48 Padhani AR, Hayes C, Landau S, Leach MO. Reproducibility of quantitative dynamic MRI of normal human tissues. *NMR Biomed* 2002; 15: 143–53.
- 49 Espinoza S, Halimi P. Interpretation pearls for MR imaging of parotid gland tumor. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2013; 130: 30–5.
- 50 Roberts C, Issa B, Stone A, Jackson A, Waterton JC, Parker GJM. Comparative study into the robustness of compartmental modeling and model-free analysis in DCE-MRI studies. *J Magn Reson Imaging* 2006; 23: 554–63.
- 51 Thomassin-Naggara I, Daraï E, Cuenod CA, Rouzier R, Callard P, Bazot M. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging: a useful tool for characterizing ovarian epithelial tumors. *J Magn Reson Imaging* 2008; 28: 111–20.
- 52 Kety SS, Schmidt CF. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure and normal values. *J Clin Invest* 1948; 27: 476–83.

- 53 Renkin EM. Effects of blood flow on diffusion kinetics in isolated, perfused hindlegs of cats; a double circulation hypothesis. *Am J Physiol* 1955; 183: 125–36.
- 54 Crone C. The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the ‘indicator diffusion’ method. *Acta Physiol Scand* 1963; 58: 292–305.
- 55 Tofts PS, Kermode AG. Blood brain barrier permeability in multiple sclerosis using labelled DTPA with PET, CT and MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1989; 52: 1019–20.
- 56 Tofts PS, Kermode AG. Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med* 1991; 17: 357–67.
- 57 Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, *et al.* The assessment of antiangiogenic and antivascular therapies in early-stage clinical trials using magnetic resonance imaging: issues and recommendations. *Br J Cancer* 2005; 92: 1599–610.
- 58 Axel L. Cerebral blood flow determination by rapid-sequence computed tomography: theoretical analysis. *Radiology* 1980; 137: 679–86.
- 59 Ostergaard L, Sorensen AG, Kwong KK, Weisskoff RM, Gyldensted C, Rosen BR. High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages. Part II: Experimental comparison and preliminary results. *Magn Reson Med* 1996; 36: 726–36.
- 60 Miles KA, Hayball MP, Dixon AK. Functional images of hepatic perfusion obtained with dynamic CT. *Radiology* 1993; 188: 405–11.
- 61 Brix G, Bahner ML, Hoffmann U, Horvath A, Schreiber W. Regional blood flow, capillary permeability, and compartmental volumes: measurement with dynamic CT--initial experience. *Radiology* 1999; 210: 269–76.
- 62 Brix G, Semmler W, Port R, Schad LR, Layer G, Lorenz WJ. Pharmacokinetic parameters in CNS Gd-DTPA enhanced MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* 1991; 15: 621–8.
- 63 Brix G, Kiessling F, Lucht R, *et al.* Microcirculation and microvasculature in breast tumors: pharmacokinetic analysis of dynamic MR image series. *Magn Reson Med* 2004; 52: 420–9.
- 64 Larsson HB, Fritz-Hansen T, Rostrup E, Søndergaard L, Ring P, Henriksen O. Myocardial perfusion modeling using MRI. *Magn Reson Med* 1996; 35: 716–26.
- 65 Patel PP, Koppenhafer SL, Scholz TD. Measurement of kinetic perfusion parameters of gadoteridol in intact myocardium: effects of ischemia/reperfusion and coronary vasodilation. *Magn Reson Imaging* 1995; 13: 799–806.
- 66 Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J Cereb Blood Flow Metab* 1983; 3: 1–7.
- 67 Miles KA, Kelley BB. CT measurements of capillary permeability within nodal masses: a potential technique for assessing the activity of lymphoma. *Br J Radiol* 1997; 70: 74–9.
- 68 Shames DM, Kuwatsuru R, Vexler V, Mühler A, Brasch RC. Measurement of capillary permeability to macromolecules by dynamic magnetic resonance imaging: a quantitative noninvasive technique. *Magn Reson Med* 1993; 29: 616–22.
- 69 Tofts PS. Modeling tracer kinetics in dynamic Gd-DTPA MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997; 7: 91–101.
- 70 De Bazelaire C, Siauve N, Fournier L, *et al.* Comprehensive model for simultaneous MRI determination of perfusion and permeability using a blood-pool agent in rats rhabdomyosarcoma. *Eur Radiol* 2005; 15: 2497–505.
- 71 Balvay D, Frouin F, Calmon G, *et al.* New criteria for assessing fit quality in dynamic contrast-enhanced T1-weighted MRI for perfusion and permeability imaging. *Magn Reson Med* 2005; 54: 868–77.
- 72 Nakahira M, Saito N, Yamaguchi H, Kuba K, Sugawara M. Use of quantitative diffusion-weighted magnetic resonance imaging to predict human papilloma virus status in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014; 271: 1219–25.
- 73 Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH, *et al.* Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer* 2014; 110: 1587–94.
- 74 Lee FK-H, King AD, Ma BB-Y, Yeung DK-W. Dynamic contrast enhancement magnetic resonance imaging (DCE-MRI) for differential diagnosis in head and neck cancers. *Eur J Radiol* 2012; 81: 784–8.
- 75 Gandhi D, Hoeffner EG, Carlos RC, Case I, Mukherji SK. Computed tomography perfusion of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Initial results. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27: 687–93.
- 76 Hermans R, Meijerink M, Van den Bogaert W, Rijnders A, Weltens C, Lambin P. Tumor perfusion rate determined noninvasively by dynamic computed tomography predicts outcome in head-and-neck cancer after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 1351–6.

- 77 Zima A, Carlos R, Gandhi D, Case I, Teknos T, Mukherji SK. Can pretreatment CT perfusion predict response of advanced squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract treated with induction chemotherapy? *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28: 328-34.
- 78 Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, *et al.* Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 270-7.
- 79 Donaldson SB, Betts G, Bonington SC, *et al.* Perfusion estimated with rapid dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging correlates inversely with vascular endothelial growth factor expression and pimonidazole staining in head-and-neck cancer: a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81: 1176-83.
- 80 Bernstein JM, Homer JJ, West CM. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging biomarkers in head and neck cancer: Potential to guide treatment? A systematic review. *Oral Oncol* 2014. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.07.011.
- 81 Sourbron SP, Buckley DL. On the scope and interpretation of the Tofts models for DCE-MRI. *Magn Reson Med* 2011; 66: 735-45.
- 82 Cuenod CA, Fournier L, Balvay D, Guinebretière J-M. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment. *Abdom Imaging* 2006; 31: 188-93.
- 83 Siauve N, Clément O, Cuénod CA, Benderbous S, Fria G. Capillary leakage of a macromolecular MRI agent, carboxymethyldextran-Gd-DTPA, in the liver: pharmacokinetics and imaging implications. *Magn Reson Imaging* 1996; 14: 381-90.
- 84 Hauger O, Delalande C, Deminière C, *et al.* Nephrotoxic nephritis and obstructive nephropathy: evaluation with MR imaging enhanced with ultrasmall superparamagnetic iron oxide-preliminary findings in a rat model. *Radiology* 2000; 217: 819-26.
- 85 Anderson H, Price P, Blomley M, Leach MO, Workman P. Measuring changes in human tumour vasculature in response to therapy using functional imaging techniques. *Br J Cancer* 2001; 85: 1085-93.
- 86 Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. 2013.http://globocan.iarc.fr.
- 87 Annertz K, Anderson H, Biörklund A, *et al.* Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002; 101: 95-9.
- 88 Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya K a. a. S, Ogden G, Macpherson LMD. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol* 2006; 42: 586-92.
- 89 Schantz SP, Yu G-P. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 268-74.
- 90 Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RCK. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* 2005; 103: 1843-9.
- 91 Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008; 26: 612-9.
- 92 Golas SM. Trends in palatine tonsillar cancer incidence and mortality rates in the United States. *Community Dent Oral Epidemiol* 2007; 35: 98-108.
- 93 Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, La Vecchia C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases. *Prev Med* 2004; 38: 613-9.
- 94 Bagnardi V, Rota M, Botteri E, *et al.* Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2013; 24: 301-8.
- 95 Viswanathan H, Wilson JA. Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004; 29: 295-300.
- 96 Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, *et al.* Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 1988; 41: 483-91.
- 97 Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 149-56.
- 98 Plant M, Miller P. Young people and alcohol: an international insight. *Alcohol Alcohol* 2001; 36: 513-5.
- 99 Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007; 110: 1429-35.

- 100 Wyss A, Hashibe M, Chuang S-C, *et al.* Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol* 2013; 178: 679–90.
- 101 Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010; 34: J258–65.
- 102 Rahman M, Sakamoto J, Fukui T. Bidi smoking and oral cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2003; 106: 600–4.
- 103 Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, *et al.* Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Cancer* 2007; 121: 1793–8.
- 104 Marks MA, Chaturvedi AK, Kelsey K, *et al.* Association of marijuana smoking with oropharyngeal and oral tongue cancers: pooled analysis from the INHANCE consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23: 160–71.
- 105 McLemore MS, Haigentz M, Smith RV, *et al.* Head and neck squamous cell carcinomas in HIV-positive patients: a preliminary investigation of viral associations. *Head Neck Pathol* 2010; 4: 97–105.
- 106 Van Monsjou HS, Wreesmann VB, van den Brekel MWM, Balm AJM. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncol* 2013; 49: 1097–102.
- 107 Leoncini E, Ricciardi W, Cadoni G, *et al.* Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE Consortium. *Eur J Epidemiol* 2014; 29: 35–48.
- 108 Paget-Bailly S, Cyr D, Carton M, Guida F, Stucker I, Luce D. 0234 Head and neck cancer and occupational exposure to asbestos, mineral wools and silica: results from the ICARE study. *Occup Environ Med* 2014; 71 Suppl 1: A90.
- 109 Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713–21.
- 110 Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6: 963–8.
- 111 Califano J, van der Riet P, Westra W, *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488–92.
- 112 Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res* 1996; 56: 2484–7.
- 113 Moustakas A, Heldin C-H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007; 98: 1512–20.
- 114 Mani SA, Guo W, Liao M-J, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704–15.
- 115 Chung CH, Parker JS, Ely K, *et al.* Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 8210–8.
- 116 Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, *et al.* Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132: 668–77.
- 117 Thariat J, Milas L, Ang KK. Integrating radiotherapy with epidermal growth factor receptor antagonists and other molecular therapeutics for the treatment of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 974–84.
- 118 Dammann F, Horger M, Mueller-Berg M, *et al.* Rational diagnosis of squamous cell carcinoma of the head and neck region: comparative evaluation of CT, MRI, and 18FDG PET. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 1326–31.
- 119 Daisne J-F, Duprez T, Weynand B, *et al.* Tumor volume in pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma: comparison at CT, MR imaging, and FDG PET and validation with surgical specimen. *Radiology* 2004; 233: 93–100.
- 120 Paidpally V, Chirindel A, Lam S, Agrawal N, Quon H, Subramaniam RM. FDG-PET/CT imaging biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Imaging Med* 2012; 4: 633–47.
- 121 Thariat J, Jegoux F, Pointreau Y, *et al.* [Advances in head and neck cancers on behalf of the French Intergroup ORL and GORTEC]. *Bull Cancer* 2013; 100: 983–97.
- 122 Greenberg JS, El Naggat AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer* 2003; 98: 508–15.
- 123 Dubrulle F, Martin-Duverneuil, Nadine, Moulin G, Varoquaux, Arthur. Imagerie en ORL. Issy-les-Moulineaux, Elsevier-Masson, 2010.

- 124 Badoual C, Righini C, Barry B, *et al.* Pre-therapeutic histological and cytological assessment in head and neck squamous cell carcinomas. French Society of Otorhinolaryngology Guidelines--2012. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2012; 129: 319–26.
- 125 Psychogios G, Mantsopoulos K, Agaimy A, *et al.* Outcome and prognostic factors in T4a oropharyngeal carcinoma, including the role of HPV infection. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 390825.
- 126 Bonifazi M, Malvezzi M, Bertuccio P, *et al.* Age-period-cohort analysis of oral cancer mortality in Europe: the end of an epidemic? *Oral Oncol* 2011; 47: 400–7.
- 127 Pignon J-P, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009; 92: 4–14.
- 128 Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000; 355: 949–55.
- 129 Perl G, Ben-Aharon I, Popovtzer A, Stemmer SM, Vidal L. Addition of taxane to induction therapy in head and neck malignancies: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Chemotherapy* 2013; 59: 435–40.
- 130 Cosmidis A, Rame J-P, Dassonville O, *et al.* T1-T2 NO oropharyngeal cancers treated with surgery alone. A GETTEC study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 276–81.
- 131 Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; 11: 781–9.
- 132 Cooper SA. On Warts. *Lancet* 1823; 1823-4: 303–5.
- 133 Payne J. On the contagiousness of common warts. *Br J Dermatol*; 1891: 185–8.
- 134 Variot G. Un cas d'inoculation experimentale des verrues de l'enfant à l'homme. *J Clin Ther Inf* 1894; : 529–34.
- 135 Jadassohn J. Sind die Verrucae vulgares ubertragbar? *Verhandl Deutsch Dermat Gesellsch* 1896; : 497.
- 136 Ciuffo G. Innesto positivo con filtrato di verruca volgare. *G Ital Mal Vener*; 1907: 12–7.
- 137 Rous P, Beard JW. A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (the Shope rabbit papilloma) : iii. Further characters of the growth: general discussion. *J Exp Med* 1934; 60: 741–66.
- 138 Strauss MJ, Shaw EW. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 72: 46–50.
- 139 Melnick JL. Papova virus group. *Science* 1962; 135: 1128–30.
- 140 Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; 36: 794.
- 141 Zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977; 78: 1–30.
- 142 Chan SY, Bernard HU, Ratterree M, Birkebak TA, Faras AJ, Ostrow RS. Genomic diversity and evolution of papillomaviruses in rhesus monkeys. *J Virol* 1997; 71: 4938–43.
- 143 Ho L, Chan SY, Burk RD, *et al.* The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol* 1993; 67: 6413–23.
- 144 Ong CK, Chan SY, Campo MS, *et al.* Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol* 1993; 67: 6424–31.
- 145 Chan SY, Ho L, Ong CK, *et al.* Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992; 66: 2057–66.
- 146 Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418–24.
- 147 Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol* 1985; 84: 417–20.
- 148 IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1995; 64: 1–378.
- 149 De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17–27.

- 150 Carrillo-Tripp M, Shepherd CM, Borelli IA, *et al.* VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: D436–42.
- 151 IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2012; 100: 1–441.
- 152 Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* 1994; 203: 73–80.
- 153 Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229–42.
- 154 Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003; 22: 5201–7.
- 155 Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 46–54.
- 156 IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2007; 90: 1–636.
- 157 Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010; 116: 2166–73.
- 158 De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, *et al.* Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 453–9.
- 159 Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 386–91.
- 160 Sanders AE, Slade GD, Patton LL. National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Dis* 2012; 18: 430–41.
- 161 Edelstein ZR, Schwartz SM, Hawes S, *et al.* Rates and determinants of oral human papillomavirus infection in young men. *Sex Transm Dis* 2012; 39: 860–7.
- 162 Cañadas MP, Bosch FX, Junquera ML, *et al.* Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1330–2.
- 163 Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1772–83.
- 164 Markowitz LE, Sternberg M, Dunne EF, McQuillan G, Unger ER. Seroprevalence of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. *J Infect Dis* 2009; 200: 1059–67.
- 165 Mehanna H, Beech T, Nicholson T, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck* 2013; 35: 747–55.
- 166 Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, *et al.* Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2620–3.
- 167 Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467–75.
- 168 Castle PE, Schiffman M, Herrero R, *et al.* A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 2005; 191: 1808–16.
- 169 Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342–50.
- 170 Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin H-Y, *et al.* Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet* 2013; 382: 877–87.
- 171 Pickard RKL, 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. *Sex Transm Dis* 2012; 39: 559–66.
- 172 Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, *et al.* Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA* 2012; 307: 693–703.
- 173 Shatalova EG, Klein-Szanto AJP, Devarajan K, Cukierman E, Clapper ML. Estrogen and cytochrome P450 1B1 contribute to both early- and late-stage head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 107–15.
- 174 Safaeian M, Porras C, Schiffman M, *et al.* Epidemiological study of anti-HPV16/18 seropositivity and subsequent risk of HPV16 and -18 infections. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 1653–62.

- 175 Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, *et al.* The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 172–82.
- 176 D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009; 199: 1263–9.
- 177 Sinha P, Logan HL, Mendenhall WM. Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *Am J Otolaryngol* 2012; 33: 130–6.
- 178 Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, *et al.* New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2013; 33: 77–87.
- 179 Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, *et al.* Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4550–9.
- 180 Gillison ML, Castellsagué X, Chaturvedi A, *et al.* Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer* 2014; 134: 497–507.
- 181 Rietbergen MM, Braakhuis BJM, Moukhtari N, *et al.* No evidence for active human papillomavirus (HPV) in fields surrounding HPV-positive oropharyngeal tumors. *J Oral Pathol Med* 2014; 43: 137–42.
- 182 Jain KS, Sikora AG, Baxi SS, Morris LGT. Synchronous cancers in patients with head and neck cancer: risks in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Cancer* 2013; 119: 1832–7.
- 183 Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, *et al.* Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res* 2007; 67: 4605–19.
- 184 Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6952–7.
- 185 Farhang Ghahremani M, Goossens S, Nittner D, *et al.* p53 promotes VEGF expression and angiogenesis in the absence of an intact p21-Rb pathway. *Cell Death Differ* 2013; 20: 888–97.
- 186 Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 34–44.
- 187 Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21: 1510–7.
- 188 Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE, Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1987; 1: 251–6.
- 189 Woodworth CD, Doniger J, DiPaolo JA. Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J Virol* 1989; 63: 159–64.
- 190 Spanos WC, Geiger J, Anderson ME, *et al.* Deletion of the PDZ motif of HPV16 E6 preventing immortalization and anchorage-independent growth in human tonsil epithelial cells. *Head Neck* 2008; 30: 139–47.
- 191 Einstein MH, Schiller JT, Viscidi RP, *et al.* Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 347–56.
- 192 Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S7–15.
- 193 Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol* 2002; 169: 3242–9.
- 194 De Jong A, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, *et al.* Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res* 2004; 64: 5449–55.
- 195 Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 2005; 4: 38.
- 196 Viscidi RP, Snyder B, Cu-Uvin S, *et al.* Human papillomavirus capsid antibody response to natural infection and risk of subsequent HPV infection in HIV-positive and HIV-negative women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 283–8.
- 197 Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, *et al.* Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 324–7.
- 198 Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. *Int J Infect Dis* 2007; 11 Suppl 2: S10–6.

- 199 Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol* 2011; 2011: 509036.
- 200 Gillison ML, Koch WM, Capone RB, *et al*. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709–20.
- 201 Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, *et al*. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009; 125: 362–6.
- 202 Mork J, Lie AK, Glattre E, *et al*. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344: 1125–31.
- 203 Klusmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, *et al*. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001; 92: 2875–84.
- 204 Combes J-D, Franceschi S. Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol* 2014; 50: 370–9.
- 205 Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol* 2012; 6 Suppl 1: S104–20.
- 206 Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998; 152: 145–56.
- 207 Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 1044–50.
- 208 Goldenberg D, Begum S, Westra WH, *et al*. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head Neck* 2008; 30: 898–903.
- 209 Rainsbury JW, Ahmed W, Williams HK, Roberts S, Paleri V, Mehanna H. Prognostic biomarkers of survival in oropharyngeal squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 2013; 35: 1048–55.
- 210 Liang C, Marsit CJ, McClean MD, *et al*. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2012; 72: 5004–13.
- 211 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. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 261–9.
- 212 Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1992–8.
- 213 Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, *et al*. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5684–91.
- 214 Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, *et al*. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6213–21.
- 215 Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, *et al*. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007; 121: 2465–72.
- 216 El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* 2012; 34: 459–61.
- 217 Kuo K-T, Hsiao C-H, Lin C-H, Kuo L-T, Huang S-H, Lin M-C. The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. *Mod Pathol* 2008; 21: 376–86.
- 218 Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371: 1695–709.
- 219 O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2012; 48: 1191–201.
- 220 Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, *et al*. p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 1595–602.
- 221 Fischer CA, Zlobec I, Green E, *et al*. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 2010; 126: 1256–62.
- 222 Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol* 2009; 3: 186–94.
- 223 Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, *et al*. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope* 2010; 120: 1788–94.

- 224 Lewis JS. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 2012; 6 Suppl 1: S75–82.
- 225 Thomas J, Primeaux T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol* 2012; 16: 91–9.
- 226 Friedrich RE, Sperber C, Jäkel T, Röser K, Löning T. Basaloid lesions of oral squamous epithelial cells and their association with HPV infection and P16 expression. *Anticancer Res* 2010; 30: 1605–12.
- 227 Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998; 153: 1741–8.
- 228 Klusmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, *et al.* Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003; 162: 747–53.
- 229 Mukherji SK, Castelijns JA. CT perfusion of head and neck cancer: why we should care versus why should we care! *AJNR Am J Neuroradiol* 2010; 31: 391–3.
- 230 Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, *et al.* Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 884–91.
- 231 Hoefling NL, McHugh JB, Light E, *et al.* Human papillomavirus, p16, and epidermal growth factor receptor biomarkers and CT perfusion values in head and neck squamous cell carcinoma. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013; 34: 1062–6, S1–2.
- 232 Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, 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 Oncol* 2010; 2: 15.
- 233 Tamás L, Szentkúti G, Eros M, *et al.* Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. *Pathol Oncol Res* 2011; 17: 721–7.
- 234 De Bazelaire C, Calmon R, Thomassin I, *et al.* Accuracy of perfusion MRI with high spatial but low temporal resolution to assess invasive breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study. *BMC Cancer* 2011; 11: 361.
- 235 Craciunescu OI, Yoo DS, Cleland E, *et al.* Dynamic contrast-enhanced MRI in head-and-neck cancer: the impact of region of interest selection on the intra- and interpatient variability of pharmacokinetic parameters. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 82: e345–50.