



HAL
open science

Cellules souches tumorales et cancers des VADS : enjeux et perspectives

Sylvain Gnaho

► **To cite this version:**

Sylvain Gnaho. Cellules souches tumorales et cancers des VADS : enjeux et perspectives. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03436496

HAL Id: dumas-03436496

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03436496v1>

Submitted on 19 Nov 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License



Université
de Paris

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTE DE SANTÉ

UFR D'ODONTOLOGIE
5, Rue Garancière 75006 PARIS

Année 2020

N°

THÈSE pour le DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR
en CHIRURGIE DENTAIRE

présentée et soutenue publiquement le

par **Sylvain GNAHO**

**CELLULES SOUCHES TUMORALES ET CANCERS DES VADS :
ENJEUX ET PERSPECTIVES**

Dirigée par Mme la Professeure Géraldine LESCAILLE

JURY

M. le Professeur Yvon ROCHE

Président

M. le Docteur Charles GOSSIOME

Assesseur

Mme la Professeure Géraldine LESCAILLE

Assesseur

Mme la Docteure Juliette ROCHEFORT

Assesseur

M. le Docteur Hervé TARRAGANO

Invité



Université
de Paris

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTE DE SANTÉ

UFR D'ODONTOLOGIE
5, Rue Garancière 75006 PARIS

Année 2020

N°

THÈSE pour le DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR
en CHIRURGIE DENTAIRE

présentée et soutenue publiquement le

par **Sylvain GNAHO**

**CELLULES SOUCHES TUMORALES ET CANCERS DES VADS :
ENJEUX ET PERSPECTIVES**

Dirigée par Mme la Professeure Géraldine LESCAILLE

JURY

M. le Professeur Yvon ROCHE

Président

M. le Docteur Charles GOSSIOME

Assesseur

Mme la Professeure Géraldine LESCAILLE

Assesseur

Mme la Docteure Juliette ROCHEFORT

Assesseur

M. le Docteur Hervé TARRAGANO

Invité

UNIVERSITÉ DE PARIS

Présidente de l'Université : Mme la Professeure Christine CLERICI

Doyenne de l'U.F.R. d'Odontologie Garancière : Mme la Professeure Ariane BERDAL

Directrice Générale des Services : Madame Pascale SAINT-CYR

JURY

M. le Professeur Yvon ROCHE	Président
M. le Docteur Charles GOSSIOME	Assesseur
Mme la Professeure Géraldine LESCAILLE	Assesseur
Mme la Docteure Juliette ROCHEFORT	Assesseur
M. le Docteur Hervé TARRAGANO	Invité

M. le Professeur Yvon ROCHE

Docteur en Chirurgie Dentaire
Docteur d'État en Odontologie
Professeur des Universités - Praticien
Hospitalier

Pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence du jury de cette thèse et en acceptant la direction de ce travail. Merci de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse.

M. le Docteur Charles GOSSIOME

Docteur en Chirurgie Dentaire
Assistant Hospitalo-Universitaire

Pour l'honneur que vous me faites en participant au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

**Mme la Professeure Géraldine
LESCAILLE**

Docteur en Chirurgie Dentaire
Professeur des Universités - Praticien
Hospitalier

Pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant la direction de ce travail. Merci de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse, de votre disponibilité, de votre gentillesse, de votre patience ainsi que de vos précieux conseils au cours de mes études. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde et respectueuse considération.

Mme la Docteure Juliette ROCHEFORT

Docteur en Chirurgie Dentaire
Maître de Conférences des Universités-
Praticien Hospitalier

Pour l'honneur que vous me faites en participant au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements. Merci également pour votre présence bienveillante et vos enseignements au cours de ma formation clinique.

M. le Docteur Hervé TARRAGANO

Docteur en Chirurgie Dentaire
Maître de Conférences des Universités -
Praticien Hospitalier

Pour l'honneur que vous me faites en participant au jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

Table des matières

Introduction.....	3
1. Rôle des cellules souches cancéreuses dans les cancers des VADS.	6
1.1. Cancers des VADS : généralités et épidémiologie.	6
1.2. Les cellules souches cancéreuses.....	12
1.2.1. De la théorie stochastique à la théorie des cellules souches cancéreuses.	12
1.2.2. Caractéristiques spécifiques des cellules souches cancéreuses.	15
1.2.3. Les grandes voies de communication inter cellulaires et leurs dérégulations dans les cellules souches cancéreuses.	23
2. Enjeux et méthodologies des techniques de détection des cellules souches cancéreuses (csc) dans les cancers solides des VADS.	38
2.1. Enjeux diagnostiques et thérapeutiques.	38
2.1.1. Enjeux de dépistage, de diagnostic précoce et prédictif.	38
2.1.2. Enjeux thérapeutiques :.....	41
2.2. Les méthodes actuelles d'identification des cellules souches cancéreuses	42
2.2.1. Les techniques d'identification des CSC.	42
2.2.2. Les principaux marqueurs aspécifiques utilisés pour les CSC des cancers des VADS.....	47
2.2.3. Les limites de ces techniques.....	51
3. La méthode de marquage aux lectines.	52
3.1. Caractéristiques des lectines.....	52
3.2. Cancer et modification de glycosylation.....	55
3.3. Cellules souches et modifications de glycosylation.	57
3.3.1. Échappement au système immunitaire et glycosylation.	57
3.3.2. Promotion de l'EMT et glycosylation.	59
3.3.3. Modification de l'activité des voies de signalisation et glycosylation.	60
3.3.4. Interactions avec le MET et glycosylation.	61
3.4. Principes du marquage des CSC avec un mélange de lectines.....	63
3.4.1. Obtention des CSC.....	64
3.4.2. Mise au point du mélange des lectines.	66
3.4.3. Test du mélange in vitro et in vivo.	67
3.4.4. Schémas récapitulatifs du processus de mise au point du mélange de lectines :.....	68

3.4.5.	Applications actuelles au cancer colorectal.....	70
3.5.	Élaboration d'un mélange de lectines pour les CSC des cancers des VADS.	72
3.5.1.	Description de l'étude clinique en cours.....	72
3.5.2.	Perspectives d'avenir.....	73
Conclusion.	74
4.	<i>Méthodologie de recherche bibliographique.</i>	75
5.	<i>Bibliographie.</i>	82

Introduction

Les cancers des VADS sont les 6èmes cancers les plus fréquents au monde. On dénombre 600 000 nouveaux cas par an. Le taux de récurrence est de 60 %, et le taux de mortalité reste stable depuis 30 ans, se situant à plus de 50 %. Ces chiffres s'expliquent en partie à cause de deux phénomènes :

- d'une part, le sous-diagnostic ou le diagnostic tardif des lésions cancéreuses. L'absence de dépistage systématique, le manque de formation des professionnels concernés (notamment les chirurgiens-dentistes) et le déni des patients peuvent tour à tour être invoqués ;
- d'autre part, la résistance des tumeurs aux traitements actuels.

Durant des années, la théorie stochastique sur l'initiation des tumeurs postulait qu'elle résultait d'une accumulation successive de mutations, associée à des phénomènes de sélection, aboutissant à des cellules devenues totipotentes et ne répondant plus aux signaux apoptotiques. Née dans les années 70, la théorie des cellules souches cancéreuses (CSC) prend actuellement de l'ampleur.

Des études récentes ont démontré le caractère hétérogène des tumeurs cancéreuses, au sein desquelles on a pu isoler une sous-famille de cellules possédant les caractéristiques des cellules souches. Pareillement aux cellules souches intervenant dans l'organogenèse, capables de procéder à des divisions asymétriques permettant leur auto-renouvellement et la création de lignées progénitrices, les CSC auraient, selon plusieurs études, la capacité d'opérer hors de tout contrôle des divisions asymétriques créant une tumeur hétérogène. **Il semble que les CSC soient à l'origine de l'initiation et de la croissance de la tumeur, et conditionnent son caractère agressif et invasif.** Enfin, ces CSC ont montré une grande **résistance aux traitements** de chimio et radiothérapie.

L'identification et le ciblage des CSC constituent actuellement un enjeu fort de la recherche sur le cancer et permettraient d'une part de répondre à la problématique du diagnostic tardif des cancers des VADS (les CSC étant initiatrices des tumeurs), et d'autre part à celle de la mortalité et de de la récurrence (compte tenu de leurs capacités de résistance aux traitements).

Il n'existe à l'heure actuelle **aucun marqueur spécifique des CSC**. L'identification repose sur deux types de techniques :

- la mise en évidence d'un différentiel d'expression de marqueurs membranaires non spécifiques mais cliniquement liés aux CSC (notamment CD44, CD133, CD24) ou de certaines enzymes (ALDH1) via la cytométrie en flux ou l'immunohistochimie ;
- la culture des sphéroïdes en milieu spécifique, reposant sur le fait que seules les CSC ont la capacité de recréer dans un nouvel environnement une tumeur hétérogène en trois dimensions (sphéroïde). Elle est souvent utilisée comme technique de contrôle après la cytométrie en flux ou l'immunohistochimie. Comme toute technique de mise en culture, elle est relativement longue.

Des kits de ciblage des CSC dans les cancers du côlon, du poumon et du sein, spécifiques et rapides (quelques heures) sont actuellement en phase de commercialisation. Ils reposent sur l'usage de lectines, glycoprotéines responsables de nombreux phénomènes de reconnaissance inter cellulaire.

Nous souhaitons, à travers ce travail, étudier l'intérêt particulier des lectines dans le ciblage des CSC comparativement aux méthodes actuelles. Nous espérons recueillir des éléments tangibles permettant d'envisager l'élaboration d'un mélange de lectines fixant spécifiquement les CSC des cancers des VADS.

Notre premier chapitre traitera du rôle des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les cancers des VADS. Nous y exposerons les données générales et épidémiologiques sur ces cancers, puis présenterons les données scientifiques actuelles relatives aux CSC.

Le deuxième chapitre sera l'occasion de décrire les enjeux et méthodologies des techniques actuelles de ciblage des CSC. Après avoir décrit les lignes forces des objectifs, nous détaillerons les méthodes actuelles d'identification et leurs limites.

Notre dernier chapitre sera consacré à l'étude de la technique de marquage aux lectines. Après avoir présenté ces glycoprotéines ubiquitaires et leurs grandes caractéristiques (capacités à reconnaître spécifiquement des motifs glycosylés notamment), nous introduirons les notions qui relient les phénomènes tumoraux en général, et les CSC en particulier, avec les

modifications de glycosylation. Ces bases étant posées, nous pourrions décrire les grands principes du marquage des CSC par les lectines, en nous appuyant sur les premiers résultats du test diagnostique pour le cancer colorectal. Nous clôturerons notre propos en donnant les éléments de recherches en cours sur la mise au point d'un mélange de lectines pour les cancers des VADS.

Notre conclusion nous permettra de faire une synthèse de notre travail et de présenter quelques perspectives sur l'usage des lectines dans le domaine diagnostique et thérapeutique.

1. Rôle des cellules souches cancéreuses dans les cancers des VADS.

1.1. Cancers des VADS : généralités et épidémiologie.

Les cancers des VADS constituent en termes d'incidence le 5ème cancer dans le monde. On dénombre en effet près de 600 000 nouveaux cas chaque année (Spears et al. 2016) (dont plus de 350 000¹ pour la cavité orale). Ces cancers présentent une forte résistance aux traitements de chimio et radiothérapie, un fort taux de récurrence et un caractère très invasif. Ces éléments concourent à un taux de mortalité très élevé (54%).

Dans la grande majorité des cas il s'agit de carcinomes épidermoïdes. Le profil du patient atteint a longtemps été l'homme d'âge mûr consommateur d'alcool et/ou de tabac, avec un effet de potentialisation de ces deux facteurs. Actuellement on observe dans le monde, une baisse de l'incidence du cancer des VADS, associée à une modification du profil des personnes atteintes. Ceci est dû à un recul de la consommation du tabac (la consommation globale diminue, mais les femmes fument plus) associé à l'identification d'autres facteurs de risque tels que le virus HPV (16 principalement et 18). Ainsi, l'incidence augmente chez les femmes caucasiennes de moins de 45 ans.

Dynamique.

Du point de vue de la **dynamique** de la pathologie les carcinomes épidermoïdes touchant les VADS semblent s'installer de deux façons au niveau de la muqueuse :

- une cancérisation d'emblée ;
- une évolution de lésions pré cancéreuses (leucoplasie, érythroplasie, lichen plan, fibrose sous muqueuse).

Le caractère lymphophile des lésions explique leur fort pouvoir métastatique (lésions viscérales fréquentes) et aboutit à des localisations secondaires multiples.

¹ Ferlay J, Colombet M and Bray F. Cancer Incidence in Five Continents, CI5plus: IARC CancerBase No. 9 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2018. Available from: <http://ci5.iarc.fr>

Classification(s).

La **classification** épidémiologique² dominante distingue 3 groupes différents selon la localisation anatomique de la lésion :

- Le groupe cavité orale, pharynx, larynx.

Les muqueuses atteintes peuvent se situer sur le vestibule, la face interne des joues, des gencives supérieure et inférieure, de la voûte palatine et du voile du palais, du plancher de bouche et de la langue, des loges amygdaliennes et de la base de langue, de l'hypo pharynx, de la paroi pharyngée postérieure et du larynx.

Avec une incidence mondiale de 500 000 nouveaux cas annuels soit 8.1/100 000, il s'agit du groupe principal. L'Europe est le continent le plus touché avec un taux d'incidence de 26/100 000, et la France figure en tête du classement des pays européens avec des disparités régionales et une incidence de 24/100 000³ (forte incidence en Bretagne, Normandie, Picardie, Champagne Ardenne, Nord-Pas-de-Calais, Lorraine).

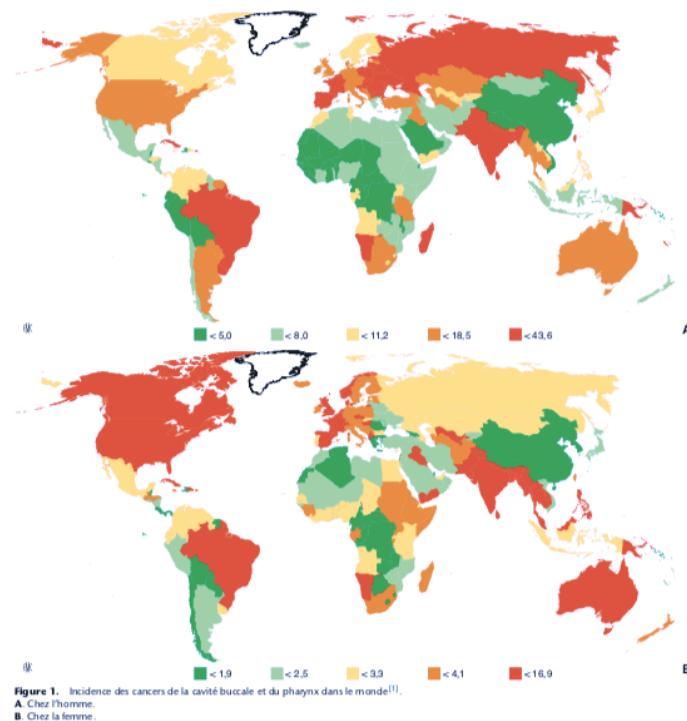


Figure 1 Lefebvre, J.-L., et D. Chevalier. « Épidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures ». *EMC - Oto-rhino-laryngologie* 7, no 2 (juin 2012)

² Lefebvre, J.-L., et D. Chevalier. « Épidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures ». *EMC - Oto-rhino-laryngologie* 7, n° 2 (juin 2012): 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0246-0351\(12\)41900-6](https://doi.org/10.1016/S0246-0351(12)41900-6).

³ Institut National du Cancer, données 2017

- Le groupe fosses nasales, cavités sinusiennes.

L'incidence mondiale annuelle est de 2/100 000 sans répartition géographique particulière. Là encore, il s'agit principalement de carcinomes épidermoïdes avec deux facteurs de risque principaux identifiés : exposition aux poussières de bois et aux tanins du cuirs.

- Le groupe nasopharynx.

On observe une répartition géographique particulière avec une incidence plus élevée (20/ 100 000) en Asie du sud-est, et jusqu'à 15 / 100 000 dans les pays du Maghreb alors qu'au niveau mondial les chiffres sont très faibles (1/ 100 000).

Les carcinomes épidermoïdes sont les plus fréquent, souvent peu différenciés, mais avec la présence d'une typologie spécifique indifférenciée (UNCT : undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type). Le virus EBV (Epstein Barr virus) a été identifié comme un facteur de risque.

LES CHIFFRES DES CANCERS DES VADS EN FRANCE				
	Nombre de nouveaux cas projetés en 2017	Rang	Nombre de décès projetés en 2017	Rang
Hommes	10 932 (en ↓)	4 ^e	2 756	8 ^e
Femmes	4 332 (en ↑)	10 ^e	867	12 ^e

SURVIE NETTE À 5 ANS		
	Cancers de la tête et du cou	Cancers du larynx
Hommes	34 %	56 %
Femmes	49 %	59 %

TOPOGRAPHIE	RÉPARTITION	TYPE HISTOLOGIQUE	PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE
Cavité buccale	20-25 %	Carcinome épidermoïde	Alcool et tabac (effet synergique)
Oropharynx	10-15 %		Alcool et tabac (effet synergique) HPV oncogènes ¹
Hypopharynx	25-30 %		Alcool et tabac (effet synergique)
Larynx	30-35 %		Tabac (prédominant), alcool
Sinus Ethmoïde Fosses nasales	< 1 %	Adénocarcinome	Exposition professionnelle : poussières de bois, nickel, aldéhyde formique, acide chromique (2) (3) (4) (5)
Nasopharynx (ou rhinopharynx ou cavum)	< 1 %	Carcinome nasopharyngé (ex Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type, UCNT)	Virus d'Epstein Barr (EBV) Origine géographique ² (Bassin méditerranéen, Asie du Sud-Est)

Figure 2 : données INC 2017 en FRANCE

Cette classification épidémiologie en trois grands groupes se superpose à la classification internationale traditionnelle TNM. Elle ne prend cependant pas en compte la grande variabilité biologique des cancers des VADS récemment mise en évidence par des analyses génomiques intégratives (Jou et al. 2017). Les cancers des VADS HPV positifs et ceux dus au tabac présentent des profils de mutations spécifiques et différents. La distinction entre ces deux groupes s'observe également quant à la réponse aux traitements avec un taux de récurrence après chimiothérapie plus faible pour les cancers HPV+. Keck et Al (2015) définissent ainsi 5 sous types sur la base de l'expression génétique, et semblant entraîner des réponses immunitaires différentes : 2 sous types HPV induits et 3 sous types non HPV induits.

Traitements.

Comme évoqué précédemment, les cancers des VADS présentent un taux de mortalité élevé malgré les **traitements**. Plusieurs causes peuvent être évoquées :

- Le diagnostic tardif des lésions dû à la sous consultation des patients, ou à la sous formation en dépistage des praticiens.
- Le caractère invasif et la tendance métastatique des lésions
- La localisation des lésions rendant parfois impossible la chirurgie.

La thérapeutique fait appel au trépied classique en oncologie, selon des séquences qui peuvent différer en fonction de la localisation et du volume de la lésion, ce qui justifie l'usage de la classification dominante.

- La chimiothérapie.

En règle générale, le traitement démarre par une chimiothérapie dite d'induction ou néoadjuvante. L'objectif est double, réduire la taille de la tumeur et limiter le risque de métastases. Le Cis platine, le 5 Fluoro-uracile et les taxanes sont les molécules de référence, et sont délivrées sous forme de « cure ». A l'issue de deux ou trois cures une décision est prise quant au reste de la séquence du traitement :

- Une chirurgie dite première puis une radiothérapie associée ou non à une chimiothérapie concomitante.
- Une radiothérapie associée ou non à une chimiothérapie concomitante, suivie(s) en cas d'échec par une chirurgie de rattrapage.

- La chirurgie.

Elle peut intervenir à différents stades de la prise en charge comme nous venons de l'évoquer. La chirurgie première peut être extrêmement délabrante (maxillectomie, mandibulectomie) et dans certains cas, impossible, lorsque des structures vitales sont situées à proximité (cancers UNCT).

La chirurgie de rattrapage présente l'inconvénient de s'effectuer sur des tissus irradiés, fibrosés, par conséquent plus difficiles à opérer (plans de séparation tissulaires absents, densité modifiée etc.) et présentant des capacités de cicatrisation altérées.

- La radiothérapie.

Il existe deux grandes techniques en radiothérapie :

- La curithérapie, ou radiothérapie locale.

Elle consiste à placer un fil d'iridium 192 dans un tube porteur à proximité ou dans la tumeur afin de délivrer une dose importante mais locale. Le patient est placé dans une chambre plombée pendant 5 jours. Cette technique est utilisée notamment pour certains cancers du bord de la langue.

- La radiothérapie externe.

C'est la technique la plus utilisée. La dose considérée comme tumoricide en France est fixée à 70 Gy et est délivrée par fractionnement de 2Gy par jour sur 5 jours, à raison de 7 répétitions espacées. En matière de prise en charge odontologique, deux notions sont importantes. La dose totale délivrée, lorsqu'elle dépasse 45Gy, expose à un risque majeur d'ostéoradionécrose, à vie. D'autre part, le champ d'irradiation doit être déterminé avec le plus de précision possible, notamment à l'aide de cartes d'irradiation.

En parallèle de ce trépied thérapeutique, l'immunothérapie, plus ciblée, semble représenter l'avenir de la prise en charge mais se heurte encore à l'insuffisance d'identification de marqueurs membranaires spécifiques. Cette notion sera développée dans le chapitre III de notre travail.

Nous avons évoqué le caractère très délabrant de la chirurgie première impliquant par conséquent des difficultés en matière de réhabilitation prothétique, mais également des atteintes d'ordre psychique en raison des modifications d'apparence, de la perte d'estime de soi qui peut en découler, et de certaines difficultés au quotidien (alimentation, phonation etc.).

Les complications intéressant directement le domaine odontologique sont multiples et rendent parfois difficile la réhabilitation fonctionnelle et esthétique du patient :

- *Xerostomie* :

Elle fait suite à l'irradiation des glandes salivaires et entraîne une baisse du flux et du pH favorisant la propagation de la maladie carieuse, une perte de lubrification muqueuse à l'origine de mucites et favorisant le développement de candidoses.

D'autre part, la réhabilitation par prothèses classiques ou prothèses maxillo-faciales peut être compromise du fait de l'absence d'un film salivaire adéquat.

- *Fibrose* :

Les tissus mous irradiés perdent en élasticité. Les muscles masticateurs, s'ils sont atteints, peuvent alors générer des limitations d'ouverture buccale susceptible d'altérer la phonation, mais également l'alimentation. La peau transmet plus facilement les contraintes de traction/tension et peut alors également déstabiliser les prothèses amovibles.

- *Ostéonécrose* :

Qu'il s'agisse de la radio ou de la chimiothérapie, l'os exposé est alors hypocellulaire, hypoxique, et hypovascularisé (règle des 3H). Le risque d'ostéonécrose est ici majeur et contre indique les réhabilitations implanto-portées et certaines extractions.

Nous venons d'effectuer un rapide survol des cancers des VADS du point de vue épidémiologique, nous avons exposé brièvement les principes des traitements actuels et certains de leurs effets secondaires. Comme nous l'avons évoqué, ces cancers présentent un fort taux de mortalité, en partie dû à de nombreuses récidives et résistances aux traitements. Ces données questionnent la réalité histologique des lésions cancéreuses des VADS en général, et des carcinomes épidermoïdes en particulier (puisque constituant la part la plus importante des lésions). Actuellement, deux théories dominantes coexistent (Chinn et al 2012). **La théorie stochastique** postule schématiquement qu'une lésion est initiée par des mutations génétiques successives et est soumise à la pression de la sélection suivant en quelque sorte un phénomène darwiniste.

La théorie des cellules souches (Graziano et al 2008), plus récente, et tendant à supplanter la première, considère la lésion comme hétérogène et composée notamment d'une famille de cellules cancéreuses présentant les caractéristiques des cellules souches. Cette sous population serait à l'origine du développement de la tumeur et de ses capacités d'invasion et de résistance aux traitements.

Dans la partie ci-après, nous allons nous attacher à développer les grandes lignes de la théorie des cellules souches, puis nous étudierons les caractéristiques principales de ces dernières.

1.2. Les cellules souches cancéreuses.

1.2.1. De la théorie stochastique à la théorie des cellules souches cancéreuses.

Quelle que soit la théorie considérée, les caractéristiques de la cellule cancéreuse (celle qui initie et soutient la tumeur) restent les mêmes. Elle devient **totipotente**, c'est-à-dire qu'elle perd sa spécialisation et par voie de conséquence sa fonction et parfois sa morphologie. D'autre part, elle répond à des cycles de **divisions** qui semblent anarchiques. Enfin elle ne répond plus aux signaux de **régulation** cellulaire (notamment apoptotiques). Cette dernière caractéristique joue un rôle important dans les deux premières. En effet, les signaux de communication inter cellulaires pilotent le fonctionnement de la cellule notamment en modifiant son activité génétique. Ainsi par exemple l'expression des molécules de surface et l'activité enzymatique plasmatique sont modifiées par ces signaux, et perturbés dans les cellules cancéreuses. Nous reviendrons sur ce dernier point dans notre chapitre 2.3

- a. Théorie stochastique, théorie des cellules souches cancéreuses : historique et grands principes.

Dès le milieu du 18^{ème} siècle, on identifie au sein du cancer des cellules indifférenciées. COHNHEIM émet en 1867 la théorie embryonnaire (Capp 2019). Il considère que ces cellules indifférenciées sont des résidus embryonnaires non utilisés⁴, et ayant conservé leur capacité. Cette théorie avait déjà été soulevée par MÜLLER, mais aussi VIRCHOW⁵ en 1838. Les tumeurs sont alors considérées comme des anomalies du développement embryonnaire. RIBBERT va plus loin et postule que de tels résidus peuvent certes provenir du stade embryonnaire, mais également être générés par l'organisme en fonction des stimulations. Les fondements de la théorie des cellules souches sont établis.

Parallèlement, au début du 19^{ème}, BOVERI explore une autre voie. Il observe que les cellules indifférenciées sont le résultat d'anomalie de distribution chromosomique. Les recherches vont,

⁴ Cohnheim. Path. Anat. Physiol. Klin. Med. 40 (1867) 1-79

⁵ Virchows Arch. 65 (1875) 64

au fil des années, s'orienter vers les gènes portés par les chromosomes. La tumeur est alors attribuée à des cellules qui ont subi des mutations génétiques (facteur intrinsèque) au hasard (le terme « stochastique », employé comme adjectif, évoque une nature hasardeuse⁶). Les cellules subissent alors une pression de sélection (facteur extrinsèque) qui va donner lieu à divers clones cellulaires différents. La théorie stochastique du cancer prend forme et va peu à peu s'imposer.

Il faut attendre les années 1970 (Chin and al. 2012) et les études de Hamburger et Salmon (1977) pour voir apparaître la théorie des cellules souches telle que formulée actuellement. Elle prend parfois le nom de “modèle hiérarchique” en ce sens qu’au sein de la tumeur, hétérogène, la catégorie formée par les cellules souches joue un rôle crucial (voir plus loin).

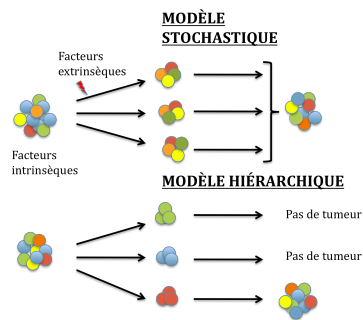


Figure 3 Représentation des deux modèles pouvant expliquer l'hétérogénéité tumorale (d'après CATALANO et al., 2011)

Récemment, des études ont tenté d'unifier les deux théories (Song et al. 2017) et présentent ainsi une approche qui laisse aux CSC le rôle dans l'initiation de la tumeur, en générant des cellules non CSC qui vont ensuite subir des mutations et créer différents clones dont certains conservent des caractéristiques de CSC (résistance aux radiation, inhibition des phénomènes apoptotiques etc.). Vient alors la pression de sélection (traitement de chimiothérapie, hypoxie etc.).

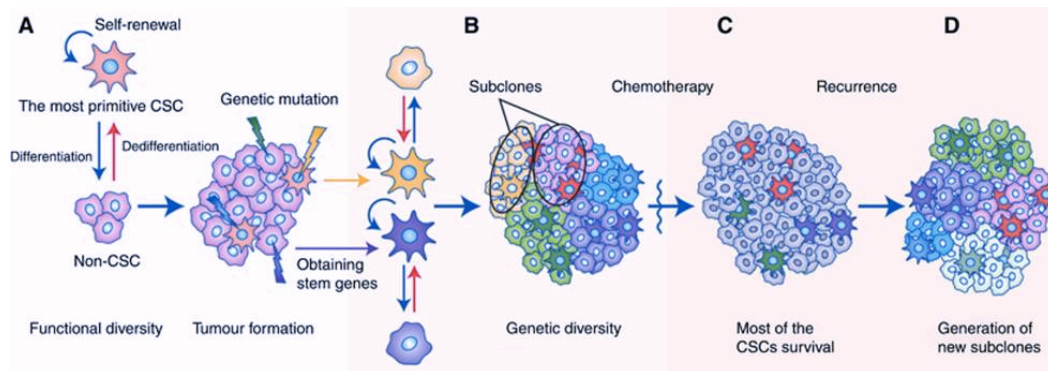


Figure 4 The unified model of cancer, Song et al. 2017

⁶ Définition de l'Encyclopédie Universalis.

Qu'il s'agisse de la théorie des CSC ou de la théorie unifiée, force est de constater qu'il subsiste un chaînon manquant : comment passe-t-on d'une cellule souche « classique » à une cellule souche cancéreuse ? Nous allons maintenant nous pencher sur cette question.

- b. Les théories sur le passage de la cellule souche adulte à la cellule souche cancéreuse.

Il existe actuellement deux grandes hypothèses (Sell 2004) sur le passage de la cellule souche adulte dont l'existence est maintenant clairement établie, à la cellule souche cancéreuse dans les cancers des VADS.

La première fait appel à la notion de « **niche** » qui constitue schématiquement le micro-environnement autour de la cellule souche et qui possède des caractéristiques spécifiques (pression d'O₂, et de CO₂, nutriments, molécules chimiques, pH etc.). Cette niche est également le lieu qui véhicule l'ensemble des ligands qui participent aux voies de communication inter cellulaire que nous étudierons plus loin. Par suite de perturbations locales (éléments chimiques cancérogènes, radiations etc.) ces signaux seraient perturbés et laisseraient alors sortir les cellules souches de la niche avec des signaux de différenciation modifiés. On obtiendrait alors des cellules souches à potentiel cancéreux.

La seconde repose en grande partie sur les particularités des cellules immatures : la **fusion**. Ce phénomène est observé bien entendu lors de la fécondation, mais aussi dans la fusion des myoblastes, la fusion des pré-ostéoclastes (aboutissant à des ostéoclastes multi nucléés), la fusion certaines cellules immunitaires ... Houghton et al. (2004) ont mis évidence certains éléments allant dans le sens de cette théorie. Ils ont observé la présence de cellules souches hématopoïétiques dans l'épithélium gastrique lors d'infections à *Helicobacter pilori*. Dans un second temps, ils ont établi le fait que la possibilité de développer un carcinome gastrique dépendait uniquement de cette lignée, après une éventuelle fusion cellulaire.

A l'heure actuelle aucune des deux théories n'est réellement étayée par des preuves solides. Nous les avons citées de manière à éclairer quelque peu la zone d'ombre autour des origines des cellules souches cancéreuses.

Considérant que nous disposons des bases de compréhension sur la théorie des CSC, nous allons maintenant exposer les caractéristiques qui leur donnent un rôle essentiel dans les phénomènes tumoraux.

1.2.2. Caractéristiques spécifiques des cellules souches cancéreuses.

Le rôle des cellules souches cancéreuses dans les cancers est de plus en plus étudié : entre 2017 et 2019, plus de 19 000 articles traitant du sujet ont été publiés (Najafi and al. 2019). Elles possèdent bien entendu certaines des capacités des cellules souches classiques, telles que l'auto renouvellement, la possibilité de réaliser des divisions asymétriques, la totipotence (Srivastava and al. 2019), mais également la faculté de quitter puis revenir à un état quiescent (Atkins and al. 2019).

Elles disposent, en sus, **d'autres particularités** qui à elles seules permettent de mieux appréhender les causes possibles de résistance aux traitements, d'envahissement tissulaire et autres phénomènes métastatiques, et de résurgence des lésions. Nous nous proposons maintenant de passer en revue les caractéristiques principales des CSC.

a. Le rôle dans l'initiation, le développement et le maintien de la tumeur.

L'une des notions importantes à appréhender afin de bien comprendre le rôle des CSC dans l'initiation, le développement et le maintien de la tumeur est celle du TME (tumor micro environnement) également appelé « niche ». Nous avons déjà expliqué que les CSC, comme les cellules souches en général, ont la capacité d'opérer des divisions asymétriques. Ce type de divisions permet à la fois d'assurer un auto-renouvellement et de « produire » des cellules différenciées.

Le TME va être un lieu d'échange de signaux entre les CSC et les cellules environnantes qui vont orienter à la fois le type de divisions des CSC, le phénotype de la tumeur, mais aussi le comportement des autres cellules (Peitzsch and al. 2017).

Au sein du TME, on trouve des cellules telles que des cellules immunitaires, endothéliales, mais également des fibroblastes appelés CAFs (cancer associated fibroblast). Ils jouent un rôle

essentiel. Ils sont tout d'abord immuno-suppresseurs (Lakins and al. 2018) (Costa and al. 2018) et favorisent la chémo-résistance via production d'IL6, IL8 et CA5 (Su and al. 2018).

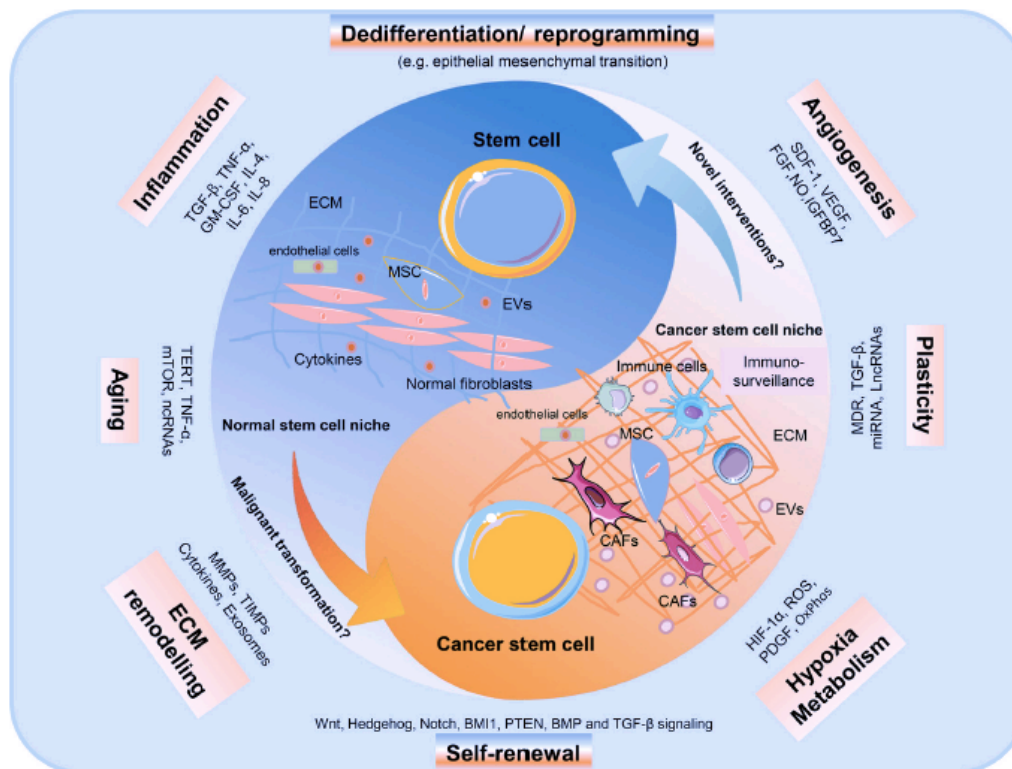


Figure 5 The architecture of stem cell- and cancer stem cell niche. Zhao et al. 2018

Sous l'influence du TME, et via diverses voies de communication cellulaire que nous étudierons plus loin, les CSC vont sortir de leur état quiescent et opérer des divisions qui vont être à l'origine de cellules différenciées constituant le « **Bulk** », c'est à dire le corps de la tumeur.

La phase **d'initiation et de développement** de la tumeur est donc dépendante des capacités des CSC, mais également de leurs interactions avec le TME. Il existe d'ailleurs une forme de dépendance des CSC qui, séparées de leur niche, peuvent perdre (de manière réversible) certaines de leurs facultés (Graziano and al 2008).

Le **maintien** de la tumeur est, lui, fortement influencé par les signaux anti apoptotiques et immuno modulateurs produits par les CSC. En définitive, on peut parler d'une forme de plasticité du TME, telle que représentée sur la figure 24.

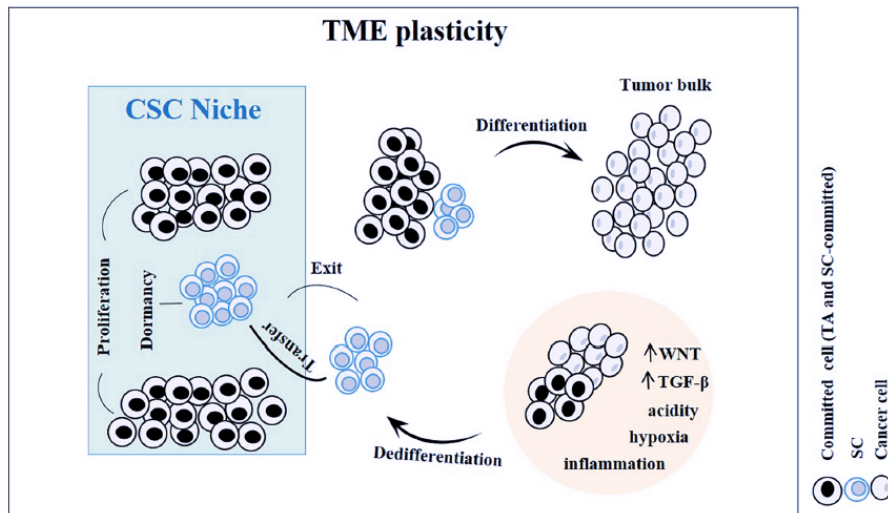


Figure 6 Control over cancer stem cell (CSC) division. Najafi et al. 2019

b. L'agressivité de la tumeur.

Le caractère agressif de la tumeur dépend de sa vitesse de développement, mais aussi de son caractère invasif et de sa capacité à métastaser. Dans les cancers des VADS, pour passer du stade de carcinome épidermoïde in situ, à celui de cancer invasif puis métastasé, une étape est indispensable : l'EMT, l'épithelial to mesenchymal transition. Les cellules doivent changer de phénotype pour pouvoir migrer. Une fois le phénotype mésenchymateux acquis, les CSC deviennent très mobiles et résistantes aux traitements (Abell and Johnson 2014). Ce phénomène est médié par différents mécanismes et s'accompagne de la perte du marqueur épithélial Cadhérine-E.

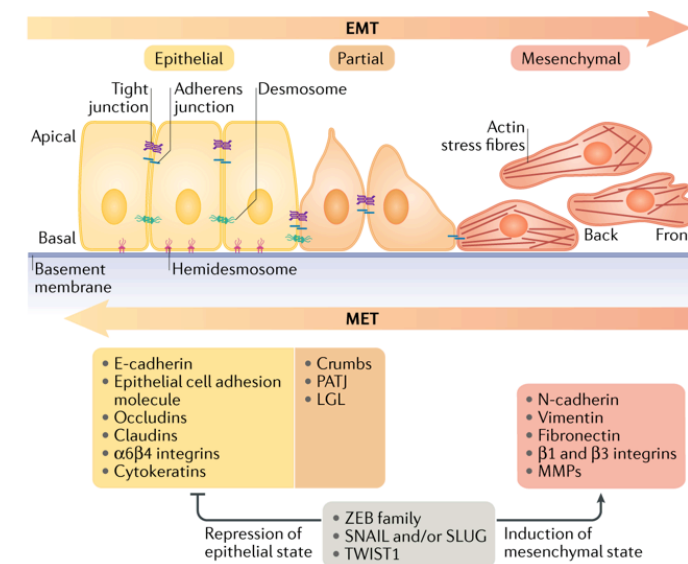


Figure 7 : epithelial to mesenchymal transition. Dongre et Weinberg 2019.

Il a été démontré le rôle des microARN, dans la régulation de l'EMT. Les micro-ARN sont des fractions non codantes d'ARN qui régulent l'expression des gènes au niveau post transcriptionnel.

Dans les CSC ils peuvent être promoteurs ou suppresseurs de tumeurs. MiR-34a inhibe l'EMT (Sun and al. 2015) via le contrôle de la transcription des gènes Snail et Twist.

A l'inverse, MiR-9, MiR-181 et MiR-215 sont oncogéniques (Sun and al. 2014). **Les MiR sont à ce titre considérés comme des marqueurs fonctionnels des CSC.**

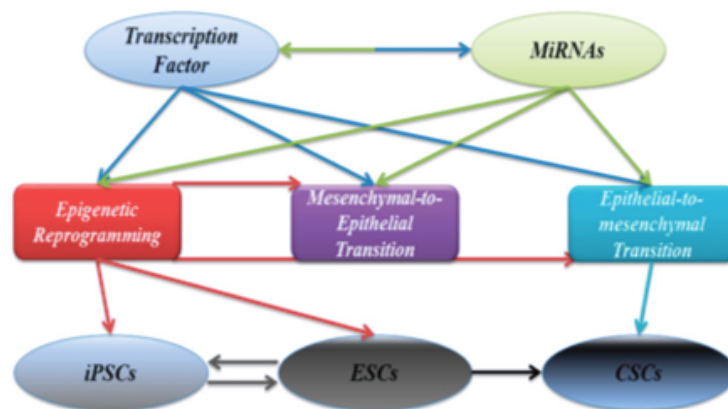


Figure 8 Sun et al. 2014

L'EMT est également favorisé par les métalloprotéases matricielles MMP9 sécrétées par les CAFs de la niche (Giannoni and al. 2010). Les MMP9 vont d'ailleurs également constituer un des marqueurs utilisés pour identifier les CSC (voir plus loin).

Enfin, comme nous le verrons au chapitre 2.3, TGF- β joue un rôle important dans le déclenchement de l'EMT (Tsubakihara and Moustakas 2018).

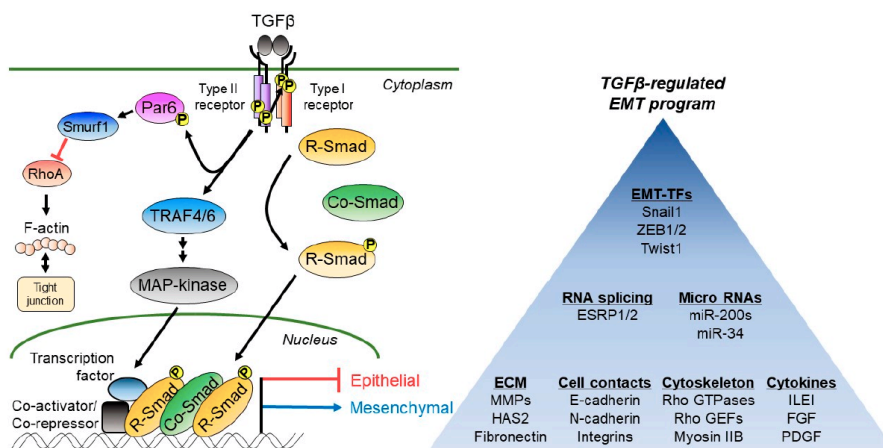


Figure 9 Tsubakihara et al. 2018

c. La tumorigénicité.

La tumorigénicité des CSC est une caractéristique impliquée à la fois dans l'initiation des tumeurs, dans les métastases, et également dans les récurrences des cancers.

Les CSC ont, seules, la possibilité de recréer une tumeur hétérogène en culture. Cet élément est d'ailleurs utilisé pour identifier leur présence dans un tissu. Nous développerons ultérieurement cette méthode appelée culture des tumorosphères (Weiswald and al. 2015).

Cette faculté de recréer une tumeur à partir de quelques cellules est également impliquée dans les récurrences après traitement.

d. La résistance aux traitements.

Schématiquement, on peut distinguer deux types de phénomènes (Najafi et al. 2019) qui permettent aux CSC de développer une résistance aux traitements (chimio et radiothérapie).

Le premier est d'ordre intrinsèque et repose sur le détournement de différentes voies de signalisation que nous avons développées plus haut, ou l'utilisation de la machinerie cellulaire. Le second est d'ordre extrinsèque et dépend en grande partie du TME.

Il existe également une troisième source de résistance aux traitements qui résulte de l'usage même de ces derniers, et qui pourrait être comparée aux résistances observées dans les antibiothérapies : la sélection de clones résistants.

- Résistance intrinsèque et extrinsèque.
 - Effets de la radiothérapie et réponses des CSC.

La radiothérapie entraîne l'apoptose cellulaire de deux manières (Mortezaei and al. 2019). A court terme, elle ionise la zone de la tumeur et génère des radicaux libres oxydants (ROS ou reactive oxygen species) toxiques pour les cellules. A moyen et long terme, le rayonnement endommage l'ADN et entraîne une apoptose des cellules tumorales.

S'agissant des ROS, les CSC vont réagir en sur-activant la fonction COX-2 (Kim and al. 2008) qui va permettre de diminuer drastiquement l'effet oxydant de la radiothérapie. D'autre part, les signaux apoptotiques des cellules tumorales « classiques » avoisinantes (TGF- β notamment) activent les voies stimulant la prolifération des CSC.

L'altération de l'ADN est, comme nous le verrons en étudiant les voies de communications des CSC, à la fois tolérée et compensée par des mécanismes de réparation.

- Effets de la chimiothérapie et réponses des CSC.

La chimiothérapie va chercher à détruire les cellules tumorales par plusieurs moyens. Nous allons voir que les CSC disposent là encore de moyen de défense contre les différentes stratégies de chimiothérapie.

Certains traitements visent à inhiber la synthèse des nucléotides nécessaires à l'édification du matériel génétique (Méthotrexate, 5FU...) et vont ainsi entraîner une incapacité des cellules tumorales à dupliquer leur matériel génétique et se diviser. L'efficacité de ces traitements dépend donc de la phase cellulaire (l'action est ciblée sur la phase S de la cellule), mais aussi du type cellulaire (action majorée sur les cellules en prolifération). Les CSC vont pouvoir échapper à ces molécules grâce à leur capacité à entrer en phase de quiescence (Tabassum and al. 2015). Cette phase de quiescence rend également inopérants les traitements de type poison de fuseaux empêchant les divisions cellulaires.

Les mécanismes de réparation de l'ADN mis en œuvre par les CSC, leur tolérance aux altérations de matériel génétique, et la faculté de quiescence diminue également drastiquement les effets des agents alkylants, intercalants ou scindants ciblant directement l'ADN cellulaire.

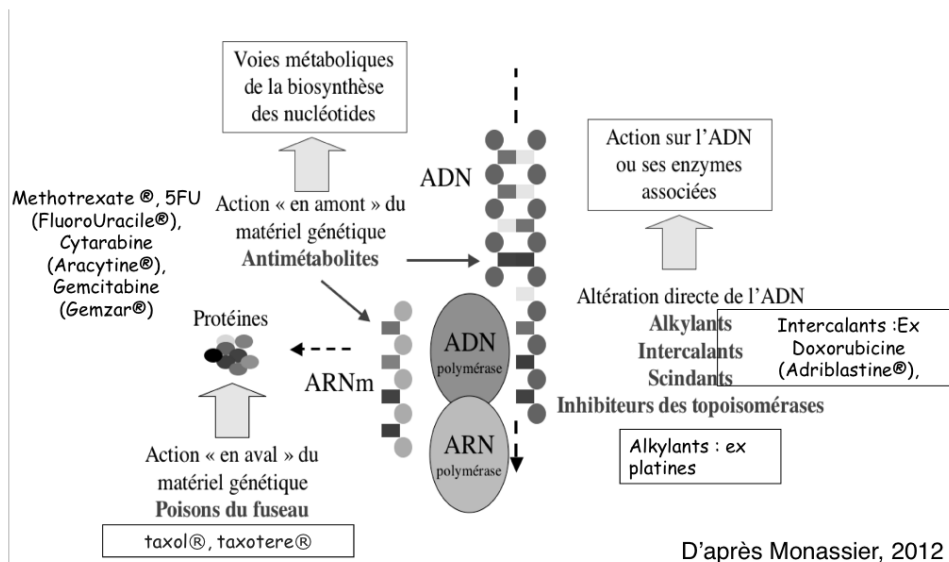


Figure 10 Cibles et effets de la chimiothérapie, Monassier 2012

Un autre mécanisme va permettre au CSC de se défendre contre les traitements de chimiothérapie : il s'agit des pompes à efflux. Ces pompes sont des transporteurs actifs unidirectionnels qui sont surexprimés à la surface des CSC (Boesch and al. 2015), en particulier ABCB1 et ABCG2 (ABC : ATP binding cassette). Les ABC vont exfiltrer les principes actifs chimiothérapeutiques de la CSC et contribuer ainsi à sa résistance aux traitements.

Les figures 29 et 30 ci-après reprennent les principales caractéristiques de résistance aux traitements que nous venons d'évoquer pour les CSC.

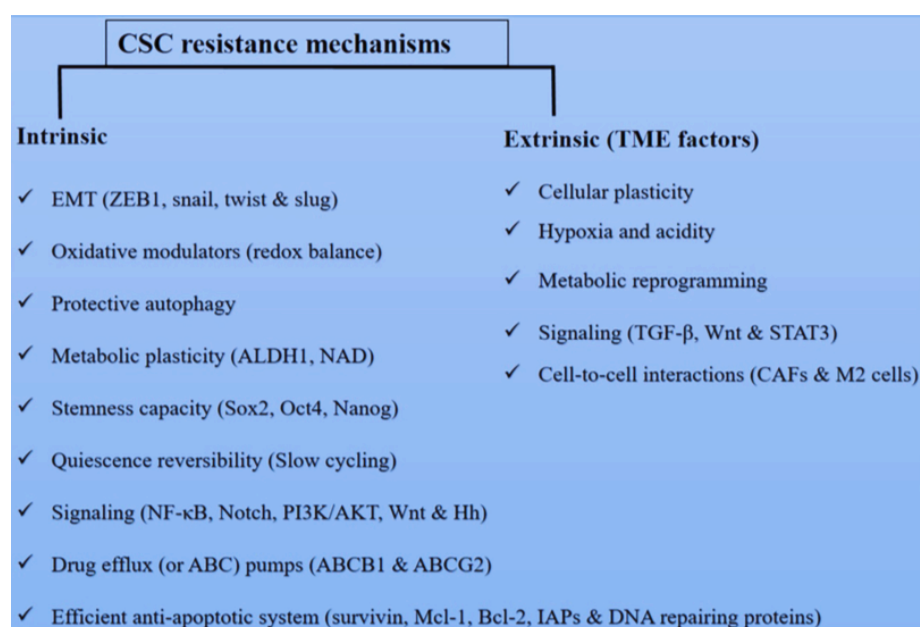
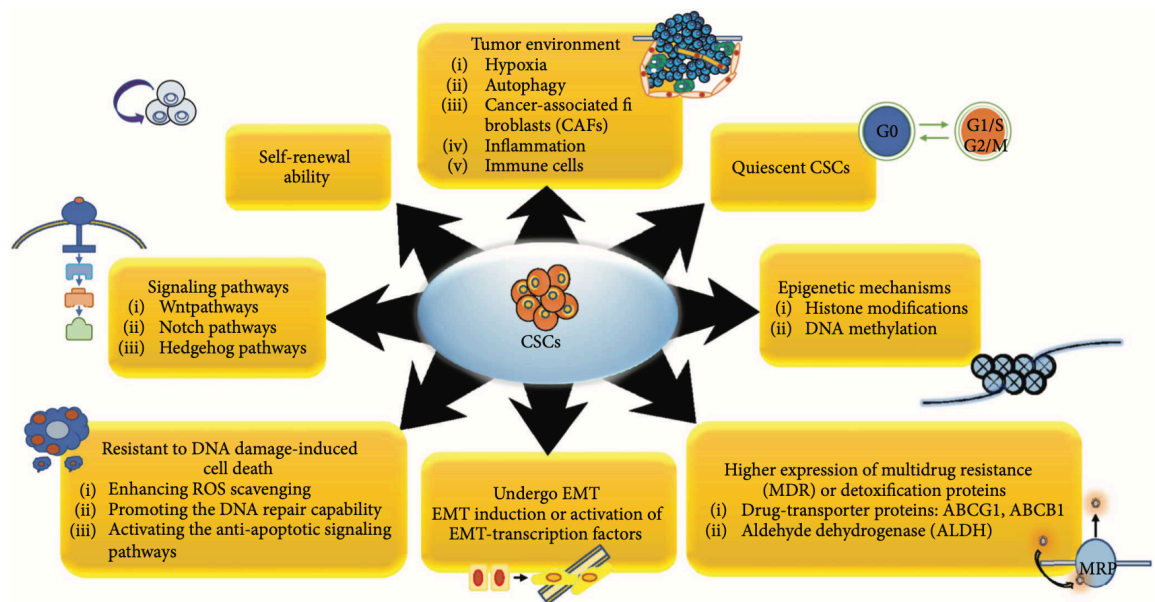


Figure 11 Mechanisms of therapy resistance in cancer stem cells (CSCs), Najafi et al. 2019.



Key signaling pathways and modifications of CSCs contributing to the resistance against chemotherapeutics. In order to survive during and after therapy, CSCs display many responses including EMT, self-renewal, tumor environment, quiescence, epigenetic modification, MDR, and so forth. The mechanisms by which CSCs contribute to resistance against therapeutics are summarized.

Figure 12 Key signaling pathways and modification of CSCs contributing to chemoresistance. Phi and al. 2018

Certains traitements ont tout de même un effet sur les cellules souches cancéreuses, mais de manière non systématique et pas aussi ciblée que souhaitée. Les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinases en sont l'illustration, mais nous ne les développerons pas ici afin de ne pas alourdir notre propos.

Comme nous venons de le voir, les effets thérapeutiques actuels sur les CSC sont assez limités. Ils sont en revanche beaucoup plus efficaces sur les cellules tumorales « classiques ». Ceci entraîne malheureusement un phénomène qui découle de l'usage successif des traitements qui vont avoir tendance à sélectionner un clone cellulaire de CSC qui va devenir de plus en plus dominant au sein de la tumeur.

- Phénomène de sélection.

Les études récentes montrent que, outre les phénomènes intrinsèques et extrinsèques de résistance aux traitements, on observe une résistance acquise, du fait des traitements (Garcia-Mayea and al. 2019).

Au fur et à mesure des différentes cures de traitement, la proportion des CSC, moins sensibles aux thérapeutiques, va augmenter au sein de la tumeur. Cette dernière va devenir d'autant plus agressive et résistante (Song et al. 2017).

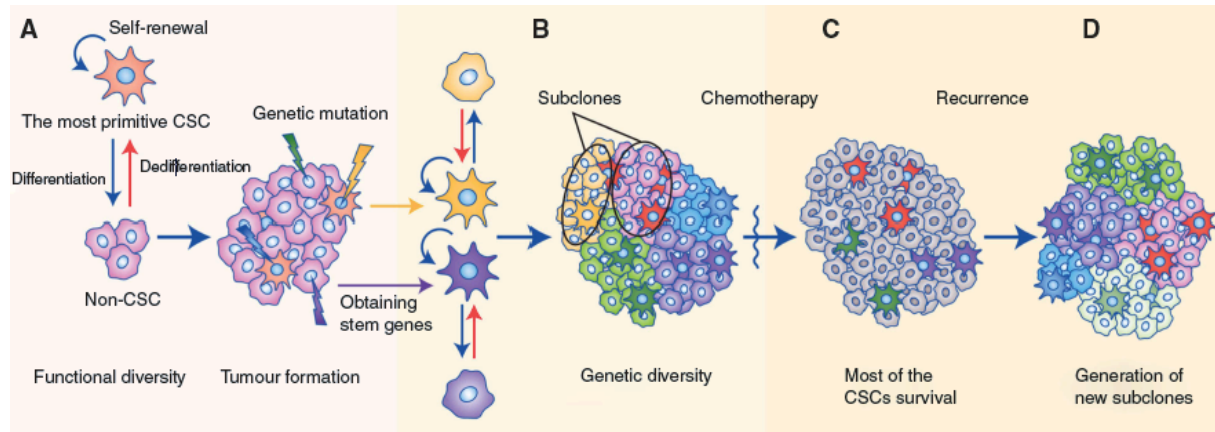


Figure 13 The unified model of cancer, Song et al. 2017

Nous pensons, à ce stade de notre travail, avoir démontré la place essentielle que tiennent les CSC au sein des processus cancéreux. Leur rôle dans l'initiation de la tumeur et son caractère agressif et invasif, ainsi que dans les phénomènes de résistance aux traitements oriente naturellement à tenter de les cibler de manière spécifique.

Les techniques actuelles de mise en évidence de la présence de cellules souches cancéreuses reposent sur les niveaux d'activité enzymatique et/ou la présence et surexpression de molécules de surface (Méry 2016). Ces deux éléments sont en lien avec les phénomènes de communication inter cellulaire. Nous allons donc nous pencher brièvement sur les grandes voies de communication inter cellulaires et leurs dérégulations dans les cellules souches cancéreuses.

1.2.3. Les grandes voies de communication inter cellulaires et leurs dérégulations dans les cellules souches cancéreuses.

a. Généralités sur les grandes voies de communication inter cellulaires.

Les organismes pluricellulaires doivent disposer d'un système de communication intercellulaire afin d'assurer leur survie. Les phénomènes de renouvellement cellulaires, de cohésion tissulaire mais aussi les grandes fonctions, nécessitent une parfaite orchestration des cycles et des

activités cellulaires. A cette fin, chaque cellule reçoit une multitude de signaux extra cellulaires pouvant provenir d'autres cellules ou de l'environnement.

Les différents signaux sont véhiculés par des ligands dont la nature chimique est très variable : protéine, peptide, acide aminé, cytokine inflammatoire, élément bactérien, gaz dissous ... Les ligands se fixent ensuite sur des récepteurs membranaires ou intra cellulaires qui vont effectuer une transduction du signal et provoquer une cascade d'événements intra cellulaires. In fine, la cellule va modifier son fonctionnement : prolifération, apoptose, différenciation, migration etc.

Ces éléments ont leur importance car l'on peut tout à fait comprendre ici qu'il existe une certaine **corrélation** entre le niveau et le type d'activité d'une cellule, et l'expression voire la sur expression de certaines protéines intra cellulaires ou de récepteurs transmembranaires.

On dénombre trois grandes familles de récepteurs membranaires⁷

- Les récepteurs couplés aux canaux ioniques.

Comme leur nom l'indique, ils permettent l'entrée ou la sortie d'ions et ont un rôle dans les phénomènes dépolarisation/repolarisation des neurones, ou plus généralement dans les phénomènes cellulaires liés à l'homéostasie. Ils jouent principalement un rôle dans les cellules électriquement excitables.

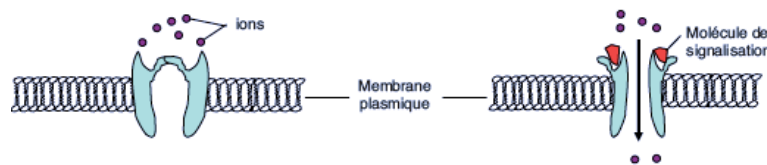


Figure 14 Le classeur immunopathologie pour le praticien

- Les récepteurs couplés à la protéine G.

Ils interagissent avec la molécule de liaison au GTP appelée protéine G qui va être un intermédiaire d'activation d'une protéine plasmatique ou d'un canal ionique.

⁷ « Biologie moléculaire de la cellule », 4ème édition, Médecine sciences, Flammarion, 2004.

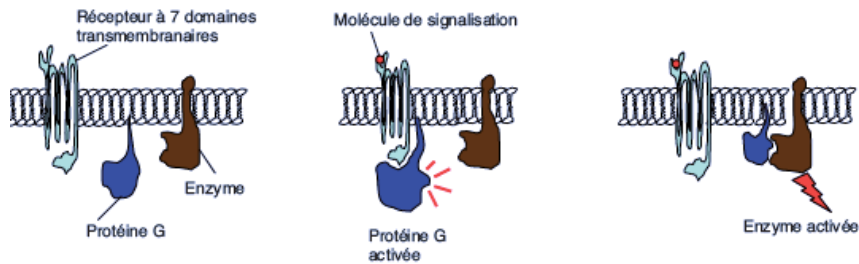


Figure 15 Le classeur immunopathologie pour le praticien

- Les récepteurs couplés aux enzymes.

Ils agissent directement comme des enzymes avec un site catalytique intracellulaire et un site récepteur extra membranaire. Dans la plupart des cas ils ont une activité de phosphorylation et activent une cascade enzymatique.

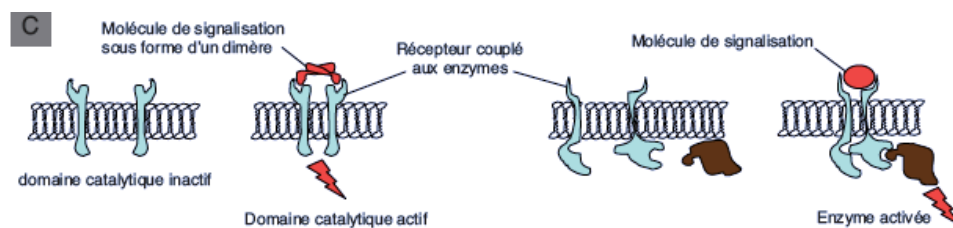


Figure 16 Le classeur immunopathologie pour le praticien

Les deux derniers types de récepteurs transduisent le signal en activant des chaînes de protéines pouvant parfois interagir secondairement entre elles en réseau. Les mécanismes d'activation reposent sur des phosphorylations (activation d'une kinase pour les récepteurs couplés aux enzymes, ou liaison au GTP pour les récepteurs couplés à la protéine G), et les inactivations font appel à des dé-phosphorylations (activation d'une phosphatase pour les récepteurs couplés aux enzymes, ou hydrolyse du GTP pour les récepteurs couplés à la protéine G).

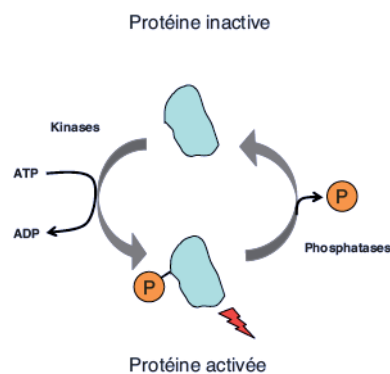


Figure 17 Le classeur immunopathologie pour le praticien

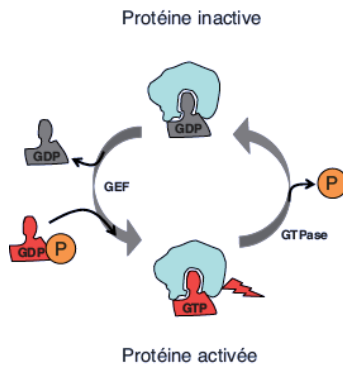


Figure 18 Le classeur immunopathologie pour le praticien

Les récepteurs couplés aux enzymes, ou couplés à la protéine G activent de nombreuses voies de signalisation⁸, dont certaines sont communes. Nous nous contenterons de donner ici quelques exemples sur le **rôle général** de ces voies afin de ne pas alourdir notre propos, avant de revenir et nous attarder sur le rôle des voies **Wnt, JAK STAT, PI3K et Notch dans les cellules souches cancéreuses**.

i. Exemples de voies activées par les récepteurs couplés à la protéine G

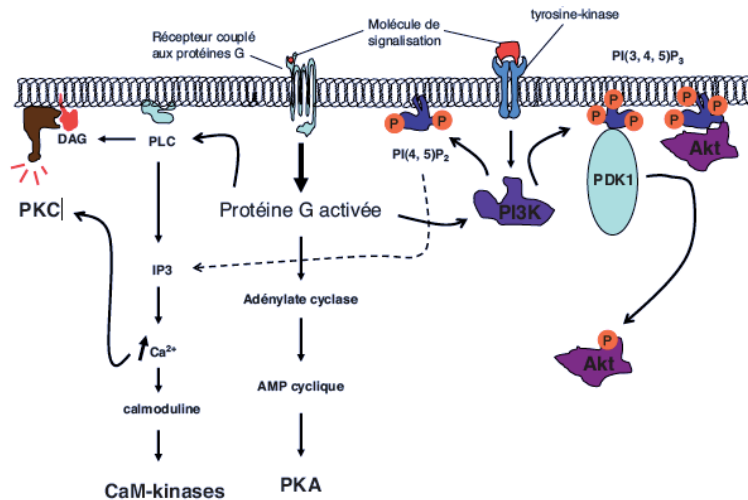


Figure 19 Le classeur immunopathologie pour le praticien

o Voie PI3K.

La voie PI3K peut être activée via les récepteurs couplés aux protéines G, mais également par les récepteurs couplés aux enzymes. L'axe PI3K-AKT-mTOR joue un rôle central dans

⁸ Le classeur immunopathologie pour le praticien, CRI, Chapitre 7 : les communications intercellulaires par les voies de signalisation, Hang Korng Ea, Frédéric Lioté Université Denis-Diderot, Paris VII, Centre Viggo Petersen, Hôpital Lariboisière, Paris <http://www.cri-net.com/formation-et-congres/documents-formation/immunopathologie-pour-le-praticien>

l'homéostasie cellulaire c'est à dire dans la régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que l'angiogenèse. Cette voie est impliquée dans les cancers, et de nombreux traitements ciblent la protéine mTOR afin de l'inhiber.

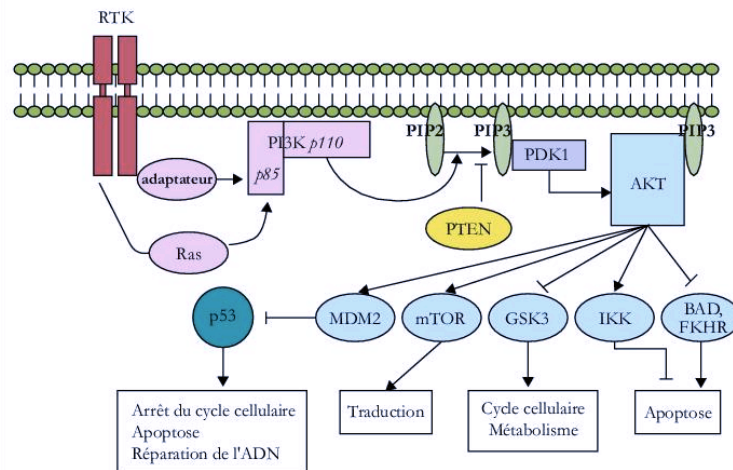


Figure 20 : Cortot, Alexis, Jean-Pierre Armand, et Jean-Charles Soria. « Les inhibiteurs de la voie PI3 kinase-AKT-mTOR ». Bulletin du Cancer 93, n° 1 (1 janvier 2006): 19-26.

o Voie Wnt-βCatenin.

Cette voie est une voie hautement conservée, depuis le nématode jusqu'à l'homme. Le ligand de la famille Wnt se fixe sur le récepteur membranaire Frizzled (famille des récepteurs couplés aux protéines G) et aboutit à l'accumulation de β-caténine qui va se lier dans le noyau à des facteurs de transcription.

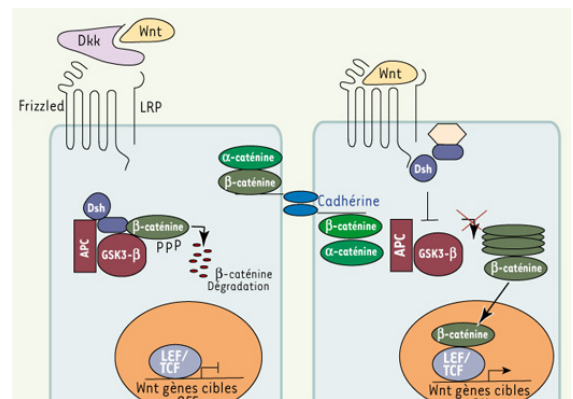


Figure 21 Importance de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans l'identité, l'activation et la différenciation des cellules souches épidermiques ». médecine/sciences 23, n° 1 (1 janvier 2007)

Elle joue un rôle important dans le développement embryonnaire, mais aussi de la régénération

tissulaire de par l'influence qu'elle a sur l'activation des cellules souches. On note dans de nombreux cancers un dérèglement de cette voie.

L'étude des cellules souches épidermiques (Blanpain 2007) a ainsi montré l'importance de Wnt dans le maintien de l'identité de celles-ci (signal faible), dans l'activation de cellules souches quiescentes (signal moyen), et dans la différenciation terminale (signal fort).

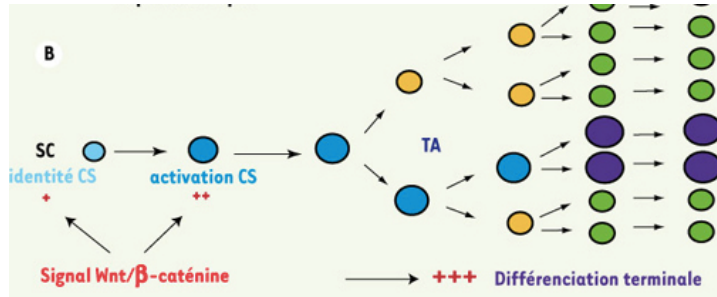


Figure 22 Importance de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans l'identité, l'activation et la différenciation des cellules souches épidermiques ». Médecine/sciences 23, n° 1 (1 janvier 2007)

ii. Exemples de voies activées par les récepteurs couplés aux enzymes.

o Voie des MAP kinases : exemple Ras/Raf.

La voie Ras joue un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire, et régule l'apoptose. Les phénomènes apoptotiques, quelle que soit la voie concernée, reposent en partie sur la régulation de l'activité des mitochondries et donc indirectement la perméabilité de leur membrane. L'activation de RAF inhibe l'apoptose (Galmiche et al 2010). Cette kinase est présente de manière physiologique dans la plupart des tissus des vertébrés, elle est fréquemment suractivée dans les cancers.

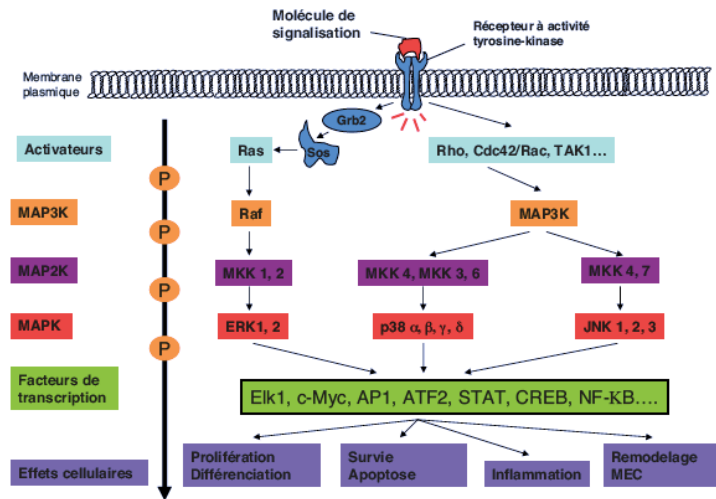


Figure 23 Le classeur immunopathologie pour le praticien

o Voie JAK STAT.

Elle régule l'expression des gènes de l'activation, de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Les principaux ligands sont les interleukines (IL6 et IL15), l'interféron (IFN) et les facteurs de croissance. Cette voie est intriquée avec celle des MAP Kinases via le complexe Ras/ERK.

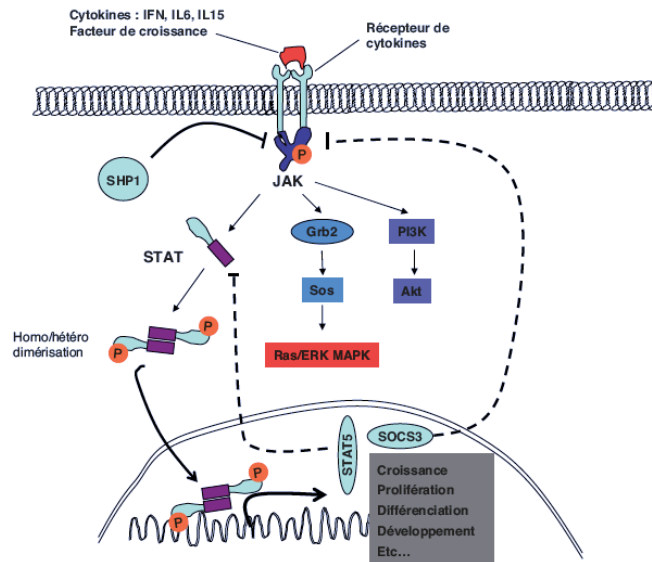


Figure 24 Le classeur immunopathologie pour le praticien

o Voie Notch.

Il s'agit d'une voie régulant la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose chez l'ensemble des métazoaires (voie hautement conservée) (Kopan 2012).

Elle joue également un rôle dans l'adaptation à l'hypoxie lors de l'organogénèse, mais aussi dans les phénomènes cancéreux (Sainson et Harris 2006).

L'activation se fait grâce au ligand Delta qui une fois lié au récepteur Notch, entraîne son clivage et la migration de la sous unité NICD dans le noyau où elle va réguler la transcription de gènes.

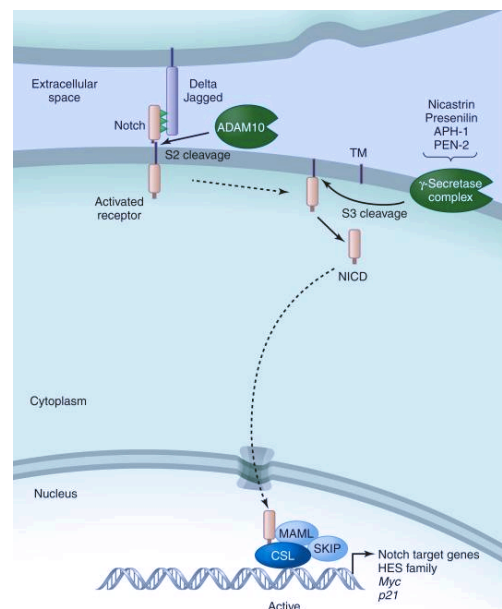


Figure 25 Kopan, Raphael. « Notch Signaling ». Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4, n° 10 (octobre 2012)

- Voie PI3K.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la voie PI3K peut également être activée par les récepteurs liés aux enzymes, en l'occurrence via la voie des MAP kinases à partir du complexe Ras.

- iii. Exemples de voies liées à d'autres récepteurs.

Hormis les récepteurs membranaires liés aux protéines G et ceux liés aux enzymes, d'autres types de récepteurs et voies existent. En voici quelques exemples :

- Voie des récepteurs TLR : exemple de NF- κ B (nuclear factor κ B).

Il s'agit d'une voie régulant la réponse immunitaire, l'inflammation et l'apoptose. Il est à noter qu'outre les récepteurs TLR, elle peut être activée également par les interleukines (IL1) et leurs récepteurs, le TNF (tumor necrosis factor) et son récepteur membranaire. Ce dernier axe est utilisé en thérapeutique (anti TNF).

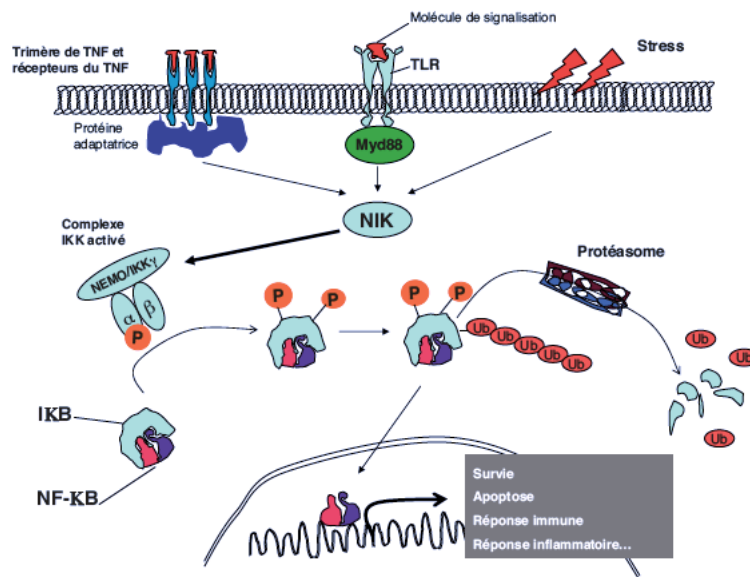


Figure 26 Le classeur immunopathologie pour le praticien

- Récepteurs intra cellulaires :

- Voie des récepteurs NOD-like.

Les NOD sont des récepteurs cytoplasmiques dont les ligands sont des DAMP (danger signal molecular patterns) c'est à dire des motifs moléculaires (origine bactérienne, virale etc.). La voie NOD est connectée à celle des MAP kinases et celle de l'inflammasome, elle a une action dans les phénomènes immunitaires. Certains pathogènes vont interférer avec les récepteurs NOD afin de moduler la réponse immunitaire de l'hôte.

- Voie de l'inflammasome.

L'inflammasome (appelé NLRP3) est un complexe protéique pouvant être activé par des DAMP et des produits microbiens (toxines). Cette voie intervient dans les réponses immunitaires et l'apoptose.

b. Dérégulation des voies de communication chez les CSC.

Nous venons de donner un aperçu de quelques-unes des voies de communication inter cellulaires. Notre objectif n'était pas d'être exhaustif mais d'illustrer par l'exemple les moyens utilisés par l'organisme afin d'assurer une bonne homéostasie cellulaire. Ces différentes voies et mécanismes peuvent, comme évoqué plus haut, être également impliqués dans des phénomènes pathologiques : modulation de la réponse immunitaire par des pathogènes, maladies auto-immunes etc. La machinerie cellulaire et ses organites (mitochondries) est alors détournée, leurrée par l'envahisseur. Mais il existe également un ennemi intérieur capable d'utiliser les différentes voies de communication à son profit : le cancer. Nous allons maintenant étudier plus en détail quatre des nombreuses voies utilisées par les cellules cancéreuses en général, et les cellules souches cancéreuses en particulier : les voies Wnt, JAK-STAT, Notch et PI3K, TGF- β , NF- κ B.

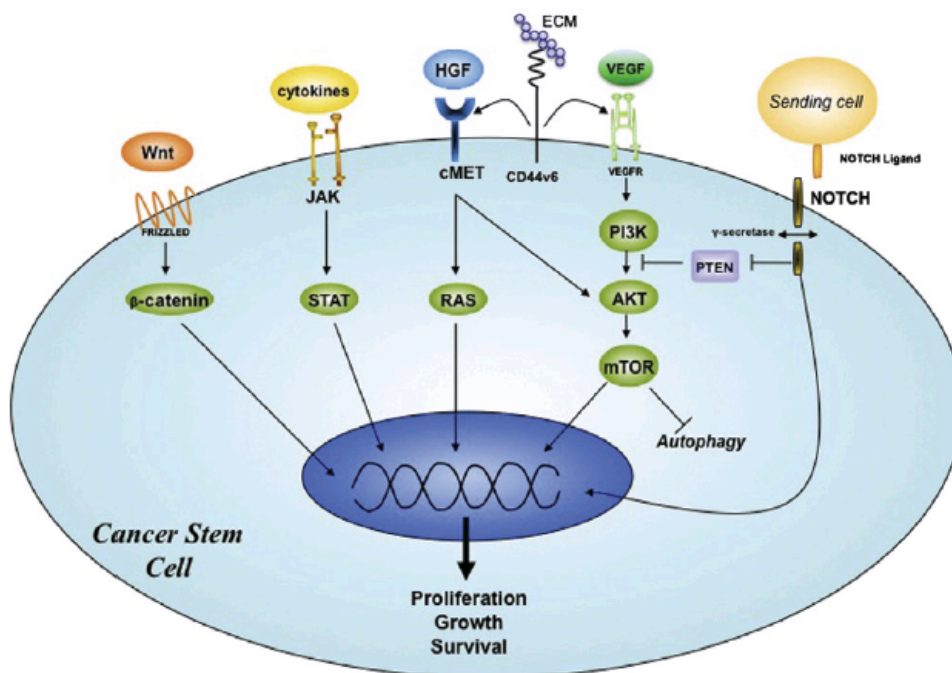


Figure 27 Figure 14 C. Monchamont et al. / Cancer Letters 322 (2012) 139-147

Nous mettrons en évidence les différents dysfonctionnements observés, et verrons également que ces détournements laissent des « stigmates » qui seront autant de supports utilisés par les techniques d'identification ou de ciblage des CSC que nous développerons dans la partie III de notre travail.

- La voie Wnt- β Catenin.

C'est l'une des voies détournées par les CSC (Kahn and Kim 2014). Le dysfonctionnement de la voie Wnt a notamment été mis en évidence dans les CSC du colon (Sousa and al. 2011), des adénocarcinomes du sein (Nusse and Varmusse 1982), des glioblastomes (Sandberg et al. 2003), des lymphomes et des leucémies (Polakis 2012).

Les caractéristiques physiologiques de la voie Wnt évoquées plus haut sont utilisées par les CSC à leur profit : maintien de l'identité des cellules souches (signal faible), activation de cellules souches quiescentes (signal moyen), différenciation terminale (signal fort).

Un grand nombre de marqueurs membranaires et enzymatiques dont l'expression découle de la voie Wnt sont utilisés pour identifier les CSC : CD24, CD44, CD133 et ALDH1.

Il est également très important de noter que le phénomène **EMT** (epithelial to mesenchymal transition) qui est à l'origine du caractère invasif des carcinomes épidermoïdes des VADS est régulée par la voie Wnt (Howe and al. 2003). Nous reparlerons plus loin de l'EMT.

Enfin, des études sur les cancers du sein ont mis en évidence la radiorésistance des CSC (nous développerons plus loin cette notion). L'un des phénomènes impliqués est une forme de tolérance à l'altération de l'ADN, voire une réparation de celui-ci, stimulée par Wnt (Moncharmont and al. 2012) (Woodward et al 2007).

- La voie Jak Stat.

Cette voie est notamment sensible aux ligands de type hormones de croissance comme nous l'avons évoqué précédemment. Au sein des cellules souches classiques elle favorise le renouvellement et le maintien de l'identité. Dans les cancers de la prostate, il a été constaté que les cellules souches cancéreuses surexprimaient certains gènes sous dépendance de la voie Jak Stat tels que IFN κ et STAT1 (Birnie et al. 2008).

De plus, des modulations de cette voie Jak Stat s'accompagnent d'augmentation et diminution de la capacité des cellules souches à former de nouvelles tumeurs en culture (voir plus loin culture sphéroïde). En d'autres termes, elle contribue à la tumorigénicité.

Ces deux éléments tendent à confirmer que les CSC détournent la voie Jak Stat afin de maintenir leur phénotype « souche ».

Il est intéressant de noter que les CSC CD44+ et ALDH1+, donc avec une voie Wnt très activée perdent de manière significative leur tumorigénicité lorsque l'on inhibe la voie Jak Stat (Chen and al. 2010).

- La voie Notch.

Le rôle joué par la voie Notch dans le fonctionnement des CSC est plus contrasté (Matsui 2016). En effet, selon le contexte, son activation peut avoir un effet promoteur ou suppresseur de tumeur (Ranganathan and al. 2011). Certains éléments semblent suggérer qu'une activation de la voie Wnt est nécessaire pour que l'activation de Notch soit tumorigénitrice (Li and Xie 2005).

Il est en revanche assez clairement défini que le blocage de la voie Notch augmente la radiosensibilité des CSC exposées aux traitements de radiothérapie (Wang and al. 2010). Notch joue donc très probablement un rôle dans les phénomènes de radio-résistance des CSC.

- Voie PI3K.

Nous avons évoqué plus haut le nouveau paradigme en matière de classification des cancers des VADS prenant en compte le caractère HPV+ ou non. Il est à noter que **les cancers des VADS HPV+ présentent la caractéristique particulière de déréguler préférentiellement la voie PI3K (Jou and al. 2017).**

La voie PI3K est considérée comme essentielle dans l'initiation, la croissance et le maintien de la tumeur cancéreuse. Son activité et son rôle au sein des CSC peut être appréhendée notamment au travers des études portant sur PTEN qui est un inhibiteur de la voie PI3K/AKT (Luongo and al. 2019).

Il a en effet été mis en évidence que les mutations ou altérations de PTEN au sein des cellules souches « normales » participent à leur évolution vers des phénotypes de cellules souches

cancéreuses, en dérégulant leur capacité d'auto renouvellement. Une augmentation de leur capacité de formation d'une sphéroïde in vitro a ainsi été observée.

D'autre part, le processus EMT qui favorise l'envahissement et le caractère invasif de la tumeur semble soutenu par PI3K (de manière non exclusive).

L'inactivation de PTEN entraîne également une augmentation des capacités de survie, de migration et d'angiogenèse des cellules souches cancéreuses (Li and Yang 2012).

En définitive, beaucoup des caractéristiques des cellules souches cancéreuses peuvent être appréciées à travers le prisme des altérations de la voie PI3K (Grivennikov and al. 2010) (Vander Broek and al. 2015).

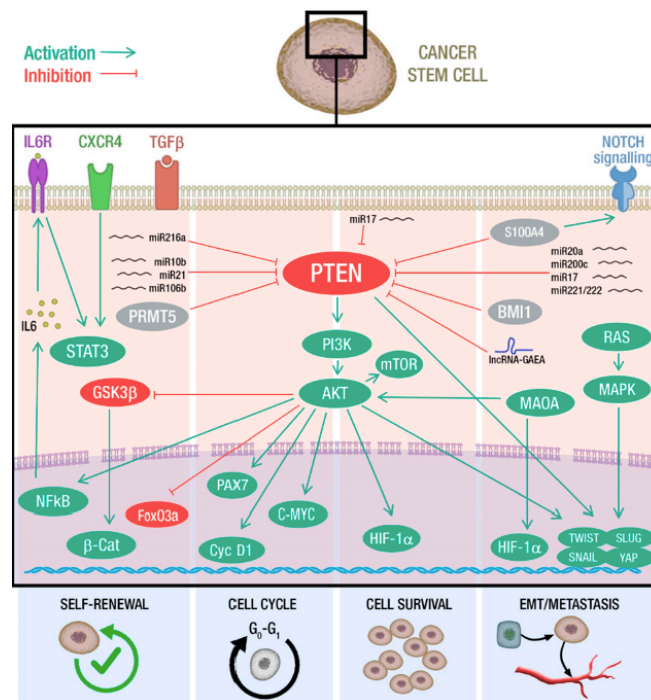


Figure 28 Vander Broek, R, S Mohan, Df Eytan, Z Chen, et C Van Waes. « The PI3K/Akt/MTOR Axis in Head and Neck Cancer: Functions, Aberrations, Cross-Talk, and Therapies ». *Oral Diseases* 21, n° 7 (octobre 2015)

○ La voie TGF-β.

TGF-β (transforming growth factor) est une cytokine libérée par de nombreuses cellules de la niche (ou TME : tumor micro environnement) en réponse à l'hypoxie (Tang and al. 2018). Elle se fixe ensuite sur son récepteur est active le facteur de transcription **SMAD** qui pilote des gènes cibles.

Ce dernier est promoteur du phénotype des CSC en orientant les cellules vers une dédifférenciation, et un état de quiescence (Brown and al. 2017). Il stimule également l'EMT (Katsuno and al. 2019). C'est en quelque sorte une voie de signalisation en réponse à un stress cellulaire local.

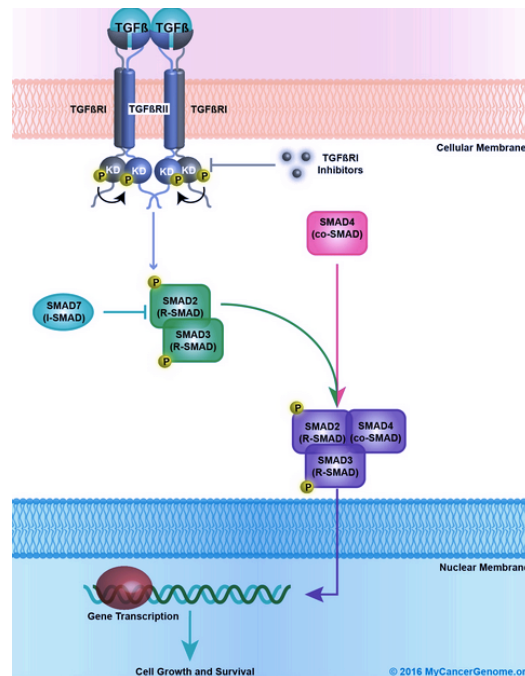


Figure 29 : 2016 MyCancerGenome.org

- La voie NF- κ B.

NF- κ B est, comme nous l'avons vu précédemment, un médiateur essentiel dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Les CSC vont réagir aux signaux NF- κ B en augmentant leur capacité de cellules souches (auto renouvellement) et en orientant les cellules de la niche vers la dédifférenciation (Yeh and al. 2016).

- La voie Sonic Hedgehog.

Hedgehog est une famille de voies constituée de Desert, Indian et Sonic Hedgehog. Cette dernière (Shh) joue un rôle pivot dans la régulation, l'auto renouvellement et la différenciation des CSC (Hou and al. 2015). Après fixation du ligand Shh, le facteur de transcription Gli migre vers le noyau et active les gènes cibles : Oct-4, SOX2 and NANOG. Leur surexpression constitue d'ailleurs un des marqueurs utilisés dans l'identification des CSC (Peacock and al. 2007).

Shh a également un rôle important dans la chimiorésistance, en régulant l'activité des pompes à efflux (faisant sortir l'élément toxique du cytoplasme de la cellule) et l'activité d'ALDH (cette substance permettra également de cibler les CSC comme nous le verrons plus loin) (Zhang and al. 2012) (Justilien and al. 2015).

Enfin, Shh a une action dans le pilotage des CAF (cancer associated fibroblast) qui sont l'un des éléments essentiels de la niche (ou TME) qui soutiennent les CSC et que nous étudierons plus tard.

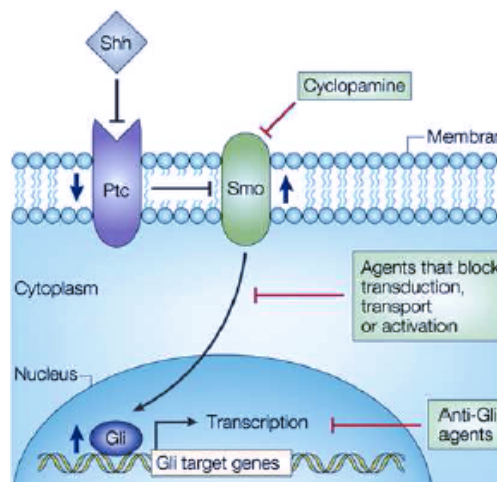


Figure 30 Altaba, Nat Rev Canc, 2002

Nous avons maintenant une idée de certains des mécanismes de communication inter cellulaires qui sous-tendent les caractéristiques et l'activité des CSC. Cette étape nous semblait utile afin de fournir le substrat nécessaire à la compréhension des caractéristiques des cellules souches cancéreuses, mais aussi à mieux appréhender les différentes méthodes de ciblage et d'identification de celles-ci.

Schématiquement, le rôle des différentes voies de signalisation dans le mécanisme des cellules souches peuvent être représentés sur la figure 20 :

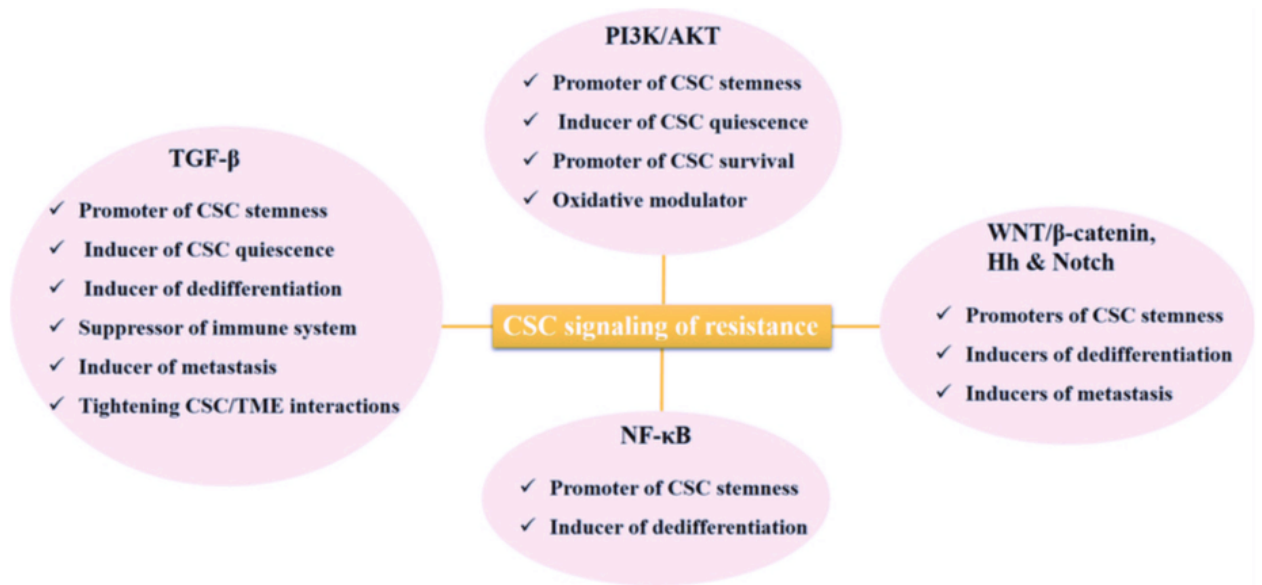


Figure 31 The diagram displaying contribution of multi-tasking signaling pathways to resistance of cancer stem cells (CSCs). Najafi et al. 2019

2. Enjeux et méthodologies des techniques de détection des cellules souches cancéreuses (csc) dans les cancers solides des VADS.

2.1. Enjeux diagnostiques et thérapeutiques.

Si les CSC suscitent autant d'intérêt, c'est parce qu'elles ouvrent la voie vers un nouveau paradigme quant au diagnostic, mais aussi à la prise en charge thérapeutique des cancers. Nous venons d'évoquer les caractéristiques de ces cellules et le rôle qu'elles jouent dans la pathologie. Pouvoir diagnostiquer leur présence ou non, déterminer leur densité et leur localisation serait essentiel pour prédire les suites probables d'une lésion. Être capable d'élaborer des molécules spécifiques pouvant s'y lier permettrait de rendre plus efficaces certains types de traitements et de limiter les récidives.

Voilà les grandes lignes des enjeux diagnostiques et thérapeutiques liés à l'identification et au ciblage des cellules souches, nous allons maintenant tenter d'étudier cette question plus avant.

2.1.1. Enjeux de dépistage, de diagnostic précoce et prédictif.

Dépistage :

L'un des piliers de la lutte contre le cancer en matière de santé publique est le dépistage. Les exemples du cancer du sein (Coleman 2017) montrent que l'examen systématisé des populations cibles (et non pas seulement à risque) permet de faire baisser significativement le nombre de décès. Pour autant, des problématiques de sur-diagnostic mais aussi de coût des politiques publiques poussent à réfléchir aux moyens d'optimiser les techniques de dépistage (Chetelen and al. 2016).

Qui suivre préférentiellement au sein d'une population, et à quelle fréquence ? Parce qu'elles constituent la sous population tumorale responsable de l'initiation et du développement de la tumeur, les CSC peuvent être le facteur clé d'une politique de dépistage efficace et ciblée du cancer en général, et des cancers des VADS en particulier. Leur présence au sein d'une lésion précancéreuse (Lichen plan par ex.) (Mortazavi and al. 2008) engendrerait alors un suivi à fréquence élevée, et un traitement précoce au moindre signe de malignité.

A contrario, leur absence déterminerait une lésion à faible pouvoir évolutif, espacerait les visites de contrôle, libérant ainsi des ressources financières et humaines pouvant être déployées plus utilement.

Diagnostic précoce :

Les cancers des VADS sont en général de diagnostic tardif (Ahar and al. 2018) ce qui explique en partie leur fort taux de mortalité (Johnson and al 2011). Plusieurs causes ont été identifiées dans ce retard diagnostic. Elles peuvent être classées selon 3 axes (Dwivedi and al. 2012) :

- Les causes primaires sont liées au temps que le patient va mettre avant de consulter. Elles dépendent notamment du niveau d'informations disponibles et assimilées par le patient (campagnes médiatiques de prévention) et de sa tendance à nier les symptômes et/ou à recourir à l'automédication.
- Les causes secondaires correspondent au délai entre le premier contact médical et le diagnostic établi. Le niveau de formation du praticien, les recommandations de bonnes pratiques en matière d'examen clinique systématique, et la facilité d'accès à ce professionnel constituent ici les principales variables. C'est également dans cette phase que se situe la notion de diagnostic précoce.
- Les causes tertiaires reposent sur le délai entre le diagnostic et le début du traitement et sont impactées par les facilités d'accès aux praticiens spécialisés et aux techniques adaptées.

La notion de diagnostic précoce des cancers des VADS nécessite donc des moyens médiatiques à destination des patients, une orientation pédagogique des professionnels en formation initiale et continue, mais aussi des outils diagnostiques. Pouvoir identifier au sein d'une lésion débutante, d'apparence bénigne et ne présentant pas encore les caractéristiques d'un carcinome épidermoïde (bords relevés et déchiquetés, fond végétant associant lésions rouges et blanches etc.) la présence de CSC permettrait de raccourcir considérablement les délais dits secondaires et pouvoir recourir plus souvent à des chirurgies premières par exemple.

Diagnostic prédictif :

Le diagnostic prédictif peut s'entendre selon plusieurs sens : prédire le risque d'invasion des tissus avoisinant et/ou à distance, ou anticiper le risque de récurrence du cancer.

Au sein des cancers des VADS, les carcinomes épidermoïdes présentent des facultés d'invasion et de récurrences très élevées. Nous avons vu que les CSC tenaient une place essentielle dans ces deux phénomènes.

A l'heure actuelle, une biopsie suivie d'une cytométrie en flux et une culture de sphéroïde permet de valider la présence de cellules souches au sein d'une lésion, mais elle repose sur des phénomènes de culture cellulaire qui rendent difficile l'estimation de la proportion initiale de CSC au sein de la tumeur. Certains des marqueurs utilisables lors d'examen d'anatomopathologie ou de cytométrie en flux peuvent également orienter vers leur niveau de présence mais nous verrons plus loin qu'il n'existe à l'heure actuelle pas de marqueur **spécifique** des CSC.

D'autre part, la limitation spatiale de l'aire de la biopsie peut constituer un biais aboutissant à des faux négatifs. En effet, les tumeurs étant hétérogènes, une étude a montré que toutes les mutations et types cellulaires ne sont pas représentés dans certaines aires de la tumeur (Gerlinger and al. 2012).

D'autres méthodes émergent actuellement, notamment la biopsie liquide, qui consiste à recueillir au sein des fluides corporels de l'ADN de tumeur circulant, de le quantifier et le caractériser (Bellairs and al. 2017). La recherche et l'identification de gènes surexprimés au sein des CSC (Oct-4, SOX2, NANOG par ex.) rend envisageable l'utilisation de ces techniques pour diagnostiquer leur présence mais ne permet pas de déterminer leur localisation.

Il n'existe donc pour l'instant aucune technique totalement satisfaisante permettant de répondre aux enjeux de ciblage et d'identification des CSC dans les cancers des VADS. Nous verrons plus loin que la méthode de marquage spécifique des CSC aux lectines semble prometteuse et a déjà été validée pour les cancers colorectaux (Peiris and al. 2015) ou du sein par exemple (Zhou and al. 2015).

2.1.2. Enjeux thérapeutiques :

Identifier de manière précoce et précise la présence de CSC est certes la condition sine qua non afin d'améliorer le taux de survie très faible des cancers de VADS en général et des carcinomes épidermoïdes en particulier. Mais encore faut-il pouvoir mettre en place des stratégies thérapeutiques adaptées. Nous avons en effet montré précédemment que les CSC présentent des fortes capacités de résistance et d'échappement aux traitements conventionnels (Chimio et radiothérapie).

Dans ce contexte, seule la faisabilité d'une chirurgie première pourrait significativement être facilitée par un diagnostic précoce (voire un dépistage) : les tissus, moins infiltrés, la rendrait moins délabrante dans des localisations anatomiques abritant souvent des structures vitales.

Le principal enjeu thérapeutique nous semble donc être de **pouvoir associer une méthode de ciblage spécifique des CSC avec l'immunothérapie ou la thérapie génique.**

Les différents enjeux liés au marquage spécifique des CSC étant posés, nous allons maintenant étudier les méthodes actuelles d'identification (techniques, marqueurs utilisés etc.) avant de mettre en lumière leurs limites.

2.2. Les méthodes actuelles d'identification des cellules souches cancéreuses

L'identification des CSC s'inscrit plus globalement dans le processus d'analyse anatomopathologique lié à la découverte ou l'exérèse d'une tumeur cancéreuse. Cet examen poursuit un triple objectif⁹:

- classer la tumeur ;
- définir son agressivité ;
- choisir le traitement le plus adapté.

Traditionnellement dans la sphère orale, le prélèvement des cellules a lieu au cours d'une microbiopsie à l'emporte-pièce lors d'une découverte/investigation. Lorsque la biopsie a lieu au cours d'une intervention, on parle de biopsie incisionnelle ou chirurgicale.

Lorsqu'elle est possible (prélèvement de l'intégralité de la tumeur), une première analyse macroscopique est réalisée par l'anatomopathologiste et vise à recueillir un maximum d'éléments (localisation, taille, présence de nécrose etc.).

Vient ensuite le temps de la préparation de la pièce anatomique en vue des analyses ultérieures. La technique de préparation dépend de la méthode d'identification des CSC prévue, comme nous allons le voir.

2.2.1. Les techniques d'identification des CSC.

a. Immunohistochimie.

Après prélèvement, et en vue d'analyse par immunohistochimie, la pièce anatomique peut être congelée ou traitée au formol et fixée à l'aide de paraffine, vient ensuite la coupe et mise sur lame. La congélation présente l'intérêt de limiter les risques d'altération ou de masquage des antigènes observés lors de la mise en coupe de paraffine (Pluot and al. 2006).

⁹ « L'analyse anatomo-pathologique | Info Sarcomes ». <http://www.infosarcomes.org/lanalyse-anatomo-pathologique>.

Une fois les coupes effectuées, l'analyse peut débuter. « L'immunohistochimie est une méthode morphologique permettant de localiser des antigènes dans les tissus ou les cellules, par des anticorps (immunoglobulines) dirigés de façon spécifique contre ces antigènes, et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré » Pluot et al. 2006.

A travers cette définition, et compte tenu de ce que nous avons jusqu'à présent pu exposer sur les CSC, on comprend toute l'importance qu'il y a à disposer de marqueurs spécifiques des cellules souches cancéreuses. Nous passerons en revue les marqueurs utilisés actuellement un peu plus loin dans notre travail.

Il existe deux types de techniques en immunohistochimie :

- Technique directe.

Elle est plutôt utilisée sur pièce congelée et consiste à introduire un anticorps directement porteur du fluorochrome.

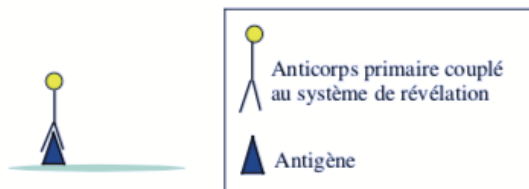


Figure 32 Pluot et al. 2006

- Technique indirecte

En général, cette technique est utilisée sur coupe de paraffine. On introduit un anticorps A ciblant l'antigène, puis un anticorps B porteur du fluorochrome et ciblant l'anticorps A.

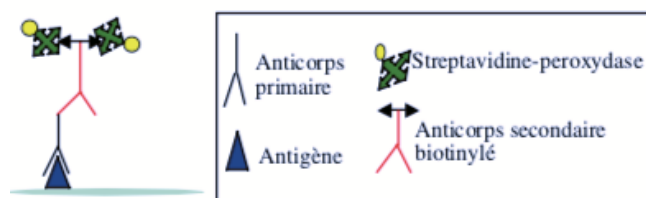


Figure 33 Pluot et al. 2006

Dans les deux cas, lorsque l'antigène est présent au sein de la pièce à analyser, les anticorps s'y fixent et modifie localement la coloration de l'échantillon visible sous microscope.

b. Cytométrie en flux.

La cytométrie en flux (ou analyse FACS pour Fluorescence Activated Cell Sorting) est une technique d'identification et de tri des cellules en suspension. Elle intervient après prélèvement de tout ou partie de la tumeur.

Après découpe et digestion enzymatique (Kim and al. 2016), la suspension cellulaire est mise en contact avec des immunoglobulines couplées avec des marqueurs fluorescents excitables à différentes longueurs d'ondes émises par un laser. Les anticorps ciblent en général des antigènes de surface, mais des séquences d'ADN ou d'ARN peuvent également être visées.

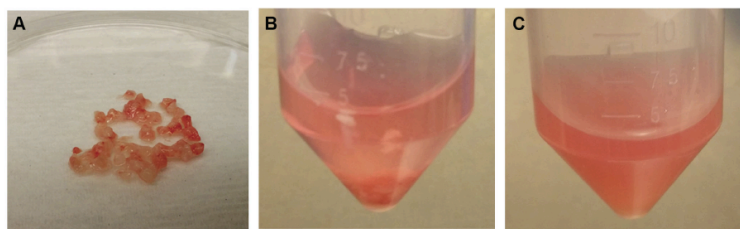


Figure 34 Kim et al. 2017 : étapes de digestion. A : découpe de la tumeur en petits fragments. B : Mise en suspension avant digestion. C : après digestion enzymatique

Plusieurs rayonnements de longueur d'onde peuvent être captés simultanément¹⁰ ce qui permet de trier les cellules sur la base de la présence de plusieurs marqueurs membranaires (cet élément aura son importance lorsque nous aborderons les marqueurs utilisés dans les cancers des VADS).

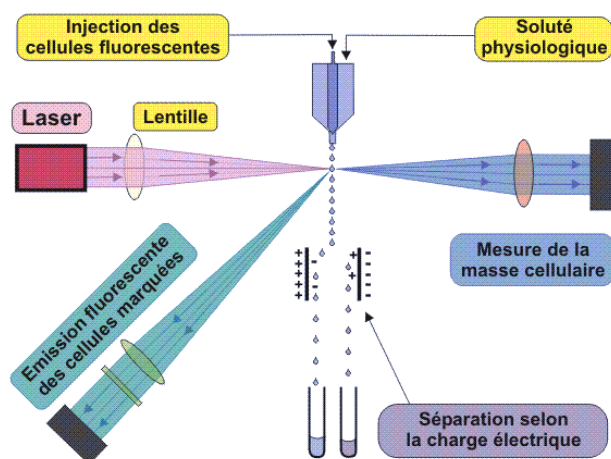


Figure 35 « Principe de la cytométrie de flux ». <https://www.oncoprof.net>

¹⁰ « Qu'est-ce que la cytométrie de flux (analyse FACS) ? ». <https://www.anticorps-enligne.fr/resources/17/1247/qu-est-ce-que-la-cytometrie-de-flux-analyse-facs/>.

Sur la figure 35, la mesure de la masse cellulaire s'effectue grâce à la lumière diffusée par l'ensemble des cellules.

A l'issue de cette analyse optique, on dispose d'un graphique à points permettant de trier les cellules selon des combinaisons d'antigènes comme le montre la figure 36 pour les marqueurs des CSC des carcinomes épidermoïdes de la sphère orale (utilisation ici de la combinaison de marqueurs ALDH1 et CD44).

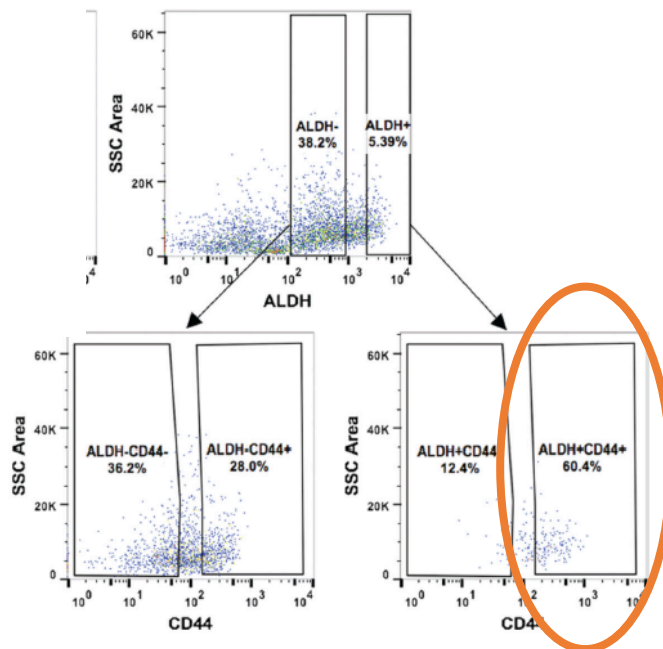


Figure 36 Kim et al. 2017

La zone cerclée sur la figure 35 représente la fraction cellulaire porteuse simultanément de deux des marqueurs des CSC, et donc de phénotype CD44+ ALDH+.

c. Culture sphéroïde.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les récentes études ont démontré le caractère hétérogène des tumeurs en termes de composition cellulaire, avec notamment des cellules souches cancéreuses soutenant l'initiation, la prolifération et la résistance au traitement de la lésion, et d'autres cellules constituant le microenvironnement tumoral (MET).

Au sein de cette architecture en 3D existent des gradients de nutriment, d'O₂, et plus globalement de molécules chimiques. Les modèles d'études ont donc dû évoluer afin de

reproduire au mieux ces caractéristiques et ainsi rendre les expérimentations *in vitro* plus fiables (Larsen 2018).

Les modèles 2D de culture ont ainsi été supplantés par de cultures sur matrices autorisant des croissances cellulaires en 3 dimensions (Matrigel) (Edmondson and al. 2014). C'est pour cette raison que l'on parle de culture sphéroïde. Les applications de ces cultures peuvent concerner différents types cellulaires (cellules embryonnaires, cellules souches etc.).

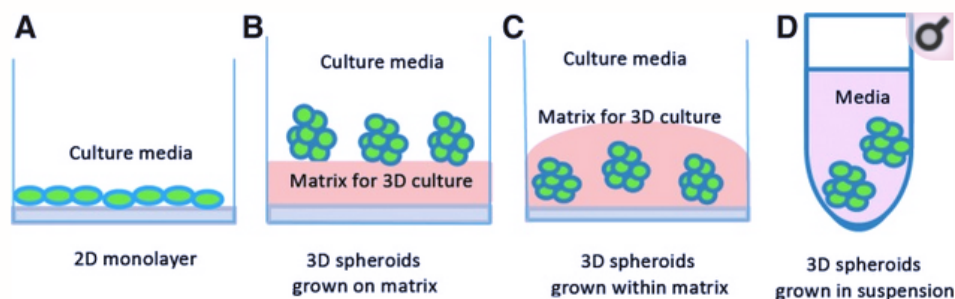


Figure 37 Edmondson et al. A: Culture cellulaire sur matrice 2D, et les 3 principaux types de cultures 3D, B C et D

S'agissant des modèles tumoraux, la classification la plus établie (Weiswald and al. 2015) propose 4 catégories de cultures 3D :

- Modèles de sphéroïdes multicellulaires
- Tumorosphères
- Sphéroïdes dérivés de tissus tumoraux
- Sphéroïdes multicellulaires organotypiques

L'étude des cellules souches cancéreuses se fait principalement sur les modèles de type tumorosphères. Ces cultures « correspondent à des agrégats de suspensions cellulaires flottant dans le milieu de culture et issues de tumeurs solides qui ont subi une dissociation cellulaire mécanique et enzymatique, de manière à isoler des cellules uniques à l'origine de chaque neurosphère et donc clonales. » (Larsen 2018).

Les cultures sphéroïdes sont utilisées comme moyen d'étude des CSC dans les cancers des VADS (Hagemann and al. 2018), notamment pour valider leurs marqueurs : après la cytométrie en flux utilisant des anticorps (anti CD133, CD44 etc.) les cellules isolées et censées être des

CSC sont cultivées sur Matrigel. **Seules les CSC ont alors la capacité de recréer une tumeur 3D hétérogène** du fait de leur faculté caractéristique à opérer des divisions asymétriques.

Les différentes techniques d'identifications des CSC des cancers des VADS reposent donc sur l'existence de marqueurs fiables. Pour autant il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur spécifique des CSC dans les cancers des VADS, c'est la raison pour laquelle **les chercheurs tentent d'établir des phénotypes reposant sur la présence simultanée de plusieurs marqueurs.**

2.2.2. Les principaux marqueurs aspécifiques utilisés pour les CSC des cancers des VADS.

La recherche de biomarqueurs des CSC des cancers des VADS repose sur la connaissance des particularités de ces dernières, et de leur micro-environnement. Nous avons ainsi, à dessein, mentionné précédemment les caractéristiques du micro-environnement tumoral (MET), les voies de signalisation, les molécules de surface etc.

Au total, il existe 7 grands axes de travail s'agissant des biomarqueurs des CSC qui sont synthétisés dans la figure 38 ci-après :

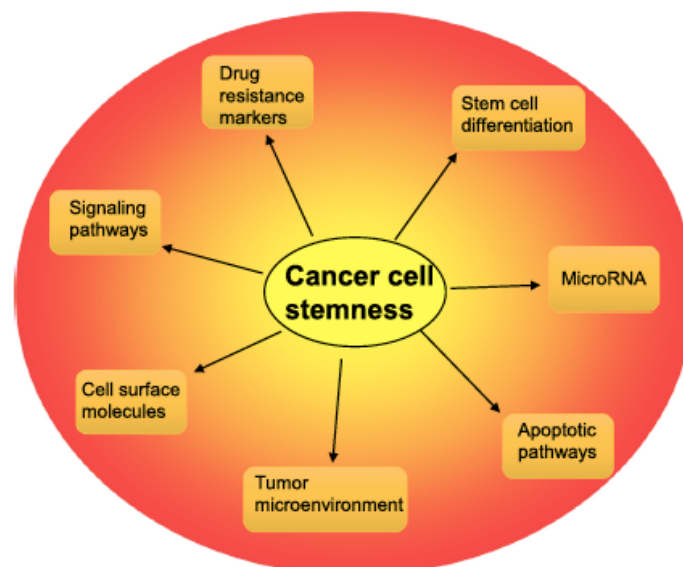


Figure 38 Therapeutic targets of cancer stem cells for the treatment of cancer, Najafi et al. 2019.

Les différents **biomarqueurs** connus pour les CSC en général sont synthétisés dans la figure 39 :

Targets	Biomarkers
Tumor Microenvironment	Hypoxia, glycoproteins, proteoglycans, laminin alpha polysaccharides, hyaluronan synthase, 2, NK cells, T-regulatory cells
Cell surface markers	CD133, CD13, CD24, CD90, CD166, CD44, MyD88, ALDH1A1, ESA
Stem cell differentiation	CD133, CD90, BMPRI, BMPR2, HNF4A, neuropilin-1 receptor, HDAC
Signaling pathways	JAK, STAT, MAPK, mTOR, HIFs, cytokines, Wnt, R-spondin 2, c-Myc, c-Met, AXIN2, MMP9, MMP7, CSC markers LGR4-6, Nestin, SOX2, Oct-4, SOX2, NANOG, β -catenin, GSK-3 β , Notch, JAG, TACE, ADAM17, sonic hedgehog, PTCH1, SMO, PI3K, Akt
Apoptotic pathway	Death receptors, cFLIP, Bcl2, ATM, ATR, Chk1, Chk2, MOMP, caspases
Drug resistance	ABC transporters, hypoxia, ROS, EMT, P-gp, MRP, BCRP, BCR, ABL, ZEB1/2, SNAIL, SLUG, TWIST1/2, PRRX1, FOXC2
MicroRNA	miR-9, miR-16, miR-17, miR-20, miR-34a/b, miR-107, miR-152, miR-122, miR-181, miR-196, miR-200c, miR-215, miR-218, miR-301, miR-320, miR-328, miR-451, miR-452

Figure 39 Biomarkers linked to the targets of cancer cell stemness. Prasad et al. 2019

Les **biomarqueurs membranaires** des CSC sont quant à eux présentés dans le tableau ci-après :

Tumor type	Cancer stem cell markers
Lung cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , ABCG2, ALDH, CD87 ⁺ , SP, CD90 ⁺
Colon cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , CD166 ⁺ , EpCAM ⁺ , ALDH, ESA
Liver cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD49f ⁺ , CD90 ⁺ , ALDH, ABCG2, CD24 ⁺ , ESA
Breast cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁻ , EpCAM ⁺ , ALDH-1
Gastric cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁺
Leukemia (AML)	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD123 ⁺
Prostate cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , α 2 β 1, ABCG2, ALDH
Pancreatic cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ABCG2, ALDH, EpCAM ⁺ , ESA
Melanoma	ABCB5 ⁺ , CD20 ⁺
Head and neck cancer	SSEA-1 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺

Figure 40 Cancer stem cell markers in human, Phi and al. 2018.

En l'état actuel, **les biomarqueurs les plus utilisés dans les cancers des VADS sont ceux de la surface membranaire** (Méry 2016). Certains marqueurs enzymatiques peuvent également être ciblés. CD44 et CD133 semblent être les marqueurs membranaires les plus utilisés (Birckland and al. 2015) (Phi and al 2018), alors que ALDH1, enzyme cytoplasmique, constitue d'après Chin and al. (2009) un marqueur intra cellulaire de premier plan.

Nous nous proposons de présenter brièvement ceux qui semblent être les plus fiables, et **les combinaisons aboutissant à un maximum de spécificité** dans les cancers des VADS.

a. CD44.

La glycoprotéine de surface CD44 est un récepteur de l'acide hyaluronique (Marcu and al. 2018) capable d'interagir avec le collagène et les métalloprotéases matricielles (MMP). Elle joue un rôle, de manière physiologique dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire (Mery 2016). Dans de nombreux cancers (Orian-Rousseau 2003) tout comme dans ceux des VADS, la surexpression de CD44 est associée à une hausse des capacités d'invasion, de métastase et de résistance aux traitements (Yüce and al).

La première étude ayant identifié CD44 comme marqueur membranaire des CSC des carcinomes épidermoïdes de la sphère orale date de 2007 (Prince and al. 2007). Après isolement via cytométrie en flux et réinjection sur modèles de souris immunodéficientes, Prince et al. ont démontré que les cellules CD44+ étaient capable de recréer des tumeurs hétérogènes.

Ces résultats ont depuis été confirmés à maintes reprises (Mack and Gires 2008), et des combinaisons de CD44+ et CD24- (autre molécule impliquée dans les phénomènes d'adhésion) ont pu démontrer une plus grande sensibilité à la présence de CSC des carcinomes épidermoïdes (Han and al. 2014).

Le couple CD44+ et CD24- a également été combiné avec BMI-1 qui est un gène dont la surexpression est liée à l'activité carcinogène. **Le phénotype CD44+ / CD24- et BMI-1+ semble être hautement spécifique des CSC de carcinomes épidermoïdes oraux.**

b. ALDH1.

Nous avons déjà présenté l'enzyme ALDH dont l'expression est liée notamment aux voies Wnt et Shh. Cette enzyme cytoplasmique joue un rôle physiologique au sein des cellules souches « classiques » en oxydant le rétinol en acide rétinoïque. Ce dernier a une action de contrôle important des phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire.

Au sein des CSC, la surexpression d'ALDH1 augmente la chimiorésistance comme nous l'avons évoqué, et soutient la tumorigénicité (Chen et al. 2009) notamment via l'activation de l'EMT (epithelial to mesenchymal transition).

Chen et al. (2009) présentent ALDH1 comme le marqueur le plus spécifique des CSC des carcinomes épidermoïdes oraux. Pour autant, la combinaison avec CD44⁺ et CD24⁻ est présentée comme plus sensible par d'autres études plus récentes (Krishnamurthy et al. 2010).

c. CD133.

CD133 est une protéine transmembranaire naturellement présente chez beaucoup de types de cellules souches, telle que les CS hématopoïétiques ou endothéliales. Elle semble liée aux phénomènes de protrusions cellulaires (Chinn et al. 2012).

La surexpression de CD133 au sein des CSC est négativement liée au taux de survie (Chen et al. 2011) et les CSC CD133⁺ semblent de plus posséder un potentiel invasif et une chimiorésistance plus élevées (Méry 2016). L'identification du phénotype CD133 est utilisée également afin de mettre en évidence la radiorésistance (Piao et al. 2012).

Comme pour les deux marqueurs précédemment décrits, des combinaisons avec CD44 (Wang et al. 2017) et ALDH1 permettent d'augmenter la qualité du ciblage des CSC des cancers des VADS en général, et des carcinomes épidermoïdes en particulier.

2.2.3. Les limites de ces techniques.

A ce stade, nous disposons d'une vision globale des techniques utilisées pour identifier les CSC des cancers solides des VADS. Qu'il s'agisse de la cytométrie en flux ou de l'immunohistochimie, la sensibilité de l'identification est liée au niveau de spécificité du marqueur ou de la combinaison de marqueurs.

Nous avons présenté les principaux marqueurs utilisés pour les VADS, il ressort **qu'aucun d'entre eux ne peut être considéré comme spécifique**. Dès 2012, une étude remettait ainsi en question la spécificité des marqueurs cités plus haut, seuls tel que CD133 (Shmelkov and al. 2008) ou combinés tels que CD44 et CD24 (Murano and al.2012).

D'autre part, la nécessité de combiner plusieurs marqueurs, cytoplasmiques, nucléaires et ou membranaires rend plus difficile une application thérapeutique ciblée de type immunothérapie.

Enfin, puisque les techniques actuelles reposent sur des marqueurs aspécifiques, elles nécessitent afin de valider définitivement la présence de CSC une étape de culture sphéroïde qui allonge le temps de diagnostic.

Ces différents points mettent en lumière l'importance de poursuivre les recherches visant à mettre au point, pour chaque type de cancer, des marqueurs spécifiques. De récentes découvertes sur les lectines (protéines ubiquitaires capable reconnaître et fixer sélectivement des motifs glycosylés) en tant que marqueurs spécifiques de CSC du cancer colorectal laissent entrevoir d'autres applications, y compris pour les CSC des cancers des VADS.

3. La méthode de marquage aux lectines.

3.1. Caractéristiques des lectines.

Les lectines sont des protéines présentes dans l'ensemble du règne du vivant, elles sont notamment impliquées dans de nombreux phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaires. Lis et Sharon définissent en 1988 les lectines ainsi :

« Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire capables de reconnaître des glucides complexes de manière spécifique et réversible. Ces protéines ne montrent aucune activité enzymatique vis-à-vis de leur ligand. »

Dans sa thèse de Biologie structurale et nano biologie¹¹ présentée en 1988, Karoline SABÓIA ARAGÃO remonte aux sources de la découverte des lectines. Elle précise que « la première lectine aurait été découverte par Peter Hermann Silltmark en 1888 qui décrit dans sa thèse de doctorat présentée à l'université de Dorpat (maintenant Tartu, Estonie) que des extraits de graines de ricin (*Ricinus communis*) agglutinaient sélectivement des érythrocytes humains d'un groupe donné ». C'est de cette **sélectivité** que découle leur nom, *legere* signifiant en latin sélectionner.

L'autre caractéristique, la **capacité à agglutiner**, repose sur l'existence de plusieurs sites de liaison aux glucides pour une même lectine. Grâce à cette faculté, il est également possible de déterminer leur spectre de spécificité. En effet, la perte de la capacité d'héماغlutination d'une lectine peut être observé lors de l'ajout de certains sucres ce qui permet de définir leur spectre de sélectivité (Van Damme, et al. 1998).

Compte-tenu de leurs caractéristiques, les lectines jouent un rôle important dans les activités de recherche et de diagnostic biomédical :

- utilisation pour l'identification et la purification de composés glyco-conjugués ;
- identification des groupes sanguins ;
- marquage des cellules cancéreuses.

¹¹ Aragão, Karoline Saboia. « Etudes structure-fonction de lectines (Discl et DiscII) de *Dictyostelium discoideum* », s. d., 135.

Ce dernier point repose sur la découverte de modifications de glycosylation à la surface des cellules cancéreuses. Nous développerons cet élément dans le chapitre suivant, mais Guillot et al. ont montré en 2004 que :

« ... la transformation tumorale est associée à des modifications de structure des résidus glycaniques appartenant aux glycoprotéines et aux glycolipides présents à la surface cellulaire. Ces glycosylations aberrantes, qui ont leur origine dans un dysfonctionnement des glycosyltransférases et/ou des glycosidases, se traduisent le plus souvent par un raccourcissement des chaînes glycaniques ou par une surexpression de structures normalement absentes ou discrètes sur les cellules concernées. »

Leurs recherches ont permis d'identifier un certain nombre de glycanes associés au cancer :

Non de l'antigène	Séquence glycanique
Tn	GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Tn	SA α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
T	Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr
Sialyl-Le α	SA α 1-3Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal- α 1-4 Fuc
Le x	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Sialyl- Le x	SA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal- α 1-3 Fuc
Le y	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal α 1-2 α 1-3 Fuc Fuc
N-acétyllactosamine	Gal β 1-4GlcNAc
Séquence β 1-6-branchée	GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β - (oligosaccharides N-liés)

Figure 41 Principaux glycanes associés au cancer selon Guillot, et al. 2004

D'autre part, grâce notamment aux phénomènes d'inhibition de l'agglutination, Guillot, et al. (2004) ont pu isoler des lectines sélectives des glycanes associés au cancer (figure 40).

Lectines	Source	Sucre inhibiteur
LEA	<i>Lycopersicum esculentum</i>	D-GlcNAc
PWL	<i>Phytolacca americana</i>	D-GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare (wheat germ)</i>	D-GlcNAc
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	D-GlcNAc
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β -
GSI-B4	<i>Griffonia (Bandeira) simplicifolia</i>	D-Gal
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	D-Gal
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	D-GalNAc
LBL	<i>Phaseolus lunatus (Lima bean)</i>	D-GalNAc
RCA-1	<i>Ricinus communis</i>	D-GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	D-GalNAc
HAA	<i>Helix aspersa</i>	D-GalNAc
HPA	<i>Helix pomatia</i>	D-GalNAc
VVA-B4	<i>Vicia villosa</i>	D-GalNAc
WFA	<i>Wistaria floribunda</i>	D-GalNAc
ECA	<i>Erythrina crista-galli</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
PSL	<i>Laetiporus sulfureus</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
GSI-A4	<i>Griffonia (Bandeira) simplicifolia</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
ABL	<i>Agaricus bisporus</i>	D-Gal β 1-3GalNAc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
JAC	<i>Artocarpus integrifolia</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
LDL	<i>Lactarius deliciosus</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
VGA	<i>Vicia graminea</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
EEA	<i>Euonymus europaeus</i>	D-Gal α 1-3(L-Fuc α 1-2)D-Gal β 1-3/4D-GlcNAc

Figure 42 Lectines utilisées dans le marquage de glycanes en oncologie selon Guillot, et al. 2004

En prenant en considération les éléments que nous venons d'exposer, nous commençons à percevoir l'intérêt que pourraient avoir les lectines dans l'éventuel marquage des CSC au sein des phénomènes tumoraux. Avant d'aller plus loin, il nous semble utile de comprendre les phénomènes qui lient la cancérisation et les modifications de glycosylation.

3.2. Cancer et modification de glycosylation.

La glycosylation est un processus complexe de modification post transcriptionnelle des protéines. Environ 1% du génome humain est mobilisé lors de cette étape (Lowe et Marth 2003), aboutissant à la glycosylation de plus de la moitié des protéines synthétisées. Cette modification post transcriptionnelle est impliquée de manière physiologique notamment dans les phénomènes de reconnaissance de communication et d'adhésion cellulaire (Varki 2017).

Elle est le reflet de la disponibilité des précurseurs (monosaccharides et autres) et de l'activité enzymatique liée aux glycotransférases et glycosidases au sein du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Deux grands mécanismes de glycosylation existent : la N-Glycosylation et la O-Glycosylation (Nardy et al. 2016).

- Dans la N-glycosylation, l'atome d'azote de l'asparagine est connecté au radical N-Acétylglucosamine (GlcNAc).
- Dans la O-Glycosylation, l'atome d'oxygène de la sérine ou de la thréonine est connecté au radical N-Acétalgalactosamine (GalNAc).

Les glucopeptides Asn-GlcNAc ou Ser/Thr-GalNAc sont ensuite allongés par l'activité de la glycotransférase :

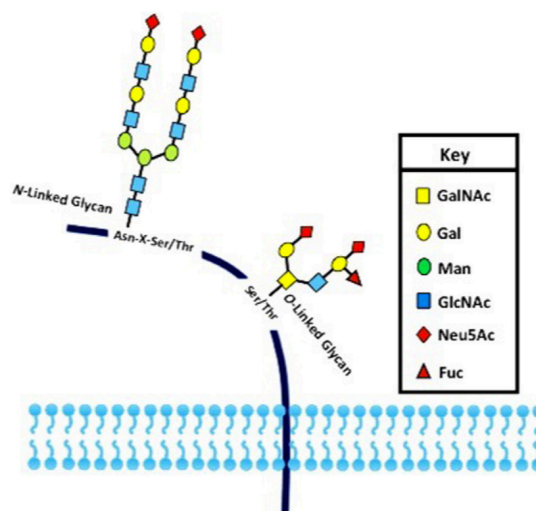


Figure 43 Les deux principaux types de glycosylation (Nardy et al. 2016)

De manière pathologique, la glycosylation peut être altérée par modification, sous expression ou troncation lors de l'élongation.

En particulier la O-glycosylation peut être stoppée par incorporation prématurée d'acide sialique (Tuccillo et al. 2014). Malgré la grande variabilité de modifications possible, **seules quelques-unes des modifications semblent être observées dans les phénomènes cancéreux.**

Elles s'accompagnent comme nous l'évoquons plus haut, de variations d'activité enzymatique (transférases principalement) :

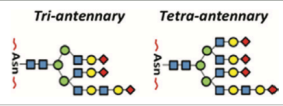



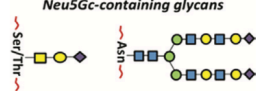

Glycan type	Glycan structure	Enzyme	Immunobiological effect	Reference
N-linked glycan		<p>↑ β1,6 GlcNAc-T (MGAT5)</p>	Helping the growth of cancer cells through inactivation of CD4 ⁺ T cells and macrophage	Li and al. 2008
O-linked glycan		<p>↓ β1,4 Gal-T ↓ COSMC</p>	Enhancing the production of anti-inflammatory cytokines; inducing a tolerogenic phenotype innate and adaptive immune cells	Takamiya and al. 2013 Carascal and al. 2014
N-linked glycan O-linked glycan		<p>↑ α 1,3 Fuc-T III</p>	Potentiating cancer metastasis; leading to lung tumor formation or rejection by NK cells	Kannagi and al. 2004 Ohyama and al. 1999
N-linked glycan O-linked glycan		<p>N-glycan ↑ β1,6 GlcNAc-T O-glycan ↑ Core 2GnT</p>	Resistance against NK cell attack, promoting tumor metastasis	Tsuboi and al. 2012 Okamoto and al. 2013
N-linked glycan O-linked glycan		<p>Neu5Gc is not synthesized in humans, it is incorporated into human tissues from dietary sources. Different sialyltransferases can use Neu5Gc as substrate</p>	Neu5Gc-containing glycans are recognized as foreign antigens by the immune system and induce chronic inflammation	Samraj and al. 2014 Samraj and al. 2015
Key				

Figure 44 Modifications de glycosylation associées aux processus cancéreux (Nardy et al. 2016)

La figure 44 et les études citées en référence illustrent le lien observé entre les modifications des glycopeptides et certaines altération générales du fonctionnement de l'immunité. De manière plus précise, d'autres études montrent que les altérations de glycosylation dans les cancers des VADS (Vajaria et al. 2018) sont liées à la progression de la tumeur.

Elles semblent conférer certaines capacités propres au cellules souches cancéreuses que nous avons précédemment détaillées, et interagissent avec des voies de communications centrales telles que Notch et MAPK. Nous allons maintenant étudier ces phénomènes.

3.3. Cellules souches et modifications de glycosylation.

Les relations entre les modifications de glycosylations et le cancer ont été mises en évidence il y a déjà plus de 60 ans (Ladenson et al. 1949). La découverte et l'étude du rôle particulier que semblent jouer les CSC dans les processus tumoraux amènent nécessairement à se pencher sur la question d'éventuelles variations de glycosylations propres à celles-ci. Cette possibilité ouvrirait alors la porte à un marquage spécifique des CSC par les lectines. Nous allons maintenant succinctement essayer de montrer que certaines des caractéristiques attribuées spécifiquement au CSC semblent aller de pair avec des modifications de glycosylation identifiables.

3.3.1. Échappement au système immunitaire et glycosylation.

La structure tridimensionnelle des glycoprotéines et donc l'accessibilité à ses différents sites antigéniques ou enzymatiques est dépendante en partie des charges portées par les sucres. Par conséquent, toute modification de glycosylation est susceptible d'altérer cette structure et les fonctions qui y sont liées.

Certains antigènes peuvent par exemple être masqués du fait du repliement de la structure et ainsi ne plus être accessibles aux cellules présentatrices d'antigènes. (Tsuboi et al. 2012). Les études montrent également une relation directe entre l'activité des cellules NK et la glycosylation.

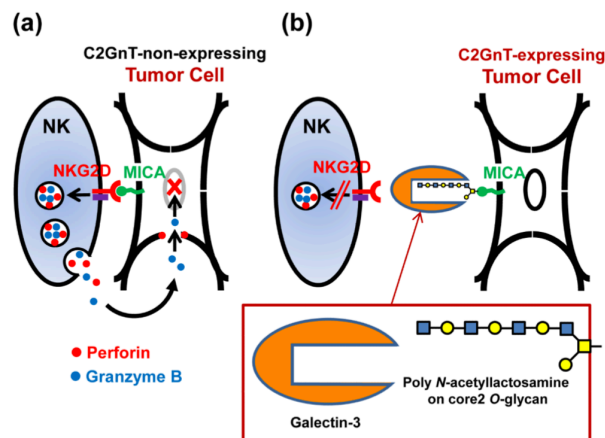


Figure 45 Activité des cellules NK et glycosylation (Tsuboi et al. 2012)

Le récepteur cellulaire du NK (le KKG2D) joue un rôle essentiel dans l'élimination des cellules tumorales en interagissant avec le ligand présent à la surface de ces dernières, le MHC Class I-related chain A (MICA) et en libérant des substances apoptotiques telles que la granzyme B et la perforine. Or la structure à O-glycosylation altérée Core2 crée une interaction avec la galectine qui rend inactif le site MICA. Daniotti et al. (2016) décrivent d'autres inhibitions de récepteurs NK tels que Siglec-7 et Siglec-9.

Beaucoup de phénomènes visant à moduler l'activité l'immunité existent. Ils reposent sur des interactions avec les cellules de l'immunité innée (Monocytes, macrophages, cellules dendritiques) présentatrices d'antigènes, et avec les médiateurs de l'inflammation recrutant les cellules de l'immunité adaptative, ou avec ces dernières directement. Ils font appel à des glycosylations modifiées de protéines de surface, mais également à des glycosylations modifiées des protéines libérées dans le microenvironnement tumoral (MET) que nous avons décrit précédemment).

L'ensemble de la réponse immunitaire serait ainsi impacté par les modifications de glycosylation comme le résume la figure 46.

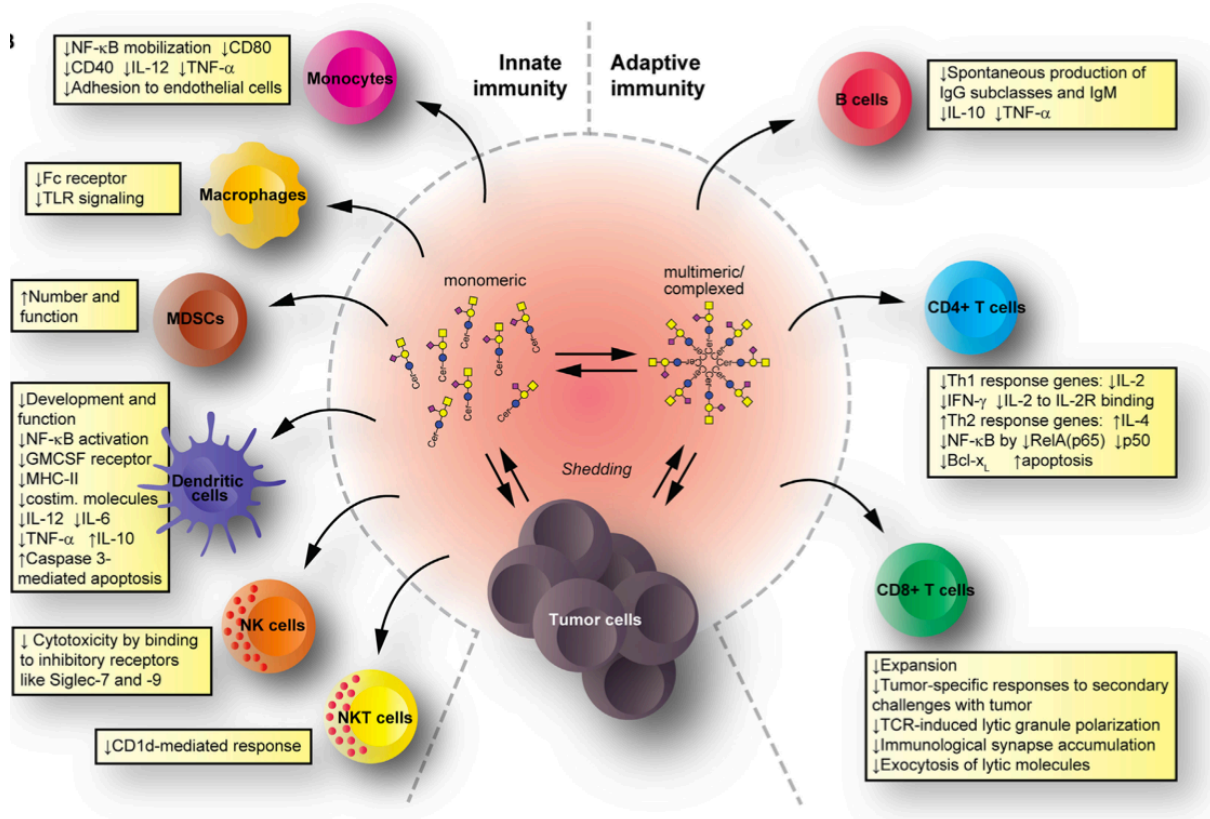


Figure 46 Synthèse des actions immunomodulatrices liées à la glycosylation (Daniotti et al. 2016)

Au-delà de ces effets immuno-modulateurs, les modifications de glycosylation semblent conférer de nouvelles capacités aux cellules qui les portent. En particulier pour le carcinome épidermoïde, la capacité de métastaser reposant sur le phénomène de Epithelial to Mesenchymal Transition que nous avons développé précédemment semble être liée aux mécanismes de glycosylation.

3.3.2. Promotion de l'EMT et glycosylation.

Le caractère agressif et invasif des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou est lié à l'EMT et aux capacités métastatiques. La glycosylation des protéines intervenant dans les phénomènes d'adhésion cellulaire il est à priori normal qu'elle intervienne ici, en ce qu'elle favorise « l'extraction » des cellules tumorales de leur environnement afin de migrer dans les tissus avoisinants. Il est cependant plus surprenant que celle-ci contribue à l'acquisition d'un nouveau phénotype. La plupart des éléments soutenant l'EMT reposent sur des activations de voies de signalisation extracellulaire.

La biodisponibilité des récepteurs, leur conformation en trois dimensions et donc leur structure de glycosylation est importante. La glycosylation est donc un des éléments clés de l'activation des facteurs transcriptionnels que nous avons étudiés dans l'EMT tels que TWIST et SNAIL.

D'autre part, certains facteurs de transcription peuvent eux-mêmes faire l'objet d'une glycosylation qui modifie leur activité. Par exemple, SNAI1 (famille SNAIL) peut soit être phosphorylé ce qui permet sa dégradation, soit O-Glycosylé (notamment en conditions hyperglycémiques) ce qui favorise l'expression des gènes liés à l'EMT (Taparra et al. 2016).

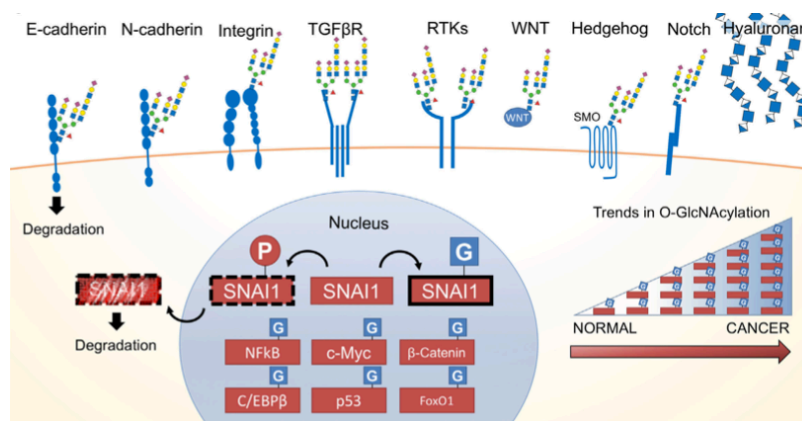


Figure 47 Cibles glycosylées de l'EMT (Taparra et al. 2016)

Enfin, nous avons déjà mentionné le rôle important que joue la cadhérine E dans le phénotype épithélial. La baisse de son expression membranaire est même un des facteurs traduisant l'EMT chez les cellules épithéliales car elle traduit la perte de la capacité d'adhésion cellule-cellule.

Or, les modifications de glycosylation de la cadhérine-E peuvent intervenir lorsque l'activité de la transférase Gnt-III est supplantée par celle de la Gnt-V aboutissant à une cadhérine-E non fonctionnelle (Fonseca et al. 2016).

3.3.3. Modification de l'activité des voies de signalisation et glycosylation.

La galectine 3 est une protéine de type lectine, se liant aux bêtas galactosides. Il s'agit donc d'une glycoprotéine. Habituellement intra cytoplasmique ou intra nucléaire, elle peut être surproduite sous l'impulsion de NFkB et sécrétée dans le milieu extra cellulaire lors de conditions de stress telle que l'hypoxie ou le manque de nutriments (Cardoso et al. 2016).

La galectine glycosylée aurait alors une action d'activation de la voie des **MAPK**, qui comme nous l'avons vu **stimule la prolifération cellulaire et inhibe le processus apoptotique**.

La voie **Notch** a un rôle plus contrasté dans les phénomènes cancéreux avec un impact suppresseur ou **promoteur de tumeur** semble-t-il selon la co-activation ou non de la voie Wnt comme nous l'avons dit précédemment. En revanche elle semble identifiée comme participant à la **radio-résistance**. Les modifications de glycosylation du récepteur Notch rendent inopérant la libération de la sous unité facteur de transcription NICD (Pakkiriswami et al. 2016).

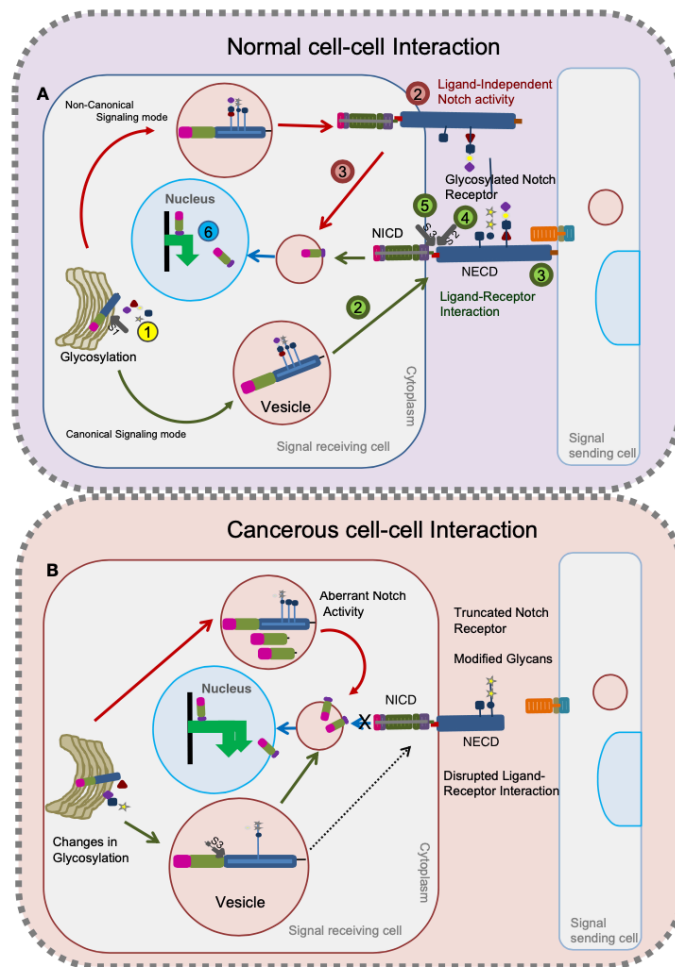


Figure 48 Glycosylation de la voie Notch au sein d'une cellule normale (A) et d'une cellule tumorale (B). Pakkiriswami et al. 2016

3.3.4. Interactions avec le MET et glycosylation.

Le microenvironnement tumoral (MET) est, comme nous l'avons précisé précédemment mentionné, important dans le maintien des capacités des CSC. Cette notion de niche a fait l'objet de nombreuses études, mais les relations entre les modifications de glycosylation et le MET sont moins documentées. Certains essais cliniques (Moriwaki et Asahi, 2017) semblent cependant mettre en évidence un lien direct entre une augmentation de la O-glycosylation et certaines particularités de la niche.

Le premier élément observé est une **inhibition de l'activité de la MAPK p38** qui entraîne une augmentation des voies ERK1 et 2. Par conséquent l'activité des facteurs de transcription (STAT, EIK1...) est majorée avec pour effet une stimulation de la prolifération, de la survie

etc. comme le montre la figure la figure 49 que nous présentons de nouveau ci-après pour rappel.

D'autre part, une **diminution de l'expression de NFkB chez les macrophages** est constatée avec par conséquent une baisse de l'activité de l'immunité innée et adaptative qui en découle.

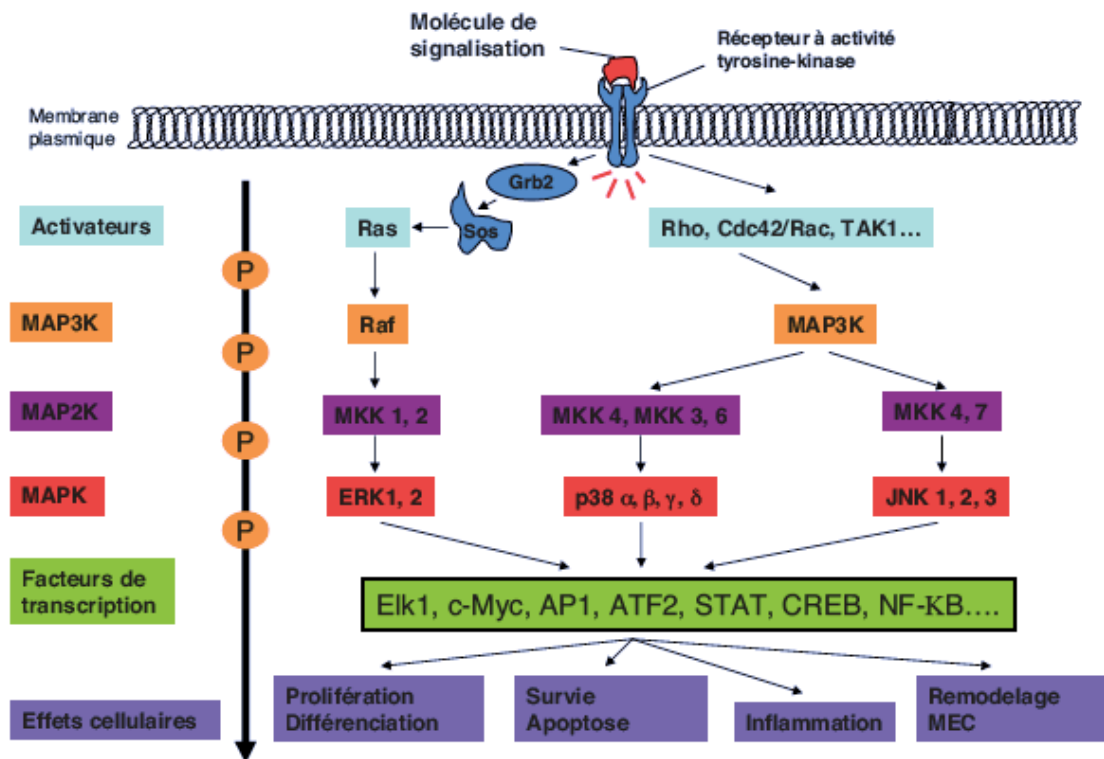


Figure 49 Le classeur immunopathologie pour le praticien

Nous pensons avoir donné quelques exemples qui démontrent que les processus tumoraux modifient la glycosylation. Ces modifications sont associées à l'acquisition de caractéristiques retrouvées chez les CSC et qui peuvent être marqués spécifiquement par des lectines en particulier dans les carcinomes épidermoïdes de la sphère orale (Baeten et al. 2014). A ce stade de notre travail, il nous reste donc à répondre à la question suivante :

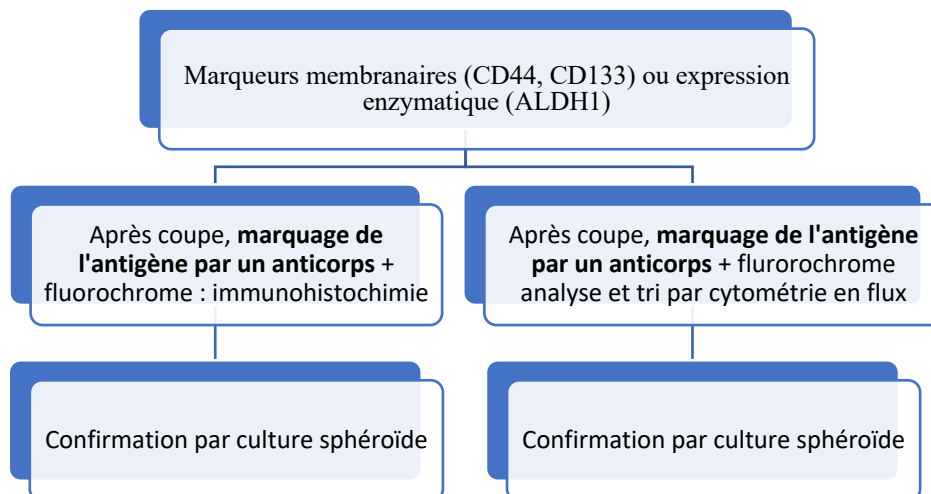
Les lectines peuvent-elles marquer spécifiquement les CSC des cancers des VADS ?

Nous tenterons d'y répondre en deux temps. Tout d'abord après avoir exposé le principe du marquage des CSC par les lectines, nous étudierons le cas du cancer colorectal pour lequel le mélange de lectines d'un laboratoire vient d'être homologué (marquage CE) comme marqueur spécifique des CSC.

Nous nous rendrons ensuite dans ce même laboratoire afin de recueillir les premiers éléments relatifs aux recherches en cours sur la mise au point d'un mélange de lectines visant à marquer spécifiquement les CSC des carcinomes épidermoïdes oraux.

3.4. Principes du marquage des CSC avec un mélange de lectines.

Pour rappel, nous schématisons ici les techniques actuelles utilisées pour identifier la présence des CSC :



Le marquage aux lectines va pouvoir reposer à la fois sur des techniques d'immunohistochimie, ou de cytométrie en flux. Les lectines fonctionnalisées (c'est-à-dire hybridées avec un radical fluorescent, une micro-bille magnétique ou autre) vont en quelque sorte y remplacer l'anticorps.

Toute la difficulté réside donc dans la mise en évidence de couples lectines / radicaux glycosylés de CSC afin de disposer d'un mélange de lectines spécifique.

L'étude de ces relations lectines / radicaux glycosylés est possible grâce à des « lectins array », le terme array signifiant réseau ordonné. Elle est basée sur la miniaturisation du principe ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et permet une analyse rapide et utilisant peu de protéines. Des sociétés biomédicales commercialisent des plaques de 96 à 384 puits contenant chacun une lectine définie, biotinylée fixée sur un bras espaceur.

Nous allons maintenant décrire le processus de mise au point d'un mélange de lectines marquant spécifiquement les CSC en général. Nous communiquerons ensuite quelques données sur le mélange de lectines mis au point pour le cancer colorectal (d'autres mélanges viennent d'être élaborés pour les cancers du sein et du poumon). Enfin, dans notre partie 5, nous exposerons l'état actuel d'avancée dans le domaine de la sphère orale.

3.4.1. Obtention des CSC.

Dans un premier temps, il est nécessaire d'acquérir des lignées de cellules tumorales auprès de sociétés biomédicales (il n'existe pour l'heure, pas de lignées de CSC disponibles sur le marché). Le choix de ces lignées dépend naturellement du type de cancer pour lequel on souhaite mettre au point le mélange. A titre d'exemple, pour le cancer colorectal, la lignée utilisée fut HT-29. Au sein de la tumeur, environ 5 à 10% des cellules seulement seraient des cellules souches cancéreuses (Martin-Neves et al., 2018 ; Phi et al., 2018).

Afin de pouvoir mettre au point le mélange de lectines, il est nécessaire de séparer les fractions souche et non-souche et d'enrichir la fraction souche.

a. Tri des CSC et enrichissement.

Le tri des deux fractions peut être réalisé à l'aide de deux techniques. La première porte le nom de **Flux force (SDFFF)**. Elle consiste en l'application au mélange en suspension d'un flux et d'une force multi-gravitationnelle. Le tri des CSC s'effectue alors par rapport au poids et à la déformabilité de ces dernières.

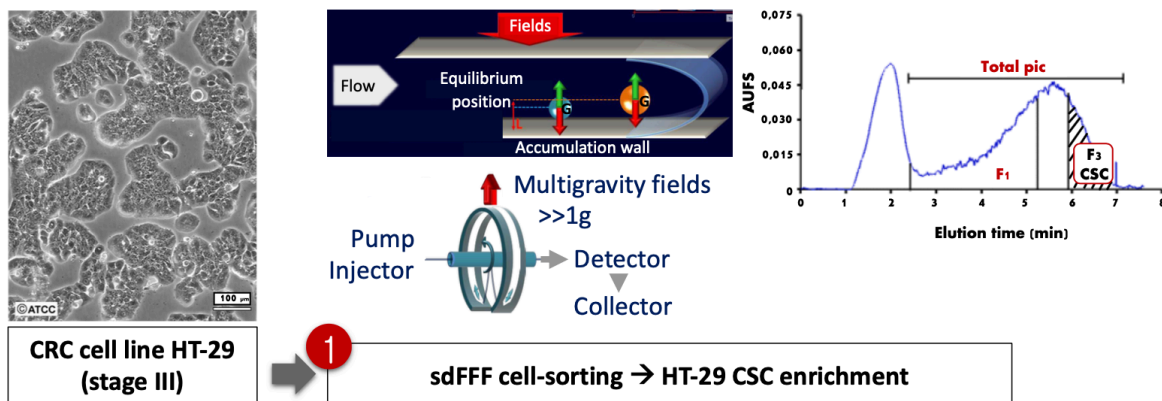


Figure 50 Specific detection of cancer stem cells (cscs) in colorectal cancer using the colostemò dx kit, Blondy S., Mathonnet M., Lalloué F., Jauberteau M.O., Carré V., Védrine B. 2019

La deuxième méthode est la cytométrie en flux avec des marqueurs existants. Comme nous l'avons vu, ces marqueurs sont peu intéressants pour le **marquage** par immuno histochimie (car présents dans beaucoup de cellules), mais utilisables pour le **tri** par cytométrie en flux (car sur expression pour les CSC de CD133 par exemple). On obtient in fine une fraction enrichie en CSC à plus de 95%.

A l'issue de cette étape, les fractions souches et non souches sont conservées, seule la fraction souche va être cultivée afin de contrôler sa pureté.

b. Culture des CSC.

La culture des CSC va se faire selon la technique de culture de sphéroïdes que nous avons déjà détaillée, dans un milieu contenant des facteurs de croissance et sur un support empêchant l'adhésion. Seule les cellules couches cancéreuses vont pouvoir créer des sphéroïdes en 3D, de nature hétérogène du fait de leur faculté à opérer des divisions asymétriques. Cette étape permet de contrôler la pureté de la fraction souche, en fonction du nombre de sphéroïdes recrées.

c. Extraction des membranes des deux fractions.

Afin d'obtenir un marquage extérieur des CSC, les membranes des deux fractions sont extraites à l'aide de détergents. Ces membranes sont ensuite rendues fluorescentes grâce à l'utilisation d'une scyaline 3 fonctionnalisée.

A ce stade, la partie cellulaire est conditionnée et prête à être étudiée dans ses relations avec les lectines. Nous avons expliqué que cette étude repose sur les lectins array.

3.4.2. Mise au point du mélange des lectines.

Les lectines sont principalement d'origine végétale, et déposées sur des plaques de 60 spots : chaque spot correspond à une lectine. Dans chaque puit sont déposées les membranes fluorescentes des fractions (souches sur un lectins array, et non-souche sur un autre lectins array).

On effectue une comparaison de l'intensité du marquage fluorescent entre la fraction souche et la fraction non-souche, lectine par lectine après dépôt sur l'ensemble de la plaque du lectins array. On fait donc en réalité 2 lectins array en parallèle, un pour la fraction CSC et un pour la fraction non-souche.

Le résultat par lectine est **qualitatif** par rapport aux spots qui fluorescent, et **quantitatif** par rapport à l'intensité de fluorescence.

C'est ainsi que de proche en proche on parvient à établir le mélange supposé idéal de lectines marquant les CSC. Ce mélange va ensuite être testé in vitro et in vivo afin de d'évaluer sa spécificité.

3.4.3. Test du mélange in vitro et in vivo.

Les lectines du mélange obtenu sont hybridées avec des micro-billes magnétiques. La lignée tumorale utilisée initialement (HT29 pour le colon par exemple) est préparée et mise en contact avec les lectines hybridées.

On réalise ensuite en cytométrie en flux aimanté afin d'isoler la fraction souche supposée de la fraction non-souche. La fraction souche et la fraction non-souche subissent ensuite **séparément** des tests de biologie moléculaire afin de vérifier si elles expriment les marqueurs connus des CSC.

Trois techniques sont utilisées de concert :

- RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) quantitative, avec recherche du niveau d'expression des gènes de CD133, de OCT 4 etc. ;
- Western blot avec recherche de l'expression de CD133 et CD44 ;
- Cytométrie en flux avec recherche de CD133 et CD44.

L'objectif de ces 3 étapes est de voir si l'on dispose effectivement d'une surexpression de ces marqueurs au sein de la fraction souche qui a été triée grâce aux lectines versus la fraction non-souche. Les deux étapes suivantes vont permettre d'évaluer la **pureté** de la fraction souche en testant une des capacités propres au CSC : la faculté de reproduire une tumeur hétérogène en trois dimensions à partir d'une CSC in vitro (test de clonogénicité) et in vivo (tumorigénicité).

- Test de **clonogénicité** : on dépose une CSC supposée dans un puit d'une plaque 96 puits et on regarde combien de sphéroïdes peuvent être créés par prélèvement successifs à partir de ce puit.
- Les fractions souches et non-souches sont ensuite testées in vivo sur les souris nude immunodéprimées en effectuant un test de **tumorigénicité** : on réalise des dilutions des CSC : 1/7000, 1/500 et 1/50 qui sont ensuite injectées à des souris nude afin de voir le nombre et la grosseur des tumeurs générées.

A l'issue de ces étapes, et après avoir comparé les résultats entre les fractions marquées comme souche et non souche par le mélange, le mélange de lectines peut être validé. Afin de clarifier notre propos, nous allons résumer ces différentes étapes à l'aides des schémas récapitulatifs à suivre.

3.4.4. Schémas récapitulatifs du processus de mise au point du mélange de lectines :

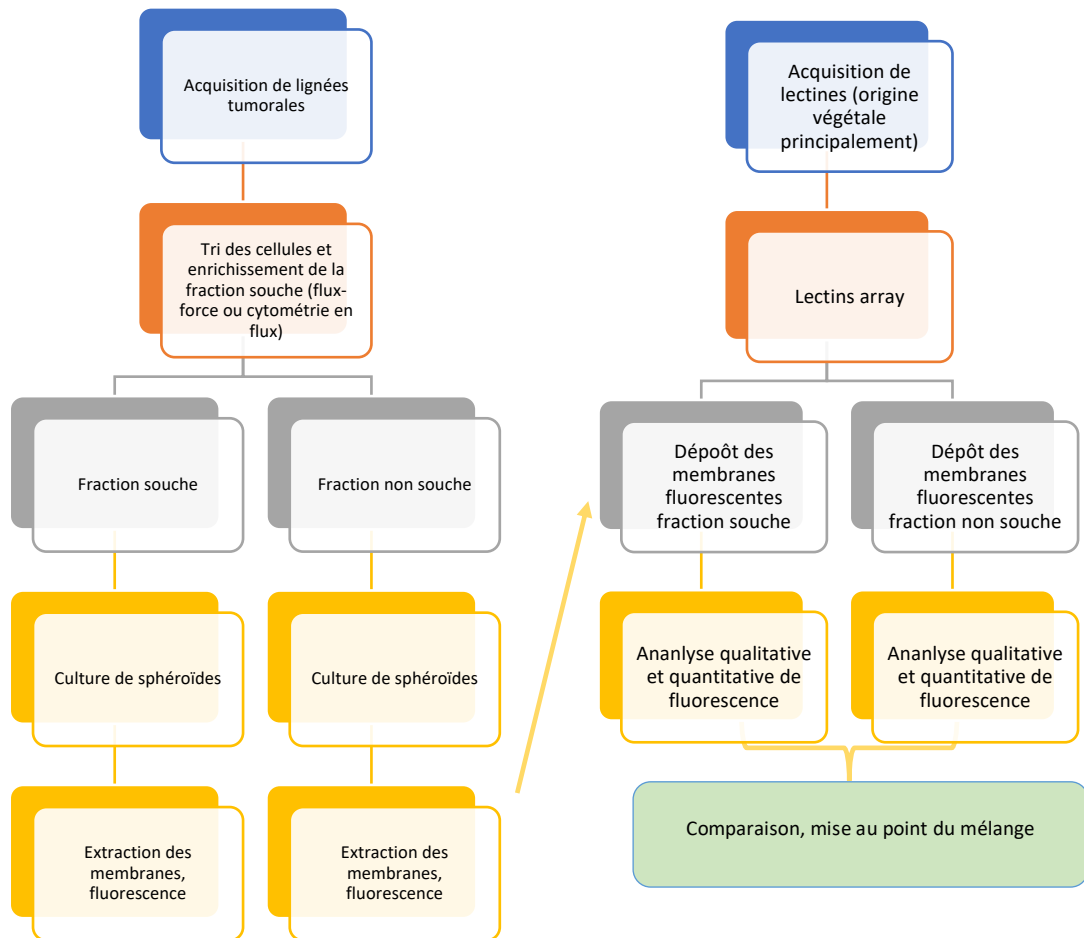


Figure 51 Étapes de mise au point du mélange de lectines

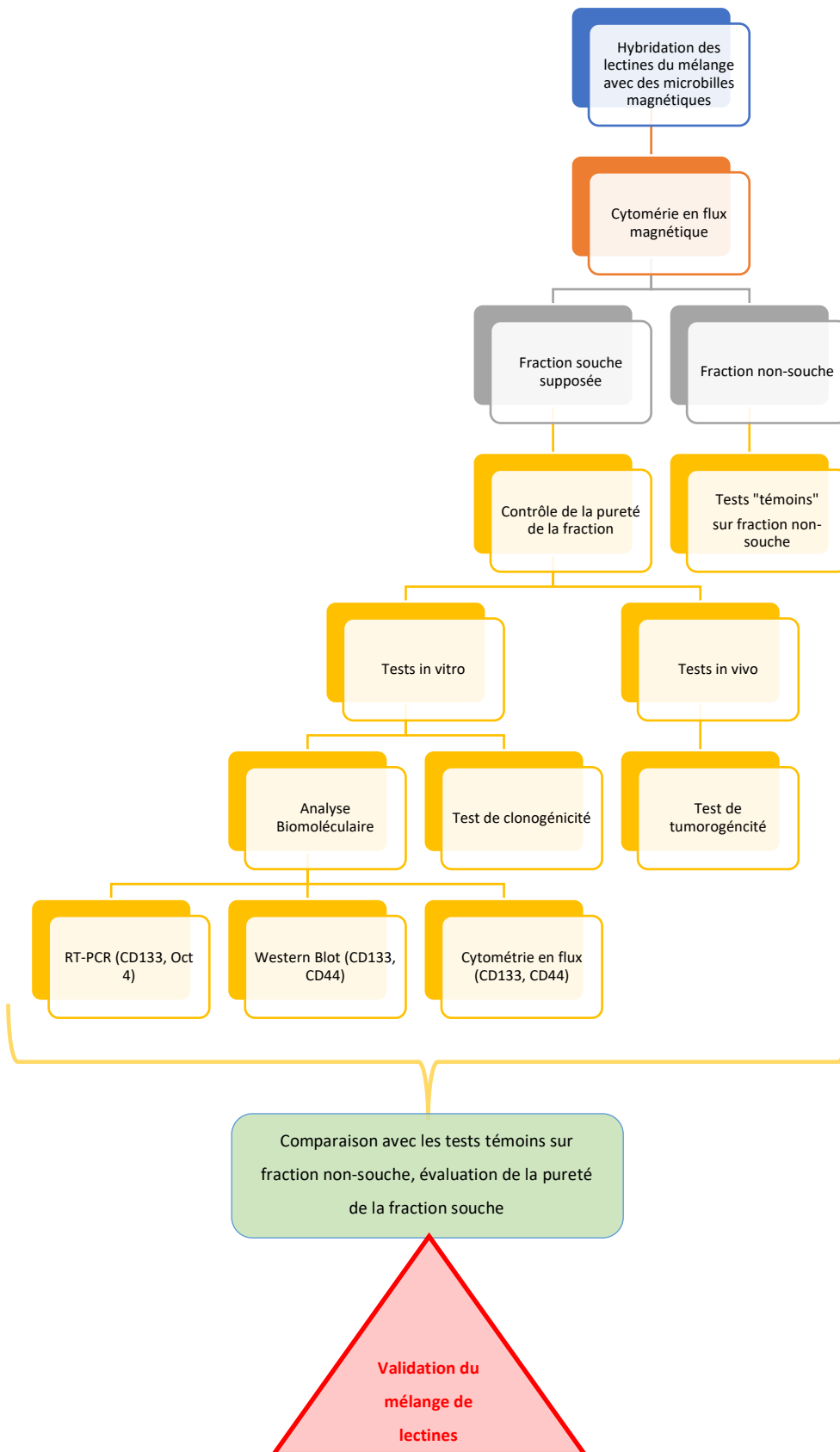


Figure 52 Étapes de validation du mélange de lectines

Tous ces éléments théoriques amènent naturellement à se poser la question de la validité du procédé de marquage des CSC chez les patients atteints de cancer. Le laboratoire CARCIDIAG vient de commercialiser un test diagnostique visant à mettre en évidence la présence de cellules souches cancéreuses dans les cancers colo-rectaux, ceux du poumon, et du sein. Leurs recherches portent maintenant sur les cancers des VADS.

Nous allons donc dans un premier temps passer en revue les résultats obtenus pour le cancer colorectal, à titre d'exemple, avant d'évoquer l'état actuel des recherches sur le mélange de lectines pour les cancers des VADS.

3.4.5. Applications actuelles au cancer colorectal.

Le kit diagnostique du côlon a été utilisé sur des coupes fixées sur paraffine issues de patients atteints du cancer colo-rectal et a fait l'objet d'une étude rétrospective sur 133 patients (ce qui permet de connaître l'évolution de la pathologie et principalement la survie à 5 ans des patients).

Dans un premier temps le test a été calibré afin de définir 5 scores, de 0 à 4, en rapport avec le pourcentage de cellules fixées, de 0 à 100%. Les scores ont ensuite été regroupés selon l'intensité de marquage (et donc le nombre de CSC) formant ainsi 2 sous-groupes : faible et haute intensité.

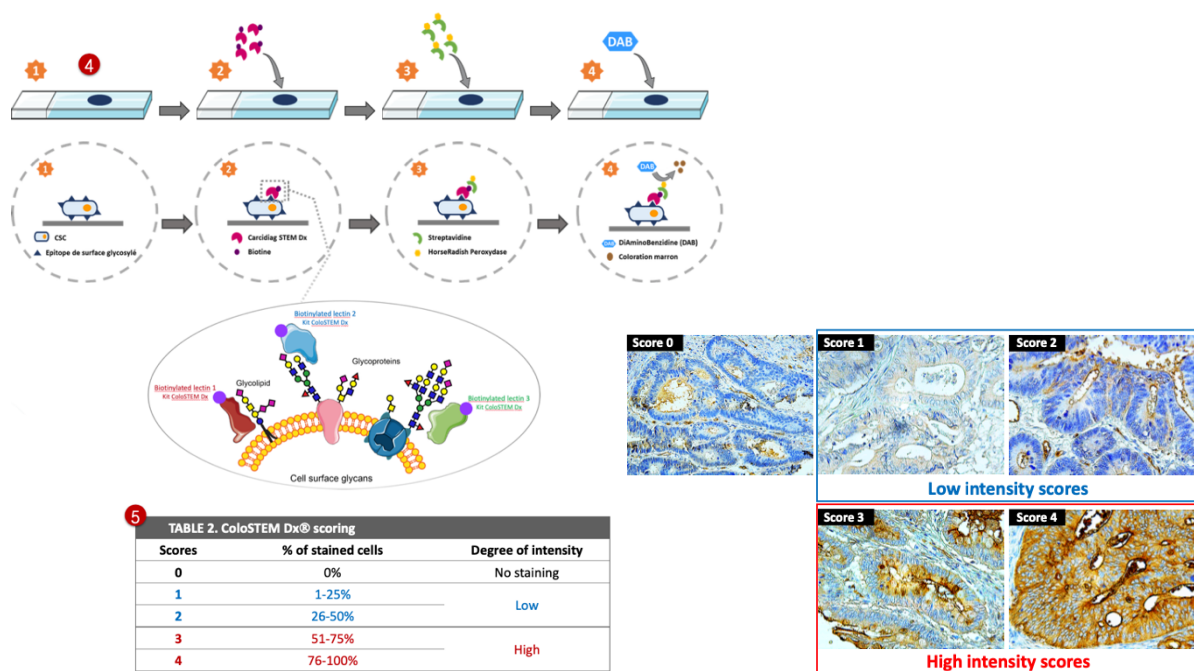
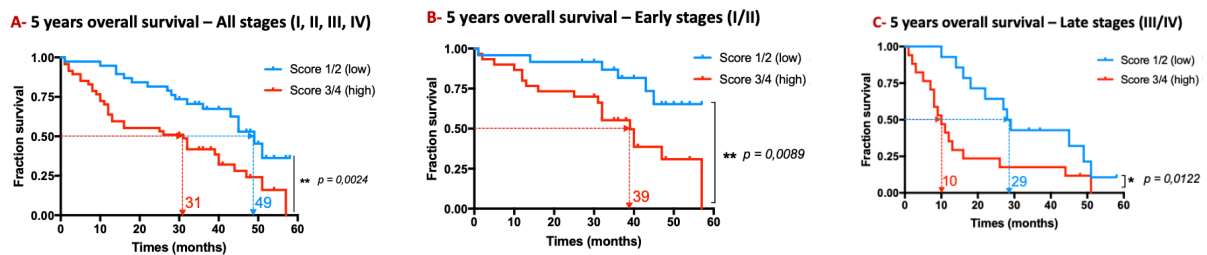


Figure 53 Schematic representation of the experimental strategy adopted to develop the ColoSTEM Dx kit for labelling glycanic profiles aberrantly expressed in CSCs by immunohistochemistry, CARCIDIAG BIOTECH

Le test diagnostique a ensuite été utilisé sur les coupes de prélèvements tumoraux fixés sur paraffine de 133 patients présentant différents stades de cancers du côlon (Stades I à IV) et dont la survie à 5 ans était connue (étude rétrospective). Les niveaux d'intensité de marquage ont été relevés sans tenir compte des stades, puis en différenciant les stades I et II, des stades III et IV :

TABLE 3. Number of patients included in the study			
	All stages	Early stages (I/II)	Late stages (III/IV)
	133	61	47
Low intensity scores	53	25	22
High intensity scores	80	36	25



Le premier constat est que le test marque la présence de CSC sur tous les prélèvements, quel que soit le stade, traduisant la présence systématique de ce type de cellules. Le marquage par fluorescence permet d'apporter une **dimension diagnostique** à la fois qualitatif, et quantitatif (niveau d'intensité).

Le second élément intéressant est la différence observée dans les taux de survie selon que les patients présentent un faible ou haut niveau d'intensité de marquage. En effet, le taux de survie à 5 ans pour les patients à haute intensité (forte présence de CSC) est nul (tous stades confondus) versus environ 45% pour ceux à faible intensité ($p=0,0024$). Ces résultats s'inscrivent dans le sens des études récentes citées précédemment dans notre travail est qui mettent en relation le taux de survie à 5 ans et le nombre de CSC dans la tumeur. On peut donc dire que le test diagnostique apporte une dimension de **diagnostic prédictif**. On notera également que le taux de survie à 5 ans s'effondre plus vite pour les patients prélevés à des stades avancés (III et IV) ce qui démontre tout l'intérêt d'un diagnostic précoce ...

Nous disposons des données relatives aux tests diagnostiques pour les cancers du poumon et du sein qui confirment les résultats obtenus pour le cancer colorectal. Il est donc permis d'envisager comme possible la mise au point d'un mélange de lectines pour le marquage de CSC dans les cancers solides des VADS. Les Chirugiens-dentistes, spécialistes de la cavité orale, seraient alors les premiers maillons d'une chaîne pouvant s'appuyer sur une nouvelle méthode de diagnostic précoce et prédictif. Nous donnons dans les lignes qui suivent l'état d'avancement des travaux actuels

3.5. Élaboration d'un mélange de lectines pour les CSC des cancers des VADS.

Certaines données ne peuvent être communiquées car relevant de brevets en cours de dépôt, nous nous bornerons donc à fournir les grandes lignes des recherches actuelles.

3.5.1. Description de l'étude clinique en cours.

La lignée tumorale utilisée actuellement est issue de tumeurs de la base de la langue, avec 2 sous lignées : une HPV16- et une autre HPV16+. Ce modèle a été choisi afin de prendre en compte l'évolution actuelle des données épidémiologiques des cancers de VADS qui voient une baisse des cas liées au tabac et à l'alcool et une hausse de ceux liés au HPV (voir chapitre I.1).

Le tri de la lignée avant enrichissement est fait selon 3 paramètres :

- CD44 ;
- ALDH1 ;
- expression de Hoechst 33342.

L'évaluation de l'expression de Hoechst 33342 repose sur le principe d'identification des CSC par la technique de la side population (Shimoda et al. 2018).

Le laboratoire entre actuellement dans la phase d'enrichissement et contrôle de la fraction souche, prélude à l'étape de test des lectines sur lectin array.

3.5.2. Perspectives d'avenir.

D'après les éléments dont nous disposons, le kit diagnostique pour les cancers des VADS pourrait être disponible d'ici 24 à 36 mois. Une fois le mélange de lectines mis au point pour le carcinome épidermoïde de la base de la langue, d'autres phases de recherche seront nécessaires afin d'évaluer la nécessité d'affiner la composition du mélange en fonction du sous-type de cancer des VADS. Les praticiens de la sphère orale en général, et les Chirugiens-dentistes en particulier, disposeraient d'un outil de **diagnostic spécifique** des CSC ayant une dimension **précoce et prédictive**.

Dans un second temps s'ouvrira une phase portant sur les **applications thérapeutiques** envisageables. En effet, la fonctionnalisation des lectines du mélange avec des anticorps ou même des molécules cytotoxique (5FU etc.) laisse entrevoir l'espoir de nouvelles thérapeutiques ciblées et peut être plus efficace dans le domaine du cancer.

Une fonctionnalisation à l'aide de molécules radio-opaques pourrait également être envisagée et améliorer la technique de radiothérapie stéréotaxique.

Enfin, l'évaluation de l'efficacité des traitements (protocoles compagnons) et leur ajustement serait rendu possible grâce à l'évaluation de leurs effets sur la population clé des CSC.

Conclusion.

Au cours de notre travail, nous avons exposé le rôle particulier que jouent les cellules souches cancéreuses au sein des cancers des VADS. Leurs différentes caractéristiques sont au cœur des grandes problématiques en matière de diagnostic et de traitement des tumeurs. C'est la raison pour laquelle la théorie stochastique tend à être supplantée par la théorie des cellules souches.

Les voies de signalisation qui régulent et coordonnent l'activité cellulaire et l'homéostasie sont modifiées au cours des phénomènes tumoraux et s'accompagnent de modifications de glycosylation. Ces modifications s'entretiennent dans une boucle d'échange avec le micro-environnement tumoral et notamment avec les CAF's à travers des échanges de molécules glycosylées.

Des modifications de glycosylations particulières sont observées et semblent être liées à certaines des grandes caractéristiques des cellules souches cancéreuses. Elles peuvent être reconnues et fixées de manière spécifique par des lectines. Ce type de marquage semble présenter un niveau plus élevé de spécificité que l'usage seul ou combiné des marqueurs membranaires CD133 et CD44, et du marqueur enzymatique ALDH1 actuellement utilisés.

Ces éléments permettent d'envisager une méthode de diagnostic spécifique, précoce et prédictif des cancers des VADS comparable à celle qui vient d'être mise au point pour le cancer du côlon, du poumon et du sein.

Des perspectives d'une application dans le domaine thérapeutique sont également ouverte, notamment grâce à la fonctionnalisation possible des lectines.

Au terme de notre recherche, nous considérons cette technique de marquage aux lectines comme une piste prometteuse et enthousiasmante en matière de recherche en vue d'améliorer le diagnostic et à terme les traitements des cancers en général et de ceux des VADS en particulier.

4. Méthodologie de recherche bibliographique.

Afin de traiter notre sujet, nous avons opté pour une **revue de littérature narrative**. Nous avons axé notre recherche dans deux directions principales selon la **méthodologie de formulation PICO** :

Thématique n°1 : les techniques d'identification des cellules souches cancéreuses dans les cancers des VADS.

Thématique n° 2 : le marquage des modifications de glycosylation à l'aide des lectines dans les cancers.

Les termes MeSH ont été traduits à l'aide de la base de données HeTOP et ont permis de mettre en place trois équations différentes.

- Thématique n°1, équation 1 :

Base de données : PubMed

MeSH terms : *head and neck neoplasm*

Filtres : titre et résumé, méta analyse, articles de 2 ans et moins, texte complet en libre accès, domaine humain.

- Thématique n°1, équation 2 :

Base de données : PubMed

MeSH terms : *head and neck neoplasm / neoplastic stem cells*

Filtres : titre et résumé, revue de littérature, article de moins de 5 ans, texte complet en accès libre, domaine humain.

- Thématique n°1, équation 3 :

Base de données : PubMed

MeSH terms : *identification / head and neck neoplasm / neoplastic stem cells*

Filtres : titre et résumé, articles de moins de 5 ans, texte complet en libre accès

- Thématique n°1, équation 4 :

Base de données : Pubmed

MeSH terms : *targeting / head and neck / stem cells*

Filtres : titre et résumé, articles de moins de 5 ans, texte complet en libre accès

- Thématique n°2, équation 5 :

Base de données : Pubmed

MeSH terms : *lectins / glycosylation / cancer*

Filtres : titre et résumé, articles de moins de 5 ans, texte complet en libre accès

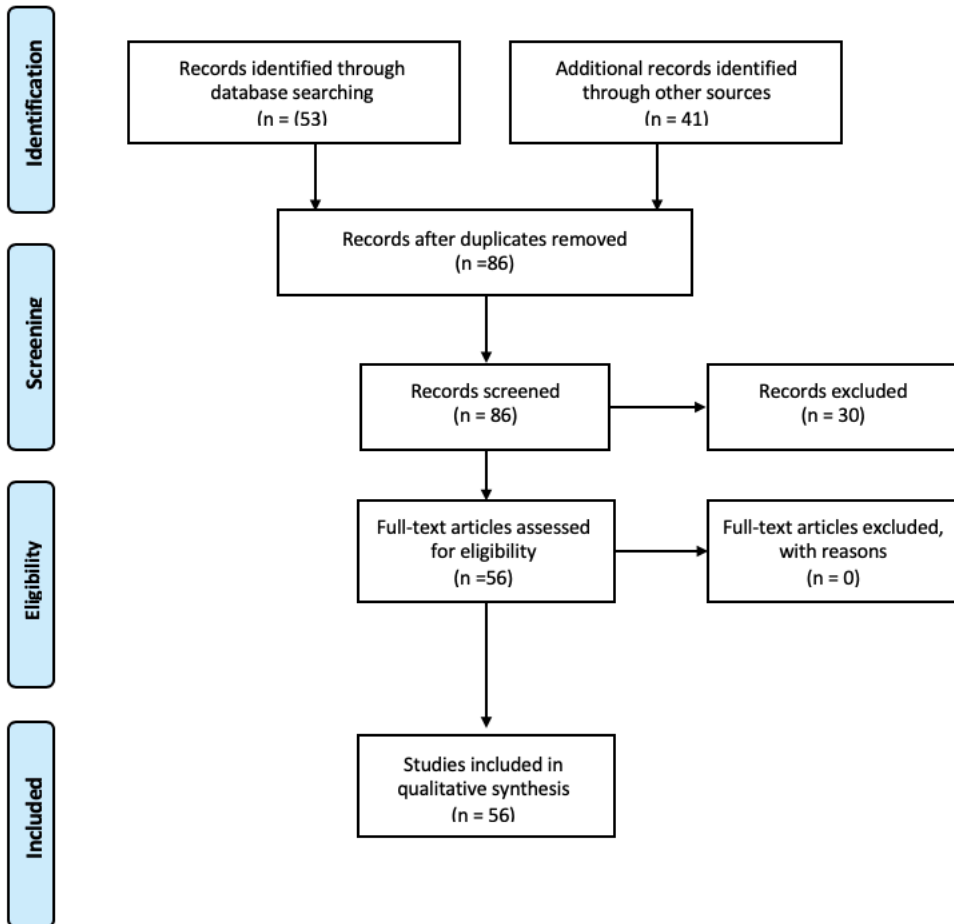
Après **élimination des doublons et lecture des résumés**, une première sélection d'articles a été effectuée pour chaque équation, puis nous avons élargi le champ d'investigation par **recherche manuelle** au sein des bibliographies, d'ouvrages et de sites internet.

Nous nous sommes également appuyés sur la méthode **PRISMA** pour évaluer le niveau de preuve des différentes sources.

Les diagrammes de flux ci-après résument notre méthodologie de travail :



PRISMA 2009 Flow Diagram Equation n° 1:
MeSH terms “head and neck neoplasm”

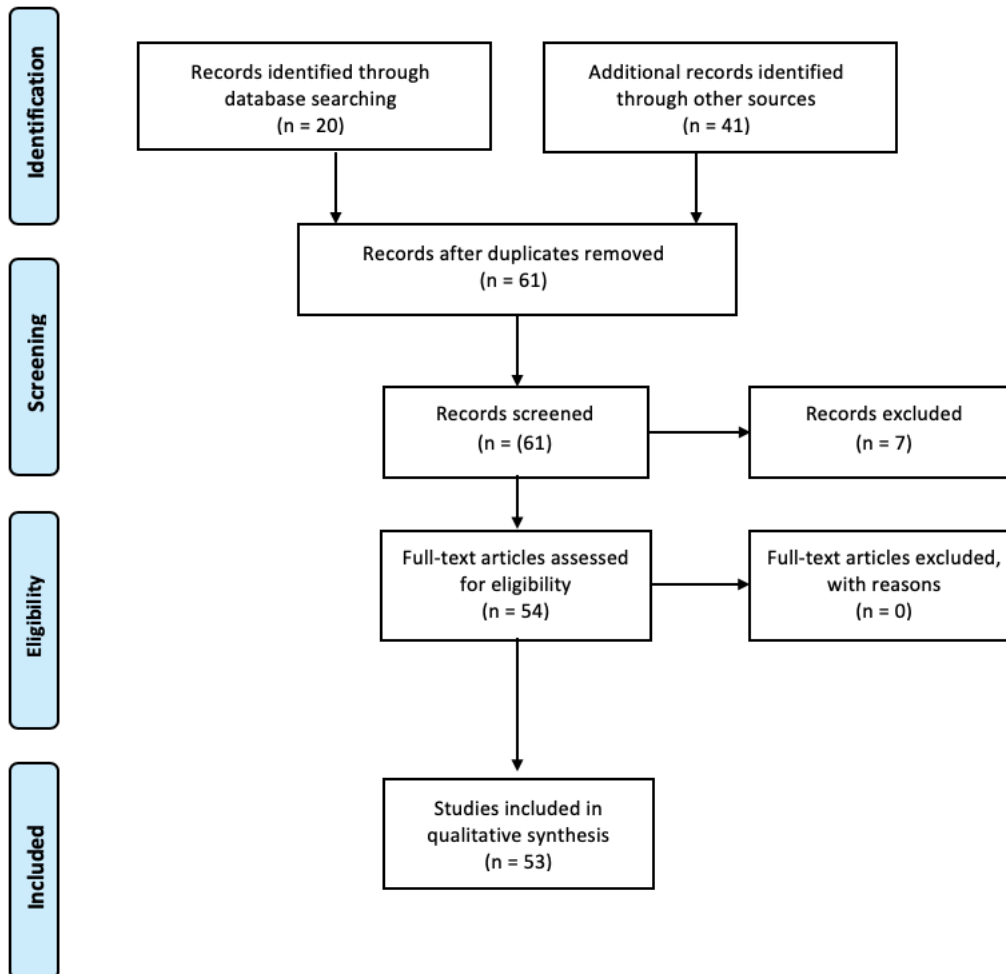


From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.



PRISMA 2009 Flow Diagram Equation n° 2:
MeSH terms “head and neck neoplasm / neoplastic stem cells”

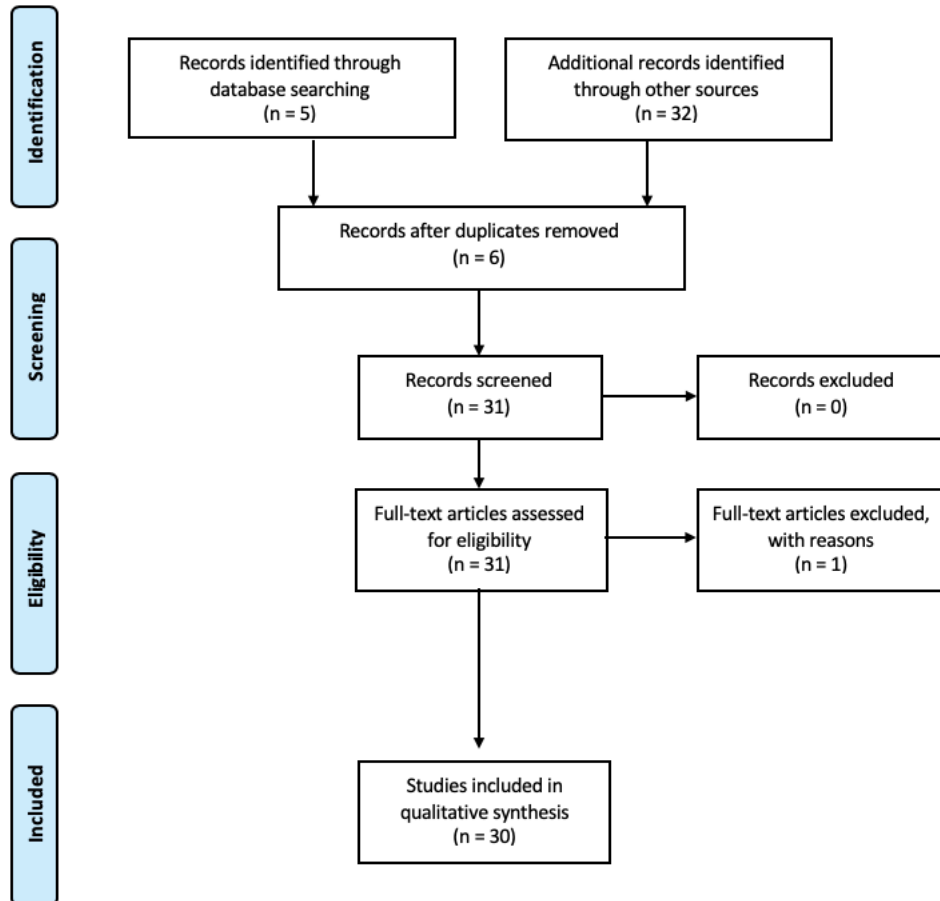


From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.



PRISMA 2009 Flow Diagram Equation n° 3:
MeSH terms "*identification / head and neck neoplasm /
neoplastic stem cells*"

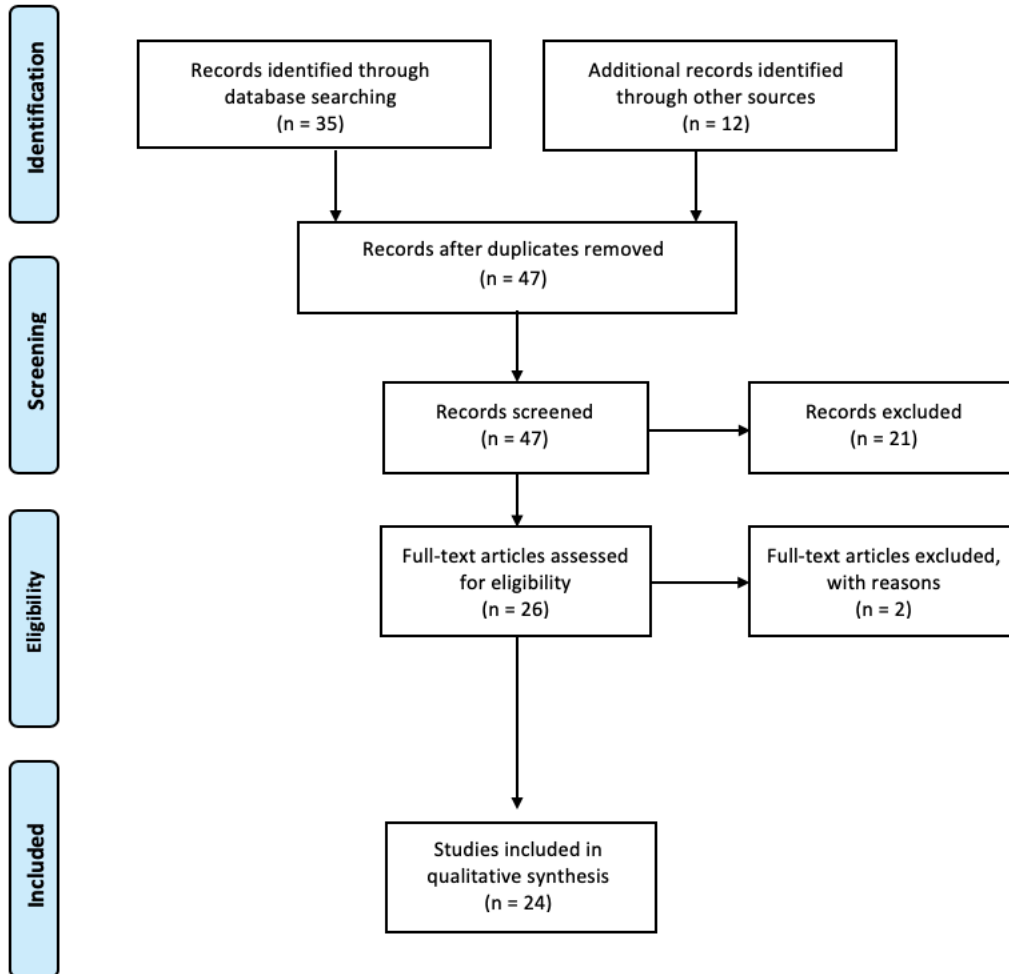


From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.



PRISMA 2009 Flow Diagram Equation n° 4:
MeSH terms “targeting / head and neck neoplasm / neoplastic stem cells”

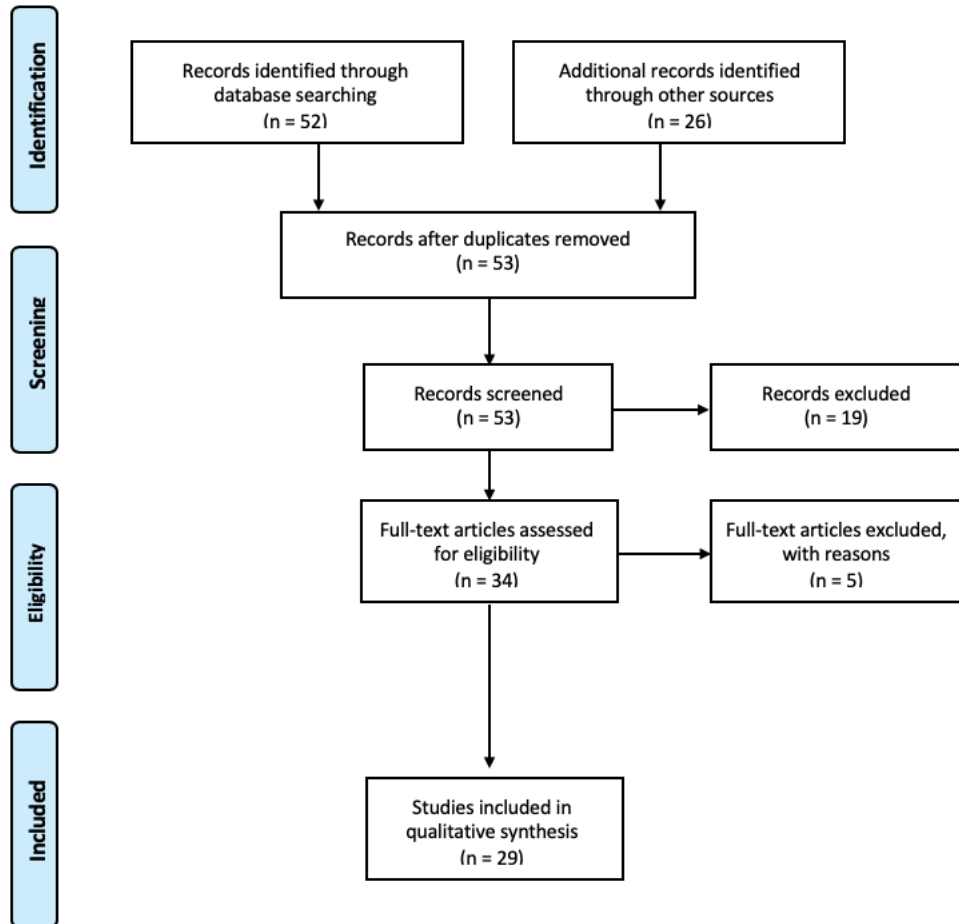


From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.



PRISMA 2009 Flow Diagram Equation n° 5:
MeSH terms “lectins / glycosylation / cancer”



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.

5. Bibliographie.

- Abell AN, Johnson GL. Implications of Mesenchymal Cells in Cancer Stem Cell Populations: Relevance to EMT. *Curr Pathobiol Rep*. 2014;2(1):21-6.
- Almeida L, Guimarães D, Squarize C, Castilho R. Profiling the Behavior of Distinct Populations of Head and Neck Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2016;8(1):7.
- Andreano A, Ansarin M, Alterio D, Bruschini R, Valsecchi MG, Russo AG. Cancer of the head and neck: a set of indicators based on register and administrative data. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2018;38(1):13-23.
- Aractingi S, Kanitakis J, Euvrard S, Le Danff C, Peguillet I, Khosrotehrani K, et al. Skin carcinoma arising from donor cells in a kidney transplant recipient. *Cancer Res*. 2005;65(5):1755-60.
- Atkins RJ, Stylli SS, Kurganovs N, Mangiola S, Nowell CJ, Ware TM, et al. Cell quiescence correlates with enhanced glioblastoma cell invasion and cytotoxic resistance. *Exp Cell Res*. 2019;374(2):353-64.
- Azhar N, Doss JG. Health-Seeking Behaviour and Delayed Presentation of Oral Cancer Patients in a Developing Country: A Qualitative Study based on the Self-Regulatory Model. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(10):2935-41.
- Baar M, Coquille L, Mayer H, Hölzel M, Rogava M, Tüting T, et al. A stochastic model for immunotherapy of cancer. *Sci Rep*. 2016;6:24169.
- Baeten J, Suresh A, Johnson A, Patel K, Kuriakose M, Flynn A, et al. Molecular imaging of oral premalignant and malignant lesions using fluorescently labeled lectins. *Transl Oncol*. 2014;7(2):213-20.
- Bellairs JA, Hasina R, Agrawal N. Tumor DNA: an emerging biomarker in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(3):515-23.
- Becker M, Varoquaux AD, Combescure C, Rager O, Pusztaszeri M, Burkhardt K, et al. Local recurrence of squamous cell carcinoma of the head and neck after radio(chemo)therapy: Diagnostic performance of FDG-PET/MRI with diffusion-weighted sequences. *Eur Radiol*. 2018;28(2):651-63.
- Benítez L, Barberis L, Condat CA. Modeling tumorspheres reveals cancer stem cell niche building and plasticity. *Physica A*. 2019;533:121906.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Lectins Are Specific Carbohydrate-Binding Proteins*. New York: W H Freeman; 2002.
- Bertrand G. Caractérisation et ciblage thérapeutique d'une sous-population de cellules souches cancéreuses dans un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde de la tête et du cou résistant à l'irradiation par photons et ions carbone [Thèse d'exercice : Biologie, aspect moléculaire et cellulaire]. [Lyon]: Claude Bernard Lyon 1; 2013.
- Birkeland AC, Owen JH, Prince ME. Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells: Current Advances and Future Challenges. *J Dent Res*. 2015;94(11):1516-23.
- Birnie R, Bryce SD, Roome C, Dussupt V, Droop A, Lang SH, et al. Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol*. 2008;9(5):R83.
- Blanpain C. Importance de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans l'identité, l'activation et la différenciation des cellules souches épidermiques. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(1):34-6.
- Boesch M, Zeimet AG, Rumpold H, Gastl G, Sopper S, Wolf D. Drug Transporter-Mediated Protection of Cancer Stem Cells From Ionophore Antibiotics. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(9):1028-32.
- Bojarová P, Křen V. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives. *Biomater Sci*. 2016;4(8):1142-60.
- Brennan MT, Treister NS, Sollecito TP, Schmidt BL, Patton LL, Mohammadi K, et al. Dental disease before radiotherapy in patients with head and neck cancer: Clinical Registry of Dental Outcomes in Head and Neck Cancer Patients. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(12):868-77.
- Brown JA, Yonekubo Y, Hanson N, Sastre-Perona A, Basin A, Rytlewski JA, et al. TGF- β -Induced Quiescence Mediates Chemoresistance of Tumor-Propagating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell*. 2017;21(5):650-664.e8.

- Cagnoni AJ, Pérez Sáez JM, Rabinovich GA, Mariño KV. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins: Chemical Inhibition of Glycan-Dependent Interactions in Cancer. *Front Oncol.* 2016;6(109):1-21.
- Capp J-P. Tissue disruption increases stochastic gene expression thus producing tumors: Cancer initiation without driver mutation: Tissue disruption, stochastic gene expression and tumorigenesis. *Int J Cancer.* 2017;140(11):2408-13.
- Capp J-P. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *J Oncol.* 2019;2019:5189232.
- Carrascal MA, Severino PF, Guadalupe Cabral M, Silva M, Ferreira JA, Calais F, et al. Sialyl Tn-expressing bladder cancer cells induce a tolerogenic phenotype in innate and adaptive immune cells. *Mol Oncol.* 2014;8(3):753-65
- Castagnola M, Scarano E, Passali GC, Messana I, Cabras T, Iavarone F, et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2017;37:94-101.
- Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1-23.
- Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells. *Front Oncol.* 2015;5(180):1-11
- Chapman CH, Parvathaneni U, Yom SS. Revisiting induction chemotherapy before radiotherapy for head and neck cancer, part I: carcinoma of non-nasopharyngeal sites. *Future Oncol.* 2017;13(6):469-75.
- Chen Y-C, Chen Y-W, Hsu H-S, Tseng L-M, Huang P-I, Lu K-H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(3):307-13.
- Chen Y-S, Wu M-J, Huang C-Y, Lin S-C, Chuang T-H, Yu C-C, et al. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e28053.
- Chen Y-W, Chen K-H, Huang P-I, Chen Y-C, Chiou G-Y, Lo W-L, et al. Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)/ALDH1(+) cells. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(11):2879-92.
- Chetlen A, Mack J, Chan T. Breast cancer screening controversies: who, when, why, and how? *Clin Imaging.* 2016;40(2):279-82.
- Chinn SB, Darr OA, Peters RD, Prince ME. The role of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells in tumorigenesis, metastasis, and treatment failure. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3(90):1-6
- Chinn SB, Darr OA, Prince MEP. Cancer stem cells mediate tumorigenesis and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2015 Mar; 37(3): 317–26.
- Coleman C. Early Detection and Screening for Breast Cancer. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(2):141-55.
- Cortot A, Armand J-P, Soria J-C. Les inhibiteurs de la voie PI3 kinase-AKT-mTOR. *Bull Cancer.* 2006;93(1):19-26.
- Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(3):463-79.
- Cramer JD, Speedy SE, Ferris RL, Rademaker AW, Patel UA, Samant S. National evaluation of multidisciplinary quality metrics for head and neck cancer. *Cancer.* 2017;123(22):4372-81.
- Dahlstrom KR, Anderson KS, Field MS, Chowell D, Ning J, Li N, et al. Diagnostic accuracy of serum antibodies to human papillomavirus type 16 early antigens in the detection of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Cancer.* 2017;123(24):4886-94.
- Dionne LK, Driver ER, Wang XJ. Head and Neck Cancer Stem Cells: From Identification to Tumor Immune Network. *Journal of Dental Research.* *J Dent Res.* 2015;94(11):1524–31.
- Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):69-84.

- Dwivedi AK, Dwivedi SN, Deo S, Shukla R, Pandey A, Dwivedi DK. An epidemiological study on delay in treatment initiation of cancer patients. *Health*. 2012;4(2):66-79.
- Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-18.
- Elkashty OA, Ashry R, Tran SD. Head and neck cancer management and cancer stem cells implication. *Saudi Dent J*. 2019;S1013905219305620.
- Fan Z, Li M, Chen X, Wang J, Liang X, Wang H, et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Markers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a Meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):43008.
- Freire-de-Lima L, Previato JO, Mendonça-Previato L. Editorial: Glycosylation Changes in Cancer: An Innovative Frontier at the Interface of Cancer and Glycobiology. *Front Oncol*. 2016;6(254):1-2
- Galmiche A, Ezzoukhry Z. Régulation de la survie cellulaire par les kinases de la famille RAF. *Med Sci (Paris)*. 2010;26(8-9):729-33.
- Galmiche A, Lustenberger P. CD44, invasion tumorale et métastase. *médecine/sciences* 1994;(10):1282-91.
- Ganapathi M, Boles NC, Charniga C, Lotz S, Campbell M, Temple S, et al. Effect of Bmi1 over-expression on gene expression in adult and embryonic murine neural stem cells. *Sci Rep*. (2018);8:7464.
- Garcia-Mayea Y, Mir C, Masson F, Paciucci R, LLeonart ME. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin Cancer Biol*. 2019;S1044579X19301646.
- Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92.
- Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res*. 2010;70(17):6945-56.
- Gilormini M, Malesys C, Armandy E, Manas P, Guy J-B, Magné N, et al. Preferential targeting of cancer stem cells in the radiosensitizing effect of ABT-737 on HNSCC. *Oncotarget*. 2016; 7(13):16732-44
- Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Rossi A, Pirozzi G. The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem*. 2008;103(2):408-12.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
- Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Penault-Llorca F. [Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas]. *Bull Cancer*. 2004;91(2):141-58.
- Hagemann J, Jacobi C, Gstoettner S, Welz C, Schwenk-Zieger S, Stauber R, et al. Therapy Testing in a Spheroid-based 3D Cell Culture Model for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Vis Exp*. 2018;(134):e57012.
- Han J, Fujisawa T, Husain SR, Puri RK. Identification and characterization of cancer stem cells in human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014;14:173.
- Hardin H, Zhang R, Helein H, Buehler D, Guo Z, Lloyd RV. The evolving concept of cancer stem-like cells in thyroid cancer and other solid tumors. *Lab Invest*. 2017;97(10):1142-51.
- Hirabayashi J. Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling. *J Biochem*. 2008;144(2):139-47.
- Ho W-L, Hsu W-M, Huang M-C, Kadomatsu K, Nakagawara A. Protein glycosylation in cancers and its potential therapeutic applications in neuroblastoma. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):100.
- Horne SD, Pollick SA, Heng HHQ. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer: Hallmarks of cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(9):2012-21.
- Hou Z-J, Luo X, Zhang W, Peng F, Cui B, Wu S-J, et al. Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*. 2015;6(8):6326-40.
- Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004;306(5701):1568-71.

- Howe LR, Watanabe O, Leonard J, Brown AMC. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res.* 2003;63(8):1906-13.
- Jabbour J, Milross C, Sundaresan P, Ebrahimi A, Shepherd HL, Dhillon HM, et al. Education and support needs in patients with head and neck cancer: A multi-institutional survey. *Cancer.* 2017;123(11):1949-57.
- Johnson NW, Warnakulasuriya S, Gupta PC, Dimba E, Chindia M, Otoh EC, et al. Global oral health inequalities in incidence and outcomes for oral cancer: causes and solutions. *Adv Dent Res.* 2011;23(2):237-46.
- Jou A, Hess J. *Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer.* *Oncol Res Treat.* 2017;40(6):328-32.
- Justilien V, Fields AP. Molecular pathways: novel approaches for improved therapeutic targeting of Hedgehog signaling in cancer stem cells. *Clin Cancer Res.* 2015;21(3):505-13.
- Kahn M, Kim Y. The role of the Wnt signaling pathway in cancer stem cells: prospects for drug development. *Res Rep Biochem.* 2014;1:1-12.
- Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.* 2004;95(5):377-84.
- Kaseb HO, Fohrer-Ting H, Lewis DW, Lagasse E, Gollin SM. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Cell Res.* 2016;348(1):75-86.
- Katsuno Y, Meyer DS, Zhang Z, Shokat KM, Akhurst RJ, Miyazono K, et al. Chronic TGF- β exposure drives stabilized EMT, tumor stemness, and cancer drug resistance with vulnerability to bitopic mTOR inhibition. *Sci Signal.* 2019;12(570):eaau8544.
- Keck MK, Zuo Z, Khattri A, Stricker TP, Brown CD, Imanguli M, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res.* 2015;21(4):870-81.
- Kemmer JD, Johnson DE, Grandis JR. Leveraging Genomics for Head and Neck Cancer Treatment. *J Dent Res.* 2018;97(6):603-13.
- Kim E-H, Na H-K, Kim D-H, Park S-A, Kim H-N, Song N-Y, et al. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 induces COX-2 expression through Akt-driven AP-1 activation in human breast cancer cells: a potential role of ROS. *Carcinogenesis.* 2008;29(4):688-95.
- Kim HS, Pearson AT, Nör JE. Isolation and Characterization of Cancer Stem Cells from Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumors. *Methods Mol Biol.* 2016;1395:241-9.
- Kodar K. Aberrant glycosylation of the anti-Thomsen-Friedenreich glycotope immunoglobulin G in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2013;19(23):3573.
- Kopan R. Notch Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(10):a011213.
- Korng Ea H, Lioté F. Le classeur immunopathologie pour le praticien, CRI, Chapitre 7 : les communications intercellulaires par les voies de signalisation [Internet]. Club rhumatismes et inflammations. [consulté le 15 juin 2019]. Disponible sur: <http://www.cri-net.com/formation-et-congres/documents-formation/immunopathologie-pour-le-praticien>
- Krause M, Dubrovskaja A, Linge A, Baumann M. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;109:63-73.
- Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010;70(23):9969-78.
- Krishnan S, Whitwell H, Cuenco J, Gentry-Maharaj A, Menon U, Pereira S, et al. Evidence of Altered Glycosylation of Serum Proteins Prior to Pancreatic Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2670.
- Krishnan AR, Korrapati A, Zou AE, Qu Y, Wang XQ, Califano JA, et al. Smoking status regulates a novel panel of PIWI-interacting RNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017;65:68-75.

- Krishnan AR, Zheng H, Kwok JG, Qu Y, Zou AE, Korrapati A, et al. A comprehensive study of smoking-specific microRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2017;72:56-64.
- Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers: Circulating tumour cells in metastatic HNC. *Int J Cancer.* 2015;136(11):2515-23.
- Kumar GK, Abidullah M, Elbadawi L, Dakhil S, Mawardi H. Epidemiological profile and clinical characteristics of oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma: A pilot study in Bidar and Gulbarga Districts, Karnataka, India. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(1):90-6.
- Kurihara K, Isobe T, Yamamoto G, Tanaka Y, Katakura A, Tachikawa T. Expression of BMI1 and ZEB1 in epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2015;34(2):771-8.
- Kuşoğlu A, Biray Avcı Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene.* 2019;681:80-5.
- Kwon T, Chandimali N, Huynh DL, Zhang JJ, Kim N, Bak Y, et al. BRM270 inhibits cancer stem cell maintenance via microRNA regulation in chemoresistant A549 lung adenocarcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2018;9:244.
- Lakins MA, Ghorani E, Munir H, Martins CP, Shields JD. Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells. *Nat Commun.* 2018;9(1):948.
- Lamb R, Bonuccelli G, Ozsvári B, Peiris-Pagès M, Fiorillo M, Smith DL, et al. Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: Understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling. *Oncotarget.* 2015;6:30453-71.
- Larsen C-J. Sphéroïdes : le modèle de référence pour la culture in vitro des tumeurs solides ? *Bull Cancer.* 2018;105(1):25-34.
- Lee SY, Jeong EK, Ju MK, Jeon HM, Kim MY, Kim CH, et al. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation. *Mol Cancer.* 2017;16(1):10.
- Lefebvre J-L, Chevalier D. Épidémiologie des cancers des voies aérodigestives supérieures. *Encycl Med Chir - Oto-rhino-laryngologie.* 2012;7(2):[41900].
- Lenz H-J, Kahn M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci.* 2014;105(9):1087-92.
- Li D, Li Y, Wu X, Li Q, Yu J, Gen J, et al. Knockdown of Mgat5 inhibits breast cancer cell growth with activation of CD4+ T cells and macrophages. *J Immunol.* 2008;180(5):3158-65.
- Li H, Yang BB. Stress response of glioblastoma cells mediated by miR-17-5p targeting PTEN and the passenger strand miR-17-3p targeting MDM2. *Oncotarget.* 2012;3(12):1653-68.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605-31.
- Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev.* 1998;98(2):637-74.
- Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:643-91.
- Luongo F, Colonna F, Calapà F, Vitale S, Fiori ME, De Maria R. PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(8): E1076.
- Maccalli C, Rasul KI, Elawad M, Ferrone S. The role of cancer stem cells in the modulation of anti-tumor immune responses. *Semin Cancer Biol.* 2018;53:189-200.
- Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS ONE.* 2008;3(10):e3360.
- Marcu L, Reid P, Bezak E. The Promise of Novel Biomarkers for Head and Neck Cancer from an Imaging Perspective. *Int J Mol Sci.* 2018b;19(9):2511.
- Martins-Neves SR, Cleton-Jansen A-M, Gomes CMF. Therapy-induced enrichment of cancer stem-like cells in solid human tumors: Where do we stand? *Pharmacol Res.* 2018;137:193-204.
- Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways: *Medicine.* 2016;95:S1(e4765).
- McMullen KP, Chalmers JJ, Lang JC, Kumar P, Jatana KR. Circulating tumor cells in head and neck cancer: A review. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2016;2(2):109-16.

- Mereiter S, Balmaña M, Gomes J, Magalhães A, Reis CA. Glycomic Approaches for the Discovery of Targets in Gastrointestinal Cancer. *Front Oncol.* 2016;6.(55):1-19.
- Méry B. Targeting head and neck tumoral stem cells: From biological aspects to therapeutic perspectives. *World J Stem Cells.* 2016a;8(1):13.
- Mito A, Nakano Y, Saitoh T, Gouraud SSS, Yamaguchi Y, Sato T, et al. Lectin ZG16p inhibits proliferation of human colorectal cancer cells via its carbohydrate-binding sites. *Glycobiology.* 2018;28(1):21-31.
- Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, et al. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett.* 2012a;322(2):139-47.
- Moriwaki K, Asahi M. Augmented TME O-GlcNAcylation Promotes Tumor Proliferation through the Inhibition of p38 MAPK. *Mol Cancer Res.* 2017;15(9):1287-98.
- Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M. Oral Potentially Malignant Disorders: An Overview of More than 20 Entities. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect.* 2014;8(1):6-14.
- Mortezaee K, Parwaie W, Motevaseli E, Mirtavoos-Mahyari H, Musa AE, Shabeeb D, et al. Targets for improving tumor response to radiotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2019;76:105847.
- Munkley J, Elliott DJ. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget.* 2016;7(23):35478-89.
- Muraro MG, Mele V, Däster S, Han J, Heberer M, Cesare Spagnoli G, et al. CD133+, CD166+CD44+, and CD24+CD44+ Phenotypes Fail to Reliably Identify Cell Populations with Cancer Stem Cell Functional Features in Established Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(8):592-603.
- Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol.* 2019a;234(6):8381-95.
- Najafi M, Mortezaee K, Ahadi R. Cancer stem cell (a)symmetry & plasticity: Tumorigenesis and therapy relevance. *Life Sci.* 2019b;231:116520.
- Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci.* 2019c;234:116781.
- Nam-Cha SH, Serrano-Vargas R, Escario E, Azaña JM, Calero-Oliver R, Martín AG, et al. CD133 Expression in Normal Skin and in Epithelial Cutaneous Tumors. *BioMed Res Int.* 2013;2013:385604.
- Nardy AFFR, Freire-de-Lima L, Freire-de-Lima CG, Morrot A. The Sweet Side of Immune Evasion: Role of Glycans in the Mechanisms of Cancer Progression. *Front Oncol.* 2016;6(54):1-7.
- Nimmakayala RK, Batra SK, Ponnusamy MP. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019;1871(1):50-63.
- Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *J Dent Res.* 2018;97(6):701-8.
- Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982;31(1):99-109.
- Ohyama C, Tsuboi S, Fukuda M. Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. *EMBO J.* 1999;18(6):1516-25.
- Okamoto T, Yoneyama MS, Hatakeyama S, Mori K, Yamamoto H, Koie T, et al. Core2 O-glycan-expressing prostate cancer cells are resistant to NK cell immunity. *Mol Med Rep.* 2013;7(2):359-64.
- Orian-Rousseau V. CD44, un régulateur de la croissance et de l'invasion cellulaire. *médecine/sciences.* 2003;19(4):405-7.
- Pakkiriswami S, Couto A, Nagarajan U, Georgiou M. Glycosylated Notch and Cancer. *Front Oncol.* 2016;6(37):1-8.
- Peacock CD, Wang Q, Gesell GS, Corcoran-Schwartz IM, Jones E, Kim J, et al. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(10):4048-53.
- Pearson AJ, Gallagher ES. Overview of Characterizing Cancer Glycans with Lectin-Based Analytical Methods. *Methods Mol Biol.* 2019;1928:389-408.

- Pearson AT, Jackson TL, Nör JE. Modeling head and neck cancer stem cell-mediated tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(17):3279-89.
- Peiris D, Ossono M, Fry S, Loizidou M, Smith-Ravin J, Dwek MV. Identification of O-Linked Glycoproteins Binding to the Lectin Helix pomatia Agglutinin as Markers of Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS ONE.* 2015;10(10):e0138345.
- Peitzsch C, Tyutyunnykova A, Pantel K, Dubrovskaya A. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin Cancer Biol.* 2017;44:10-24.
- Peixoto A, Relvas-Santos M, Azevedo R, Santos LL, Ferreira JA. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks. *Front Oncol.* 2019;9:380.
- Phi LTH, Sari IN, Yang Y-G, Lee S-H, Jun N, Kim KS, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int.* 2018;2018:5416923.
- Piao LS, Hur W, Kim T-K, Hong SW, Kim SW, Choi JE, et al. CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2012;315(2):129-37.
- Pluot M, Cahn V, Ducasse A. L'immunohistochimie en anatomie pathologique ophtalmologique: intérêt et limites. *J Fr Ophtalmol.* 2006;29(8):946-56.
- Polverini PJ, D'Silva NJ, Lei YL. Precision Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res.* 2018;97(6):614-21.
- Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S, et al. Identification and Characterization of Cancer Stem Cells from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(2):784-98.
- Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(5).a008052.
- Prakruthi B, Babu N. Circulating tumor cells in oral squamous cell carcinoma: An insight. *Indian J Cancer.* 2015;52(2):232.
- Prasad S, Ramachandran S, Gupta N, Kaushik I, Srivastava SK. Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;S0925443919300717.
- Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(3):973-8.
- Rambaruth NDS, Dwek MV. Cell surface glycan-lectin interactions in tumor metastasis. *Acta Histochem.* 2011;113(6):591-600.
- Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(5):338-51.
- Reid P, Marcu LG, Olver I, Moghaddasi L, Staudacher AH, Bezak E. Diversity of cancer stem cells in head and neck carcinomas: The role of HPV in cancer stem cell heterogeneity, plasticity and treatment response. *Radiother Oncol.* 2019;135:1-12.
- Reinisch CM, Uthman A, Erovcic BM, Pammer J. Expression of BMI-1 in normal skin and inflammatory and neoplastic skin lesions. *J Cutan Pathol.* 2007;34(2):174-80.
- Revilla G, Corcoy R, Moral A, Escolà-Gil JC, Mato E. Cross-Talk between Inflammatory Mediators and the Epithelial Mesenchymal Transition Process in the Development of Thyroid Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):1-21.
- Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(6):708-15.
- Rodriguez-Ramirez C, Nör JE. p53 and Cell Fate: Sensitizing Head and Neck Cancer Stem Cells to Chemotherapy. *Crit Rev Oncog.* 2018;23(3-4):173-87.
- Saboia Aragão K. Etudes structure-fonction de lectines (DiscI et DiscII) de *Dictyostelium discoideum* [Thèse de doctorat : biologie structurale et nano biologie]. [Grenoble] : Université Joseph Fourier – Grenoble 1; 2008.

- Safa AR. Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells. *Crit Rev Oncog*. 2016;21(3-4):203-19.
- Sainson RCA, Harris AL. Hypoxia-regulated differentiation: let's step it up a Notch. *Trends Mol Med*. 2006;12(4):141-3.
- Samraj A, Läubli H, Varki N, Varki A. Involvement of a Non-Human Sialic Acid in Human Cancer. *Front Oncol*. 2014;4(33):1-13.
- Samraj AN, Pearce OMT, Läubli H, Crittenden AN, Bergfeld AK, Banda K, et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(2):542-7.
- Sandberg CJ, Altschuler G, Jeong J, Strømme KK, Stangland B, Murrell W, et al. Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt- signaling and a fingerprint associated with clinical outcome. *Exp Cell Res*. 2013;319(14):2230-43.
- Santos PS, Cremonesi AL, Quispe RA, Rubira CM. The impact of oral health on quality of life in individuals with head and neck cancer after radiotherapy: the importance of dentistry in psychosocial issues. *Acta Odontol Latinoam*. 2017;30(2):62-7.
- Schiffman JD, Fisher PG, Gibbs P. Early Detection of Cancer: Past, Present, and Future. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:57-65.
- Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;51(1):1-28.
- Shen Y-A, Wang C-Y, Hsieh Y-T, Chen Y-J, Wei Y-H. Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle*. 2015;14(1):86-98.
- Shibata M, Shen MM. The roots of cancer: Stem cells and the basis for tumor heterogeneity. *BioEssays*. 2013;35(3):253-60.
- Shimoda M, Ota M, Okada Y. Isolation of Cancer Stem Cells by Side Population Method. *Methods Mol Biol*. 2018;1692:49-59.
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2111-20.
- Sola AM, Johnson DE, Grandis JR. Investigational multitargeted kinase inhibitors in development for head and neck neoplasms. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019;28(4):351-63.
- Song Y, Wang Y, Tong C, Xi H, Zhao X, Wang Y, et al. A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *Br J Cancer*. 2017;116(8):973-89.
- Sousa EMF de, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt Signaling in Colon Cancer Stem Cells. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):647-53.
- Srivastava AK, Banerjee A, Cui T, Han C, Cai S, Liu L, et al. Inhibition of miR-328-3p Impairs Cancer Stem Cell Function and Prevents Metastasis in Ovarian Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(9):2314-26.
- Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*. 2018;172(4):841-856.e16.
- Sun X, Jiao X, Pestell TG, Fan C, Qin S, Mirabelli E, et al. MicroRNAs and cancer stem cells: the sword and the shield. *Oncogene*. 2014;33(42):4967-77.
- Sun Y, Cheng L, Gu Y, Xin A, Wu B, Zhou S, et al. A Human Lectin Microarray for Sperm Surface Glycosylation Analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(9):2839-51.
- Sun Z, Hu W, Xu J, Kaufmann AM, Albers AE. MicroRNA-34a regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype of head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Oncol*. 2015a;47(4):1339-50.
- Sun Z, Hu W, Xu J, Kaufmann AM, Albers AE. MicroRNA-34a regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype of head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Int J Oncol*. 2015b;47(4):1339-50.

- Syed P, Gidwani K, Kekki H, Leivo J, Pettersson K, Lamminmäki U. Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. *Proteomics*. 2016;16(8):1257-65.
- Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(8):473-83.
- Takahashi H, Sakakura K, Mito I, Ida S, Chikamatsu K. Dynamic changes in immune cell profile in head and neck squamous cell carcinoma: Immunomodulatory effects of chemotherapy. *Cancer Sci*. 2016;107(8):1065-71.
- Takamiya R, Ohtsubo K, Takamatsu S, Taniguchi N, Angata T. The interaction between Siglec-15 and tumor-associated sialyl-Tn antigen enhances TGF- β secretion from monocytes/macrophages through the DAP12-Syk pathway. *Glycobiology*. 2013;23(2):178-87.
- Tang Y-A, Chen Y-F, Bao Y, Mahara S, Yatim SMJM, Oguz G, et al. Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(26):E5990-9.
- Taparra K, Tran PT, Zachara NE. Hijacking the Hexosamine Biosynthetic Pathway to Promote EMT-Mediated Neoplastic Phenotypes. *Front Oncol*. 2016;6(85):1-15.
- Tomasson MH. Cancer stem cells: A guide for skeptics. *J Cell Biochem*. 2009;106(5):745-9.
- Tsubakihara Y, Moustakas A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3672.
- Tsuboi S, Hatakeyama S, Ohyama C, Fukuda M. Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis. *Trends Mol Med*. 2012;18(4):224-32.
- Tuccillo FM, de Laurentiis A, Palmieri C, Fiume G, Bonelli P, Borrelli A, et al. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *Biomed Res Int*. 2014;2014:742831.
- Vajaria BN, Patel KA, Patel PS. Role of aberrant glycosylation enzymes in oral cancer progression. *J Carcinog*. 2018;17:5.
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 1998;17(6):575-692.
- Vander Broek R, Mohan S, Eytan D, Chen Z, Van Waes C. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies. *Oral Dis*. 2015;21(7):815-25.
- Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2017;27(1):3-49.
- Wang D, Plukker JTM, Coppes RP. Cancer stem cells with increased metastatic potential as a therapeutic target for esophageal cancer. *Semin Cancer Biol*. 2017;44:60-6.
- Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang X-F, White RR, et al. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(1):17-28.
- Wang J, Wu Y, Gao W, Li F, Bo Y, Zhu M, et al. Identification and characterization of CD133+CD44+ cancer stem cells from human laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *J Cancer*. 2017;8(3):497-506.
- Wang T, Shigdar S, Gantier MP, Hou Y, Wang L, Li Y, et al. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget*. 2015;6:44191-206.
- Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015a;17(1):1-15.
- Whiteside TL. Head and Neck Carcinoma Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(1):6-13.
- Wong ALA, Bellot GL, Hirpara JL, Pervaiz S. Understanding the cancer stem cell phenotype: A step forward in the therapeutic management of cancer. *Biochem Pharmacol*. 2019;162:79-88.
- Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(2):618-23.
- Wu X-L, Tu Q, Faure G, Gallet P, Kohler C, Bittencourt MDC. Diagnostic and Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:20210.

- Xiang M, Holsinger FC, Colevas AD, Chen MM, Le Q-T, Beadle BM. Survival of patients with head and neck cancer treated with definitive radiotherapy and concurrent cisplatin or concurrent cetuximab: A Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare analysis. *Cancer*. 2018;124(23):4486-94.
- Xiao M, Liu L, Zhang S, Yang X, Wang Y. Cancer stem cell biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma: A bioinformatic analysis. *Oncol Rep*. 2018;40(6):3843-51.
- Yang C, Wang X, Liao X, Han C, Yu T, Qin W, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) isoform expression and potential clinical implications in hepatocellular carcinoma. Lu S-N, éditeur. *PLOS ONE*. 2017;12(8):e0182208.
- Yeh D-W, Huang L-R, Chen Y-W, Huang C-YF, Chuang T-H. Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells: The Role of Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol Res*. 2016;2016:4368101.
- Yoshizaki T, Kondo S, Endo K, Nakanishi Y, Aga M, Kobayashi E, et al. Modulation of the tumor microenvironment by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci*. 2018;109(2):272-8.
- Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *J Cell Physiol*. 2020;235(1):65-73.
- Yu Y, Zhang WB, Wang Y, Liu XJ, Guo CB, Yu GY, et al. [Application of three-dimensional reconstruction of the enhanced CT with iPlan CMF software in head and neck neoplasms]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2017;49(5):878-82.
- Yüce I, Bayram A, Çağlı S, Canöz O, Bayram S, Güney E. The role of CD44 and matrix metalloproteinase-9 expression in predicting neck metastasis of supraglottic laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 2011;32(2):141-6.
- Zhang D, Tang DG, Rycaj K. Cancer stem cells: Regulation programs, immunological properties and immunotherapy. *Semin Cancer Biol*. 2018a;52:94-106.
- Zhang L, Luo S, Zhang B. The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. *MAbs*. 2016;8(3):524-35.
- Zhang M, Mathur A, Zhang Y, Xi S, Atay S, Hong JA, et al. Mithramycin represses basal and cigarette smoke-induced expression of ABCG2 and inhibits stem cell signaling in lung and esophageal cancer cells. *Cancer Res*. 2012;72(16):4178-92.
- Zhang Z, Wuhrer M, Holst S. Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj J*. 2018b;35(2):139-60.
- Zhao Q, Zhan T, Deng Z, Li Q, Liu Y, Yang S, et al. Glycan analysis of colorectal cancer samples reveals stage-dependent changes in CEA glycosylation patterns. *Clin Proteomics*. 2018a;15:9.
- Zhao Y, Dong Q, Li J, Zhang K, Qin J, Zhao J, et al. Targeting cancer stem cells and their niche: perspectives for future therapeutic targets and strategies. *Semin Cancer Biol*. 2018b;53:139-55.
- Zhou S-M, Cheng L, Guo S-J, Wang Y, Czajkowsky DM, Gao H, et al. Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17:36.

Les opinions émises dans les dissertations présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, sans aucune approbation ni improbation de la Faculté de Chirurgie Dentaire.

GNAHO Sylvain. Cellules souches tumorales et cancers des VADS : enjeux et perspectives. 2020. 92 p. : ill., graph. Réf. Biblio. : 85-91.

Sous la direction du Professeur LESCAILLE Géraldine

Th : Chir Dent. : Paris 7 : année 2020

RESUME :

Les cellules souches cancéreuses (CSC) jouent un rôle particulier dans les cancers des VADS. Leurs différentes caractéristiques sont au cœur des grandes problématiques en matière de diagnostic et de traitement.

Les voies de signalisation régulant l'activité cellulaire et l'homéostasie sont modifiées dans les phénomènes tumoraux et s'accompagnent de modifications de glycosylation. Ces modifications s'entretiennent dans une boucle d'échange avec le micro-environnement tumoral et notamment avec les CAF's (cancer associated fibroblasts) à travers la libération de molécules glycosylées.

Des modifications de glycosylations particulières sont liées à certaines des caractéristiques des CSC. Elles peuvent être reconnues de manière spécifique par des lectines. Ce type de marquage semble présenter un niveau plus élevé de spécificité que les techniques actuelles.

Ces éléments permettent d'envisager une méthode de diagnostic spécifique, précoce et prédictif des cancers des VADS.

Des perspectives dans le domaine thérapeutique sont également ouvertes, notamment grâce à la fonctionnalisation possible des lectines.

Nous considérons cette technique de marquage aux lectines comme prometteuse et enthousiasmante en vue d'améliorer le diagnostic, et à terme les traitements des cancers en général et de ceux des VADS en particulier.

DISCIPLINE : Chirurgie Buccale

MOTS-CLES Français : Cellules souches tumorales (FMeSH) – Lectines (FMeSH)– Tumeur de la tête et du cou (FMeSH) – Ciblage.

TITRE en anglais: Head and neck squamous cancer and cancer stem cells: prospects and issues.

MOTS-CLES anglais: Neoplastic stem cells (MeSH) – Lectins (MeSH) – Head and neck neoplasms (MeSH) – Targeting.

Université de Paris
UFR d'odontologie
5, rue Garancière
75006 Paris