

Université de Montréal

Rôles de K-RAS et de ERCC1 dans le traitement
des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou
traités par chimioradiothérapie concomitante

par
Olivier-Michel Abboud, M.D.
Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales (M.Sc)
Option générale

Août 2012

© Olivier-Michel Abboud, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:
**Rôles de K-RAS et ERCC1 dans le traitement
des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou
traités par chimioradiothérapie concomitante**

Présenté par :
Olivier-Michel Abboud M.D.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Gerald Batist
président-rapporteur

Dr Denis Soulières, M.D.
directeur de recherche

Dr Louis Guertin, M.D.
codirecteur

Dr Olguta Gologan, M.D.
membre du jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

Introduction: Les mutations du gène RAS sont présentes dans plusieurs types de cancers et ont une influence sur la réponse à la chimiothérapie. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) est un gène impliqué dans la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), et son polymorphisme au codon 118 est également associé à la réponse au traitement. Le peu d'études pronostiques portant sur ces deux gènes dans les cancers oto-rhino-laryngologiques (ORL) ne permet de tirer des conclusions claires.

Objectifs: Déterminer l'influence des mutations de K-RAS codons 12 et 13 et du polymorphisme de ERCC1 codon 118 dans le traitement des cancers épidermoïdes avancés tête et cou traités par chimioradiothérapie concomitante à base de sels de platine.

Méthode: Extraction de l'ADN provenant de spécimens de biopsie de patients traités par chimioradiothérapie concomitante pour des cancers avancés tête et cou, et ayant un suivi prospectif d'au moins deux ans. Identification des mutations de K-RAS codons 12 et 13 et du polymorphisme de ERCC1 au codon 118 dans les spécimens et corrélation de ces marqueurs avec la réponse au traitement.

Résultats: Les mutations de K-RAS codon 12 sont associées à un moins bon contrôle loco-régional par rapport aux tumeurs ne démontrant pas la mutation (32% vs 83% $p=0.03$), sans affecter pour autant la survie globale. Aucune mutation de K-RAS codon 13 n'a été identifiée. Les différents polymorphismes de ERCC1 n'ont pas eu d'impact sur la réponse au traitement.

Conclusion: Les mutations de K-RAS codons 12 et 13 et le polymorphisme de ERCC1 au codon 118 ne semblent pas mettre en évidence les patients qui bénéficieraient d'une autre modalité thérapeutique.

Mots clés: K-RAS, ERCC1, carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, chimiothérapie, radiothérapie, sels de platine, polymorphisme, biomarqueurs

RÉSUMÉ ANGLAIS – ENGLISH ABSTRACT

Background: RAS gene mutations have been shown to occur in certain malignancies and have an impact treatment response and overall prognosis. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) is a gene implicated in deoxyribonucleic acid (DNA) repair, whose polymorphism at codon 118 has been linked to treatment response. Studies of these two genes in head and neck oncology literature have shown inconsistent results.

Objectives: Determine the influence of K-RAS mutations (codons 12 and 13) and the polymorphism of ERCC1 codon 118 in patients with locally advanced head and neck cancer treated with concomitant platinum-based chemoradiation therapy.

Methods: DNA extraction from paraffin-embedded biopsy specimens of patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma treated with concomitant chemoradiation and followed prospectively for at least two years. Identification of K-RAS mutations (codons 12 and 13) and ERCC1 codon 118 polymorphism in the extracted DNA. Correlation of these markers with treatment response.

Results: K-RAS codon 12 mutations were associated with a worse locoregional control than tumors without any mutations (32% vs 83% $p=0.03$); however, mutational status did not influence overall survival. No K-RAS codon 13 mutation was identified in our specimens. The different ERCC1 polymorphisms did not have an impact on treatment response.

Conclusion: K-RAS mutational status (codon 12 and 13) and ERCC1 codon 118 polymorphism does not seem to discriminate between patients for whom another treatment option should be sought in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma.

Key words: K-RAS, ERCC1, head and neck squamous cell carcinoma, chemotherapy, radiotherapy, platinum salts, polymorphism, biomarkers

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	iii
RÉSUMÉ ANGLAIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LA LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LA LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES.....	ix
REMERCIEMENTS.....	x
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction.....	2
1.2 Épidémiologie et étiologie.....	3
1.3 Anatomie et histologie.....	8
1.3.1 Anatomie.....	8
1.3.2 Histologie.....	10
1.4 Biologie moléculaire des cancers de la tête et du cou.....	12
CHAPITRE DEUXIÈME : RÔLE DE K-RAS.....	18
2.1 Résumé.....	19
2.2 Introduction.....	20
2.3 Patients et méthodes.....	23
2.4 Résultats.....	25
2.5 Discussion.....	26
2.6 Conclusion.....	28

CHAPITRE TROISIÈME : RÔLE DE ERCC1.....	31
3.1 Résumé.....	32
3.2 Introduction.....	33
3.3 Patients et méthodes.....	34
3.4 Résultats.....	36
3.5 Discussion.....	37
3.6 Conclusion.....	39
CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION.....	43
4.1 Mécanismes de résistance au cisplatine.....	44
4.2 ERCC1 et la voie du NER.....	45
4.3 Rôle prédictif de ERCC1 dans la réponse à la chimiothérapie.....	48
4.4 La voie de signalisation de RAS.....	50
4.5 Implication thérapeutique de RAS.....	52
4.6 RAS et les CETEC.....	53
CHAPITRE CINQUIÈME : CONCLUSION.....	56
CHAPITRE SIXIÈME : BIBLIOGRAPHIE.....	58

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU DE L'ARTICLE 1 :

Table 1: Patients' characteristics and treatment intention.....	29
---	----

TABLEAU DE L'ARTICLE 2 :

Table 1: Patients' characteristics and treatment intention.....	40
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Effet synergique du tabac et de l'alcool dans le développement des CETEC	6
Figure 2 : Relation entre les différents sites anatomiques de la tête et du cou.....	9
Figure 3 : Évolution histologique d'un carcinome épidermoïde.....	12
Figure 4 : Transformation d'une muqueuse saine en cancer à travers des anomalies génétiques successives.....	13
Figure 5 : Voies de signalisation de EGFR.....	16
FIGURE DE L'ARTICLE 1 :	
Figure 1 : Kaplan-Meier projected overall survival of wild-type K-RAS compared to mutated.....	30
FIGURES DE L'ARTICLE 2	
Figure 1 : Kaplan-Meier projected overall survival of the three genotypes of ERCC1.....	41
Figure 2 : Kaplan-Meier projected disease-free survival of the three genotypes of ERCC1.....	42

LISTE DES SIGLES

ADN : Acide désoxyribonucléique

BER : Base Excision Repair

CETEC : Carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

DNA : Deoxyribonucleic acid

EBV : Epstein-Barr Virus

EGF : Epidermal growth factor – Facteur de croissance de l'épiderme

EGFR : Epidermal growth factor receptor – Récepteur du facteur de croissance épidermique

ERCC1: Excision repair cross complementation group 1

GAP : GTPase activating proteins

GEF : Guanine nucleotide exchange factors

GST : Gène suppresseur de tumeur

HB-EGF : Heparin-binding EGF-like growth factor

HNSCC : Head and neck squamous cell carcinoma

IGF: Insulin-like growth factor

IGF-1R : Insulin-like growth factor-1 receptor

kDa : kilodalton

MMR : Mismatch Repair

NER : Nucleotide Excision Repair

NSCLC : Non small-cell lung cancer – cancer pulmonaire non à petites cellules

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORL : Oto-rhino-laryngologie ou oto-rhino-laryngologique

PDGF : Platelet derived growth factor

PI3-K/Akt : Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protéine kinase B

Rb : Rétinoblastome

HSV : Herpes Simplex Virus – Virus de l'Herpès Simplex

SNP : Single nucleotide polymorphism

VADS : Voies aéro-digestives supérieures

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPH : Virus du papillome humain

XP : Xeroderma pigmentosum

REMERCIEMENTS

Cette thèse de maîtrise n'aurait pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de plusieurs personnes. Dans son œuvre *Citadelle*, St-Exupéry écrit : « Le véritable enseignement n'est point de te parler mais de te conduire. » Si j'ai été conduit à cet aboutissement de plusieurs années de recherche, c'est grâce à tous ceux qui m'ont accordé leur confiance et permis de travailler à leur côté.

Je remercie énormément Dr Denis Soulières, mon directeur de recherche, qui m'a supervisé tout au long des années et m'a transmis son enthousiasme pour la recherche à travers ses idées innovatrices. Un grand merci à Dr Xiaodoan Weng qui a dirigé mes travaux en laboratoire. Merci au programme d'ORL, particulièrement à son directeur, Dr Louis Guertin, qui m'a donné la chance de faire cette maîtrise durant ma résidence. Merci à Dr Félix Nguyen qui m'a introduit au monde de la recherche. Merci à Dr Jean-Claude Tabet pour toute son aide. Merci aux Drs Bernard Fortin et Sébastien Clavel pour leurs analyses statistiques. Sincères remerciements à Louise Robin, Marie-Lise Audet et Ginette Lapointe pour leur aide en laboratoire.

Merci également à ma famille, à mon frère Camille et sa femme Nadine, à ma sœur Caroline et son mari Élias. Merci à mon parrain et ma marraine, Victor et Ado Bardagi, pour leurs encouragements continuels. Merci à Marie-Constance Lacasse, Carl Attié, Daniel Dallala, Moustapha Nahouli, Radu Pescarus et Karl Sayegh, mes fidèles compagnons de voyage.

Je dédie cette maîtrise à mes parents, Samir et Salwa, pour leur support indéfectible.

CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION

1.1 Introduction

Chaque année, 500 000 carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (CETEC) sont diagnostiqués à travers le monde [1] et plus de 270 000 personnes vont en mourir [2]. Les CETEC représentent environ 6% de tous les cancers [2] et 5% de leur mortalité attribuable [2, 3]. Aux États-Unis, les cancers de la cavité orale, du pharynx et du larynx secondaires au tabagisme étaient responsables de 11 331 décès annuellement entre 1997 et 2001, et de 131 479 années potentielles de vie perdues [4]. Les coûts pour la société sont considérables : plus de 2,8 milliards de dollars annuels aux États-Unis en perte de productivité et plus de trois milliards en coûts reliés directement au traitement du cancer [5, 6].

De par leur localisation au niveau de la cavité orale, du pharynx et du larynx, les CETEC affectent des fonctions importantes, telles la phonation et la déglutition. Pour réussir à guérir ces maladies, les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie entraînent malheureusement souvent une toxicité importante avec des limitations fonctionnelles majeures telles la xérostomie ou l'aspiration chronique nécessitant trachéotomie et/ou gastrostomie. De plus, les chirurgies dans les cancers avancés peuvent être mutilantes et extensives; celles-ci nécessitent souvent la résection du larynx, de la langue ou de la mandibule, entraînant des chirurgies complexes de reconstruction.

Néanmoins, les avancées médicales dans les vingt dernières années ont permis deux réalisations majeures grâce à la chimiothérapie et la radiothérapie: la préservation de l'organe ainsi que sa fonction et l'amélioration de la survie globale. Bien que ces percées aient permis d'augmenter la survie de ces malades, il n'en demeure pas moins que la survie globale se situe entre 30 et 60% à cinq ans et que les traitements affectent la qualité de vie des patients de façon significative.

Plusieurs questions nécessitant réflexion se posent alors. Pourquoi certains patients répondent au traitement médical alors que d'autres non? Pourquoi un CETEC situé dans un site anatomique identique chez deux patients se comporte-t-il différemment avec le

même traitement? Deux éléments peuvent nous donner une piste de réflexion : la cellule cancéreuse et l'hôte. L'activité intrinsèque de chaque cellule cancéreuse en termes d'altération génétique, de gènes clés mutés ou d'anomalies chromosomiques peut expliquer la sensibilisation préférentielle d'une cellule à la chimiothérapie ou la radiothérapie. La biologie génétique unique de chaque individu joue un rôle majeur dans la pharmacodynamique et l'effet biologique des agents de chimiothérapie. Certaines caractéristiques de la cellule cancéreuse et de l'hôte peuvent donc être associées à une moins bonne réponse à la chimiothérapie ou radiothérapie, c'est-à-dire la chimiorésistance.

Il sera impératif dans le futur de déterminer les facteurs de radiorésistance et de chimiorésistance aux sels de platine, les agents les plus utilisés dans les CETEC. Ces facteurs de chimiorésistance et de radiorésistance tant intrinsèques à la cellule cancéreuse et à l'hôte dicteront le traitement optimal dans les CETEC. Cette individualisation du traitement permettra de sélectionner les patients qui pourront répondre aux sels de platine ou à la radiothérapie, et ainsi offrir une alternative thérapeutique à ceux qui ne bénéficieront pas de ces traitements.

Deux gènes connus, un lié à la cellule et l'autre à l'hôte, sont des facteurs de résistance à la chimiothérapie. Les mutations de K-Ras, un proto-oncogène, sont associées à la chimiorésistance, notamment dans les cancers digestifs [7]. L'autre gène, ERCC1, est impliqué dans la réparation de l'ADN et associé à la chimiorésistance aux sels de platine. Il a été surtout étudié dans les cancers digestifs et pulmonaires [8, 9]. Peu d'études sur ces biomarqueurs ont été publiées dans les CETEC et leurs résultats ne permettent pas de tirer des conclusions précises. La présente étude vise à établir et clarifier le rôle de ces deux gènes dans les CETEC avancés traités par chimioradiothérapie concomitante.

1.2 Épidémiologie et étiologie

Les CETEC représentent le cinquième cancer en importance dans le monde et sont endémiques dans certaines régions d'Asie [2]. La Mélanésie a la plus grande incidence de

nouveaux cancers (25,9 cas / 100 000 habitants), suivie de l'Asie Centrale/Sud et de l'Europe (France, Espagne, Portugal, Hongrie et autres pays de l'Est) [10, 11]. Les cancers de la cavité orale sont les plus communs en Inde [12]. Plus de 80 000 personnes sont diagnostiquées annuellement avec un cancer du nasopharynx, hautement prévalent dans le sud de la Chine [11]. Au Canada, 4350 nouveaux cas de CETEC ont été diagnostiqués en 2006 [13].

Aux États-Unis, l'incidence des CETEC est à la baisse (~ 25 cas / 100 000 habitants en 1987 vs ~ 15 cas / 100 000 habitants en 2007). Celle-ci est plus élevée chez les Caucasiens par rapport aux populations afro-américaines. Cependant, la mortalité est plus grande chez les Afro-Américains [6], probablement parce que les cancers de l'oropharynx dans cette population présentent un statut du virus du papillome humain (VPH) négatif [14].

Les hommes comptent pour deux tiers des nouveaux cas de CETEC [10]. Les trois quarts de ces cancers affectent la cavité orale et le pharynx; le reste est représenté par les cancers du larynx. Il semble y avoir une corrélation entre ces cancers et le statut socio-économique. Par exemple, au Canada, les CETEC sont associés à un statut socio-économique plus faible, en raison de la consommation plus élevée d'alcool et de tabac dans ce groupe [15].

Il existe plusieurs facteurs de risque dans la genèse des CETEC. Les principales étiologies sont révisées.

Tabac et alcool

Le tabac et l'alcool sont responsables de 80% des CETEC [16]. Le risque est proportionnel avec l'importance et la durée de la consommation.

Un tabagisme significatif augmente de 5 à 25 fois le risque de développer un CETEC [17], surtout au niveau de la cavité orale ou du larynx [3]. La consommation de tabac

peut se faire par voie d'inhalation (cigarette, pipe, cigare), mais aussi par voie orale (tabac à chiquer). Chiquer du tabac est typiquement associé aux cancers de la cavité orale, spécifiquement au niveau de la crête alvéolaire ou de la muqueuse buccale [18] [3]. La fumée secondaire est également associée à un risque accru de cancers de la langue chez la femme [19]. Le rôle de la marijuana reste encore à déterminer, vu que la cigarette et l'alcool sont des facteurs confondants [16].

L'alcool est surtout associé aux cancers du pharynx [3]. Le risque est multiplié par 5 à 125 avec 4 à 8 consommations par jour respectivement [20] [16]. L'effet synergique de l'alcool et du tabac a été démontré dans de nombreuses études [21] [22] [23]. L'effet est plus exponentiel qu'additionnel. Il varie en fonction du type d'alcool et de tabac consommé (figure 1).

La chique de feuille de Bétel

En Inde et dans certaines régions d'Asie, le tabac est souvent chiqué avec des feuilles de Bétel. Cet agent est fortement associé aux cancers de la cavité orale et a un effet synergique avec l'alcool et le tabac. La noix d'arec peut être mélangée avec la chique tabagique et induire une fibrose sous-muqueuse pré-cancéreuse dans la bouche. La consommation de ces produits en Grande-Bretagne est à la hausse en raison d'une immigration forte asiatique [24] [3].

Le maté

Le maté est une tisane populaire en Amérique du Sud, issue de l'herbe *Ilex paraguariensis*. Son association aux CETEC (possiblement à l'origine de 20% des CETEC) serait secondaire à son rôle de solvant ou promoteur pour d'autres carcinogènes [25] [26] [3].

L'hygiène orale

Une hygiène orale déficiente est associée à un risque accru de CETEC, sans qu'un lien de causalité clair n'ait été établi [3]. L'inflammation chronique des gencives pourrait cependant l'expliquer.

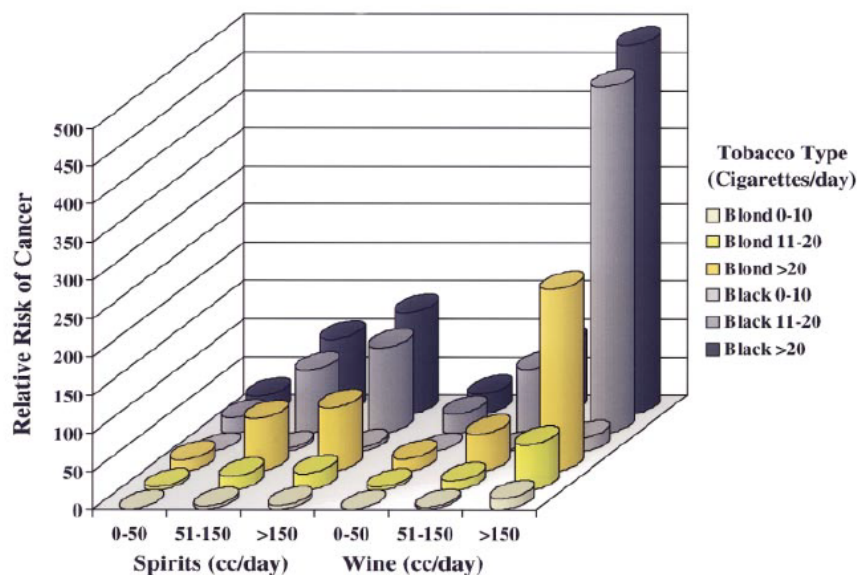


Figure 1 : Effet synergique du tabac et de l'alcool dans le développement des CETEC. Adapté de : Shah, J. P. (2001). *Cancer of the Head and Neck*. Hamilton, London, BC Decker.

Exposition environnementale

Plusieurs carcinogènes environnementaux sont associés aux CETEC : le perchloéthylène, l'amiante, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la poudre de bois, le gaz de moutarde, le charbon, le ciment, les peintures, les produits dérivés du plastique et du caoutchouc, la naphthalène, le formaldéhyde et les vapeurs d'acide sulfurique. Les mécaniciens, machinistes et les travailleurs dans le domaine textile sont également à risque [3, 16].

Les virus

Le virus Epstein-Barr (EBV) est impliqué dans la pathogénèse de plusieurs types de lymphomes. Dans la sphère ORL, il est un agent étiologique dans le développement des carcinomes nasopharyngés, particulièrement les grades histologiques 2 et 3 définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [27].

Le VPH, particulièrement les sous-types 16 et 18, est fortement associé aux CETEC, particulièrement aux carcinomes de l'oropharynx. Il agit en inactivant les protéines des gènes suppresseurs de tumeurs, p53 et rétinoblastome (Rb), à travers les oncoprotéines virales E6 et E7 [28].

Le virus de l'Herpès Simplex (HSV) a été corrélé dans plusieurs études aux CETEC. Sa valeur pronostique n'a pas été établie et son association est plus faible que les deux virus mentionnés plus haut [29, 30].

Le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a pour sa part été associé aux cancers de la cavité orale [16].

La diète

Une diète riche en fruits et en légumes contenant des anti-oxydants tels la vitamine C et la vitamine E, de la bêta-carotène et du zinc, semble avoir un effet protecteur dans le développement des CETEC. Pour les cancers du nasopharynx, les produits en conserve contenant de la nitrosamine, le poisson traité par salaison et le beurre ranci (consommé dans le Maghreb) sont des facteurs de risque [16, 24].

Les facteurs génétiques et immunologiques prédisposants

On retrouve une incidence accrue de CETEC dans plusieurs syndromes : Li-Fraumeni (mutation de p53), ataxie-telangiectasie, syndrome de Bloom, anémie de Fanconi. Tous

ont en commun des mutations génétiques associées à une instabilité chromosomale [3]. Les patients immunosupprimés et ayant subi des transplantations d'organes sont à risque de cancer de la lèvre [16].

Autres

Un CETEC déjà traité dans le passé est un des plus importants facteurs de risque pour en développer un nouveau. Ce risque est estimé à 4% par année et est probablement secondaire à des mutations silencieuses acquises suite l'exposition chronique antérieure à des carcinogènes et se développant après un certain nombre d'années. La radiothérapie peut également provoquer des cancers radio-induits [31, 32].

1.3 Anatomie et histologie

1.3.1 Anatomie

Les CETEC se retrouvent dans la cavité orale, le nasopharynx, l'oropharynx, l'hypopharynx ou laryngopharynx, le larynx et les sinus paranasaux. Ils peuvent également se présenter sous la forme d'un ganglion unique cervical.

Les sites anatomiques (figure 2) comprennent plusieurs sous-sites [33]; il est important de bien les distinguer, car chaque tumeur peut avoir un comportement et un pronostic différents en fonction du sous-site impliqué.

La cavité orale

La cavité orale s'étend de la jonction peau-vermillon supérieurement à la jonction palais dur-palais mou et inférieurement aux papilles circumvallées. Elle comprend la lèvre muqueuse, la muqueuse buccale, la crête alvéolaire supérieure et inférieure, le trigone rétromolaire, le plancher buccal, le palais dur et les deux-tiers antérieurs de la langue.

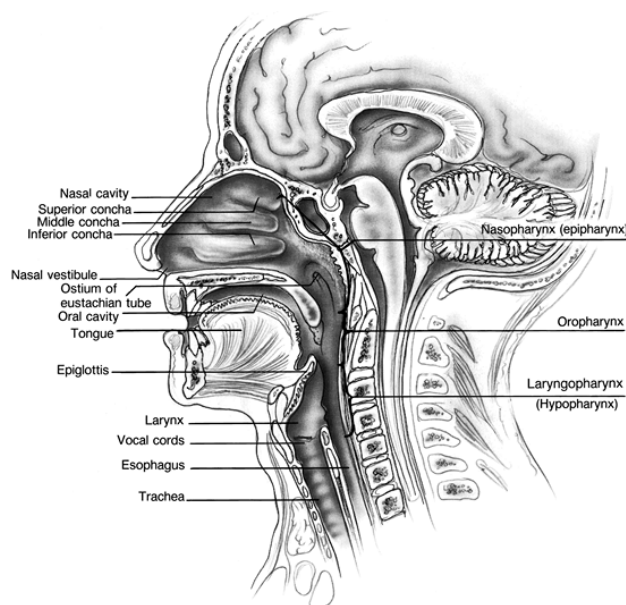


Figure 2 : Relation entre les différents sites anatomiques de la tête et du cou. Tiré de :Bailey B., Head and Neck Surgery – Otolaryngology. 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 2006

Le nasopharynx

Le nasopharynx est délimité des choanes postérieures jusqu'au rebord libre du palais mou. Il contient la voûte, les murs latéraux (fosse de Rosenmuller et les tori) ainsi que le mur postérieur pharyngé.

L'oropharynx

L'oropharynx s'étend du plan formé par le palais mou jusqu'au plancher de la vallécule. Il inclut la base de la langue, la face inférieure du palais mou et de la luette, les piliers amygdaliens antérieurs et postérieurs, les sulcus glosso-amygdaliens, les amygdales et les murs pharyngés latéraux et postérieurs.

L'hypopharynx

L'hypopharynx est délimité par le plan s'étendant du plancher de la vallécule jusqu'au rebord inférieur du cartilage cricoïdien. Il est composé des sinus pyriformes, des murs

pharyngés postérieurs et latéraux ainsi que de la région post-cricoïdienne.

Le larynx

L'anatomie du larynx est un plus complexe et s'étend de l'épiglotte à la région sous-glottique. Il est divisé en trois parties : la supraglotte, la glotte et la sous-glotte. La supraglotte comprend l'épiglotte supra et infra-hyoïdienne, les replis aryépiglottiques, les aryténoïdes et les bandes ventriculaires. La glotte contient les cordes vocales ainsi que les commissures antérieure et postérieure. La sous-glotte s'étend de 10 mm sous les ventricules laryngés jusqu'à la portion inférieure du cartilage cricoïde.

Les sinus paranasaux

Les sinus paranasaux sont composés des sinus frontaux, maxillaires, ethmoïdiens et du sphénoïde.

Chaque CETEC a un site de drainage lymphatique cervical préférentiel avant de donner des métastases à distance. A noter que certaines volumineuses tumeurs, notamment au niveau des sinus paranasaux ou du nasopharynx, peuvent transgresser la base du crâne en envahir directement le système nerveux central.

1.3.2 Histologie

Plus des 90% des cancers de la tête et du cou sont des carcinomes épidermoïdes, d'origine épithéliale. D'autres cancers épithéliaux (lymphoépithéliome, carcinome sinonasal, carcinome d'origine des glandes salivaires, etc.), cancers des tissus mous (fibrosarcome, rhabdomyosarcome, etc.), cancers de l'os et du cartilage, cancers hématolymphoïdes forment le reste des cancers [34].

Un épithélium squameux stratifié non kératinisant tapisse la cavité orale et le pharynx, exceptés les amygdales et le nasopharynx [35]. La muqueuse de ce dernier, dérivée de

l'endoderme, possède un épithélium mixte partiellement squameux stratifié et respiratoire (pseudostratifié cilié). Les amygdales (oropharynx) et les adénoïdes (nasopharynx) ont une composante lymphoïde proéminente avec des centres germinaux. Au niveau du larynx, l'épiglotte et les vraies cordes vocales sont alignées d'un épithélium squameux stratifié. Les ventricules, les bandes ventriculaires et la sous-glotte sont composés d'un épithélium respiratoire cilié pseudostratifié. Les cavités nasales et les sinus sont formés d'une muqueuse embryologiquement dérivée de l'ectoderme, appelée muqueuse shneiderienne, et constituée d'épithélium pseudostratifié cilié en colonne.

Il est important de reconnaître deux grandes catégories de lésions précancéreuses identifiable tout le long des voies aéro-digestives supérieures: la leucoplasie et l'érythroplasie [34]. La leucoplasie, ou plaque blanchâtre, est un diagnostic clinique associé surtout à de l'hyperplasie cellulaire à l'histologie. Dans 3% des cas, la pathologie démontre un carcinome infiltrant en l'absence de dysplasie cellulaire. En présence de dysplasie, cette proportion augmente à 10% [36]. L'érythroplasie, ou plaque rougeâtre, a un potentiel de carcinome infiltrant estimé à 30%.

Il est important de différencier l'hyperplasie de la dysplasie. Dans l'hyperplasie, le nombre de cellules est augmenté, mais l'architecture demeure normale et ne présente pas d'atypie. Dès que l'architecture de l'épithélium est perturbée et que ceci est accompagné d'atypies cellulaires, le terme dysplasie s'applique. La dysplasie est légère lorsque l'architecture de l'épithélium est anormale dans son tiers inférieur. Lorsque l'architecture est perturbée dans le tiers moyen épithélial, la dysplasie est qualifiée de modérée. La dysplasie sévère s'accompagne d'altérations de plus de deux tiers de l'épithélium et d'atypies cellulaires marquées. Il peut être difficile de différencier la dysplasie sévère du carcinome in situ vu que l'aspect morphologique de l'épithélium est grossièrement semblable et qu'il n'y a pas de transgression de la lame basale. Lorsque la quasi-totalité de l'épithélium est envahi en plus d'importantes altérations cellulaires, on a tendance à qualifier l'anomalie de carcinome in situ [36]. Il existe donc une évolution graduelle histologique d'une muqueuse saine à un carcinome invasif (figure 3).

Il existe plusieurs sous-types de carcinomes épidermoïdes [37]. Le carcinome épidermoïde kératinisant, le prototype de ces cancers, est le plus commun. Le carcinome épidermoïde non kératinisant est associé au VPH et se retrouve dans près de 50% des cancers de l'oropharynx [231]. Le carcinome basaloïde est une variante plus agressive. Le carcinome adénoquameux possède une double composante épidermoïde et adénocarcinomateuse. Le carcinome verruqueux est une forme exophytique localement agressive. Finalement, il existe des variantes papillaire et sarcomatoïde.

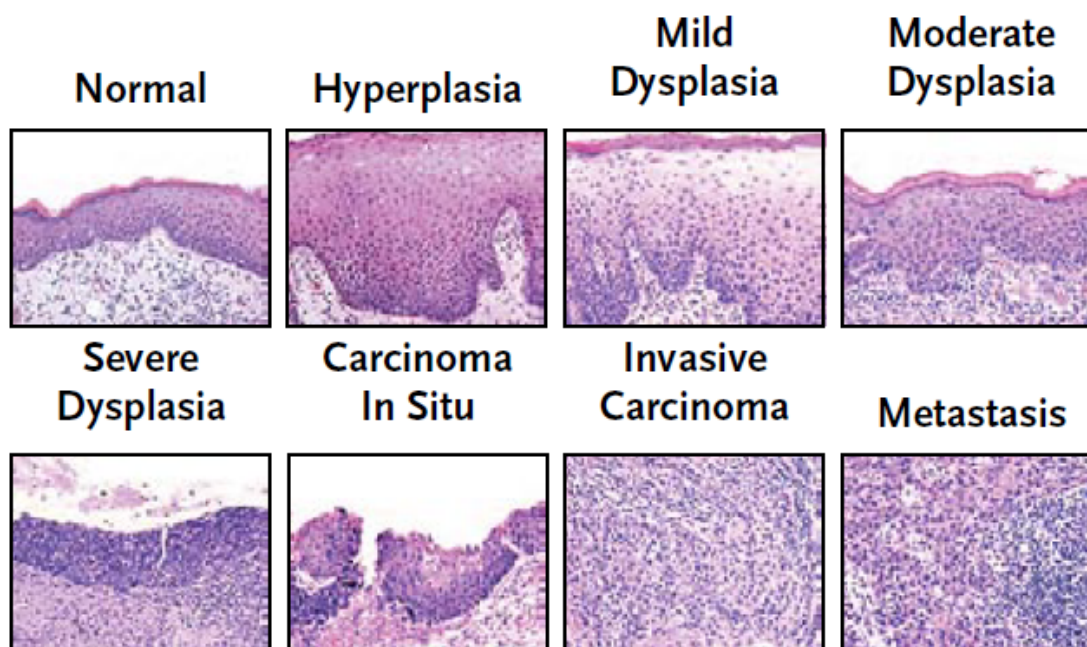


Figure 3 : Évolution histologique d'un carcinome épidermoïde. Tiré de : Haddad, R. I. and D. M. Shin (2008). "Recent advances in head and neck cancer." *N Engl J Med* 359(11): 1143-1154.

1.4 Biologie moléculaire des CETEC

Plus de 90% des cancers de la sphère ORL sont des carcinomes épidermoïdes. Malgré ceci, il s'agit d'une maladie très hétérogène empêchant la mise en place d'un traitement standard efficace pour tous [38]. Cette hétérogénéité a pour assise des mécanismes moléculaires différents d'une tumeur à l'autre.

Plusieurs études ont démontré à ce jour que les CETEC originent de lésions pré-malignes ayant des altérations génotypiques puis phénotypiques qui graduellement vont conduire à des cellules cancéreuses [39-41]. Les anomalies génétiques telles les délétions, mutations, amplifications, etc. inactivent les gènes suppresseurs de tumeurs (GST) et activent les proto-oncogènes. Cependant, des phénomènes épigénétiques, tels l'hyperméthylation de promoteurs peuvent également, en recrutant de la chromatine, inactiver un GST [42]. Il est nécessaire que les deux allèles des GST soient mutés pour que le gène perde sa fonction. La perte d'un des deux gènes peut être compensée par l'autre allèle ayant un génotype sauvage [43]. Cette perte de fonction des GST a un effet délétère en permettant à la cellule de proliférer sans aucune régulation et de manière totalement autonome. Une mutation d'un seul gène codant pour un proto-oncogène va aider les cellules à atteindre un phénotype malin [44]. Typiquement, six altérations de la physiologie normale cellulaire mène au phénotype malin : l'autonomie dans la croissance cellulaire, la perte de l'apoptose, l'insensibilité aux messagers inhibiteurs de la croissance, la réplication infinie, l'angiogenèse et l'invasion locale et à distance [45]. Chaque stade de transformation d'un épithélium squameux stratifié en cancer correspond grossièrement à une ou plusieurs séquences spécifiques d'altérations génétiques (figure 4). Plus la cellule altérée s'éloigne de la cellule normale, plus le spectre d'anomalies génétiques est grand et variable [1].

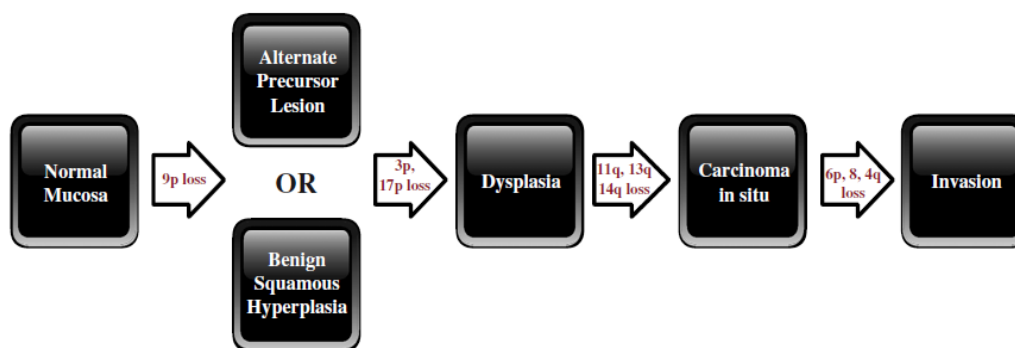


Figure 4 : Transformation d'une muqueuse saine en cancer à travers des anomalies génétiques successives.
Tiré de Stadler, M. E., M. R. Patel, et al. (2008). "Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways." *Hematol Oncol Clin North Am* 22(6): 1099-1124, vii.

Une des altérations génétiques les plus fréquentes est la perte de la région chromosomale 9p21 qui apparaît dès le stade d'hyperplasie ou de dysplasie légère [41]. Cette perte

d'hétérozygotie se trouve dans près de 80% des CETEC. Cette région code pour les protéines p14 et p16, responsables du cycle cellulaire en phase G1 et de la dégradation de p53 [46]. Dans près de 20% des cas, p16 est également inactivé par hyperméthylation de son promoteur [47]. Une autre anomalie fréquente est la délétion de la région chromosomale 3p, impliqué dans la régulation de GST [46, 48, 49]. Les mutations isolées de TP53, gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine p53, et la perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 17(17p), qui contient le gène TP53, sont retrouvées dans 50% des CETEC. Toutes ces atteintes génétiques vont causer surtout de la dysplasie. Les altérations au niveau des gènes 11q, 13q et 14q mèneront au carcinome in situ [44]. Le carcinome invasif est lié à la perte d'hétérozygotie aux chromosomes 6p, 8p, 4p27 et 10q12 [39]. D'autres études ont associé des anomalies aux chromosomes 5q, 8p, 13p, 18q, et 21q aux CETEC[42]. Les patients avec des pertes de 3p et de 9p ont 3,8 fois plus de chances de progresser vers un CETEC et ce risque augmente à 33 lorsque une mutation de 4q, 8p, 11q, ou 17p s'y ajoute [42].

La surexpression du gène cycline 1 (11q) est associée à un plus grand taux de métastases régionales et à un pronostic défavorable [46]. Normalement, ce gène régule le passage du stade G1 de la cellule au stade S en phosphorylant Rb [46]. Une perte d'hétérozygotie au niveau du locus bcl-1/int-2 contenant le gène entraîne sa surexpression [50]. Cette surexpression, liée à une inactivation de p16 va continuellement induire Rb, favorisant ainsi la multiplication cellulaire.

Un concept clé dans les CETEC est la cancérisation géographique (field cancerization). Ce concept a été développé par Slaughter et al. [51] dans les CETEC, particulièrement les tumeurs de la cavité orale, et propose une explication rationnelle pour les récurrences et les deuxièmes primaires [52] :

- Premièrement, les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS), particulièrement ceux de la cavité orale, apparaissent dans des régions où la muqueuse des tissus avoisinants est dysplasique.

- Deuxièmement, le regroupement de plusieurs petites lésions dysplasiques est visible cliniquement et apparaît comme lésion isolée.
- Troisièmement, les récurrences et les deuxièmes primaires originent de la muqueuse dysplasique résiduelle.

Les voies de signalisation intracellulaires menant à la cancérogenèse sont complexes; celles-ci seront brièvement discutées.

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) et la voie de transduction cellulaire

EGFR joue un rôle déterminant dans le comportement des cellules, dans la mesure où il va initier les signaux de transduction intracellulaires. EGFR correspond à une famille de quatre protéines, ayant un domaine extracellulaire (le récepteur), une région intramembranaire et un domaine intracellulaire avec fonction tyrosine kinase. La première protéine du groupe ayant été isolée est HER-1 (c-erb-1) et la littérature y réfère sous le nom de EGFR. Les autres protéines sont HER-2/neu (c-erb-2), HER3 (c-erbB-3) et HER4 (c-erbB-4)[53]. Une cellule normale peut compter jusqu'à 100 000 récepteurs de EGFR [54]. Dans la majorité des cancers solides, EGFR et/ou HER-2/neu sont surexprimés et ceci est un facteur de mauvais pronostic [55] [56]. Dans les CETEC, plus de 80% des cellules tumorales les surexpriment, un des plus hauts taux tous cancers confondus ([57]. Plusieurs ligands vont activer EGFR: EGF, TGF- α , l'amphiréguline, l'épiréguline, la betacelluline, et l'heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) [58]. HER-2/neu n'a pas de ligands naturels [58, 59]. EGF et TGF- α sont les ligands les plus importants [59]. Suite à la liaison de la molécule avec le récepteur, il existe une homodimérisation de l'EGFR ou une hétérodimérisation avec HER-2, -3 ou -4 du récepteur à la surface de la cellule suivi d'une internalisation du récepteur dimérisé (figure 5)[59]. Après ceci, il y a une autophosphorylation du domaine intra-membranaire qui active la protéine tyrosine kinase [60]. Ceci va activer plusieurs cascades de signalisation intra-cellulaire, dont JAK-STAT, MAPK, PI3K-AKT, et RAS [61]. Plusieurs mutations du récepteur ont été identifiées; la plus commune dans les CETEC est EGFRvIII qui survient dans 40% des cas [61, 62].

La voie du phosphatidylinositol-3-Kinase/Protéine Kinase B (PI3-K/Akt)

PI3-K/Akt est une des voies principales de signalisation intracellulaire de EGFR. Cette voie est vitale au niveau de la régularisation cellulaire [63]. Elle induit plusieurs protéines antiapoptotiques et impliquées dans la prolifération cellulaire : Bcl-2, Bcl-x, et NF- κ B [63]. Cette voie serait activée de façon pathologique dans 50 à 80% des CETEC [64].

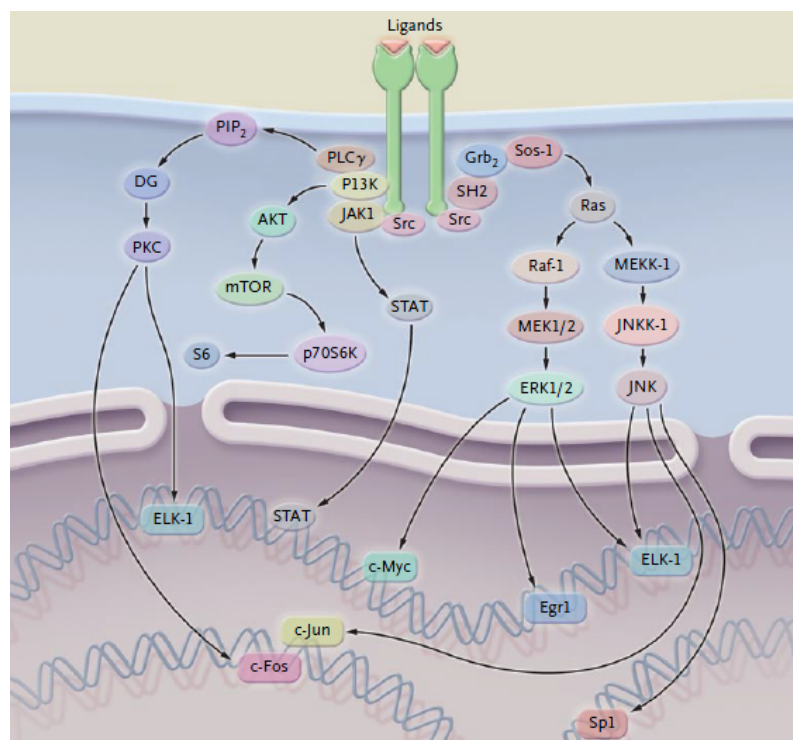


Figure 5 : Voies de signalisation de EGFR. Tiré de : Haddad, R. I. and D. M. Shin (2008).

"Recent advances in head and neck cancer." *N Engl J Med* 359(11): 1143-1154.

Voie de signalisation de RAS

La voie de signalisation de RAS inclut les gènes RAF, phosphoinositide 3-kinase et Ral guanine exchange factors [65], très importants au niveau de la régularisation cellulaire. H-RAS, N-RAS et K-RAS sont les trois gènes de la famille RAS identifiés et ceux-ci sont finement régulés par le cycle GTD-GDP transformant la protéine inactive et protéine

biologiquement active [66]. Les mutations de K-RAS comptent pour 20 à 90% de tous les cancers [67]. Les mutations dans les CETEC sont rares, mais le gène est surexprimé par un processus d'amplification qui contribue au développement du cancer [68].

Rôle du virus du papillome humain

Le VPH envahit les muqueuses épithéliales et les surfaces cutanées de toutes les espèces vertébrées [69]. Les papillomavirus sont des virus à ADN icosahédraux, non encapsulés et mesurant 55 nm de diamètre [69]. Ils sont associés à 10% des carcinomes dans le monde [70]. Près de 90 virus ont été génotypés [71]. Les sous-types 16 et 18 sont surtout associés au cancer. Ces deux sous-types, surtout le 16 vont produire deux glycoprotéines, E6 et E7, responsables de l'oncogenèse du virus. E6 active la télomérase, dégrade p53 et agit comme facteur de transcription [72-74]. E7 inactive Rb et libère plusieurs facteurs de transcription dans la cellule [75].

Rôle du insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R)

IGF-1R est un récepteur hétérotétramérique transmembranaire qui contient deux sous-unités α et β [44]. Il possède une activité tyrosine kinase induite par la phosphorylation et qui a une voie de signalisation intra-cellulaire commune avec EGFR : l'activation de Ras-MAPK-ERK et PI3K/Akt [76]. Six ligands à la protéine existent chez l'humain, dont l'insulin-like growth factor (IGF). Une surexpression du récepteur est fréquente dans les CETEC [77].

Les voies de réparation de l'ADN

De multiples voies de réparation de l'ADN existent et incluent le Nucleotide Excision Repair (NER), le Base Excision Repair (BER) et le Mismatch Repair (MMR). Si ces voies de réparation font défaut à cause d'une mutation ou d'une expression génique diminuée, les altérations génomiques qui en résultent peuvent éventuellement mener vers un cancer.

CHAPITRE DEUXIÈME :

PREVALENCE OF K-RAS CODONS 12 AND 13 MUTATIONS IN
LOCALLY ADVANCED HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL
CARCINOMA AND IMPACT ON CLINICAL OUTCOMES

Prevalence of K-RAS codons 12 and 13 mutations in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and impact on clinical outcomes.

Olivier Abboud¹, Eric Bissada¹, Zahi Abou Chacra¹, Louis Guertin¹, Xiaoduan Weng², Phuc Félix Nguyen-Tan³, Jean-Claude Tabet¹, Louise Robin², Marie-Josée Dion², Marie-Lise Audet², Véronique St-Onge², Bernard Fortin³, Denis Soulières²

¹ Department of Head and Neck Surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

² Department of Hematology and Medical Oncology, CHUM

³ Department of Radiation Oncology, CHUM

N.B. the two first authors (E.B. and O.A.) participated equally in the creation of this manuscript

2.1 Abstract

Background: RAS gene mutations have been shown to occur in certain malignancies and have an impact on response to treatment and overall prognosis for certain types of cancer, more specifically NSCLC and colo-rectal carcinoma. Studies of these mutations in head and neck oncology literature have shown inconsistent results.

Objectives: To determine the prevalence of K-RAS codon 12 and 13 mutations in patients with locally advanced HNSCC treated with chemo-radiation therapy with/without prior surgery and to evaluate the impact of these mutations on loco-regional control as well as overall, disease-free and distant metastasis free survival.

Methods: Out of 428 consecutive patients treated with chemo-radiation therapy in our institution and followed for a median of 37 months, 199 paraffin embedded biopsy or surgical specimens were retrieved. DNA was isolated and analyzed for K-RAS mutational status by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Statistical analysis was performed using Fisher's test for categorical data and Kaplan-Meier's curves and log-rank statistics for failure times.

Results: DNA extraction was successful in 197 patients. Of the 197 specimens, 3.5% presented K-RAS codon 12 mutations using a single PCR technique. Patient characteristics did not differ statistically. For mutated cases and non-mutated cases, complete initial response to chemo-radiation therapy was 71 and 73% ($p=0.32$). LRC was respectively 32 and 83% ($p=0.03$), DFS was 27 and 68% ($p=0.12$), distant metastasis free survival was 100 and 81% ($p=0.30$) and OS was 57 and 65% ($p=0.14$) at three years. K-Ras codon 13 analysis was successful in 166 specimens and revealed no mutation.

Conclusion: K-RAS codon 12 mutational status, although not associated with a difference in response rate, may influence failure pattern and overall aggressiveness and may influence the type of therapy offered to such patients. Our study did not reveal any mutation of K-RAS codon 13 in this large cohort of patients.

2.2 Introduction

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) accounts for 47 000 new malignancies diagnosed each year in the US and is the sixth most common human neoplasm, representing about 3% of all cancers [78]. Despite efforts to improve conventional treatment, survival rates for these cancers have not changed significantly over the past decade.

Initial evaluation of patients includes clinical assessment, histology characteristics and tumor grading as well as local-regional and distant metastasis status. Traditional clinical, radiological and histopathological characteristics are however limited in their ability to accurately predict response to treatment. This has motivated many researchers to identify molecular characteristics that may influence overall prognosis.

The recent and increasing study of molecular biology and genetics is motivated by the belief that understanding the origins of cancer will lead to more logical means of treating these malignancies [79]. Therefore identification of molecular events that lead to HNSCC may represent a key to predicting biological behaviour and may consequently lead to new

treatment modalities needed to increase cure rate in patients [80-83]. Despite the recent progress in field of molecular biology, clinicians still need more tools to predict response to therapy or to identify patients at high risk of poor outcome. Identification of biological markers predictive of treatment failure would potentially permit more aggressive therapy or adaptation of current protocols to these patient groups in order to improve results.

Oncogenes of the *RAS* family are strongly implicated in the pathogenesis of cancer. *K-RAS* gene mutations have been reported in approximately 15-30% of human solid tumours [84-87]. It is the single most common abnormality of dominant oncogenes in human tumors and is a common event in the development and progression of adenocarcinomas of the pancreas (90%), colon (50%), thyroid (50%), bladder (50%) and lung (30%). The *RAS* family of genes is of particular interest in HNSCC because a mechanism for mutation (activation) of *K-RAS* based on tobacco carcinogens has been suggested [88]. Furthermore, *RAS* mutations have been observed in other tobacco-related cancers, namely pancreatic carcinoma and non-small cell lung carcinoma. [83]

The *RAS* gene is known to encode for a family of related proteins, termed p21s, which are associated with the plasma membrane and participate in the transduction of signals involved in cellular growth and differentiation. The conversion of normal *RAS* proto-oncogenes, specifically *K-RAS* to activated oncogenes is usually accomplished by point mutations involving the 12th and occasionally the 13th and 61st codons on chromosome 12. Several carcinogens preferentially bind at codon 12 and create DNA adducts [89]. This results in the expression of abnormal p21 proteins harbouring a single amino acid substitution favouring an active GTP-bound state. This activates the *RAS-RAF* pathway and culminates in a pathologic activation of cellular mitosis.

K-RAS mutations are known to be associated with resistance to chemotherapy and radiation therapy, particularly non-small cell lung and colo-rectal cancers [7, 90]. For metastatic cancer, the response rate to classical regimens of chemotherapy or to tyrosine kinase inhibitors is much lower in patients with the mutation. Hence, survival is lower

and *K-RAS* mutations are considered a negative prognostic factor. These results have not been reproduced in HNSCC.

A limited number of researchers have examined the frequency of these mutations in the development of HNSCC. In a paper published in 1990, Howell and Al. [91] described the first published report of an activated *RAS* oncogene specific to HNSCC. Following that report, others have attempted, through different techniques, to quantify the presence of this specific mutation in head and neck cancers. While some suggested that mutational activation of *RAS* was not associated with the occurrence of HNSCC [79, 83, 86, 92-99] others found that *K-RAS* mutations had a direct causal role in the development of these cancers [100-102].

Current literature describes a low frequency of these mutations in the western hemisphere. Investigations of RAS mutations in the Western World have shown that the incidence of these mutations is estimated to be less than 5% [83, 92, 94-97, 99, 103]. The prevalence of this mutation increases to 18% in countries such as Spain and Taiwan [100, 104] and may be even higher in India [102, 105]. Whereas H-RAS mutation were detected in as much as 35% of Indian oral cancer specimens [106] and has been associated with betel quid chewing, K-RAS mutation results vary considerably [102, 106]. Some investigators have looked at the possible association between *K-RAS* mutations and clinical correlates. The existing literature is however scarce and includes small numbers of patients with wide inclusion criteria making patient samples excessively heterogeneous to properly interpret those results.

From these results, authors have concluded that HNSCC with or without RAS mutations do not seem to differ clinically from each other [104].

Over-expression of the of the RAS gene product p21 in HNSCC has been reported by a number of groups despite the low incidence of RAS mutations in head and neck cancers [68]. Abnormal expression of RAS genes may be attributed to mutation in the promoters of the genes and not to the coding region itself. The expression of this protein seems to be

increased in well differentiated cancers whereas severely dysplastic lesions and poorly differentiated cancers show little amounts of this protein [107]. Authors have found a correlation between increased p21 and a more malignant and invasive biological behaviour [68, 82, 96, 108-111] whereas others have correlated this with a favourable clinical prognosis [99, 107, 112]. In contrast, increased RAS p21 were found in poorly differentiated cancers correlating with increased disease free survival [112]. Oral cancers positive for H-RAS mutations may actually fare better than those who do not harbour the mutation as suggested by Anderson [86]. This finding however was not shown to be statistically significant do to the small number of positive tumors. No reference to prognosis was made by Saranath [106, 113] in regards to oral tumors positive for this particular mutation in 20/57 of Indian oral specimens.

The objectives of our study were to determine the prevalence of K-RAS codons 12 and 13 mutations in patients with locally advanced HNSCC treated with chemo-radiation therapy with/without surgery and to evaluate the impact of these mutations on loco-regional control as well as overall, disease free and distant metastasis free survival at three years.

2.3 Patients and Methods

All available paraffin embedded biopsy or surgical tissue blocks of four hundred and twenty-eight consecutive patients with stage III and IV head and neck squamous cell carcinoma treated with chemo-radiation therapy at Centre Hospitalier de l'université de Montréal – Hôpital Notre-Dame (Montreal, Canada) and followed for a minimum of 24 months were retrieved. Data was collected prospectively from a regular assessment of outcome variables such as response rates, local or regional recurrences, and survival rates by means of regular clinical and radiological evaluations. All patients had histological confirmation of SCC based on histological features in hematoxylin and eosin-stained tissue sections diagnosed by a pathologist experienced in head and neck pathology. Three to eight sections of 10 μ m were obtained from each tumor. To avoid cross-contamination during sectioning, disposable microtome blades were used, and the microtome was

cleaned after cutting each specimen. The paraffin was removed by xylene and ethanol, and the tissue was then be incubated in 200 μ l lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 20 mM NaCl) containing 0.2 mg/mL proteinase K for 2 hours at 55° C. The mixture was then heated at 96°C for 5 minutes in order to inactivate proteinase K. Optic density was calculated for the supernate after having centrifuged the mixture at 12000 G for 20 minutes. Four hundred ng of the prepared DNA was used as the template for K-RAS gene amplification and the remaining mixture was stored at -80°C for repeat analysis using the nested PCR technique.

PCR amplification of K-RAS of codons 12 and 13

PCR was performed in 100 μ l of reaction mixture containing a 400 to 500ng of DNA, following a technique described by Hatzaki et al. [114]. Forward primer incorporated a C residue mismatch at the first position of codon 11. This created a BstNI restriction enzyme cleavage site in the amplified normal allele after PCR amplification. This cleavage site was absent in the amplified mutated DNA strand when any of the known point mutations were found on codon 12. Reverse primer incorporated a G residue mismatch at the first intron as a positive control for BstNI digestion. For codon 13, a mismatched downstream primer was used, creating and HaeIII restriction site in the wild-type allele.

Digestion of the PCR end products

For codon 12, digestion was carried out with BstNI. For codon 13, HaeIII digestion was carried out. Samples were then analyzed with 6% polyacrylamide gel electrophoresis. Mutated K-RAS codon 12 had a 143bp strand, whereas wild-type had two strands of 114bp and 29 bp. Mutated K-RAS codon 13 had two strands of 85bp and 74bp, whereas wild-type had three strand measuring 85bp, 48bp and 26bp. Positive controls for all mutations, derived from cell lines were run with each PCR. Cell line SW480 (ATCC inc., Manassas, VA) has a homozygous mutation of K-RAS codon 12. Cell line HCT116 (ATCC inc., Manassas, VA) has a heterozygous mutation of codon 13.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Fisher's test for categorical data and Kaplan-Meier's curves and log-rank statistics for disease free survival, overall survival and loco-regional control.

2.4 Results

All available tissue samples of 428 consecutive patients treated with chemo-radiation therapy in our institution were retrieved. In total, 199 paraffin embedded biopsy or surgical specimens were recovered. DNA extraction was accomplished successfully in 197 of these. Patient characteristics did not differ statistically. Seventy-seven percent of specimens were from male subjects. Primary tumor site is listed in Table 1. Seventy-nine percent of patients were stage IV at initial presentation. Chemotherapeutical treatment involved combined carboplatin and 5FU in the majority of patients (55%) and single agent platinum salts base drugs for the remainder of patients. K-RAS codon 12 mutations were detected in 7 of 197 DNA samples (3,5%). This value increases to 8 (4%) with the use of nested technique suggesting an adequate sensitivity in detecting K-RAS mutations with simple PCR-RFLP and by reproducing these results, confirms that these are in fact accurate (data not shown). None of the samples showed mutations involving codon 13.

No statistically significant correlation could be made between degree of histological differentiation and presence or absence of K-RAS codon 12 mutations, nor could a correlation be made between this mutation and stage of disease, recurrence or second primary tumor formation. Mutations involving K-RAS codon 12 was not more prevalent according to gender. Four of the mutations were from oropharyngeal cancers showing an even distribution between base of tongue and tonsillar lesions. The remaining three mutations were from laryngeal specimens two of which were supra-glottic and one being glottic carcinoma.

Complete initial response to chemo-radiation therapy was not influenced by mutational status. For mutated cases and non-mutated cases, complete initial response to chemo-radiation therapy was 71 and 73% respectively ($p=0.32$). At three years, a statistically significant difference is observed for local-regional control between mutated and non mutated cases, with respective values of 32% and 83% ($p=0.03$). Disease-free survival was 27 and 68% ($p=0.12$), distant metastasis free survival was 100 and 81% ($p=0.30$) and overall survival was 57 and 65% ($p=0.14$) at three years. Lifetime results were not different when using the nested technique (data not shown).

2.5 Discussion

The prevalence of K-RAS codon 12 mutations in our study population is in agreement with what has been previously published in the western world. Contrary to one report which could only identify K-RAS codon 12 mutations using a nested technique, our results indicate that simple PCR-RFLP was able to clearly identify 7 of the 8 mutated specimens studied. However, K-RAS codon 13 mutation is a very rare event in HNSCC. In a study on sinonasal carcinoma, 1% of squamous cell carcinomas harboured a K-RAS codon 12 mutation and there were no mutations in codon 13 [89]. Furthermore, no codon 13 mutations were found in 22 SCC of the larynx in a study by Rizos et al. [97]. Also, in the study conducted by Weber et al., only one case of HNSCC out of 89 harboured a codon 13 mutation [115].

We haven't analysed the other two well known RAS oncogenes in our study. Our estimate may therefore be conservative in that RAS gene mutations other than K-RAS may be present. K-RAS gene mutations may only represent 50% of RAS mutations in head and neck cancer specimens [104]. Furthermore, K-RAS mutations themselves may have been underestimated since codon 59 and 61 have not been ascertained in our study; however, mutations in these codons are even less frequent.

On the other hand, K-RAS mutations found in head and neck specimens may possibly represent mutations in the lymphocytic infiltration of the carcinoma and not the

malignant epithelium itself as described by Chang & al[116]. Blood sampling verifying this possibility was not carried out. Tissue samples showing K-RAS codon 12 mutations did not show a more aggressive pattern on histology than those without the mutation.

Our study failed to determine the chronological occurrence of these mutations since all tissue specimens studied were from advanced stage III and IV cancers. All of the mutations were found in advanced stage IV disease and recurrences. Its role in early stages of carcinogenesis has not been ascertained. Whether or not K-RAS activation plays a part in early carcinogenesis remains a possibility [98, 101]. Inducible activation of K-ras in the oral cavity of mice has been objectified by Caulin & al.[117] These tumors represent early stages of tumor progression, and their differentiation characteristics resemble those observed in benign human oral lesions.

In our population, tumors demonstrating K-RAS codon 12 mutations did not show an increased metastatic potential over its non mutated counterpart. Thyroid cancer on the other hand demonstrates a substantial difference in occurrence of RAS gene activation between papillary (20%) and follicular (80%) cancers, suggesting a relation between this pattern and the marked difference in metastatic potential of these tumor types [118]. RAS gene activation, usually by point mutation, may be an important event in the transformation of glandular tissue to adenocarcinoma but seems less important in SCC formation [94].

Treatment of HNSCC has evolved over the last two decades to incorporate modalities that have resulted in decreased morbidity of afflicted HNSCC patients. Unfortunately, mortality over the same time span has shown little improvement.

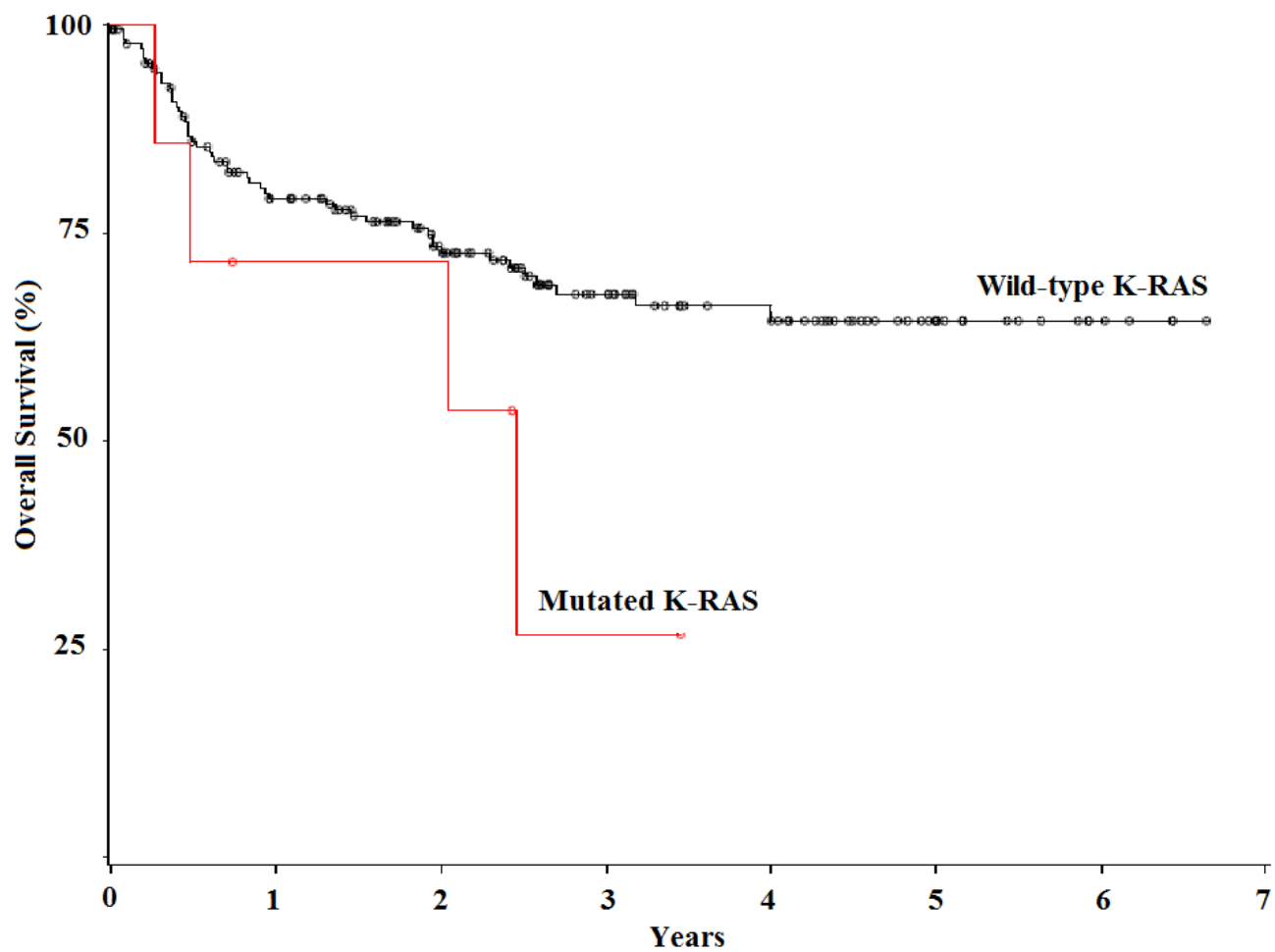
2.6 Conclusion

Although the prevalence of K-RAS codon 12 mutations is below 5 % in the western hemisphere, the benefit of searching for such a mutation is not without consequence. Just as sarcomas represent only a fraction of laryngeal tumors and is treated surgically, HNCSS with K-RAS codon 12 mutations may represent a subset of tumors requiring special treatment considerations in order to improve outcomes. Histology has long been accepted as the way to diagnose and characterise tumors eventually orienting treatment of afflicted patients. Molecular biology and the search for certain markers must also be considered as an added tool which could help distinguish between tumors that behave differently but share the same histological characteristics. Inherent limitations of histology may therefore be partially overcome and treatment outcomes may be improved with specific treatment modalities.

TABLE 1

Patients' characteristics and treatment intention				
Characteristic	K-RAS codon 12 (no mutation)	K-RAS codon 12 (mutation)	K-ras codon 13	All
Sex - M/F	144/44	6/1	-	150/45
Age – yr	56	62	-	56
Stage -				
II	2	0	0	2
III	31	0	0	31
IV	148	6	0	154
Relapse	7	1	0	8
Site of primary tumor				
mouth	21	0	0	21
oropharynx	119	4	0	123
larynx	26	3	0	29
hypopharynx	11	0	0	11
other	11	0	0	11
Tumor stage				
T1	21	1	0	22
T2	39	1	0	40
T3	60	1	0	61
T4	61	3	0	64
Nodal stage				
N0	21	0	0	21
N1	31	0	0	31
N2	103	5	0	108
N3	25	1	0	26
Radiotherapy				
Conventional	170	6	0	176
Adjuvant	18	0	0	18
Chemotherapy				
Cisplatin	61	1	0	62
Carboplatin	126	6	0	132

FIGURE 1



Kaplan Meier projected overall survival of wild-type K-RAS compared to mutated K-RAS

CHAPITRE TROISIÈME :

ERCC1 POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED
HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA TREATED WITH
CONCOMITANT CHEMORADIATION: PREVALENCE
AND IMPACT ON TREATMENT EFFICACY

ERCC1 polymorphism in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated with concomitant chemoradiation: Prevalence and impact on treatment efficacy

Olivier Abboud¹, Xiaoduan Weng², Louis Guertin¹, Éric Bissada¹, Zahi Abou Chacra¹, Phuc-Félix Nguyen-Tan³, Bernard Fortin³, Jean-Claude Tabet¹, Radu Pescarus⁴, Marie-Lise Audet², Denis Soulieres²

¹ Department of Head and Neck Surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

² Department of Hematology and Medical Oncology, CHUM

³ Department of Radiation Oncology, CHUM

⁴ Department of General Surgery, CHUM

3.1 Abstract

Background: Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) is a gene coding for the nucleotide excision repair complex. Its increased expression and polymorphism at codon 118 have been linked to poor response to chemotherapy or chemoradiation in several types of cancer. ERCC1 removes the cisplatin adducts on the DNA of cells and its polymorphism appears to be a marker of chemotherapeutic resistance to platinum-based therapy.

Objectives: To determine the prevalence of the polymorphism of ERCC1 (codon 118) in patients with locally advanced HNSCC treated with concomitant platinum-based chemoradiation therapy with or without prior surgery, and its effect on efficacy evaluated by locoregional control, disease-free survival and overall survival.

Methods: Prospective data on efficacy was available on 460 consecutive patients treated with concomitant chemoradiation in our institution with a minimal follow-up of 2 years. Of these, 255 fixed and paraffin embedded biopsies or surgical specimens were collected. DNA was extracted from specimens and polymorphism of codon 118 was determined using a PCR technique. All analysis were performed using Kaplan-Meier survival curves, Fisher's test for categorical data and log-rank statistics for failure times.

Results: DNA extraction was successful in 252 patients. Polymorphism mapping was possible in 202 specimens. Genotypic distribution in the population was the following:

AAT/AAT:41% (Gr1), AAC/AAT: 47%(Gr2), AAC/AAC: 12% (Gr3). At 3 years, evaluation of efficacy for Gr1, Gr2 and Gr3 was determined. Locoregional control was respectively 77%, 84% and 70% (p=NS), DFS was 61%, 70% and 60% (p=NS), and OS was 70%, 72% and 67% (p=NS).

Conclusions: ERCC1 codon 118 polymorphism did not have an impact in our population on response to chemoradiation therapy. It can be postulated that ERCC1 codon 118 does not seem to discriminate patients for whom another treatment option should be sought for patients with locally advanced SCCHN.

3.2 Introduction

During the last decades, personalizing cancer care has been the main focus of oncologists. Individualizing chemotherapy (CT), radiotherapy (RT) and surgery taking into account not only the tumor's intrinsic activity but the host's genetic characteristics, is becoming the cornerstone of treatment. DNA repair pathways have been extensively studied as they were recognized as a potential link between cancer biology and treatment response: first, for their important role in cancer susceptibility for failing to repair somatic mutations leading to cancer; second, for the survival advantage they confer during chemotherapy, especially with platinium agents [119]. Cisplatin forms several bulky DNA adducts, which include inter-strand and intra-strand DNA cross-links [120]. Those in turn can lead to cell death by activating a complex intra-cellular apoptosis cascade [121].

Excision Repair Cross Complementation Group 1 (ERCC1) is a DNA repair gene highly conserved throughout evolution [122], whose expression has been associated to treatment response in gastric, colon, pulmonary, head & neck and ovarian cancers. It was the first gene to be cloned and sequenced in the NER pathway complex [123], which repairs DNA bulky covalent insults secondary to platinum agents, UV lights, cyclobutane pyrimidine dimers, polycyclic aromatic hydrocarbons, mitomycin C, psoralen, nitrogen mustard and possibly other heavy metals [124-126]. Inborn defects in the NER pathway complex are recognized to cause three distinct rare entities: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and

trichothiodystrophy [127]. Absence of ERCC1 activity is associated with very important deficits in DNA repair [124]; and knockout mice for ERCC1 die prematurely from liver, kidney and spleen abnormalities, as well as severe developmental delay [128, 129]. This leads to believe that ERCC1 is essential for life [124, 128]. One hundred and nine single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ERCC1 have been reported [130]. Some are missense mutations, causing an amino acid change, but most are silent mutations without any change in the amino acid [130] sequence. One of the most studied and prevalent polymorphism, located at the codon 118 (cluster id rs11615), seems to influence the expression of the gene [131], although its significance is not entirely understood.

The purpose of the present study is to evaluate the influence of the codon 118 polymorphism on overall response in advanced head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy with platinum-based chemotherapy.

3.3 Patients and Method

Patients and specimens

After approval by our Institutional Ethics Committees, all available paraffin embedded biopsy or surgical tissue blocks of four hundred and twenty-eight consecutive patients with stage III and IV head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) treated with chemo-radiation therapy at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal – Hôpital Notre-Dame (Montreal, Canada) and followed for a minimum of 24 months were retrieved. Data was collected prospectively from a regular assessment of outcome variables such as response rates, local or regional recurrences, and survival rates by means of regular clinical and radiological evaluations. All patients had histological confirmation of SCC from all subsites based on histological features in hematoxylin and eosin-stained tissue sections diagnosed by a pathologist experienced in head and neck pathology. Patients had to be at least 18 years old at diagnosis and have a Karnofsky performance status scale ≥ 70 . All patients received platinum-based chemotherapy, either cisplatin or carboplatin, concomitantly with ≥ 60 Gy of radiotherapy.

Two major CT protocols were used in our institution. The low dose daily CT protocols was based on a study by Jeremic et al.[132]. Because of the high toxicity rate with this regimen, all the other patients were treated with high dose CT on a 3-week basis following studies made by the GORTEC group [133] and by the RTOG 9111[134].

DNA extraction

Three to eight sections of 10 μ m were obtained from each paraffin embedded specimen. To avoid cross-contamination during sectioning, disposable microtome blades were used, and the microtome was cleaned with a 95% ethanol solution after cutting each specimen. The paraffin was removed by xylene and ethanol, and the tissue was then be incubated in 200 μ l lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0, 20 mM NaCl) containing 0.2 mg/mL proteinase K for 2 hours at 55° C. The mixture was then heated at 96°C for 5 minutes in order to inactivate proteinase K. Optic density was calculated for the supernate after having centrifuged the mixture at 12000 G for 20 minutes. Five hundred nanograms of the prepared DNA was used as the template for ERCC1 gene amplification and the remaining mixture was stored at -80°C.

PCR amplification of ERCC1 codon 118

PCR was performed using 500 ng of genomic DNA, following a technique described by Viguiet et al. [9]. Two sets of primers were used to amplify a 413 bp fragment that contained codon 118 (exon 4): 5V-GTGCGAGGAGGCAGGAGGTGTGGG-3V and 5V-TGTTGCACTGGGCACCTCCAGGCC-3V. Each primer was diluted to achieve a final working concentration of 50 μ mol/L in the master mix. We added the following reagents to the solution in order to obtain a total mixture of 50 μ l: 5 μ L of a buffer with MgCl₂ 15 mM, 5 μ l of deoxynucleotide triphosphate 2 mM, 0,5 μ l of MgCl₂, 1 μ l of BSA, 1 μ l of Hot-Star Taq DNA polymerase 10X (Qiagen) and 10 μ l of Q solution 5X. Deionized water was added to complete 50 μ l. The final mix was denaturized for 15 minutes at 95°C. This step was followed by 50 cycles of successive 30-second denaturation at 94°C, 30-second annealing at 60°C and

30-second elongation of at 72°C. Elongation was continued for 10 minutes at the end of those cycles.

Digestion of the PCR end products

The 413 bp fragment contains a restriction site recognized by BsrDI that specifically cleaves the AAT allele of codon 118 into two smaller fragments of 253 pb et 160 pb. The AAC genotype is not cut and remains 413 bp long. A 10 µl solution containing 2 µL of buffer with MgCl₂ 15 mM, 0.2 µL BSA, 1 µL BsrDI (2 U/µl) and water was mixed with 10 µl of PCR product for a digestion phase of 5 h at 65 °C. Samples were then put for migration on a 0.8% agarose gel.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Fisher's test for categorical data and Kaplan-Meier's curves and log-rank statistics for disease free survival, overall survival and loco-regional control. Survival was calculated from the first day of chemotherapy or radiotherapy. P value < 0,05 was considered statistically significant.

3.4 Results

All available tissue samples of 451 consecutive patients treated with concomitant chemo-radiation therapy for advanced HNSCC in our institution were retrieved. In total, 255 paraffin embedded biopsy or surgical specimens were recovered. DNA extraction was accomplished successfully in 252 of these. ERCC1 genotype mapping was successful in 202 specimens. All the patients with their corresponding specimens were analyzed in this study. Median follow-up was 4.6 years. The median age at diagnosis (table 1) and the male to female ratio (approximately 3 to 1) are consistent with what is reported in the literature. Eighty-three percent of the patients had a stage IV disease at presentation. The others had a stage III. One hundred and thirty-eight patients (68.5%) were treated with carboplatin-5-FU. The other 63 patients received cisplatin. Data concerning chemotherapy was missing for one patient. Most

of the patients had an oropharyngeal malignancy (68%), which explains why the majority of them received carboplatin-5-FU [133].

ERCC1 genotyping of the polymorphism at codon 118 was as followed: 94 (47%) patients were heterozygous (CT genotype), 83 (41%) were homozygous at the AAT codon (TT genotype) and 25 (12%) were homozygous at the AAC codon (CC genotype). The three groups were not statistically different in terms of demographics, cancer distribution and treatment.

The ERCC1 genotype did not influence treatment response. Overall survival (figure 1) was 72%, 70% and 67% at three years respectively for the CT, TT and CC genotypes (p= NS). At five years, overall survival was similar between the groups. Disease-free survival (figure 2) was 70%, 61% and 60% at three years respectively for the CT, TT and CC genotypes (p=NS). No difference was observed at 5 years. Locoregional control and distant metastasis-free survival again showed no significant difference at three and five years between the groups.

3.5 Discussion

Treatment with platinum compounds alone or in association with another chemotherapy agent, is the standard of care in several solid malignancies [135], including HNSCC. Cisplatin is to date one of the most potent chemotherapeutic agents [136]. Its cytotoxic mechanism of action involves reaction with the nucleophilic N7 atom of purine bases forming inter-strand and intra-strand (most cytotoxic) cross-links, and DNA-protein cross-links [120, 136]. Carboplatin seems to act in a similar fashion, but its different pharmacokinetics accounts for less severe toxicity [137].

Resistance to platinum compounds exists as initial response to cancer is good but does not last [136]. For example, in head and neck cancer, locoregional control with combined CT/RT in advanced HNSCC can attain 80-90%; however, overall survival generally reaches a plateau at 5 years of 50% [138, 139]. Several mechanisms of platinum resistance have been proposed, particularly: diminished intracellular drug accumulation, increased DNA damage repair,

dysfunctional p53 protein, etc. [136]. Up-regulation of certain key rate-limiting proteins implicated in DNA repair like ERCC1 can significantly increase tumor resistance to platinum compounds[124]. Hence, high levels of expression of those proteins are associated with tumoral resistance. Conversely, low levels are associated with high sensibility to platinum, as is the case with testicular cancer cells [140]. In the head and neck literature, high levels of ERCC 1 have been associated with a poorer outcome in several studies [141-145]. Levels of ERCC1 were not correlated with response in others [146, 147]. This discrepancy can partly be explained by the different treatment regimens, proportion of sub-sites involved and study populations.

The SNP located in codon 118 (exon 4) of ERCC1 seems to have a functional significance, however not fully understood. The C→T transition in the codon is believed to influence the expression of the gene [131]. This silent mutation codes in both cases for the amino acid asparagine. However, the thymine nucleotide diminishes the codon usage and transcription of the gene by 50%, thus reducing the translation and changing the protein folding of ERCC1 in a fully functional NER system [148, 149]. Several studies have linked this polymorphism to treatment response to platinum compounds in ovarian [150, 151], GI [9, 152] and pulmonary cancers [153]. The sensitizing polymorphism is not always the same from one study to another. Conversely, other studies have found no association.

The distribution of the C↔T polymorphism codon 118 depends on the population studied. Our results show that 47%, 41% and 12% of our Caucasian population respectively had heterozygous CT, homozygous TT and homozygous CC genotypes. These are in accordance to other studies that evaluated the distribution of codon 118 polymorphism among Caucasian populations [9, 150]. However, in Asian populations, the CC genotype is much more prevalent (around 50-60%) than the TT genotype (around 5-15%)[154, 155]. This variation can affect to a certain degree the expression of ERCC1 in different populations.

Very few studies have evaluated the role of ERCC1 codon 118 polymorphisms in head and neck patients treated by chemoradiation. Ma and colleagues [156] investigated this polymorphism in recurrent advanced nasopharyngeal carcinoma treated by gemcitabine and

oxaliplatin, and found no influence on response or survival. Castro and colleagues [157] did not find a genotypic influence of the polymorphism in patients treated with postoperative chemoradiation. However, high expression of ERCC1 was correlated with a better response, which contradicts existing previous theories. Hao et al. evaluated [158] the polymorphism by comparing the CC+CT with the TT genotypes in patients treated concomitantly with cisplatin and radiotherapy. The CC+CT genotypes had statistically significant higher recurrence of disease. Those three studies were retrospective and included a limited number of patients. Quintela-Fandino et al. on the other hand evaluated the C8092A polymorphism of ERCC1 [135], also hypothesized to affect the expression of the gene, with other SNPs of other NER genes, in patients receiving induction CT. The C8092A polymorphism didn't have an effect on survival. However, the patients with the most polymorphic alleles (compared to the common alleles) had a significant survival advantage.

In our large cohort of patients, we did not find any influence of the codon 118 polymorphism of ERCC1 on locoregional control, disease-free survival and overall survival on a long period of follow-up. This is to our knowledge, the largest cohort of patients evaluated for this polymorphism in advanced HNSCC treated by platinum compounds and radiotherapy. Several explanations can account for that. Firstly, environmental factors such as tobacco were not evaluated and could potentially be confounding elements. Second, linkage disequilibrium to other polymorphisms can attenuate the effect of a SNP and can explain a preferential expression of the gene [159].

3.6 Conclusion

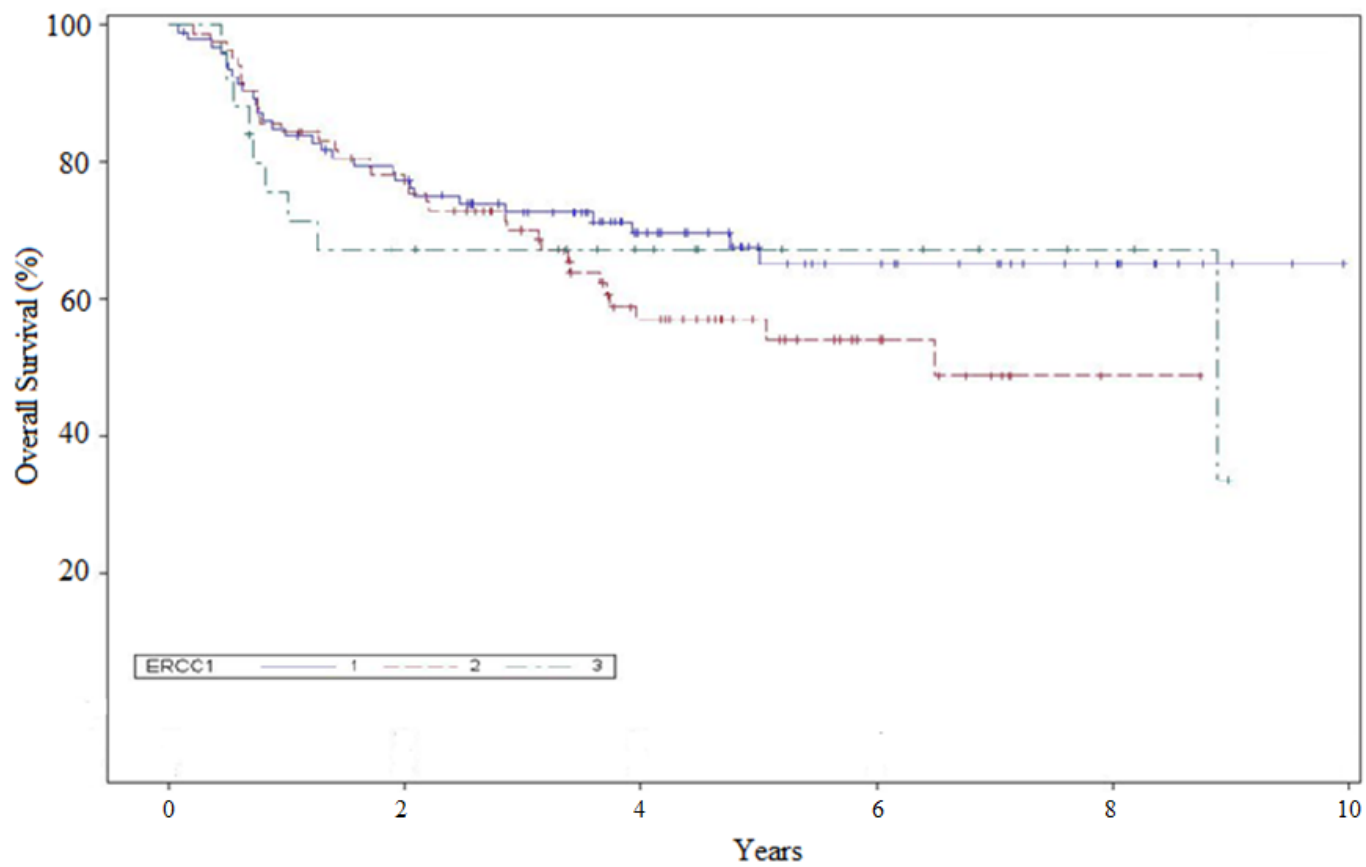
ERCC1 codon 118 polymorphism does not affect outcome in advanced head and neck cancer treated by concomitant chemoradiation. It can be postulated that ERCC1 codon 118 does not seem to discriminate patients for whom another treatment option should be sought for patients with locally advanced SCCHN. Other polymorphisms might be more associated with gene expression. Further studies are therefore mandatory.

TABLE 1

Patients' characteristics and treatment intention	
Characteristic	Population (%)
Sex - M/F	158/44 (78/22)
Age – yr	56.6
Site of primary tumor	
Oral cavity	18 (9)
Larynx	27 (13.5)
Oropharynx	138 (68)
Hypopharynx	11 (5.5)
Nasal cavity	1 (0.5)
Paranasal sinuses	2 (1)
Nasopharynx	4 (2)
Unknown	1 (0.5)
Stage	
III	32 (17)
IV	168 (83)
ERCC1 status	
CT	94 (47)
TT	83 (41)
CC	25 (12)
Radiotherapy	
6000 Gy	17 (8.5)
7000 Gy	179 (88.5)
7200 Gy	6 (3)
Chemotherapy	
Carbo die	19 (9.5)
Carbo-5 FU q 3 wks	119 (59)
C.D.D.P. die	1 (0.5)
C.D.D.P. q 1 wk	8 (4)
C.D.D.P. q 3 wks	54 (27)

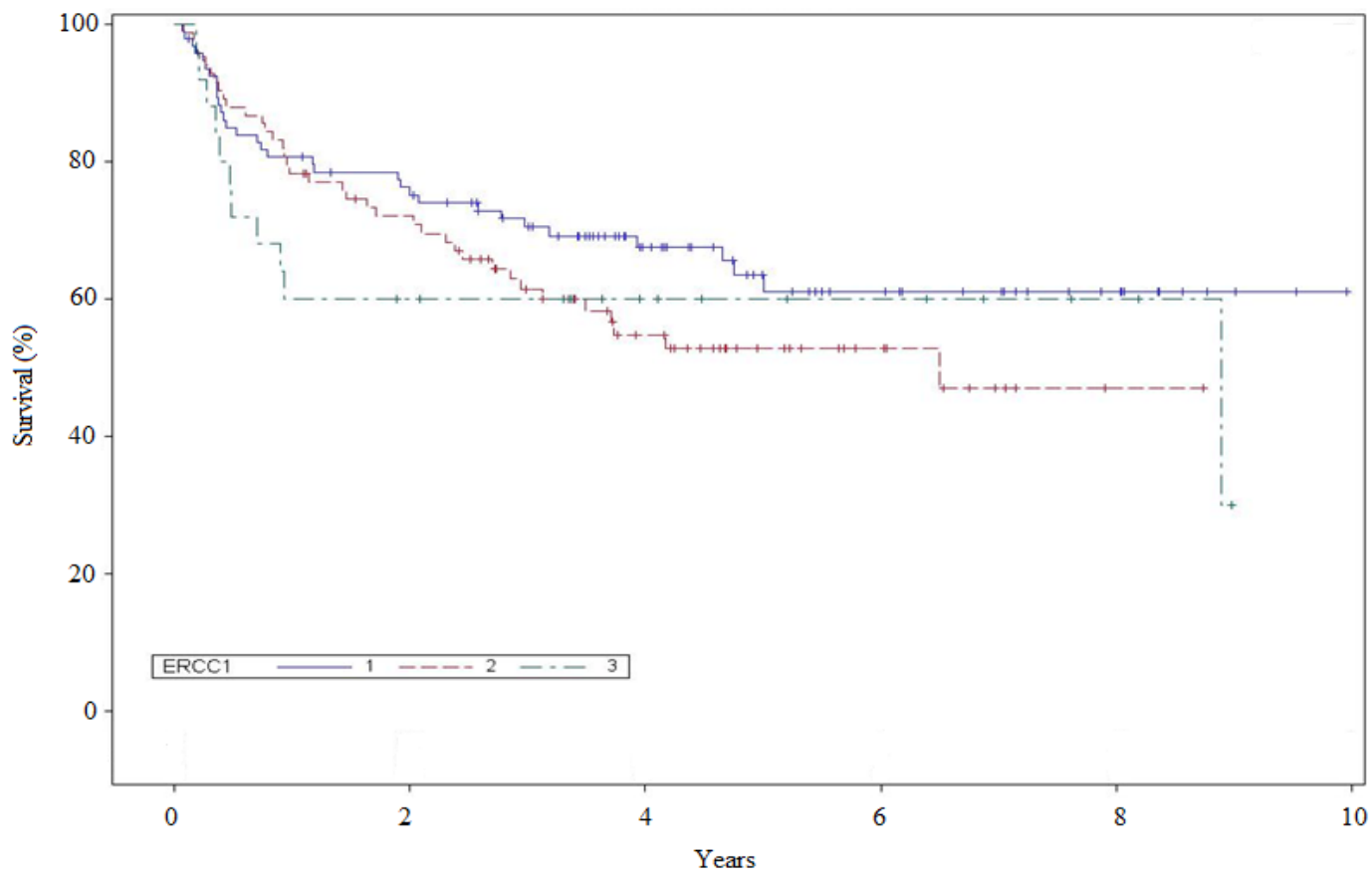
wk : week

FIGURE 1



Kaplan Meier projected overall survival of the three genotypes of ERCC1

FIGURE 2



Kaplan Meier projected disease-free survival of the three genotypes of ERCC1

CHAPITRE QUATRIÈME : DISCUSSION

4.1 Mécanismes de résistance au cisplatine

Le cisplatine, sel de platine introduit dans les années 70, est un des agents de chimiothérapie les plus puissants et les plus utilisés dans le traitement des tumeurs solides. Cependant, son efficacité est limitée par la résistance tumorale et sa toxicité. Le carboplatin, un autre sel de platine développé dans les années 80, est moins toxique mais tout aussi efficace [160]. La cible principale de ces deux agents est l'ADN.

En interagissant avec les sites N7 nucléophiles de la guanine et de l'adénine sur l'ADN, [161], les sels de platine exercent leur toxicité cellulaire à différents niveaux [162]. Premièrement, ils inhibent la synthèse d'ADN en formant des liens covalents entre les brins d'ADN (liens inter-brins). Deuxièmement, ils peuvent dénaturer la double hélice et se lier aux bases d'ADN, altérant ainsi sa fonction. Troisièmement, ils peuvent se fixer sur deux guanines d'un même brin et produire des liens intra-brins qui dénaturent la molécule; c'est par ce mécanisme que les sels de platine sont le plus toxiques [161]. Finalement, ils peuvent s'attacher à des protéines et les inactiver [163].

Au niveau cellulaire, cette liaison entre l'ADN et le cisplatine active des voies de signalisation complexes et opposées : certaines maintenant la survie cellulaire et réparant l'ADN dénaturé et d'autres menant vers l'apoptose cellulaire. Le poids relatif de chacun de ces signaux conduit soit à l'apoptose soit à la survie de la cellule [136].

L'objectif primaire de la chimiothérapie est d'induire la mort des cellules cancéreuses. Bien que les sels de platine soient des agents puissants d'apoptose, il peut se développer une résistance à des doses usuelles de chimiothérapie. Cette chimiorésistance peut être due à un usage chronique du médicament ou à une résistance intrinsèque à l'agent [136]. Les mécanismes de résistance au cisplatine sont multiples et complexes [136] :

- Une accumulation intracellulaire réduite du médicament diminue son action.
- Une exposition chronique au cisplatine induit une augmentation intracellulaire de glutathione et de metallothionéine qui l'inactivent.

- Une augmentation de la réparation de l'ADN diminue son effet apoptotique. Le NER est la principale voie qui répare l'ADN endommagé par le cisplatine. Une plus forte activité du NER réduit donc l'effet du médicament. Par ailleurs, la voie du MMR, autre mécanisme de réparation de l'ADN, reconnaît la liaison du cisplatine à l'ADN; la mutation de ces gènes semble causer une résistance aux sels de platine.
- Une surexpression du proto-oncogène HER/neu active la voie du PI3-K/Akt et diminue l'action du cisplatine en inhibant p21.
- La voie de RAS et de MAPK sont associées à sa résistance.
- Une dysfonction de p53 amène la cellule à être tolérante au dommage induit à l'ADN par le cisplatine.
- Une surexpression des gènes inhibiteurs de l'apoptose, dont la survivine et XIAP, ainsi qu'une diminution de l'activation des caspases 3, 8 et 9 réduisent son efficacité.

4.2 ERCC1 et la voie du NER

L'ADN de tout organisme vivant est constamment la cible d'altérations génétiques. Celles-ci peuvent être secondaires à des erreurs lors de la réplication, à des altérations dans la structure des bases ou à l'exposition à des agents environnementaux mutagènes [53]. Il est donc primordial pour la survie de l'organisme de disposer de mécanismes pour contrer et réparer ces dommages génétiques. Si l'ADN n'est pas réparé adéquatement, ces dommages peuvent se transmettre aux différentes générations engendrées par la réplication de l'organisme, phénomène appelé mutagenèse. Ces instruments de réparation de l'ADN ont dû apparaître très tôt dans l'évolution [164].

Le NER est un mécanisme sophistiqué par lequel l'ADN est réparé via l'excision du matériel génétique défectueux. Deux autres mécanismes réparent l'ADN par ce même procédé : le BER et le MMR [165]. Le xeroderma pigmentosum (XP) est l'archétype d'une déficience en réparation de l'ADN. Dans cette maladie autosomale récessive caractérisée par une prédisposition marquée à développer des cancers de la peau suite à l'exposition au soleil (rayons ultraviolets), la voie de réparation du NER est déficiente [166]. Sept gènes impliqués dans cette maladie (XP-A à XP-G) ont été identifiés et ceux-ci jouent tous un rôle clé dans la

voie du NER [167]. Deux autres maladies, le syndrome de Cockayne et la forme photosensible de la trichothiodystropie, sont également associées à une voie déficiente du NER [167].

Près de trente gènes [168] constituent la voie du NER et ceux-ci ont été fortement conservés à travers l'évolution des cellules eucaryotes, d'où l'importance de la réparation de l'ADN dans la survie de chaque organisme. Le *Saccharomyces cerevisiae*, eucaryote primitif couramment appelé « levure de bière » possède une voie du NER très similaire à celle retrouvée chez l'humain [167]. Les principales lésions de l'ADN détectées par le NER sont les dimères de cyclobutane pyrimidine et les photoproduits, tous deux secondaire à l'exposition aux rayons ultraviolets [164]. Par ailleurs, d'autres agents endommageant l'ADN, tels les sels de platine, les produits dérivés du tabac, la mitomycine C et la moutarde de nitrogène sont éliminés par le NER [164].

Le système du NER peut être considéré comme une arme à double tranchant [121]. D'une part, un système efficace répare le génome mais est associé à une résistance aux sels de platine. D'autre part, un système peu performant favorise le développement de cancers mais répondra mieux à la chimiothérapie. Un système du NER efficace peut être bénéfique à un stade précoce de la maladie et être néfaste à un stade plus avancé [169]. En effet, suite l'exérèse chirurgicale d'un cancer à un stade précoce, un système performant peut ralentir la progression moléculaire des tissus traités vers un deuxième cancer ou une récurrence [121]. Cependant, il y aura résistance au traitement médical à un stade plus avancé. Dans la même optique, un système peu performant serait néfaste à un stade précoce mais bénéfique à un stade avancé de la maladie.

La première étape de la réparation de l'ADN dans la voie du NER consiste à reconnaître la lésion. Le complexe hétérodimérique XPC/hHR23B a une grande affinité pour les lésions produisant une distorsion de l'ADN [170]. Par la suite le facteur de transcription TFIIH, composé de deux sous-complexes unis par XPD, sépare les deux brins d'ADN au site de la lésion [171, 172]. TFIIH et les hélicases XPB et XPD scindent les brins d'ADN sur une longueur de 30 paires de bases [126]. RPA et XPA stabilisent cette ouverture. Deux

endonucléases, XPG et ERCC1-XPF, résèquent les paires de bases endommagées, du côté 3' et 5' de l'ADN respectivement [172]. Par ailleurs, le complexe ERCC1-XPF répare les liens inter-brins d'ADN et a un rôle très important par conséquent [173]. Finalement, pol δ et ϵ synthétisent l'ADN excisé.

ERCC1, ou Excision Repair Cross-Complementating Rodent Repair Deficiency, Complementation Group 1, est nommé ainsi en raison de sa capacité de restaurer la réparation de l'ADN chez les cellules ovariennes des hamsters chinois déficientes en gènes réparateurs de l'ADN [9]. Il est l'équivalent de RAD 10 chez le *Saccaromyces cervisiae*, de SWI10 chez le *Schizosaccaromyces pombe* et des régions des gènes UvrA et UvrC du *E. Coli* [122]. ERCC1, situé sur le chromosome 19q [174, 175], semble essentiel à la vie. Il est possiblement le gène le plus important du NER [124]. Il est un facteur limitant au passage aux diverses étapes du NER [176]. Seul un cas de gène muté a été rapporté chez l'humain dans la littérature [168]; ce patient qui avait des anomalies majeures est décédé dans la période néonatale. Cent neuf polymorphismes du gène ont été recensés [130]. Certains polymorphismes correspondent à des mutations aberrantes causant un changement d'acide aminé dans la séquence de la protéine. Par contre, la majorité des polymorphismes du gène est secondaire à des mutations silencieuses sans aucun changement dans la séquence d'acides aminés de la protéine.

Un des polymorphismes les plus étudiés de ERCC1 est situé au niveau du codon 118 (exon 4, référence rs11615) et semble influencer l'expression du gène [131]. La transition C→T du troisième nucléotide du codon est une mutation silencieuse. Les nucléotides C et T codent tous deux pour l'acide aminé asparagine. Cependant, le nucléotide thymine diminue l'utilisation et la transcription du gène de près de 50%, ce qui diminue la translation du gène et induit un changement dans la conformation de la protéine [152]. De nombreuses études ont associé ce polymorphisme ou SNP (single nucleotide polymorphism) et son expression à la réponse à la chimiothérapie dans plusieurs cancers. En effet, les niveaux de ERCC1 sont corrélés à la capacité de la réparation de l'ADN [177] et influence la réponse aux sels de platine [178].

4.3 Rôle prédictif de ERCC1 dans la réponse à la chimiothérapie

Plusieurs études *in vitro* ont associé la surexpression de ERCC1 à la résistance aux sels de platine dans les cellules cancéreuses des ovaires, du col de l'utérus, des testicules, de l'œsophage, du côlon et des cancers pulmonaires non à petites cellules [179]. Ces derniers sont les cancers qui ont été le plus étudiés. Olausson et al. ont démontré dans une importante étude que le statut de ERCC1 semblait sélectionner les patients qui pourraient bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante à base de cisplatine dans les cancers pulmonaires avancés non à petites cellules [8]. En effet, les patients avec un statut ERCC1-négatif semblent avoir une meilleure survie globale [8]. Certaines études viennent corroborer ces résultats [180-182] [183] alors que d'autres les réfutent [184]. Ces résultats sont mitigés et la variabilité des traitements et des populations étudiées ne permettent de tirer des conclusions précises. Cette variabilité se reflète aussi dans l'étude du polymorphisme au niveau du codon 118 [185] [155]. Wei et al. confirment néanmoins la tendance pronostique du polymorphisme dans leur méta-analyse les cancers pulmonaires non à petites cellules [186].

L'expression de ERCC1 dans les cancers ovariens est également associée à la résistance aux sels de platine [187, 188], et les souris ayant reçu une transplantation de cellules cancéreuses déficientes en ERCC1 survivent plus longtemps [150, 189]. L'expression phénotypique de ERCC1 semble avoir un effet pronostic dans certaines études [150] [190], alors que l'effet semble moins évident dans d'autres [191]. Le polymorphisme au niveau du codon 118 semble également un facteur influençant la réponse au traitement [150] [151].

Les cancers des voies digestives semblent également influencés par ERCC1. Dans les cancers de l'œsophage, le statut ERCC1 négatif tend vers un avantage en terme de réponse au traitement [192] [193]. Les cancers du colon suivent la même tendance quant à l'expression du gène [194]. Pour les polymorphismes de ERCC1 au niveau du codon 118, il existe une corrélation clinique avec la réponse au traitement et la survie [195] [9] [152].

Très peu d'études ont porté sur les CETEC et ERCC1. Des niveaux élevés de ERCC1 ont été associés à un mauvais pronostic dans plusieurs études [141-145]. Dans d'autres, il n'y avait

pas d'association avec la réponse [146, 147]. Cette différence peut être expliquée en partie par les différents traitements, la proportion des sous-sites impliqués et la population étudiée. En effet, la distribution du polymorphisme C↔T du codon 118 dépend de l'origine génétique de la population en question. Nos résultats ont démontré que 47%, 41% et 13% la population caucasienne dans notre étude avaient respectivement un génotype hétérozygote CT, homozygote TT et homozygote CC. Ceci est en accord avec d'autres études ayant étudié la distribution du génotype dans des populations caucasiennes [9, 150]. Cependant, dans les populations asiatiques, le génotype CC est beaucoup plus prévalent (près de 50-60%) que le génotype TT (près de 5-15%)[154, 155]. Cette variation génotypique peut influencer jusqu'à un certain point l'expression du gène en fonction des populations étudiées.

Ma et al. [156] ont investigué le polymorphisme de ERCC1 codon 118 dans les cancers avancés nasopharyngés récidivants traités avec gemcitabine et oxaliplatine; aucune influence sur la survie ou la réponse n'a été notée. Castro et al. [157] n'ont trouvé aucune influence du polymorphisme chez les patients ayant des CETEC avancés traités par chimioradiothérapie postopératoire. Cependant, des hauts niveaux d'expression de ERCC1 étaient corrélés avec une meilleure réponse, ce qui semble en contradiction avec les théories établies. Hao et al. ont évalué [158] le polymorphisme en comparant les génotypes CC+CT avec le génotype TT chez les patients traités avec cisplatine en combinaison avec de la radiothérapie. Les génotypes CC+CT avaient une chance plus grande de récurrence. Ces trois études sont cependant rétrospectives et ont inclus un nombre limité de patients. Quintela-Fandino et al. ont évalué le polymorphisme C8092A de ERCC1, qui possiblement affecte l'expression du gène [135], avec des polymorphismes d'autres gènes du NER, chez des patients ayant reçu une chimiothérapie d'induction à base de cisplatine. Ce polymorphisme n'a pas eu d'effet sur la survie; cependant, les patients avec le plus d'allèles polymorphiques (par rapport aux allèles communs) avaient un avantage de survie.

Dans notre cohorte, tous les patients ont reçu le même traitement. Nous avons tenté d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs pronostiques, pouvant être utilisés de façon prédictive dans des études subséquentes, afin de définir une meilleure thérapie. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence une influence du polymorphisme du codon 118 de ERCC1

sur le contrôle loco-régional, la survie sans maladie et la survie globale. Plusieurs hypothèses nous permettent d'expliquer ceci. Premièrement, une population plus nombreuse nous permettrait de mettre en évidence cette influence. Deuxièmement, des facteurs environnementaux tels le tabac n'ont pas été évalués et sont potentiellement des variables confondantes. Finalement, le déséquilibre de liaison (linkage disequilibrium) associé avec d'autres polymorphismes peut atténuer l'effet du SNP et expliquer une expression préférentielle du gène [159].

4.4 La voie de signalisation de RAS

La grande famille d'oncogènes RAS est divisée en trois sous-familles de gènes, chacune sur un chromosome différent : H-RAS (chromosome 11), K-RAS (chromosome 12) et N-RAS (chromosome 1) [196]. K-RAS est divisée en une variante majeure (4B) et mineure (4A) [197]. Toutes les protéines de la famille RAS ont un petit poids moléculaire (21 kDa) [196] et ont une activité GTPase qui permet à la protéine de passer d'un état actif (GTP-lié) à un état inactif (GDP-lié) sur le côté cytoplasmique de la membrane cellulaire [197]. Cet état est régulé par les GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) qui peuvent stimuler la formation de RAS-GTP et les GAPs (GTPase activating proteins, aussi appelées oncoprotéines RAS-p21) qui inactivent la protéine en RAS-GDP [198]. Ces régulateurs sont eux-mêmes influencés par plusieurs récepteurs cellulaires de surface dont EGFR, le récepteur de PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et IL-2 [197]. La voie de signalisation de RAS est une voie efférente majeure de EGFR [199].

Les mutations qui affectent ces quatre protéines (3 gènes) au niveau des acides aminés 12, 13 et 61 les maintiennent dans leur forme active [200]. Ces mutations surviennent aux codons 12, 13 et 61 qui sont critiques pour la régulation de la protéine et elles empêchent les GAP de s'y lier. Plusieurs carcinogènes incluant la nitrosamine et le benzo(a)pyrene diol-epoxideguanine dérivé du tabac se lient préférentiellement au codon 12 et créent des liaisons covalentes avec l'ADN [89]. La mutation la plus fréquente inclut la transversion d'une liaison G-C à une liaison T-A, conduisant à une substitution d'acide aminé [89, 201]. Ceci résulte en l'expression d'une protéine RAS-p21 anormale qui favorise un état GTP-activé de RAS. Les

mutations au niveau du codon 12 sont beaucoup plus fréquentes que les mutations aux codons 13 et 61. Ceci a pour lourde conséquence la perte du contrôle de la prolifération cellulaire. Les quatre protéines de RAS sont homologues à près de 90%; elles divergent à la portion C-terminale qui possède une grande portion hypervariable [200]. La portion N-terminale a été très conservée au cours de l'évolution [202]. Il semble que le haut degré d'homologie parmi ces trois gènes confère aux protéines de RAS, mutées ou non, un rôle identique dans la prolifération cellulaire ou l'oncogenèse [203, 204].

RAS-GTP peut activer une multitude de voies de signalisation intracellulaires. Celles-ci incluent : RAF, PI 3-K, les protéines Ral GDS, AF-6, Nore 1, Mekk 1, Rin et la voie de la protéine kinase C [197]. Ces voies efférentes permettent de transmettre autant d'informations cellulaires internes qu'externes. Ultimement, cette cascade intracellulaire active des facteurs de transcription intranucléaires, qui stimuleront la migration, le remodelage du cytosquelette d'actine, la prolifération cellulaires et l'apoptose [205] [206]. La voie efférente la plus connue de RAS la famille de kinases sérine/thréonine appelée RAF. Cette famille de kinases sert à activer la voie de la cascade de la MAP kinase [207]. En contrôlant la voie MAP kinase, la protéine RAF influence significativement l'action mitogénique de RAS [207].

Les gènes de la famille RAS sont les proto-oncogènes qui ont le plus haut taux de mutations et présentent près de 30% de toutes les mutations associées aux cancers [202]. Chaque sous-type de Ras est impliqué dans différents types de cancers. Par exemple, les mutations de K-RAS sont associées aux cancers du pancréas (près de 90% de mutations), du colon, de l'endomètre, des poumons et du col utérin, alors que les mutations de H-RAS et N-RAS sont respectivement associées aux mélanomes et aux cancers de la vessie [202]. Les tumeurs hématologiques sont liées à N-RAS [197]. Les cancers de la thyroïde peuvent avoir les trois sous-types mutés [208]. Par ailleurs, les mutations de K-RAS sont rares dans les tumeurs de l'ovaire, de l'œsophage, du sein ou de la prostate [208].

La protéine RAS mutée a un effet direct sur le potentiel métastatique de la cellule cancéreuse. En effet, l'expression de métalloprotéinases, telles la gélatinase et la stromélysine pouvant dégrader la matrice extracellulaire, est augmentée [209]. De plus, l'expression de VEGF

s'avère également à être augmentée dans les cellules mutantes via la voie de signalisation de RAF [210].

4.5 Implication thérapeutique de RAS

Les mutations de RAS ont été beaucoup étudiées dans les cancers pulmonaires (40% de mutations) et colo-rectaux (50% de mutations) [65].

Dans les cancers du colon, peu de consensus existait initialement sur la valeur pronostique des mutations de K-RAS en raison de la variabilité des populations étudiées, des sous-sites impliqués et des facteurs prédisposant au cancer, tels la colite ulcéreuse [211]. Andreyev et al [211] dans leur étude multicentrique ont démontré que ces mutations étaient associées à un plus haut taux de mortalité et de récurrence dans les cancers colorectaux. Cette étude a également mis en évidence le caractère particulièrement agressif de la mutation Gly→Val du codon 12. La première étude qui a illustré l'impact thérapeutique de la mutation de K-RAS dans les cancers colorectaux a été publiée en 2006 [212]. En effet, on a démontré que les cancers métastatiques ayant des mutations K-RAS répondaient moins aux anticorps monoclonaux dirigés contre EGFR. D'autres importantes études sont venues confirmer ces résultats [213, 214].

Les mutations de K-RAS dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (NSCLC) sont un facteur de mauvais pronostic et sont associées à une survie diminuée [215]. Près de 15-25% de ces tumeurs ont des mutations de K-RAS [216]. Comme dans les CETEC, les carcinomes épidermoïdes pulmonaires ont peu de mutations de RAS [216]. Les NSCLC qui expriment EGFR muté au niveau du site tyrosine kinase ont une réponse favorable aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de EGFR tels l'erlotinib ou le gefitinib [217]. Cependant, les mutations de RAS et de EGFR sont en général mutuellement exclusives et une double mutation n'accorde pas un avantage de survie à la cellule cancéreuse [218]. Plusieurs études ont démontré que les cellules cancéreuses arborant des mutations de RAS sont peu sensibles aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de EGFR, à moins de présenter une

amplification de EGFR [217]. Par ailleurs, les patients présentant ces mutations ne semblent pas bénéficier d'une chimiothérapie à base de cisplatine [216] [219, 220].

Les mutations et l'expression de K-RAS sont un facteur de mauvais pronostic. La cascade de signalisation déclenchée par K-RAS est très complexe et malheureusement à date, aucun agent qui bloque directement K-RAS n'a été développé. Cependant, plusieurs stratégies thérapeutiques agissant à différents niveaux ont été conceptualisées et mises en pratique [65] :

- L'inhibition de l'expression de RAS.
L'approche antisense consiste à cibler des séquences d'ARN spécifiques afin de bloquer la traduction de l'ARN messager en protéine, à travers des oligonucléotides stimulant l'ARNase.
- L'inhibition de l'adhésion de RAS à la membrane plasmique.
Suite à sa traduction, la pré-protéine RAS se transforme en protéine mature à travers plusieurs étapes, dont l'isoprénylation. Cette réaction nécessite l'enzyme farnesyltransférase qui transfère un groupe farnesyl à la pré-protéine RAS. Ce groupement farnesyl est essentiel à l'adhésion de RAS à la membrane plasmique, adhésion essentielle à l'activation des voies efférentes de RAS [232]. Les inhibiteurs de la farnesyltransférase n'ont pas eu les résultats escomptés dans les études cliniques [208].
- L'inhibition des voies efférentes de RAS.
Des inhibiteurs de RAF ont été développés et utilisés dans les études cliniques dans les cancers rénaux, pulmonaires et hépatiques. Les résultats de ces études sont encourageants [221][233]. Par ailleurs, les inhibiteurs de MEK ont été testés dans des études de phase II [217] et les résultats sont également prometteurs.
- Le blocage de l'interaction de RAS avec les GEF.
- La stimulation de l'interaction de RAS avec les GAP.

4.6 RAS et les CETEC

Les études portant sur le rôle de RAS dans les CETEC sont peu nombreuses. L'influence de ce gène a été décrite pour la première fois en dans les années 80 et depuis, plusieurs

chercheurs ont tenté de mettre en évidence les mutations et le rôle de l'expression de RAS dans les CETEC. Une des difficultés qu'a présentées l'étude de ce gène est la grande variabilité des critères d'inclusions et le nombre limité de patients dans les recherches, rendant l'interprétation de ces résultats difficile dans une perspective globale. Néanmoins, certains auteurs s'entendent pour dire que les CETEC qui présentent ou non une mutation de RAS semblent avoir une évolution clinique identique [104].

Les mutations de RAS dans les CETEC par ordre d'importance se situent au niveau des codons 12, 13 et 61 et occasionnent une perte d'hétérozygotie ainsi qu'une instabilité microsatellite [196]. Les études ont surtout mis en évidence le rôle des mutations de K-RAS et H-RAS [98, 99, 222]; les mutations de N-RAS n'ont pas encore été décrites [98, 99, 222]. La fréquence de ces mutations qui est inférieure à 5% [83, 223] en Occident est nettement moins élevée que dans d'autres types de cancers [196, 224]. Ces statistiques sont en accord avec les résultats obtenus dans notre étude. Seulement 3,5% de mutations de K-RAS ont été trouvées dans notre population caucasienne au codon 12 et aucune au codon 13. Au contraire, en Inde, les mutations de RAS, particulièrement de H-RAS sont très fréquentes (près de 35%) dans les cancers épidermoïdes de la cavité buccale et sont associées à la mastication des noix de bétel [106].

De façon intéressante, H-RAS est rarement muté chez les fumeurs ou non fumeurs ayant un cancer de la cavité orale, et ceci traduit l'importance des produits carcinogènes contenus dans les noix de bétel [224]. Ces mutations de H-RAS sont associées à une expression faible des protéines régulatrices du cycle cellulaire en G1, soit la cycline D1 et CDK4 et une surexpression de p16 et Rb [225]. Dans les carcinomes verruqueux des VADS, les mutations de H-RAS sont deux fois plus fréquentes [226]. Par ailleurs, il semble que RAS a un haut taux d'activation dans les cancers du larynx [227]. Ceci explique possiblement pourquoi 3/7 mutations provenaient du larynx dans notre banque de données.

Kiaris et al. [99] dans une grande banque tumorale de CETEC n'ont découvert que 2 mutations de RAS (tous gènes confondus) sur 120 spécimens. Ces deux mutations étaient situées sur le codon 12 de K-RAS. Yarbrough et al. ont évalué les mutations de RAS dans 51

spécimens de CETEC [83] et n'ont trouvé aucune mutation. Ceci suggère que RAS muté n'a pas de rôle important dans la grande majorité des CETEC.

L'expression de RAS a été évaluée par Spandidos et al. dès 1985 [228]; les auteurs ont démontré une surexpression de H-RAS et K-RAS dans tous les spécimens cancéreux étudiés. Cependant, la signification clinique de ces données immunohistochimiques restait encore à déterminer [229]. Ces études ont été en grande partie limitées à la détection de K-RAS et de H-RAS. La surexpression de RAS, particulièrement de H-RAS, semble être fréquente dans les CETEC et est estimée à près de 50% [99], ce qui suggère que la stimulation vient en amont de la voie de signalisation de RAS ou que des phénomènes épigénétiques agissent au niveau du promoteur du gène. Cette surexpression de H-RAS semble liée à un meilleur pronostic. Une autre étude est en accord avec la valeur pronostique de l'expression de RAS [112], mais ceci reste débattu. Il existe également une surexpression (plus de 70%) de l'oncoprotéine RAS-p21 dans les cancers laryngés [230], sans que ceci n'ait d'impact sur l'évolution clinique des patients.

Notre étude sur K-RAS n'a pas évalué l'apparition chronologique de ces mutations, vu que tous nos spécimens étaient à un stade avancé. Il demeure néanmoins possible que cette mutagenèse arrive tôt dans le processus cancéreux [98]. Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de différence statistique quant à la survie globale ou la survie sans métastase parmi les cas mutés et non mutés. Notre étude sur 197 spécimens est la plus nombreuse à date sur les mutations de K-RAS et leur corrélation clinique dans les cancers avancés de la tête et du cou. Vu la rareté de ces mutations, des études multicentriques sont nécessaires afin de mettre en évidence l'impact pronostic des mutations de RAS.

CHAPITRE QUATRIÈME : CONCLUSION

Les traitements médicaux des cancers sont en constante évolution. Depuis déjà plus de dix ans, la science a permis de progresser vers l'individualisation du traitement du cancer. Celle-ci tient compte de deux facteurs clés : l'hôte et la cellule cancéreuse. Ces deux facteurs ont une activité biologique unique et font en sorte qu'une tumeur identique chez deux patients ne répondra pas de façon égale. L'hôte a une activité pharmacodynamique qui lui est propre quant à sa manière de métaboliser les agents de chimiothérapie. De plus, il possède un mécanisme de protection de son génome qui influence sa réponse face à des agressions internes ou externes. Également, chaque cellule tumorale est unique dans la mesure où son activité dépend des altérations génétiques intrinsèques qui ont conduit au processus du cancer.

Deux gènes ont été étudiés ici : l'un qui dépend de l'hôte et l'autre qui dépend de la cellule cancéreuse. Ces deux gènes ne sont pas encore complètement compris dans toute leur complexité. Mais il est certain que les informations obtenues à partir de cette cohorte de patients traités de façon similaire nous donnent des informations sur les facteurs qui influencent le pronostic pour les patients traités par chimio-radiothérapie. Ils nous donnent donc des éléments de réflexion dans notre lutte contre le cancer.

CHAPITRE CINQUIÈME : BIBLIOGRAPHIE

1. Haddad, R.I. and D.M. Shin, *Recent advances in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1143-54.
2. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 1999. **49**(1): p. 33-64, 1.
3. Shah, J.P., *Cancer of the Head and Neck* 2001, Hamilton, London: BC Decker. 484.
4. CDC, *Annual Smoking-Attributable Mortality, Years of Potential Life Lost, and Productivity Losses — United States, 1997–2001*, in MMWR 2005. p. 625-628.
5. Menzin, J., L.M. Lines, and L.N. Manning, *The economics of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2007. **15**(2): p. 68-73.
6. NCI, *A snapshot of Head and Neck and Thyroid Cancers*. 2010.
7. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
8. Olaussen, K.A., et al., *DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy*. N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 983-91.
9. Viguier, J., et al., *ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumor response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6212-7.
10. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
11. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
12. Sankaranarayanan, R., et al., *Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis*. Anticancer Res, 1998. **18**(6B): p. 4779-86.
13. Canada, C.C.S.N.C.I.O., *Canadian Cancer Statistics 2006*, 2006: Toronto, Canada.
14. Settle, K., et al., *Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients*. Cancer Prev Res (Phila), 2009. **2**(9): p. 776-81.
15. Johnson, S., et al., *Socio-economic status and head and neck cancer incidence in Canada: a case-control study*. Oral Oncol, 2010. **46**(3): p. 200-3.
16. Stenson, K., *Epidemiology and risk factors for head and neck cancer*, in Uptodate 2011, Wolters Kluwer Health.
17. Spitz, M.R., *Epidemiology and risk factors for head and neck cancer*. Semin Oncol, 1994. **21**(3): p. 281-8.
18. Wray, A. and W.F. McGuirt, *Smokeless tobacco usage associated with oral carcinoma. Incidence, treatment, outcome*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1993. **119**(9): p. 929-33.
19. Tan, E.H., et al., *Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers*. Am J Clin Oncol, 1997. **20**(2): p. 146-50.
20. Maier, H., et al., *Chronic alcohol consumption--the key risk factor for pharyngeal cancer*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1994. **110**(2): p. 168-73.
21. Franceschi, S., et al., *Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer*. Int J Cancer, 1999. **83**(1): p. 1-4.
22. Andre, K., et al., *Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1995. **31B**(5): p. 301-9.
23. Sancho-Garnier, H. and S. Theobald, *Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk II: Pharynx and larynx cancer*. Eur J Cancer, 1993. **29A**(2): p. 273-6.
24. Auperin, A. and C. Hill, *[Epidemiology of head and neck carcinomas]*. Cancer Radiother, 2005. **9**(1): p. 1-7.
25. Pintos, J., et al., *Mate, coffee, and tea consumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil*. Epidemiology, 1994. **5**(6): p. 583-90.
26. De Stefani, E., et al., *Risk factors for laryngeal cancer*. Cancer, 1987. **60**(12): p. 3087-91.

27. Hording, U., et al., *Nasopharyngeal carcinoma: histopathological types and association with Epstein-Barr Virus*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1993. **29B**(2): p. 137-9.
28. Ang, K.K., et al., *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 24-35.
29. Kassim, K.H. and T.D. Daley, *Herpes simplex virus type 1 proteins in human oral squamous cell carcinoma*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1988. **65**(4): p. 445-8.
30. Schildt, E.B., et al., *Oral infections and dental factors in relation to oral cancer: a Swedish case--control study*. Eur J Cancer Prev, 1998. **7**(3): p. 201-6.
31. Benner, S.E., et al., *Prevention of second primary tumors with isotretinoin in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: long-term follow-up*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(2): p. 140-1.
32. Miyahara, H., T. Sato, and K. Yoshino, *Radiation-induced cancers of the head and neck region*. Acta Otolaryngol Suppl, 1998. **533**: p. 60-4.
33. AJCC, *Cancer Staging Manual*. 6th Edition ed2002, Philadelphia: Lippincott Raven
34. Barnes L, E.J., Reichart P, Sidransky D, *Pathology and genetics of head and neck tumors*, ed. W.H.O.C.o. Tumours2005, Lyon: IARC press.
35. Wenig, B., *Atlas of Head and Neck Pathology*1993, Philadelphia: W.B. Saunders Company. 412.
36. Haines, G. *Pathology of head and neck neoplasms*. Uptodate 2010 [cited 2011 June 13th, 2011]; Available from: www.uptodate.com.
37. Barnes, B., *Surgical Pathology of the Head and Neck*2009, New York: Informa Healthcare.
38. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nature reviews. Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
39. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
40. Califano, J., et al., *Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization*. Cancer research, 1996. **56**(11): p. 2488-92.
41. Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, and R.C. Jordan, *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Journal of clinical pathology, 2006. **59**(5): p. 445-53.
42. Loyo, M. and S.I. Pai, *The molecular genetics of laryngeal cancer*. Otolaryngol Clin North Am, 2008. **41**(4): p. 657-72, v.
43. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
44. Stadler, M.E., et al., *Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways*. Hematol Oncol Clin North Am, 2008. **22**(6): p. 1099-124, vii.
45. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
46. Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, and R.C. Jordan, *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck*. J Clin Pathol, 2006. **59**(5): p. 445-53.
47. Reed, A.L., et al., *High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3630-3.
48. Masayeva, B.G., et al., *Gene expression alterations over large chromosomal regions in cancers include multiple genes unrelated to malignant progression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(23): p. 8715-20.
49. Garnis, C., et al., *Use of complete coverage array comparative genomic hybridization to define copy number alterations on chromosome 3p in oral squamous cell carcinomas*. Cancer research, 2003. **63**(24): p. 8582-5.
50. Lese, C.M., et al., *Visualization of INT2 and HST1 amplification in oral squamous cell carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer, 1995. **12**(4): p. 288-95.

51. Slaughter, D.P., H.W. Southwick, and W. Smejkal, *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin*. *Cancer*, 1953. **6**(5): p. 963-8.
52. Kupferman, M.E. and J.N. Myers, *Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma*. *Otolaryngologic clinics of North America*, 2006. **39**(2): p. 229-47.
53. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
54. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. *Annual review of biochemistry*, 1979. **48**: p. 193-216.
55. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
56. Herbst, R.S. and C.J. Langer, *Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers*. *Seminars in oncology*, 2002. **29**(1 Suppl 4): p. 27-36.
57. Herbst, R.S., et al., *Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2*. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2004. **22**(5): p. 785-94.
58. Falls, D.L., *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. *Experimental cell research*, 2003. **284**(1): p. 14-30.
59. Herbst, R.S., *Review of epidermal growth factor receptor biology*. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2004. **59**(2 Suppl): p. 21-6.
60. Franklin, W.A., et al., *Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy*. *Seminars in oncology*, 2002. **29**(1 Suppl 4): p. 3-14.
61. Gschwind, A., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy*. *Nature reviews. Cancer*, 2004. **4**(5): p. 361-70.
62. Sok, J.C., et al., *Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2006. **12**(17): p. 5064-73.
63. Brazil, D.P., Z.Z. Yang, and B.A. Hemmings, *Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts*. *Trends in biochemical sciences*, 2004. **29**(5): p. 233-42.
64. Lothaire, P., et al., *Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation*. *Head & neck*, 2006. **28**(3): p. 256-69.
65. Adjei, A.A., *K-ras as a target for lung cancer therapy*. *J Thorac Oncol*, 2008. **3**(6 Suppl 2): p. S160-3.
66. Campbell, S.L., et al., *Increasing complexity of Ras signaling*. *Oncogene*, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1395-413.
67. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. *Cancer Res*, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
68. Hoa, M., et al., *Amplification of wild-type K-ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7154-6.
69. McKaig, R.G., R.S. Baric, and A.F. Olshan, *Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology*. *Head & neck*, 1998. **20**(3): p. 250-65.
70. Boring, C.C., et al., *Cancer statistics, 1994*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 1994. **44**(1): p. 7-26.
71. de Villiers, E.M., *Human pathogenic papillomavirus types: an update*. *Current topics in microbiology and immunology*, 1994. **186**: p. 1-12.
72. Hubbert, N.L., S.A. Sedman, and J.T. Schiller, *Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes*. *Journal of virology*, 1992. **66**(10): p. 6237-41.
73. Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley, *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53*. *Science*, 1990. **248**(4951): p. 76-9.

74. Klingelhutz, A.J., S.A. Foster, and J.K. McDougall, *Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16*. *Nature*, 1996. **380**(6569): p. 79-82.
75. Cobrinik, D., et al., *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. *Trends in biochemical sciences*, 1992. **17**(8): p. 312-5.
76. Khandwala, H.M., et al., *The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth*. *Endocrine reviews*, 2000. **21**(3): p. 215-44.
77. Ouban, A., et al., *Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas*. *Human pathology*, 2003. **34**(8): p. 803-8.
78. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. *CA Cancer J Clin*, 2008. **58**(2): p. 71-96.
79. Irish, J.C. and A. Bernstein, *Oncogenes in head and neck cancer*. *Laryngoscope*, 1993. **103**(1 Pt 1): p. 42-52.
80. McDonald, J., *Immunohistochemical detection of the H-ras, K-ras, and N-ras oncogenes in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Oral Pathol Med*, 1994. **23**: p. 342-346.
81. Yarbrough, W.G., *ras Mutations and Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*. *Laryngoscope*, 1994. **104**: p. 1337-1347.
82. McDonald, J.S., et al., *Immunohistochemical detection of the H-ras, K-ras, and N-ras oncogenes in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *J Oral Pathol Med*, 1994. **23**(8): p. 342-6.
83. Yarbrough, W.G., et al., *ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas*. *Laryngoscope*, 1994. **104**(11 Pt 1): p. 1337-47.
84. Anderson, J.A., *Prevalence of RAS oncogene mutation in head and neck carcinomas*. *The Journal of Otolaryngology*, 1992. **21**(5): p. 321-326.
85. Spencer, J.M., et al., *Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas*. *Arch Dermatol*, 1995. **131**(7): p. 796-800.
86. Anderson, J.A., J.C. Irish, and B.Y. Ngan, *Prevalence of RAS oncogene mutation in head and neck carcinomas*. *J Otolaryngol*, 1992. **21**(5): p. 321-6.
87. Barbacid, M., *ras genes*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 779-827.
88. Belinsky, S.A., et al., *Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines*. *Cancer Res*, 1989. **49**(19): p. 5305-11.
89. Bornholdt, J., et al., *K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 53.
90. Huncharek, M., J. Muscat, and J.F. Geschwind, *K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(8): p. 1507-10.
91. Howell, R.E., F.S. Wong, and R.G. Fenwick, *A transforming Kirsten ras oncogene in an oral squamous carcinoma*. *J Oral Pathol Med*, 1990. **19**(7): p. 301-5.
92. Chang, S.E., et al., *Ras mutations in United Kingdom examples of oral malignancies are infrequent*. *Int J Cancer*, 1991. **48**(3): p. 409-12.
93. Saranath, D., et al., *Detection and cloning of potent transforming gene(s) from chewing tobacco-related human oral carcinomas*. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1994. **30B**(4): p. 268-77.
94. Rumsby, G., R.L. Carter, and B.A. Gusterson, *Low incidence of ras oncogene activation in human squamous cell carcinomas*. *Br J Cancer*, 1990. **61**(3): p. 365-8.
95. Yeudall, W.A., et al., *Ras gene point mutation is a rare event in premalignant tissues and malignant cells and tissues from oral mucosal lesions*. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1993. **29B**(1): p. 63-7.
96. Ruiz-Godoy, R.L., et al., *Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006. **25**(1): p. 73-8.

97. Rizos, E., et al., *Low incidence of H-, K- and N-ras oncogene mutations in cytological specimens of laryngeal tumours*. Oral Oncol, 1999. **35**(6): p. 561-3.
98. Hirano, T., P.E. Steele, and J.L. Gluckman, *Low incidence of point mutation at codon 12 of K-ras proto-oncogene in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1991. **100**(7): p. 597-9.
99. Kiaris, H., et al., *Mutations, expression and genomic instability of the H-ras proto-oncogene in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Br J Cancer, 1995. **72**(1): p. 123-8.
100. Kuo, M.Y., et al., *Mutations of Ki-ras oncogene codon 12 in betel quid chewing-related human oral squamous cell carcinoma in Taiwan*. J Oral Pathol Med, 1994. **23**(2): p. 70-4.
101. Caulin, C., et al., *Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5054-8.
102. Das, N., J. Majumder, and U.B. DasGupta, *ras gene mutations in oral cancer in eastern India*. Oral Oncol, 2000. **36**(1): p. 76-80.
103. Field, J.K., *The role of oncogenes and tumour-suppressor genes in the aetiology of oral, head and neck squamous cell carcinoma*. J R Soc Med, 1995. **88**(1): p. 35P-39P.
104. Nunez, F., et al., *Analysis of ras oncogene mutations in human squamous cell carcinoma of the head and neck*. Surg Oncol, 1992. **1**(6): p. 405-11.
105. Saranath, D., et al., *Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Jpn J Cancer Res, 1989. **80**(5): p. 430-7.
106. Saranath, D., et al., *High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India*. Br J Cancer, 1991. **63**(4): p. 573-8.
107. Freer, E., et al., *RAS oncogene product expression in normal and malignant oral mucosa*. Aust Dent J, 1990. **35**(2): p. 141-6.
108. Azuma, F.N., Kawamata H et al., *The relation of ras oncogene product p21 expression to the clinicopathological status criteria and clinical outcome in squamous cell head and neck cancer*. Cancer J, 1987. **1**: p. 375-380.
109. Kuo, M.Y., et al., *Elevated ras p21 expression in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in Taiwan*. J Oral Pathol Med, 1995. **24**(6): p. 255-60.
110. Ruol, A., et al., *Expression of ras oncogene p21 protein in esophageal squamous cell carcinoma*. J Surg Oncol, 1990. **44**(3): p. 142-5.
111. Oft, M., R.J. Akhurst, and A. Balmain, *Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(7): p. 487-94.
112. Field, J.K., et al., *Low levels of ras p21 oncogene expression correlates with clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma*. Eur J Surg Oncol, 1992. **18**(2): p. 168-76.
113. Saranath, D., L.T. Bhoite, and M.G. Deo, *Molecular lesions in human oral cancer: the Indian scene*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1993. **29B**(2): p. 107-12.
114. Hatzaki, A., et al., *A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients*. Mol Cell Probes, 2001. **15**(5): p. 243-7.
115. Weber, A., et al., *Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Oncogene, 2003. **22**(30): p. 4757-9.
116. Chang, S.E., et al., *Novel Ki-ras codon 61 mutation in infiltrating leucocytes of oral squamous cell carcinoma*. Lancet, 1989. **1**(8645): p. 1014.
117. Caulin, C., et al., *Inducible activation of oncogenic K-ras results in tumor formation in the oral cavity*. Cancer research, 2004. **64**(15): p. 5054-8.
118. Lemoine, N.R., et al., *Activated ras oncogenes in human thyroid cancers*. Cancer Res, 1988. **48**(16): p. 4459-63.
119. Rosell, R., et al., *DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 2002. **38**(3): p. 217-27.

120. De Silva, I.U., et al., *Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3848-56.
121. Gazdar, A.F., *DNA repair and survival in lung cancer--the two faces of Janus*. N Engl J Med, 2007. **356**(8): p. 771-3.
122. Wilson, M.D., et al., *ERCC1: a comparative genomic perspective*. Environ Mol Mutagen, 2001. **38**(2-3): p. 209-15.
123. van Duin, M., et al., *Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10*. Cell, 1986. **44**(6): p. 913-23.
124. Reed, E., *Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy*. Cancer Treat Rev, 1998. **24**(5): p. 331-44.
125. De Silva, I.U., et al., *Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 7980-90.
126. Wood, R.D., *DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells*. Biochimie, 1999. **81**(1-2): p. 39-44.
127. Bootsma D, C.J., Kraemer KH, Hoesjmakers JHJ *Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy*. The Metabolic Basis of Inherited Disease, 8th edn. Edited by Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vall D. New York: McGraw-Hill, 2001, 2001.
128. Weeda, G., et al., *Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence*. Curr Biol, 1997. **7**(6): p. 427-39.
129. McWhir, J., et al., *Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning*. Nat Genet, 1993. **5**(3): p. 217-24.
130. NCBI. 2011; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=2067.
131. Yu, J.J., et al., *A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues*. Mutat Res, 1997. **382**(1-2): p. 13-20.
132. Jeremic, B., et al., *Radiation therapy alone or with concurrent low-dose daily either cisplatin or carboplatin in locally advanced unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial*. Radiother Oncol, 1997. **43**(1): p. 29-37.
133. Calais, G., et al., *Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(24): p. 2081-6.
134. Forastiere, A.A., et al., *Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(22): p. 2091-8.
135. Quintela-Fandino, M., et al., *DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy*. J Clin Oncol, 2006. **24**(26): p. 4333-9.
136. Siddik, Z.H., *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7265-79.
137. Knox, R.J., et al., *Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA*. Cancer Res, 1986. **46**(4 Pt 2): p. 1972-9.
138. Fortin, A., et al., *A comparison of treatment outcomes by radiochemotherapy and postoperative radiotherapy in locally advanced squamous cell carcinomas of head and neck*. Am J Clin Oncol, 2008. **31**(4): p. 379-83.
139. Vokes, E.E., et al., *Concomitant chemoradiotherapy as primary therapy for locoregionally advanced head and neck cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(8): p. 1652-61.

140. Koberle, B., et al., *Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours*. *Curr Biol*, 1999. **9**(5): p. 273-6.
141. Jun, H.J., et al., *ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(1): p. 167-72.
142. Chiu, T.J., et al., *High ERCC1 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance and poor outcome in unresectable squamous cell carcinoma of head and neck in a betel-chewing area*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 31.
143. Fountzilias, G., et al., *Induction chemotherapy with docetaxel and cisplatin followed by concomitant chemoradiotherapy in patients with inoperable non-nasopharyngeal carcinoma of the head and neck*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(2): p. 529-38.
144. Lee, H.W., et al., *High expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in patients with nasopharyngeal cancer*. *Oral Oncol*, 2010. **46**(3): p. 209-13.
145. Handra-Luca, A., et al., *Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(13): p. 3855-9.
146. Chan, S.H., et al., *Can the analysis of ERCC1 expression contribute to individualized therapy in nasopharyngeal carcinoma?* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **79**(5): p. 1414-20.
147. Koh, Y., et al., *Class III beta-tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. *Ann Oncol*, 2009. **20**(8): p. 1414-9.
148. Yu, J.J., et al., *Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene*. *Int J Oncol*, 2000. **16**(3): p. 555-60.
149. Komar, A.A., *Genetics. SNPs, silent but not invisible*. *Science*, 2007. **315**(5811): p. 466-7.
150. Smith, S., et al., *ERCC1 genotype and phenotype in epithelial ovarian cancer identify patients likely to benefit from paclitaxel treatment in addition to platinum-based therapy*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(33): p. 5172-9.
151. Kang, S., et al., *Association between excision repair cross-complementation group 1 polymorphism and clinical outcome of platinum-based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer*. *Exp Mol Med*, 2006. **38**(3): p. 320-4.
152. Park, D.J., et al., *ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2003. **1**(3): p. 162-6.
153. Isla, D., et al., *Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer*. *Ann Oncol*, 2004. **15**(8): p. 1194-203.
154. Yu, D., et al., *Characterization of functional excision repair cross-complementation group 1 variants and their association with lung cancer risk and prognosis*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(9): p. 2878-86.
155. Ryu, J.S., et al., *Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy*. *Lung Cancer*, 2004. **44**(3): p. 311-6.
156. Ma, B.B., et al., *Multicenter phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in advanced nasopharyngeal carcinoma--correlation with excision repair cross-complementing-1 polymorphisms*. *Ann Oncol*, 2009. **20**(11): p. 1854-9.
157. Castro G., P.F.S., Siqueira S. A., Ferraz A. R., Villar R. C., Snitcovsky I. M. , Federico M. H. , *ERCC1 protein, mRNA expression, and T19007C polymorphism as prognostic markers in head and neck*

- squamous cell carcinoma (HNSCC) patients treated with surgery and adjuvant cisplatin-based chemoradiation (CRT)*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28 (supplement)**: p. 15 S.
158. Hao D., L.H.Y., Eliasziw M. , Box A., Diaz R., Shin B., Lees-Miller S. P., Magliocco A. M. , *A comprehensive evaluation of the prognostic value of ERCC1 protein expression, mRNA and genotype in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (LA-SCCHN)*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26S**.
 159. Ryu, J.S., J. Viguier, and F. Praz, *Genetic effect of ERCC1 codon 118 polymorphism and confounding factors*. Clin Cancer Res, 2006. **12(15)**: p. 4784; author reply 4784-5.
 160. Kelland, L.R., et al., *Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance*. J Inorg Biochem, 1999. **77(1-2)**: p. 111-5.
 161. Pinto, A.L. and S.J. Lippard, *Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA*. Biochim Biophys Acta, 1985. **780(3)**: p. 167-80.
 162. Roberts, J.J. and A.J. Thomson, *The mechanism of action of antitumor platinum compounds*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1979. **22**: p. 71-133.
 163. Eastman, A., *The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis*, in *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, B. Lippert, Editor 1999, Wiley: Zurich. p. 111-134.
 164. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes & development, 1999. **13(7)**: p. 768-85.
 165. Friedberg, E.C., *Rous-Whipple Award Lecture. Nucleotide excision repair and cancer predisposition: A journey from man to yeast to mice*. The American journal of pathology, 2000. **157(3)**: p. 693-701.
 166. Cleaver, J.E. and D. Bootsma, *Xeroderma pigmentosum: biochemical and genetic characteristics*. Annual review of genetics, 1975. **9**: p. 19-38.
 167. Bootsma D, C.J., Kraemer KH, Hoeijmakers JHJ, *Nucleotide Excision Repair Syndromes: Xeroderma Pigmentosum, Cockayne Syndrome, and Trichothiodystrophy*, in *The genetic Basis of Human Cancer*, K.W.K. Bert Vogelstein, Editor 2002, McGraw Hill: New York. p. 211-238.
 168. Jaspers, N.G., et al., *First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure*. Am J Hum Genet, 2007. **80(3)**: p. 457-66.
 169. Zheng, Z., et al., *DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer*. N Engl J Med, 2007. **356(8)**: p. 800-8.
 170. de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers, *Molecular mechanism of nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1999. **13(7)**: p. 768-85.
 171. Ito, S., et al., *XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients*. Mol Cell, 2007. **26(2)**: p. 231-43.
 172. Rosell, R., et al., *Platinum resistance related to a functional NER pathway*. J Thorac Oncol, 2007. **2(12)**: p. 1063-6.
 173. Niedernhofer, L.J., et al., *The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks*. Mol Cell Biol, 2004. **24(13)**: p. 5776-87.
 174. Bicher, A., et al., *Loss of heterozygosity in human ovarian cancer on chromosome 19q*. Gynecol Oncol, 1997. **66(1)**: p. 36-40.
 175. Liang, B.C., D.A. Ross, and E. Reed, *Genomic copy number changes of DNA repair genes ERCC1 and ERCC2 in human gliomas*. J Neurooncol, 1995. **26(1)**: p. 17-23.
 176. Zamble, D.B., et al., *Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease*. Biochemistry, 1996. **35(31)**: p. 10004-13.
 177. Arora, S., et al., *Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells*. DNA Repair (Amst), 2010. **9(7)**: p. 745-53.

178. Welsh, C., et al., *Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines*. *Int J Cancer*, 2004. **110**(3): p. 352-61.
179. Altaha, R., et al., *Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance*. *International journal of molecular medicine*, 2004. **14**(6): p. 959-70.
180. Cobo, M., et al., *Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(19): p. 2747-54.
181. Vilmar, A.C., E. Santoni-Rugiu, and J.B. Sorensen, *ERCC1 and histopathology in advanced NSCLC patients randomized in a large multicenter phase III trial*. *Ann Oncol*, 2010. **21**(9): p. 1817-24.
182. Lord, R.V., et al., *Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(7): p. 2286-91.
183. Chen, S., et al., *The platinum-based treatments for advanced non-small cell lung cancer, is low/negative ERCC1 expression better than high/positive ERCC1 expression? A meta-analysis*. *Lung Cancer*, 2010. **70**(1): p. 63-70.
184. Booton, R., et al., *ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2007. **2**(10): p. 902-6.
185. Zhou, W., et al., *Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(15): p. 4939-43.
186. Wei, S.Z., et al., *Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis*. *Med Oncol*, 2011. **28**(1): p. 315-21.
187. Dabholkar, M., et al., *ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients*. *J Natl Cancer Inst*, 1992. **84**(19): p. 1512-7.
188. Dabholkar, M., et al., *Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(2): p. 703-8.
189. Selvakumaran, M., et al., *Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2003. **63**(6): p. 1311-6.
190. Scheil-Bertram, S., et al., *Excision repair cross-complementation group 1 protein overexpression as a predictor of poor survival for high-grade serous ovarian adenocarcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2010. **119**(2): p. 325-31.
191. Stadlmann, S., et al., *ERCC1-immunoexpression does not predict platinum-resistance in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2008. **108**(1): p. 252-3.
192. Kim, M.K., et al., *ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(1): p. 54-60.
193. Tanaka, K., et al., *Excision-repair cross-complementing 1 predicts response to cisplatin-based neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. *Mol Med Report*, 2009. **2**(6): p. 903-9.
194. Kim, S.H., et al., *Prognostic value of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase pi for 5-FU/oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer*. *Am J Clin Oncol*, 2009. **32**(1): p. 38-43.
195. Moreno, V., et al., *Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2101-8.
196. Raybaud, H., et al., *[Genic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature]*. *Pathol Biol (Paris)*, 2003. **51**(3): p. 176-84.
197. Ellis, C.A. and G. Clark, *The importance of being K-Ras*. *Cell Signal*, 2000. **12**(7): p. 425-34.

198. Quilliam, L.A., et al., *Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins*. *Bioessays*, 1995. **17**(5): p. 395-404.
199. Lurje, G. and H.J. Lenz, *EGFR signaling and drug discovery*. *Oncology*, 2009. **77**(6): p. 400-10.
200. Haigis, K.M., et al., *Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon*. *Nat Genet*, 2008. **40**(5): p. 600-8.
201. Husgafvel-Pursiainen, K., et al., *K-ras mutations in human adenocarcinoma of the lung: association with smoking and occupational exposure to asbestos*. *Int J Cancer*, 1993. **53**(2): p. 250-6.
202. Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 295-308.
203. Rodriguez-Viciana, P., et al., *Cancer targets in the Ras pathway*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005. **70**: p. 461-7.
204. Umanoff, H., et al., *The murine N-ras gene is not essential for growth and development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1709-13.
205. Hill, C.S. and R. Treisman, *Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 199-211.
206. Malumbres, M. and M. Barbacid, *RAS oncogenes: the first 30 years*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 459-65.
207. Moodie, S.A., et al., *Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase*. *Science*, 1993. **260**(5114): p. 1658-61.
208. Adjei, A.A., *Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy*. *J Natl Cancer Inst*, 2001. **93**(14): p. 1062-74.
209. Su, Z.Z., et al., *Defining the critical gene expression changes associated with expression and suppression of the tumorigenic and metastatic phenotype in Ha-ras-transformed cloned rat embryo fibroblast cells*. *Oncogene*, 1993. **8**(5): p. 1211-9.
210. Rak, J., et al., *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*. *Cancer Res*, 1995. **55**(20): p. 4575-80.
211. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study*. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(9): p. 675-84.
212. Lievre, A., et al., *KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 3992-5.
213. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
214. Jonker, D.J., et al., *Cetuximab for the treatment of colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(20): p. 2040-8.
215. Mascaux, C., et al., *The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(1): p. 131-9.
216. Riely, G.J., J. Marks, and W. Pao, *KRAS mutations in non-small cell lung cancer*. *Proc Am Thorac Soc*, 2009. **6**(2): p. 201-5.
217. Zhu, C.Q., et al., *Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(26): p. 4268-75.
218. Pao, W., et al., *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib*. *PLoS Med*, 2005. **2**(1): p. e17.
219. Tsao, M.S., et al., *Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(33): p. 5240-7.

220. Winton, T., et al., *Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **352**(25): p. 2589-97.
221. Adjei, A.A., et al., *Phase I trial of sorafenib in combination with gefitinib in patients with refractory or recurrent non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(9): p. 2684-91.
222. Kiaris, H. and D. Spandidos, *Analysis of h-ras, k-ras and N-ras genes for expression, mutation and amplification in laryngeal tumors*. Int J Oncol, 1995. **7**(1): p. 75-80.
223. Matsuda, H., et al., *Alterations of p16/CDKN2, p53 and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions*. J Oral Pathol Med, 1996. **25**(5): p. 232-8.
224. Xu, J., et al., *Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use*. Cancer, 1998. **83**(2): p. 204-12.
225. Sathyan, K.M., K.R. Nalinakumari, and S. Kannan, *H-Ras mutation modulates the expression of major cell cycle regulatory proteins and disease prognosis in oral carcinoma*. Mod Pathol, 2007. **20**(11): p. 1141-8.
226. Anderson, J.A., et al., *H-ras oncogene mutation and human papillomavirus infection in oral carcinomas*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1994. **120**(7): p. 755-60.
227. Field, J.K. and D.A. Spandidos, *The role of ras and myc oncogenes in human solid tumours and their relevance in diagnosis and prognosis (review)*. Anticancer Res, 1990. **10**(1): p. 1-22.
228. Spandidos, D.A., A. Lamothe, and J.K. Field, *Multiple transcriptional activation of cellular oncogenes in human head and neck solid tumours*. Anticancer Res, 1985. **5**(2): p. 221-4.
229. Field, J.K., A. Lamothe, and D.A. Spandidos, *Clinical relevance of oncogene expression in head and neck tumours*. Anticancer Res, 1986. **6**(4): p. 595-600.
230. Scambia, G., et al., *Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic laryngeal tissues: correlation with histopathological features and epidermal growth factor receptors*. Br J Cancer, 1994. **69**(6): p. 995-9.
231. Ramqvist, T. and T. Dalianis, *Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(11): p. 1671-7.
232. Reuter, C.W., M.A. Morgan, and L. Bergmann, *Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?* Blood, 2000. **96**(5): p. 1655-69.
233. Escudier, B., et al., *Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(2): p. 125-34.