

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE de MEDECINE

Ecole Doctorale Science, Technologie, Santé

Laboratoire de Biochimie Médicale

Année 2008

Thèse N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biochimie

Présentée et soutenue publiquement par

Karine AUBRY

Le 27 Mai 2008

**CREATION ET CARACTERISATION DE MODELES
ANIMAUX DE CANCERS DE
LA SPHERE OTO-RHINO-LARYNGOLOGIQUE
CHEZ DES RATS IMMUNOCOMPETENTS**

Directeur de Thèse : Mr. le Professeur Michel RIGAUD

Jury

**Mr. le Professeur BEBEAR
Mr. le Professeur PUISIEUX
Mr. le Professeur BESSEDE
Mr. le Professeur RIGAUD
Mlle le Docteur DUTOUR
Mr. le Professeur MONTEIL
Mr. le Professeur PARAF**

**Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Membre invité
Membre invité**

A Monsieur le Professeur Michel RIGAUD

Professeur des Universités

Biochimie et Biologie Moléculaire

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée au cours de ces dernières années. Ce fut un plaisir de découvrir la Recherche à vos côtés. Nous vous remercions d'avoir inspiré et dirigé ce travail.

Veillez trouver ici, le témoignage de notre profond respect et de notre grande admiration.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre BEBEAR

Professeur des Universités

Oto-Rhino-Laryngologie

*Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de participer à ce jury,
en tant que rapporteur.*

*Veillez trouver ici, le témoignage de notre profond respect et de notre sincère
reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur Alain PUISIEUX

Professeur des Universités

Biochimie et Biologie Moléculaire

*Vous nous faites l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteur. Nous vous remercions
de votre présence.*

Veillez trouver ici, le témoignage de notre gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre BESSEDE

Professeur des Universités

Oto-Rhino-Laryngologie

*Vous nous faites l'honneur de participer à ce jury. Nous vous remercions pour le soutien que
vous nous avez apporté tout au long de ces années.*

Veillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

A Mademoiselle le Docteur Aurélie DUTOUR

Docteur ès sciences

Biochimie et Biologie Moléculaire

Vous nous faites l'honneur de revenir à Limoges pour juger notre travail. Nous avons admiré vos compétences et votre rigueur scientifique.

Veillez trouver ici, le témoignage de notre grande admiration et de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jacques MONTEIL

Professeur des Universités

Biophysique et Médecine Nucléaire

*Nous vous adressons nos sincères remerciements pour votre disponibilité, vos compétences et
votre soutien dans l'élaboration de ce travail.*

Veillez trouver ici le témoignage de notre estime et de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur François PARAF

Professeur des Universités

Anatomie et Pathologie Cytologiques

*Nous vous adressons nos sincères remerciements pour votre disponibilité, vos compétences et
votre participation à l'élaboration de ce travail.*

Veillez trouver ici le témoignage de notre estime et de notre profonde reconnaissance.

RESUME

Le développement de modèles animaux de cancers est indispensable pour la réalisation d'essais thérapeutiques pré-cliniques. Nous avons développé un modèle animal de carcinome épidermoïde, à partir d'une tumeur induite chimiquement par de la 4-Nitroquinoline1-oxyde (4-NQO), par allogreffes tumorales successives chez des rats immunocompétents âgés de 21 jours. Il s'agit du premier modèle de carcinome épidermoïde créé par greffe tumorale sur rat immunocompétent. Selon le même protocole, un modèle d'ostéosarcome mandibulaire a été obtenu par greffe sous-périostée d'une tumeur d'ostéosarcome de rats. Les tumeurs ainsi obtenues ont été caractérisées sur le plan histologique, immunohistochimique et radiologique par tomographie à émission de positons couplée à une tomodensitométrie (FDG-TEP/TDM). Elles présentent des caractéristiques histologiques, radiologiques et évolutives similaires à celles des tumeurs humaines. De par ces résultats, nous proposons ainsi un protocole général de production de modèles animaux de cancers sur rats immunocompétents.

Mots clés :

- Modèles animaux
- Cancers ORL
- Allogreffe tumorale
- Rats immunocompétents

ABSTRACT

Title: Setup and characterization of animal models of head and neck cancers in immunocompetent rats.

Setup of animal models of cancers is indispensable for pre-clinic therapeutic essays. We developed an animal model of squamous cell carcinoma, from a tumor induced by 4-Nitroquinoline-1-oxyde (4-NQO), by successive tumoral grafts in Sprague Dawley immunocompetent rats old of 21 days. Using the same protocol, a model of mandible osteosarcoma was obtained by grafting osteosarcoma tumors. These tumors were characterized by pathological, immunohistochemical analysis and imaging using positron emission tomography coupled with computed tomography (PET/CT). They presented similar characteristics than human ones. We propose a protocol to produce animal models of cancer, in immunocompetent rats.

Keywords:

- Animal models
- Head and neck cancers
- Tumoral allograft
- Immunocompetent rats

TABLE DES MATIERES

I-INTRODUCTION.....	20
II-MATERIELS ET METHODES.....	32
II-1-Etude anatomique de la région cervicale et des VADS chez le rat.....	33
II-2-Protocole expérimental.....	38
II-2-1-Carcinome épidermoïde.....	38
a) Induction chimique de carcinome épidermoïde.....	38
b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde.....	40
II-2-2-Ostéosarcome mandibulaire.....	41
II-3-Protocole d'imagerie par FDG-TEP/TDM.....	43
II-3-1-Carcinome épidermoïde.....	45
a) Induction chimique de carcinome épidermoïde.....	45
b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde.....	45
II-3-2-Ostéosarcome mandibulaire.....	45
II-4-Protocole de l'étude anatomopathologique.....	46
II-4-1-Carcinome épidermoïde.....	46
a) Induction chimique de carcinome épidermoïde.....	46
b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde.....	46
II-4-2-Ostéosarcome mandibulaire.....	46
II-5-Essai thérapeutique utilisant le <i>bevacizumab</i> (Avastin®) sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire.....	47
II-5-1-Protocole expérimental.....	47
II-5-2-Evaluation de l'efficacité du <i>bevacizumab</i> par imagerie par résonance magnétique (IRM).....	47

III-RESULTATS.....	48
III-1-Résultats cliniques.....	49
III-1-1-Carcinome épidermoïde.....	49
a) Induction chimique de carcinome épidermoïde.....	49
b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde.....	53
III-1-2-Ostéosarcome mandibulaire.....	55
III-2-Résultats de l'imagerie par FDG-TEP/TDM.....	56
III-2-1-Carcinome épidermoïde.....	56
a) Induction chimique de carcinome épidermoïde.....	56
b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde.....	60
III-2-2-Ostéosarcome mandibulaire.....	63
III-3-Résultats de l'étude anatomopathologique.....	65
III-3-1-Carcinome épidermoïde.....	65
a) Induction chimique de carcinome épidermoïde.....	65
b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde.....	69
III-3-2-Ostéosarcome mandibulaire.....	73
III-4-Résultats de l'essai thérapeutique utilisant le <i>bevacizumab</i> (Avastin®) sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire.....	75
III-4-1-Résultats cliniques.....	75
III-4-2-Résultats de l'IRM dynamique.....	77
IV-DISCUSSION.....	79
V-CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	92
VI-BIBLIOGRAPHIE.....	95
VII-ANNEXES.....	105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Résultats lors de l'examen clinique après exposition à la 4-NQO (N=55).....	50
Tableau II : Résultats de la FDG-TEP/TDM chez 5 rats du groupe boisson	57
Tableau III : Données de la FDG-TEP/TDM obtenues dans le groupe d'allogreffe de carcinome épidermoïde à J14 et J30 (n=10).....	61
Tableau IV : Tumeurs obtenues dans le groupe boisson (n=25).....	67

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Dissection cervicale superficielle après incision cutanée cervico-thoracique médiane.....	33
Figure 2 : Dissection cervicale profonde, A : le muscle sterno-cléido-mastoïdien est désincéré de ses attaches sterno-claviculaires, B : l'ouverture de l'aponévrose cervicale profonde permet de découvrir l'axe trachéal.....	34
Figure 3 : Dissection de la cavité buccale et de l'oropharynx.....	35
Figure 4 : Dissection de l'axe laryngo-trachéal.....	35
Figure 5 : Dissection laryngée.....	36
Figure 6 : Dissection thoracique.....	36
Figure 7 : Appareil d'anesthésie avec chambre d'inhalation.....	38
Figure 8 : A : Optique 0° avec canal opérateur – pince de coloscopie, B: Grossissement : extrémité de la pince de coloscopie.....	39
Figure 9 : Endoscopie des VADS chez le rat : introduction de l'optique 0° avec pro traction linguale.....	40
Figure 10 : Greffe tumorale en région cervicale.....	41
Figure 11 : Appareil de TEP/TDM (biograph 6).....	44
Figure 12 : (A) : Injection intraveineuse du FDG; (B) : Réalisation de la TEP/TDM sur rat anesthésié.....	44
Figure 13 : Leucoplasie développée sur le bord latéral droit de la langue (site d'application de la 4-NQO).....	51
Figure 14 : Papillome développé sur la pointe de la langue.....	51
Figure 15 : Tumeur développée au niveau de la langue mobile (site d'application de la 4-NQO).....	52

Figure 16: Présence d'une tumeur développée sur la lèvre inférieure.....	52
Figure 17 : (A) : Présence d'une masse tumorale développée en région cervicale à J30 après la greffe ; (B) : Présence d'un nodule de perméation.....	53
Figure 18: Courbe d'évolution du volume tumoral moyen en fonction du nombre de jour après la greffe (n=10).....	54
Figure 19: Schéma de reproduction et de conservation d'une tumeur par allogreffes successives sur 4 séries de rats âgés de 21 jours, à 7 jours d'intervalle. (* : tumeur fraîche prélevée pour la greffe suivante). Rat rouge : prise de greffe – Rat vert : absence de prise de greffe.....	54
Figure 20: Présence d'une masse tumorale cervicale à J20 après la greffe.....	55
Figure 21: Evolution du volume tumoral moyen sur une période de 23 jours après la greffe (n=20).....	55
Figure 22 : Rat n°1. A: Aspect macroscopique d'une tumeur développée au niveau de la lèvre inférieure. De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en B: coupes sagittales, en C: coupes axiales et en D: coupes coronales: tumeur de la lèvre inférieure.....	58
Figure 23: Rat n°2. De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en B: coupes axiales, en C: coupes coronales et en D: coupes sagittales: extension rétro-orbitaire d'une tumeur développée au niveau du maxillaire supérieur.....	59
Figure 24: Rat n°3 : De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en A: coupes axiales et en B: coupes coronales: tumeur de la face interne de joue.....	59

Figure 25: Rat n°4. A: Dissection autopsique (tumeur de la base de langue: flèche noire; épiglotte : flèche blanche). De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en B: coupes sagittales C: coupes coronales: tumeur de la base de langue.....60

Figure 26: FDG-PET/TDM à J14 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et hot métal pour la TEP en coupes coronales: tumeur développée de manière bilatérale sur la face ventrale du cou.....62

Figure 27: FDG-TEP/TDM à J30 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes coronales: l'activité du FDG prédomine en périphérie de la tumeur ; présence d'un centre nécrotique...62

Figure 28: FDG-TEP/TDM à J15 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes coronales : présence de calcifications intra-tumorales caractéristiques de l'ostéosarcome.....63

Figure 29: FDG-TEP/TDM à J15 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes frontales : fixation du FDG au niveau du poumon droit.....64

Figure 30: Comparaison de l'examen en microscopie optique après coloration à l'hématéine-eosine-safran, du carcinome épidermoïde de rat (A) (grossissement x200) et du carcinome épidermoïde humain (B) (grossissement x100): présence de cellules épithéliales malpighiennes bien différenciées avec une architecture trabéculaire et nodulaire et de nombreux globes cornés caractéristiques du carcinome épidermoïde.....65

Figure 31: Examen en microscopie optique après coloration HES, grossissement x25 (A) et x100 (B) : présence d'un carcinome épidermoïde bronchique (flèche bleue : alvéole pulmonaire ; flèche rouge : amas de cellules épithéliales malpighiennes avec globes cornés).....66

- Figure 32:** (A) : Examen en microscopie optique (grossissement x40) : ganglion lymphatique normal. (B – C): FDG-TEP/TDM: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes coronales (B) et axiales (C) : présence d’une adénopathie cervicale droite.....68
- Figure 33 :** Examen en microscopie optique après coloration HES, grossissement x25 (A) et x200 (B) : présence d’un infiltrat de carcinome épidermoïde (flèches) au sein d’une structure ganglionnaire.....69
- Figure 34:** Examen en microscopie optique (A, B et D : grossissement x125 ; C et E : grossissement x320). (A) : coloration HES : carcinome épidermoïde avec présence d’une ulcération de surface (flèche rouge). (B et C) : marquage immunohistochimique de la cytokératine AE1/AE3, positif au niveau du cytoplasme de quelques cellules (flèches). (D et E) : marquage immunohistochimique de la cytokératine 5/6, intense au niveau du cytoplasme de nombreuses cellules (flèches noires).....70
- Figure 35:** Examen en microscopie optique (A, B et D : grossissement x125 ; C et E : grossissement x320). (A) : coloration HES : carcinome épidermoïde. (B et C) : marquage immunohistochimique de la cytokératine CKHPM, intense au niveau du cytoplasme de nombreuses cellules (flèches). (D et E) : marquage immunohistochimique de la cytokératine 19, positif au niveau du cytoplasme de quelques cellules.....71
- Figure 36:** Examen en microscopie optique d’une lame de carcinome épidermoïde de rat. Marquage du CD 31, CD34 et facteur VIII (grossissement x50) : positif.....72
- Figure 37:** Examen en microscopie optique après coloration HES. (A : présence de cellules tumorales en amas denses, grossissement x50 ; B : zone centrale de la tumeur, présence de vaisseaux (V) et de nécrose (N), grossissement x50).....73
- Figure 38:** Examen macroscopique d’un poumon de rat porteur d’un ostéosarcome mandibulaire: présence de métastases.....73

Figure 39: Examen en microscopie optique après coloration HES. A : section d'un poumon entier, présence de nombreuses métastases (M) ; B : grossissement x100 : métastase pulmonaire.....	74
Figure 40: Etude de la progression de la moyenne des volumes tumoraux dans le groupe traité par <i>bevacizumab</i> et dans le groupe témoin.....	76
Figure 41: Evolution des volumes tumoraux exprimés en cm ³ sur une période de 23 jours après la greffe tumorale : mise en évidence d'une différence significative entre le groupe témoin et le groupe traité par <i>bevacizumab</i> (* : p< 0,05 et ** : p< 0,01) à J8, J13, J15, J17 et J23.....	76
Figure 42: IRM avec clichés dynamiques en T1-écho de gradient rapide, après injection intraveineuse de Gadolinium : présence d'un rehaussement relatif plus haut en périphérie (flèche) qu'au centre de la tumeur chez un rat issu du groupe témoin (A) et chez un rat traité par <i>bevacizumab</i> (B).....	77
Figure 43: Courbes d'intensité du signal sur la vitesse de prise de contraste: le rehaussement du signal en périphérie tumorale se fait rapidement jusqu'à saturation, chez un rat issu du groupe témoin (A) et chez un rat traité par <i>bevacizumab</i> (B).....	78
Figure 44: Courbes d'intensité du signal sur la vitesse de prise de contraste: le rehaussement du signal au centre de la tumeur se fait progressivement sans saturation, chez un rat issu du groupe témoin (A) et chez un rat traité par <i>bevacizumab</i> (B).....	78

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Aubry K, Labourey JL, Bessède JP, Tubiana-Mathieu N, Rigaud M. *Expression levels of thymidylate synthase, thymidylate phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in head and neck squamous cell carcinoma : preliminary study. Clinical Medicine : Oncology, 2008, 2: 27-35.*

Annexe 2 : Aubry K, Barriere G, Chable-Rabinovitch H, Dutour A, Paraf F, Monteil J, Rigaud M. *Molecular mechanisms regulating the angiogenic phenotype in tumors: clinical impact in the future. Anticancer Res, 2007, 27:3111-3119.*

Annexe 3 : Article accepté, en attente de publication dans la revue *Molecular Imaging and Biology*. Aubry K, Shao Z, Monteil J, Paraf F, Bessède JP, Rigaud M. *FDG-PET/CT of head and neck squamous cell carcinoma in rat model.*

Annexe 4 : Article accepté, en attente de publication dans la revue *In vivo*. Aubry K, Paraf F, Monteil J, Bessède JP, Rigaud M. *Characterization of a new rat model of head and neck squamous cell carcinoma.*

I-INTRODUCTION

Présentation des cancers ORL étudiés

Les cancers ORL sont nombreux et variés ; ils représentent 20% de l'ensemble des cancers humains. Nous avons étudié deux types histologiques : le carcinome épidermoïde et l'ostéosarcome.

Le carcinome épidermoïde de la cavité buccale et des voies aéro-digestives supérieures (VADS) est la forme histologique la plus fréquente des tumeurs ORL. Il survient le plus souvent après intoxication chronique au tabac et /ou à l'alcool dont l'association augmente le risque carcinologique de façon exponentielle. Il a été montré que certains carcinomes épidermoïdes ORL pouvaient être liés à une infection virale par l'Human Papilloma Virus (HPV 16 et 18) [1, 2]. Le carcinome épidermoïde présente la caractéristique d'être longtemps localisé au niveau locorégional, donnant des métastases ganglionnaires cervicales. Les métastases viscérales à distance (poumon ; foie ; squelette ; tissu cérébral) sont plus rares. Compte tenu du terrain, l'existence d'une seconde localisation néoplasique n'est pas rare au niveau pulmonaire et/ ou oesophagienne. Ces tumeurs sont classées selon la classification TNM après réalisation d'une panendoscopie ORL, d'un scanner cervical et d'un bilan d'extension à distance comprenant une échographie hépatique et une radiographie pulmonaire, complétée au moindre doute par un scanner thoracique. Le pronostic de ces tumeurs est principalement lié au diagnostic précoce. Le traitement de ces tumeurs comporte classiquement une chirurgie suivie d'une radiothérapie locorégionale et selon les résultats histologiques (présence de métastases ganglionnaires en rupture capsulaire) de chimiothérapie. Si la tumeur est classée inopérable, lors de la prise en charge initiale, le traitement associe une chimiothérapie et une radiothérapie. En présence d'une récurrence locale non opérable, la chimiothérapie reste le traitement de choix. Actuellement,

plusieurs protocoles de chimiothérapie sont disponibles. La chimiothérapie la plus classiquement utilisée associe le *5-fluoro-uracil* (5-FU®), un sel de platine (*cisplatine* (Cisplatine®) ou *carboplatine* (Paraplatine®)) et un taxane (*docétaxel* (Taxotère®)). Le 5-FU fait partie de la famille des agents anti-métabolites ; il agit en inhibant la thymidylate synthase, bloquant la phase S du cycle cellulaire et arrêtant ainsi le développement et la division cellulaire. Les sels de platine appartiennent à la famille des agents alkylants, ils arrêtent la croissance de la tumeur en liant ensemble les nucléotides guanine dans la double hélice d'ADN. Les deux brins ne peuvent ainsi pas se dérouler ni se séparer, l'ADN ne se réplique pas et la cellule ne se divise pas. Les taxanes sont des alcaloïdes végétaux qui bloquent la division cellulaire en empêchant la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique, bloquant ainsi la phase M du cycle cellulaire [3]. Par ailleurs il est connu que les cellules du carcinome épidermoïde expriment à leur surface, à des degrés variables, le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGF) [4]. La thérapie ciblée utilisant des anticorps anti-EGFR (Epithelial growth factor receptor) est parfois proposée en association avec la radiothérapie pour des carcinomes épidermoïdes ORL localement avancés et non opérables. Il s'agit de la molécule de *cétuximab* (Erbix®) qui correspond à un anticorps monoclonal chimérique de classe IgG1 qui se lie spécifiquement au récepteur EGFR (HER1 ou c-ErbB-1) et inhibe ainsi la liaison avec le facteur de croissance EGF. Le blocage du récepteur entraîne la non activation des kinases associées au récepteur, une inhibition de la croissance cellulaire, une induction de l'apoptose, une diminution des métalloprotéinases de la matrice extra-cellulaire et une diminution de la vascularisation. Son action reste limitée aux tumeurs dont les cellules expriment le récepteur EGFR. Des essais thérapeutiques de phase III ont récemment démontré l'intérêt de l'utilisation de cet anticorps soit couplé à la radiothérapie, soit en traitement de première ligne des

tumeurs récidivantes ou métastatiques, avec une augmentation de la survie et un meilleur contrôle locorégional [5].

L'ostéosarcome est une des tumeurs osseuses les plus fréquentes après le myélome. Cette tumeur maligne est caractérisée par une formation directe de l'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales [6]. Elle affecte le plus souvent des enfants ou de jeunes adultes. Sa localisation élective est la métaphyse des os longs et le genou pour plus de la moitié des cas. C'est une tumeur maligne potentiellement létale, plus fréquemment rencontrée au niveau des os longs des membres que dans la région maxillo-faciale atteinte dans 10% des cas. Elle représente 1% des cancers ORL. Elle présente une croissance rapide et a la capacité de métastaser rapidement à distance, notamment au niveau pulmonaire. Son traitement repose dans un premier temps sur une chimiothérapie néo-adjuvante suivie d'une chirurgie de réduction tumorale [7]. La chimiothérapie joue un rôle essentiel dans le contrôle des métastases à distance. Les principaux agents chimiothérapeutiques sont le *methotrexate*, la *doxorubicine*, l'*ifosfamide* et le *cisplatine*. Le *methotrexate* est un anti-métabolique du groupe des antifolates qui inhibe la dihydrofolate réductase, enzyme essentielle à la synthèse des purines et des pyrimidines, bloquant ainsi la phase S du cycle cellulaire. La *doxorubicine* est un antibiotique antitumoral qui inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN en s'intercalant dans sa structure, bloquant ainsi la division cellulaire. L'*ifosfamide* et le *cisplatine* au mode d'action précédemment décrit, sont des agents alkylants. L'ostéosarcome présente d'emblée ou développe souvent rapidement une résistance à ces agents cytotoxiques, ainsi qu'à la radiothérapie [8, 9]. L'analyse de la pièce de résection chirurgicale évalue la réponse à la chimiothérapie par le décompte des cellules tumorales viables, selon la classification de Rosen et Huvos; il s'agit d'un facteur pronostique important qui permet

d'ajuster la chimiothérapie adjuvante. La radiothérapie est parfois discutée lors d'une exérèse chirurgicale limitée ou incomplète. Le bilan d'extension locorégionale repose sur la TDM et l'IRM. Le bilan d'extension à distance recherche des lésions secondaires au niveau pulmonaire (TDM) et osseux (Scintigraphie). Les récurrences tumorales sont fréquentes. Le pronostic de l'ostéosarcome mandibulaire est meilleur que celui des os longs et une exérèse chirurgicale complète avec marges saines permet d'espérer une survie de 80% à 5 ans [6].

Phénomène de résistance aux thérapeutiques classiques

La résistance tumorale à une thérapeutique spécifique par chimiothérapie est souvent multi-factorielle. En effet, elle peut être liée à l'hôte ou aux altérations génétiques ou épigénétiques des cellules malignes [10]. Cette résistance peut s'exprimer d'emblée ou peut être acquise lors du traitement, même après une efficacité initiale. Selon les mécanismes d'action des produits, on peut distinguer des mécanismes généraux de résistance. Parmi celle-ci, on décrit une diminution de l'accumulation intracellulaire des molécules, en particulier une déficience des mécanismes de transport dans le sens plasma-milieu intracellulaire. Il peut s'agir également d'une modification du métabolisme des molécules. Ce mécanisme est singulièrement important pour les anti-métabolites qui nécessitent une transformation pour être activés. Pour certaines molécules, il existe une activation des mécanismes de réparation biochimique de l'ADN. Dans certains cas il s'agit de la modification de la cible des médicaments anticancéreux ou de la modification de l'expression des gènes sous l'effet de l'agression chimiothérapique quelle que soit l'étape de transcription intéressée : mutation, délétion, amplification, altération de la transcription, altération du mRNA, altération des protéines (instabilité génétique des cellules cancéreuses sous l'effet de la pression de sélection).

De plus nous savons qu'il existe une susceptibilité interindividuelle de sensibilité à la chimiothérapie, très variable d'un individu à l'autre. Ce thème avait fait l'objet d'une étude, au sein de notre unité de recherche, sur la sensibilité au 5-FU de patients porteurs d'un cancer du pharyngo-larynx classé T3 T4. L'efficacité thérapeutique de la molécule était comparée aux niveaux d'expression des gènes du métabolisme du 5-FU (Annexe 1).

Parmi les résistances multi-drogues, on peut distinguer schématiquement trois types de résistance commune aux anticancéreux:

-la classique MDR (Multiple Drug Resistance) (dépendant de la glycoprotéine P) qui correspond à un mécanisme général de résistance en rapport avec une diminution de l'accumulation intracellulaire des anticancéreux par augmentation de l'efflux vers l'extérieur. Cet efflux accru, dépend d'une glycoprotéine P, synthétisée par un gène *mdr*, acquis ou présent spontanément dans certains tissus.

-la MDR associée aux anti-topoisomérase II ; cette résistance n'est pas associée avec un trouble du transport du médicament, mais plutôt à une diminution ou à une modification structurale de la topoisomérase II, qui altère la fixation du médicament à l'enzyme. En outre, la topoisomérase II est très réduite dans les cellules au repos, ce qui explique la faible sensibilité de certaines tumeurs peu évolutives à ces médicaments.

-la MDR associée aux enzymes de détoxification. Elles sont nombreuses et permettent de détoxifier des xénobiotiques, dont l'organisme doit se débarrasser.

La résistance biochimique à la chimiothérapie est l'indice majeur du succès d'un traitement. De nouveaux tests permettent de prévoir les échecs thérapeutiques avec une efficacité de 99,2%. Il s'agit de l' « Extreme Drug Resistance Assay » développé par la société Oncotech permettant de classer les tumeurs en très résistantes (moins de 1% de réponse), moyennement résistantes (réponse inférieure à 50%) et peu résistantes (2 fois plus répondantes) [11-13]. La survie des patients semble directement corrélée aux résultats de ces analyses ; ceci permettrait un choix thérapeutique adapté à chaque tumeur.

Intérêt des thérapeutiques anti-angiogéniques

La croissance tumorale se fait grâce au développement d'une néovascularisation tumorale. L'étude des facteurs anti-angiogéniques est une voie intéressante de recherche de nouvelles thérapeutiques. La néovascularisation tumorale apporte des nutriments et de l'oxygène, indispensables à la croissance tumorale. Les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale sécrètent des facteurs de croissance et des facteurs anti-apoptotiques au contact des cellules tumorales [14]. Les cellules tumorales produisent quant à elles des facteurs proangiogéniques qui entraînent la prolifération des cellules endothéliales formant ainsi les néo vaisseaux tumoraux. Cette interaction entre cellules tumorales et cellules endothéliales semble être une cible intéressante dans le traitement antiangiogénique (Annexe 2). Contrairement aux chimiothérapies qui ciblent directement les cellules tumorales, la thérapeutique anti-angiogénique du réseau microvasculaire tumoral concerne tout type de tumeur et ne semble pas induire de résistance. De nombreuses molécules anti-angiogéniques ont été identifiées mais leurs modes d'action ne sont pas totalement élucidés. Le *bevacizumab* (Avastin®) est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), situés à la surface des cellules endothéliales. Il bloque ainsi la formation de néo-vaisseaux induits par l'action du VEGF. Le *bevacizumab* est actuellement utilisé en pratique clinique pour traiter le cancer colo-rectal métastatique, le cancer du sein métastatique, le cancer bronchique non à petites cellules et le cancer du rein avancé. L'efficacité des agents anti-angiogéniques peut être appréciée soit par l'étude histologique d'un fragment tumoral (marquage des cellules endothéliales ; étude de la micro densité vasculaire (MDV)) soit de manière non invasive en utilisant

l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en acquisitions dynamiques. En effet, l'étude quantitative non invasive du réseau micro-vasculaire tumoral par IRM dynamique a fait l'objet d'une publication de Faccioli et al [15]. Cette technique d'imagerie utilisé par l'équipe de Preda pour évaluer l'efficacité *in vivo* du *bevacizumab* sur un modèle murin de cancer du sein, semble être intéressante pour prévoir et évaluer l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique [16, 17].

Etude bibliographique des modèles animaux de cancer ORL

Afin de pouvoir améliorer la connaissance des mécanismes de carcinogénèse, le diagnostic, le suivi, et les essais de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de disposer de modèles animaux de cancers ORL.

En ce qui concerne le carcinome épidermoïde localisée au niveau de la sphère ORL, la littérature décrit plusieurs modèles chez les rongeurs. La plupart d'entre eux sont induits chimiquement par l'application d'un carcinogène. Le plus ancien carcinogène est le coal tar, utilisé au début du 20^{ème} siècle, en application locale pour induire la formation de cancers cutanés [18]. En 1954, Salley et al. a utilisé un hydrocarbure polycyclique (9,10 dimethyl-1,2-benzathracene (DMBA)) en application sur la face interne de joue d'un hamster [19] ; ce produit a été utilisé dans des publications plus récentes [20, 21]. Le carcinogène actuellement le plus connu, car facilement manipulable du fait de son caractère hydrosoluble, est la 4-Nitroquinoline-1-oxyde (4-NQO). Il peut être utilisé soit en application locale soit administrée dans l'eau de boisson [21-27]. Ce modèle a été décrit initialement par Wallenius en 1973 [28]. Ces modèles induits chimiquement, présentent l'avantage d'être réalisés chez les rats immunocompétents, cependant leur inconvénient principal est la durée d'obtention des tumeurs, les rendant inutilisables pour tout essai thérapeutique [29, 30]. Les autres modèles de carcinome épidermoïde, décrits dans la littérature, sont obtenus par greffe. Certains correspondent à des homogreffes de lignée cellulaire de carcinome épidermoïde murin, obtenu chimiquement, sur des rats nus ou génétiquement modifiés [31-35]. Des modèles de xéno-greffes sont également décrits et correspondent à des greffes de lignée cellulaire de carcinome épidermoïde humain sur des rats nus [36-45]. Ces modèles de greffe présentent l'avantage d'être obtenus rapidement et facilement mais présentent des

inconvenients à la fois relatifs à l'utilisation de rats immunodéprimés et au fait que les tumeurs ainsi obtenues ne présentent pas les mêmes caractéristiques immuno-histochimiques et évolutives que celles de l'homme [29].

En ce qui concerne l'ostéosarcome mandibulaire, plusieurs modèles sont décrits dans la littérature. Un modèle a été induit chimiquement en 1975, par l'injection intramédullaire de 4-NQO chez une population de lapins immunocompétents [46]. Ce mode d'administration du carcinogène a permis d'obtenir 65,6% d'ostéosarcome après une latence de 6 mois. En 1978, Sato et al. ont décrit l'utilisation de deux autres carcinogènes, le 3-methylcholanthrene, et le 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene (DMBA) à l'origine d'ostéosarcome chez le lapin [47]. En 1980, Allouche a créé un modèle d'ostéosarcome par injection intra-médullaire tibiale d'une suspension de cerium radioactive (Ce^{144*}). Il a obtenu une lignée cellulaire d'ostéosarcome dont les caractéristiques immuno-histochimiques et évolutives étaient identiques à celles des ostéosarcomes humains [48]. Cette lignée cellulaire a été utilisée par la suite dans notre unité de recherche, pour réaliser des greffes orthotopiques au niveau du tibia, sur des rats immunocompétents [9, 49-52].

Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail de recherche étaient de proposer des modèles animaux de cancers ORL, d'étudier leurs caractéristiques histologiques et radiologiques, afin de pouvoir en disposer pour des essais thérapeutiques, utilisant notamment des molécules anti-angiogéniques. Dans la dernière partie, nous rapportons les résultats d'un essai thérapeutique utilisant un anti-VEGF (*bevacizumab*-Avastin®) sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire.

II-MATERIELS ET METHODES

II-1-ETUDE ANATOMIQUE DE LA REGION CERVICALE ET DES VADS CHEZ LE RAT

Une étude anatomique de la région cervicale et des VADS était indispensable avant la création de modèles animaux de cancer ORL. L'étude anatomique a été réalisée chez des rats mâles, adultes âgés de 3 mois, sains dont la taille variait entre 20 et 25 cm de long et dont le poids était de 220 grammes.

Protocole de Dissection: figures 1-6.

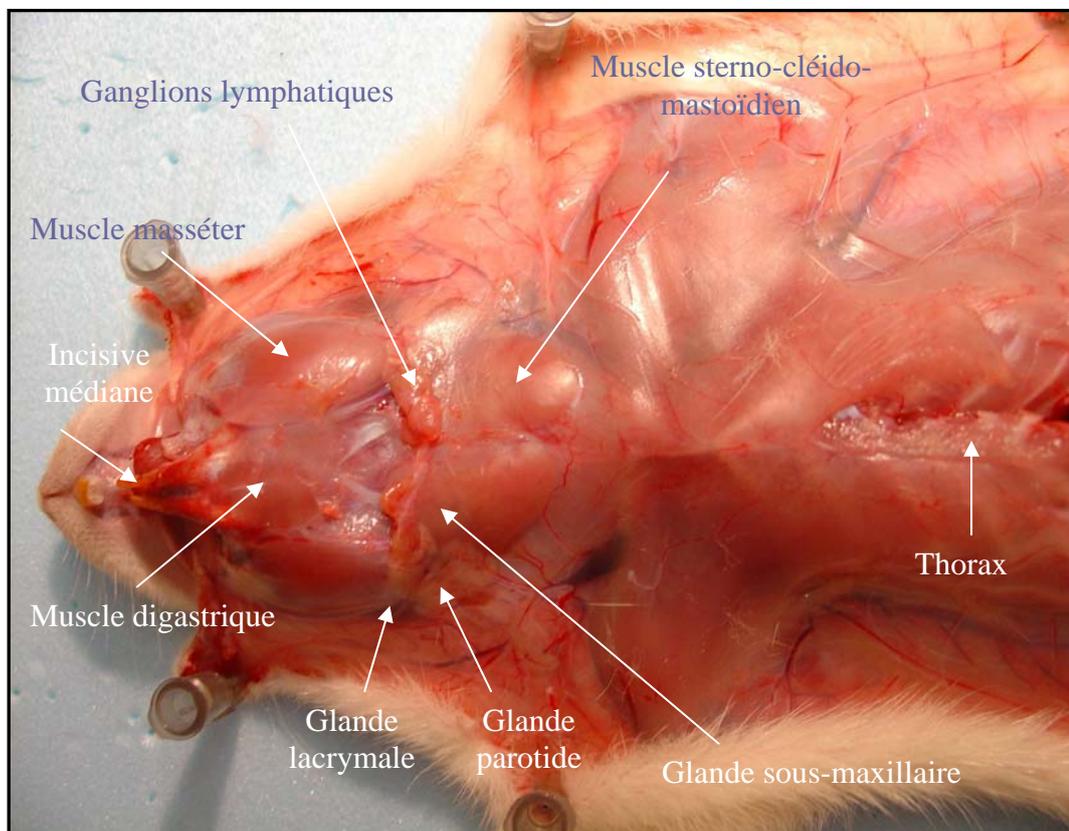


Figure 1 : Dissection cervicale superficielle après incision cutanée cervico-thoracique médiane.

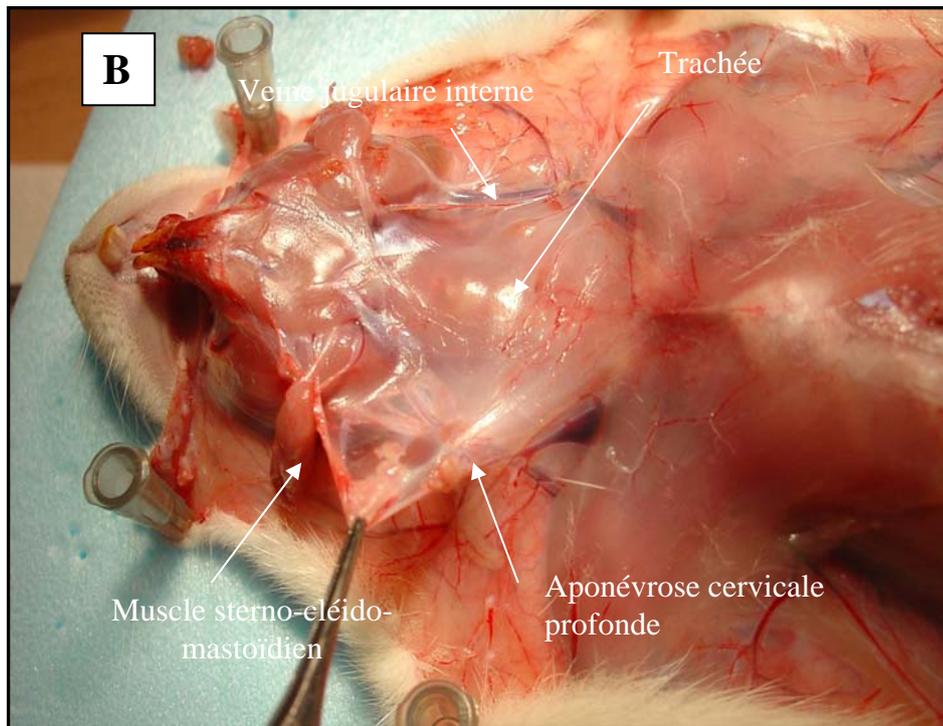
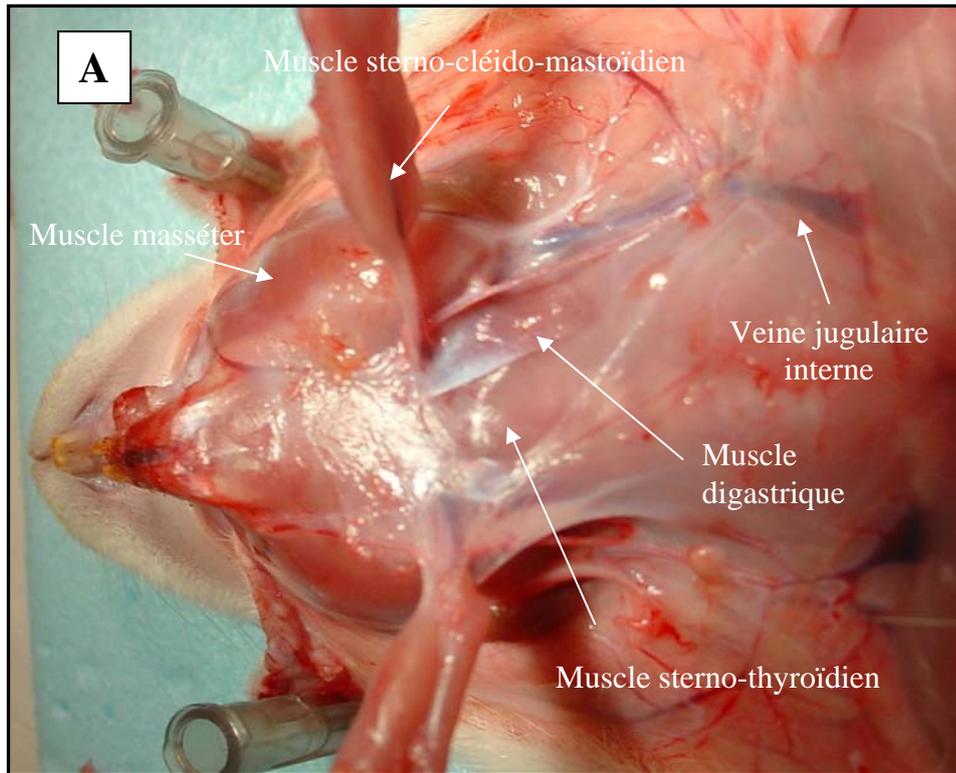


Figure 2 : Dissection cervicale profonde, A : le muscle sterno-cléido-mastoïdien est désincéré de ses attaches sterno-claviculaires, B : l'ouverture de l'aponévrose cervicale profonde permet de découvrir l'axe trachéal.

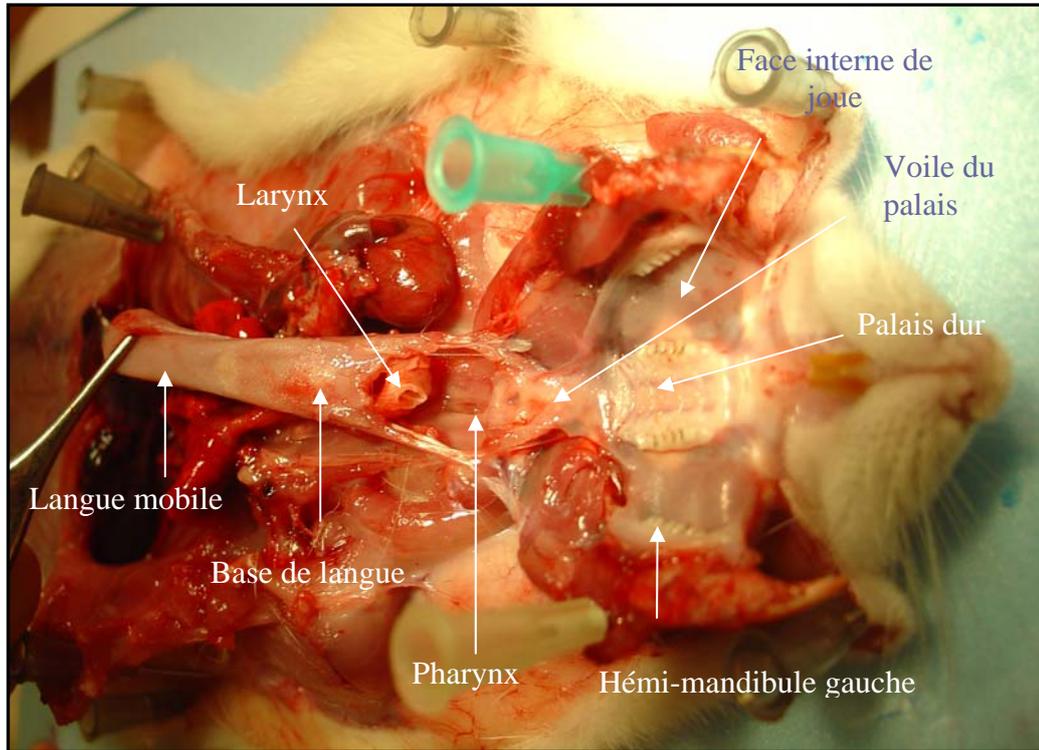


Figure 3 : Dissection de la cavité buccale et de l'oropharynx.

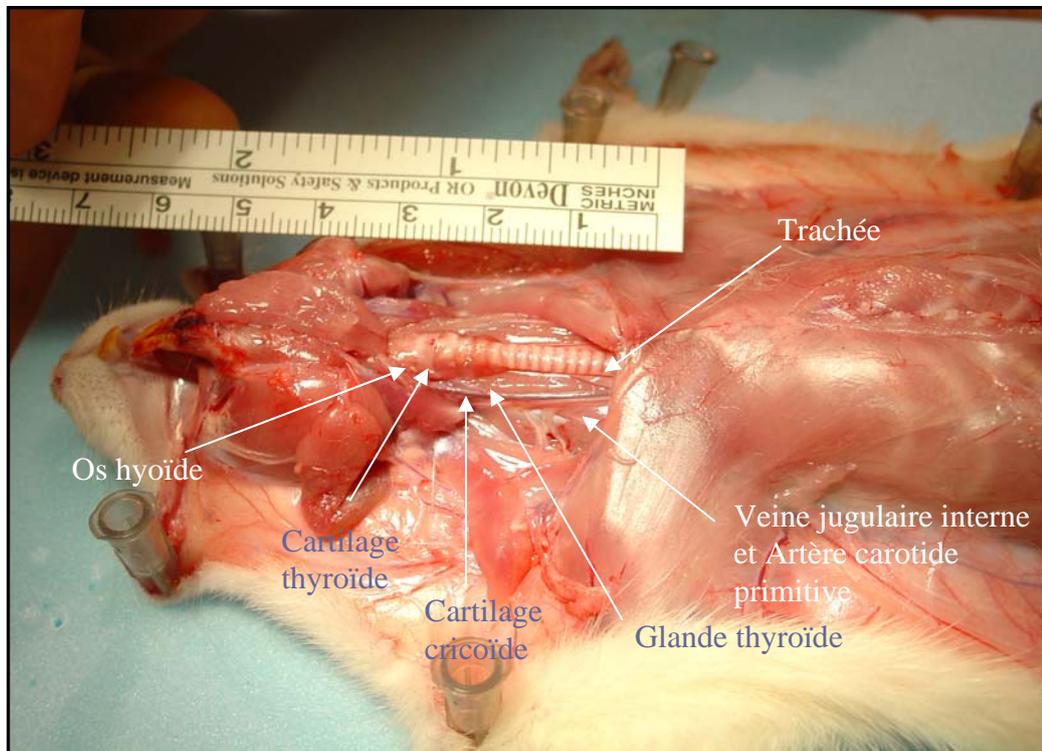


Figure 4 : Dissection de l'axe laryngo-trachéal.

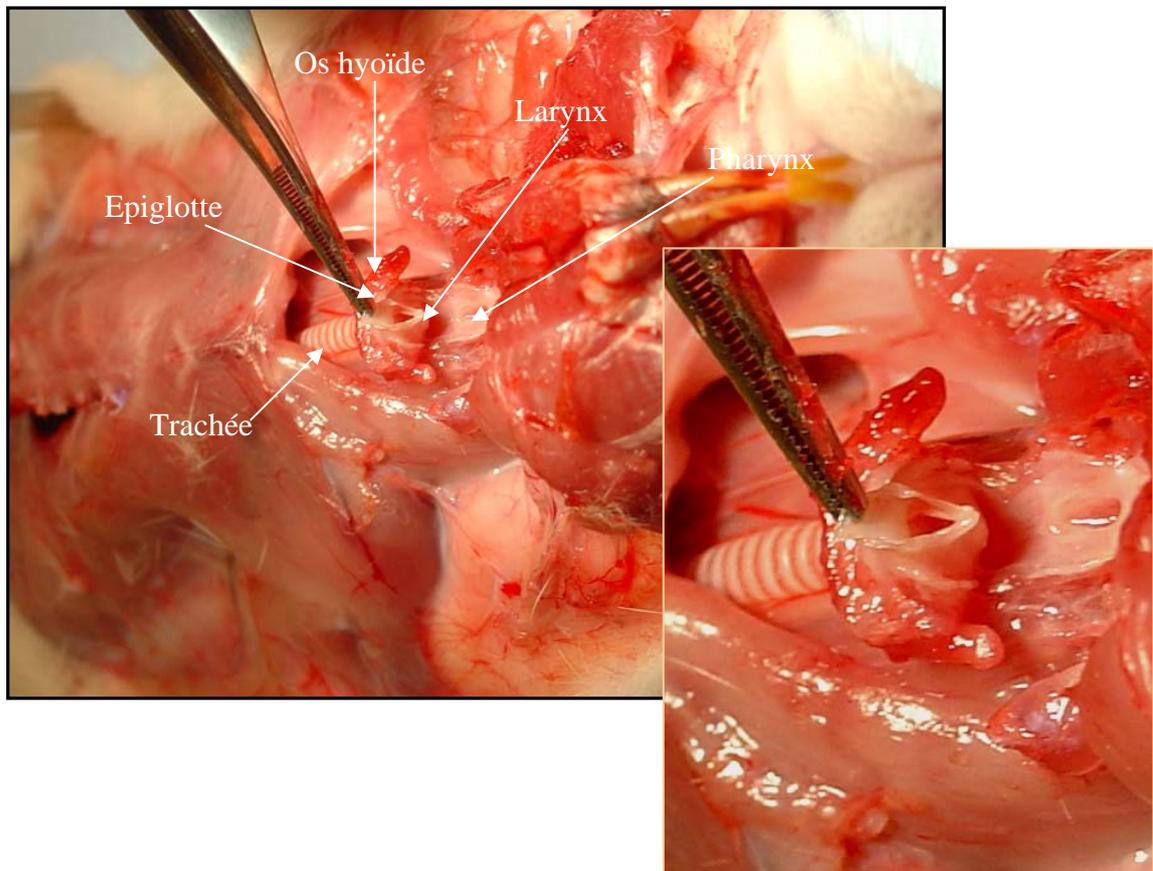


Figure 5 : Dissection laryngée.

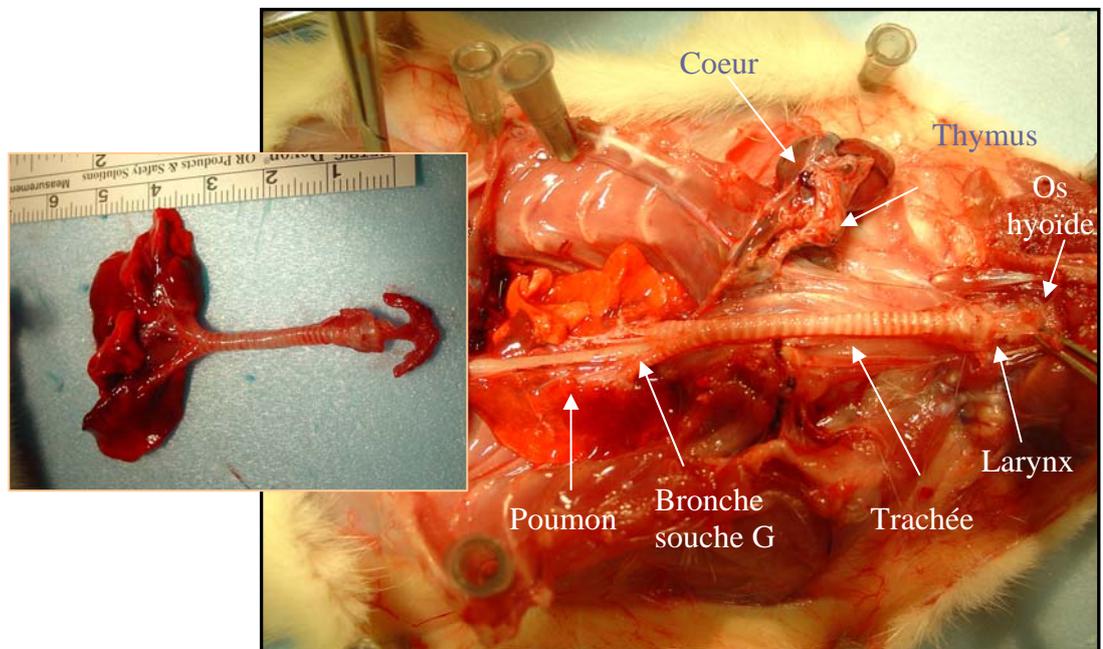


Figure 6 : Dissection thoracique.

L'anatomie cervicale et des VADS du rat est très proche de l'anatomie humaine sur le plan musculaire et viscéral [53].

Sur le plan histologique, nous retrouvons un épithélium malpighien non kératinisé au niveau de la cavité buccale, de l'oropharynx et des étages sus-glottique et glottique du larynx. L'étage sous-glottique et la trachée sont bordés par un épithélium cylindrique, cilié de type respiratoire, ce qui est identique à l'étude histologique chez l'homme [54, 55].

II-2-PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Tous les soins et manipulations ont été réalisés selon les règles de l'expérimentation animale. Les rats utilisés étaient des Sprague Dawley, immunocompétents, âgés de 21 jours dont le poids était de 30 grammes. Ils étaient placés 2 par cage et nourris avec de la nourriture standard pour rongeurs. La pièce était à une température constante de 20°C et le cycle diurne-nocturne était de 12h/12h. Toutes les manipulations animales étaient réalisées sous anesthésie générale utilisant un appareil d'anesthésie adapté au petit animal (Minerve, Esternay, France). La sédation était réalisée dans une chambre d'inhalation avec 1 à 3% d'*isoflurane* (Baxter, Belgique) entraîné par 100% d'oxygène à 4l/min. La sédation était obtenue en moins de 3 minutes.



Figure 7 : Appareil d'anesthésie avec chambre d'inhalation (flèche).

II-2-1-Carcinome épidermoïde

a) Induction chimique de carcinome épidermoïde

La solution de 4-NQO était préparée une fois par semaine, à la fois pure à la concentration de 10mg/ml pour les applications et diluée dans de l'eau à la

concentration de 0,001% pour la boisson. Soixante rats ont été inclus dans l'étude. Ils ont été répartis en trois groupes :

- Groupe application (n=30) : l'application était réalisée avec un écouvillon, délivrant une quantité constante ($0,15 \pm 0,03$ mg) de carcinogène par application. La 4-NQO était appliquée par un mouvement de va-et-vient, sur la langue mobile pour 25 rats et sur le larynx pour 5 rats. L'application au niveau du larynx a nécessité l'utilisation d'une optique de 4 mm 0° sur laquelle nous avons fait souder un canal opérateur. Une pince à biopsie coloscopique munie à son extrémité d'une cotonnette de 3mm^3 était, une fois imbibée par la solution de 4-NQO, introduite dans le canal opérateur et appliquée sous contrôle visuel au niveau des cordes vocales du rat. La bonne exposition laryngée, lors de cette endoscopie, était favorisée par la traction de la langue mobile par une pince à disséquer. L'application était pratiquée 3 fois par semaine sur une durée totale de 16 semaines. Les séances d'application n'étaient pas suivies de période de jeûne et les rats disposaient de boisson et d'alimentation à volonté.

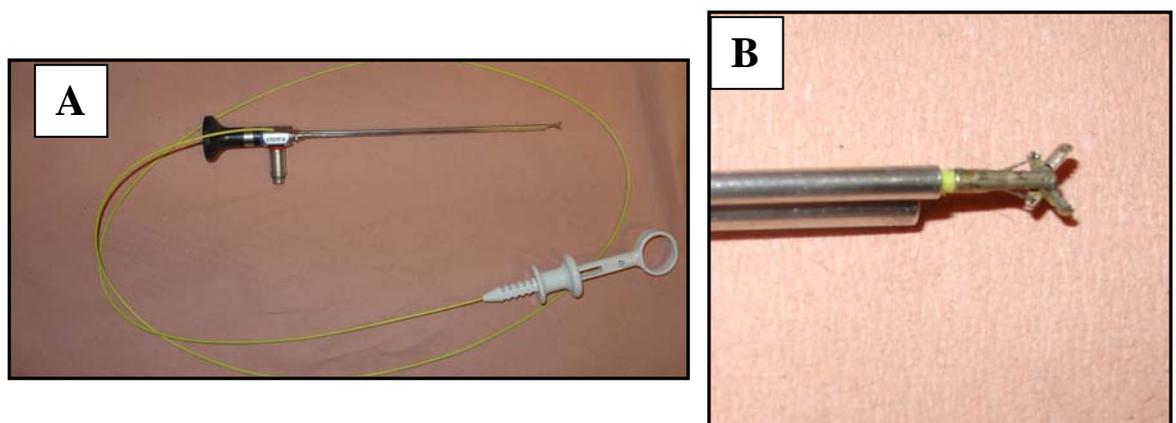


Figure 8 : A : Optique 0° avec canal opérateur – pince de coloscopie, B: grossissement : extrémité de la pince de coloscopie.



Figure 9 : Endoscopie des VADS chez le rat : introduction de l'optique 0° avec pro traction linguale.

- Groupe boisson (n=25) : l'eau de boisson contenant la 4-NQO était disponible à volonté pendant une durée de 16 semaines. La solution était renouvelée une fois par semaine.
- Groupe témoin (n=5) : les rats témoins n'avaient subi aucune manipulation.

L'examen de la cavité orale et du larynx par endoscopie, a été réalisé chez tous les rats, une fois par semaine pendant 34 semaines.

b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde

La première greffe a été réalisée en utilisant les tumeurs induites chimiquement par la 4-NQO. Les tumeurs ainsi obtenues ont été prélevées et conservées par congélation à -80°C dans une solution associant 50% de sérum fœtal de veau (GIBCO), 40% de RPMI (GIBCO) et 10% de DMSO (dimethyl sulphoxide, SIGMA). Les fragments tumoraux étaient décongelés dans du sérum fœtal de veau puis découpés en fragments de 100 mm³. Cinq rats ont été greffés au niveau de la face ventrale du cou, après une incision cutanée de 4 mm puis une incision du muscle masséter sous-jacent.

Le fragment tumoral était placé dans le muscle masséter, de manière bilatérale afin d'augmenter les chances de prise de greffe. L'incision cutanée était refermée par 2 points de suture (fil non résorbable 5/0). Les tumeurs ainsi obtenues ont été prélevées et utilisées à l'état frais pour réaliser des greffes successives tous les 7 jours, sur un nombre total de 20 rats, selon le même protocole. Les rats étaient examinés quotidiennement à la suite de la greffe tumorale.



Figure 10 : Greffe tumorale en région cervicale.

Les dimensions tumorales étaient mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et les volumes tumoraux étaient calculés selon la formule de Carlsson : $V = a \times b^2 \times \frac{1}{2}$ (a: diamètre le plus long; b: diamètre le plus court) [56].

II-2-2-Ostéosarcome mandibulaire

Nous avons utilisé une tumeur d'ostéosarcome créée initialement par Allouche en 1980 [48] par injection intra-médullaire tibiale d'une suspension de cerium radioactif. Il a obtenu une tumeur dont les caractéristiques immunohistochimiques et

évolutives étaient identiques à celles de l'ostéosarcome humain. Cette souche tumorale a été conservée par congélation à -80°C dans les conditions précédemment décrites. Soixante quinze rats Sprague Dawley immunocompétents ont été successivement greffés à partir de cette tumeur. Au sein de notre unité de recherche, nous avons l'expérience de greffes d'ostéosarcome en position para-tibiale [9, 49-52] avec un rendement de prise de greffe de 80% avec du tissu tumoral frais. Nous avons greffé les fragments tumoraux en région cervicale. Le protocole de greffe était identique à celui décrit dans le paragraphe précédemment ((b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde) mais le geste était complété par l'ouverture du périoste osseux et l'abrasion de la corticale osseuse au bistouri froid, afin de faciliter l'ostéo-intégration tumorale.

La surveillance de la croissance tumorale était réalisée quotidiennement par une palpation cervicale et les volumes tumoraux étaient mesurés tous les 3 jours selon le protocole décrit dans le paragraphe b).

II-3- PROTOCOLE D'IMAGERIE PAR FDG-TEP/TDM

Nous avons réalisé une imagerie par 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG)-tomographie à émission de positons couplée à une tomодensitométrie (TEP/TDM). Les rats étaient mis en jeun 12 heures avant la réalisation de la TEP. Deux heures avant l'imagerie, 18,5mBq/100g de FDG (Cyclopharma, Laboratoire Saint Beauzire, France) étaient injectés dans une des veines caudales du rat. L'analyse des images de la TEP a été réalisée avec un appareil à usage clinique humain couplant la TEP et la TDM (Biograph 6) (Siemens Medical Solutions; Knoxville, TE). Le scanner permettait d'obtenir des acquisitions simultanées de 325 coupes axiales de 0,6 mm pour chacune des positions de lit d'acquisitions de la TEP. La résolution axiale de la TEP était de 4,5-mm FWHM (Full Width at Half Maximum). Les paramètres techniques utilisés pour la TDM étaient de 6 x 0,5 mm pour la configuration du détecteur, pitch de 1,8 mm, tension de 80kV et intensité de 130 mAs. Ce mode d'acquisition a été utilisé pour les corrections d'atténuation et le système de fusion automatique des coupes TEP et TDM. La FOV (Field Of View) choisie pour la reconstruction tomодensitométrique était de 25 cm. Les images scannographiques étaient reconstruites par une rétro projection filtrée permettant d'obtenir des coupes transversales de 1 mm d'épaisseur. Une acquisition TEP, en 3 dimensions, de 10 minutes, sur 15 cm de FOV axiale a été réalisée après la TDM. Les images de la TEP ont été reconstruites après un processus itératif (8 iterations, 16 subsets) avec filtrage passe bas avec un seuil à 1.0 pour obtenir des images de matrice à 337² pixels avec un zoom de 2. Des coupes contiguës de 2,0 mm en plan axial, de 2,7 mm en plan sagittal et en plan coronal ont été obtenues. La fixation tumorale du FDG a été quantifiée en SUV (Standardized Uptake Value). La SUV est la concentration de l'activité métabolique tumorale (MBq/ml) ramenée à la dose injectée (MBq) normalisée par le poids de l'animal (ml). Les SUV maximales et moyennes ont

été calculées. Le volume tumoral métabolique a été calculé par un niveau de seuil de 40% de la fixation maximum du volume tumoral.

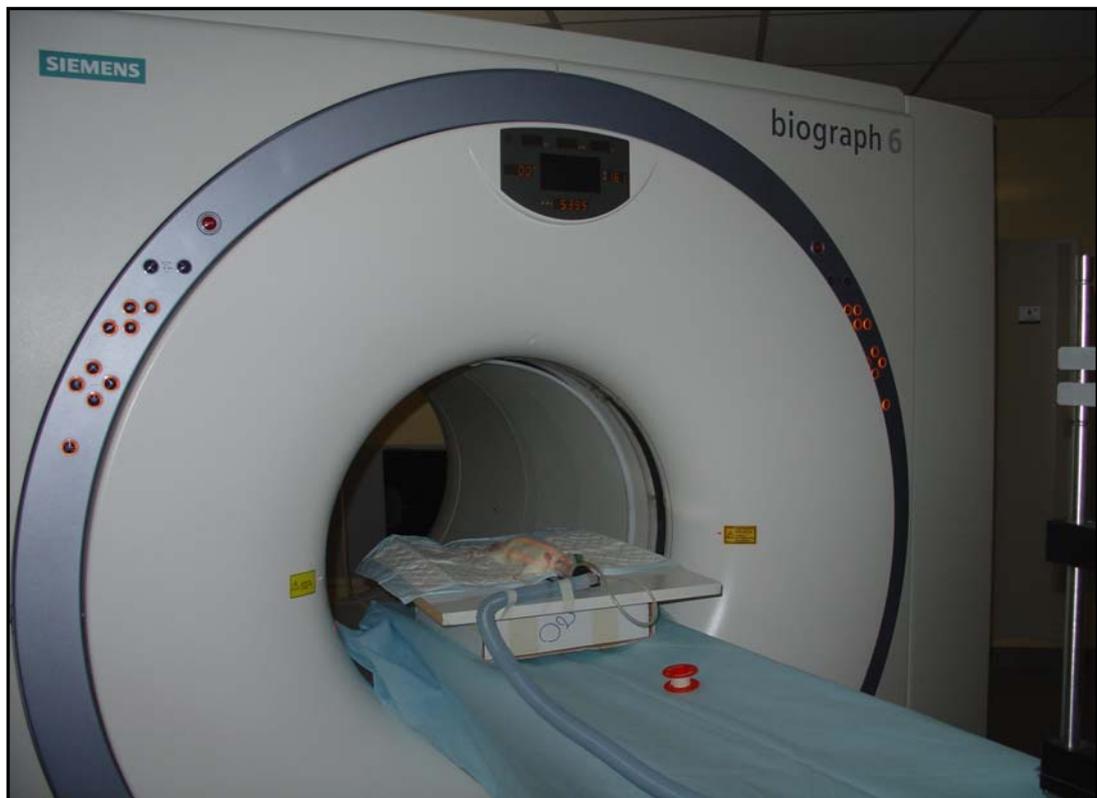


Figure 11 : Appareil de TEP/TDM (biograph 6).

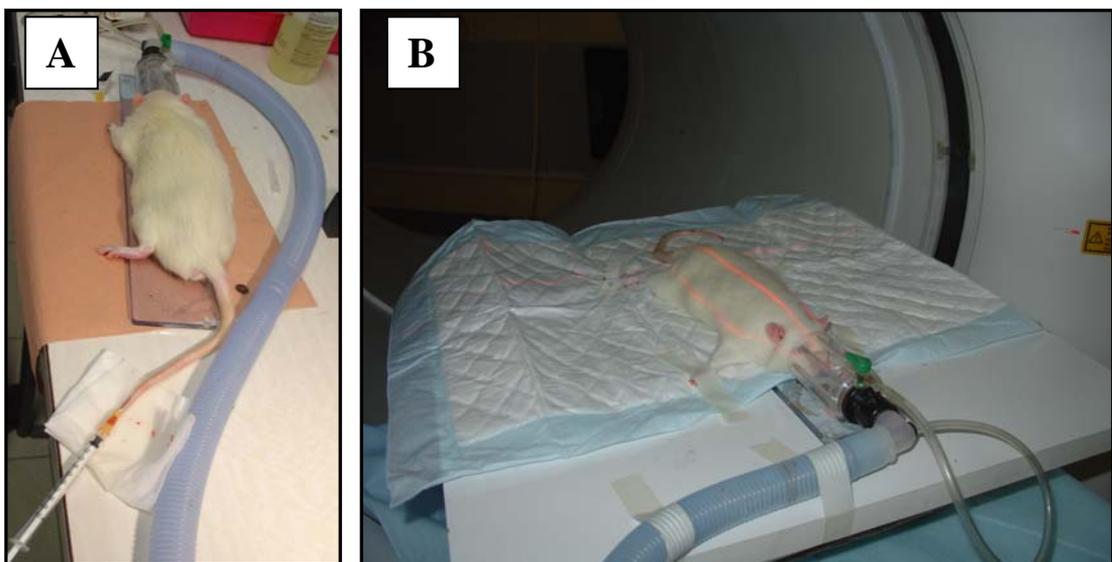


Figure 12 : (A) : Injection intraveineuse du FDG; (B) : Réalisation de la TEP/TDM sur rat anesthésié.

II-3-1-Carcinome épidermoïde

a) Induction chimique de carcinome épidermoïde

La FDG-TEP/TDM a été réalisé à la 34^{ème} semaine suivant le début de l'expérimentation. Dix rats ont bénéficié de cet examen, 5 issus du groupe boisson (3 d'entre eux présentaient une tumeur développée au niveau de la cavité buccale lors de l'examen clinique) et 5 issus du groupe témoin afin de déterminer la fixation physiologique du FDG en région cervicale.

b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde

La FDG-TEP/TDM a été réalisé chez 10 rats aux 15^{ème} et 30^{ème} jours suivant la greffe.

II-3-2-Ostéosarcome mandibulaire

La FDG-TEP/TDM a été réalisé chez 20 rats aux 8^{ème} et 15^{ème} jours suivant la greffe.

II-4-PROTOCOLE DE L'ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE

Les rats ont été sacrifiés après injection veineuse de chlorure de potassium sous sédation par *isoflurane*. L'ensemble des prélèvements a été fixé dans une solution de formol à 10%. Chaque prélèvement a été sectionné puis inclus dans un bloc de paraffine. Des sections d'une épaisseur de 5 micromètres ont été réalisées, colorées par l'hématéine-éosine-safran (HES) et analysées en microscopie optique.

II-4-1-Carcinome épidermoïde

a) Induction chimique de carcinome épidermoïde

La cavité orale, le pharynx, la trachée, l'œsophage, les ganglions lymphatiques cervicaux, les poumons et le foie ont été prélevés.

b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde

Les masses cervicales, les ganglions lymphatiques cervicaux, les poumons et le foie ont été prélevés. Une analyse immunohistochimique par marquage des cytokératines AE1/AE3, 5/6, 19 et à haut poids moléculaire (HPM) a été réalisée afin de caractériser la tumeur. L'étude de la vascularisation tumorale s'est faite par un marquage de CD31, CD34 et du facteur VIII.

II-4-2-Ostéosarcome mandibulaire

Les masses cervicales, les poumons et le foie ont été prélevés.

II-5-ESSAI THERAPEUTIQUE UTILISANT LE *BEVACIZUMAB* (AVASTIN®) SUR LE MODELE D'OSTEOSARCOME MANDIBULAIRE

II-5-1-Protocole expérimental

Vingt rats porteurs d'un ostéosarcome mandibulaire ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été divisés en deux groupes, un groupe de 10 rats non traités constituant le groupe témoin et un groupe de 10 rats recevant le traitement par *bevacizumab*. Le *bevacizumab* a été administré par voie intra-péritonéale à la dose de 1 mg par injection, 3 fois par semaine pendant 3 semaines. Les tumeurs ont été mesurées tous les 3 jours et les volumes tumoraux calculés. Les masses tumorales et les poumons ont été prélevés pour l'analyse anatomopathologique à J25. Les résultats ont été analysés selon les tests statistiques Mann et Whitney, Friedman et Anova.

II-5-2-Evaluation de l'efficacité du *bevacizumab* par imagerie par résonance magnétique (IRM)

Quatre rats du protocole ostéosarcome mandibulaire ont bénéficié d'une IRM en séquences dynamiques à J14. Deux rats étaient issus du groupe témoin et deux rats étaient issus du groupe traité selon le protocole expérimental décrit précédemment. Les images ont été acquises avec une IRM Philips Intera, 1,5-T, antenne crâne. Les coupes axiales de 6 mm chevauchées de 3 mm, ont été réalisées en T1-écho de gradient rapide, avec des séquences dynamiques multiphasées, multicoupes de 6 acquisitions toutes les 46 secondes. Une injection de *gadolinium* (Dotaren, Guerbet, France) à la dose de 0,2 ml/kg a été réalisée dans une veine caudale de chaque rat.

III-RESULTATS

III-1-RESULTATS CLINIQUES

III-1-1-Carcinome épidermoïde

a) Induction chimique de carcinome épidermoïde

Sur le plan clinique, aucune lésion n'a été observée à la 16^{ème} semaine. Nous avons observé des leucoplasies développées sur la langue mobile chez 18 rats (10 du groupe boisson et 8 du groupe application) et des papillomes chez 2 rats du groupe application sur la langue mobile, 20 semaines après le début de l'expérimentation (Figures 13 et 14). Les 5 rats badigeonnés au niveau des cordes vocales sont tous morts d'asphyxie entre la 20^{ème} et la 25^{ème} semaine suivant le début de l'expérimentation. L'examen clinique du larynx après autopsie montrait chez 4 rats un œdème laryngé associé à des lésions de leucoplasies et chez le dernier la présence d'une lésion bourgeonnante réalisant une obstruction complète de la filière laryngée. Des tumeurs ulcéro-bourgeonnantes ou infiltrantes de la cavité orale ont été détectées entre la 28^{ème} et la 34^{ème} semaine chez 39 rats (14 du groupe boisson et 25 du groupe application sur la langue mobile) (Figure 15 et Tableau I). A la 34^{ème} semaine, parmi les 5 rats du groupe boisson sélectionnés pour la TEP, 2 rats ne présentaient aucune tumeur apparente lors de l'examen clinique et 3 d'entre eux présentaient une tumeur développée dans la cavité orale (une sur la lèvre inférieure (Figure 16), une au niveau du maxillaire supérieur et une sur la face interne de la joue). Nous n'avons pas mis en évidence de double localisation tumorale au sein des deux groupes. Les rats du groupe témoin (n=5) étaient indemnes de toute lésion.

Tableau I : Résultats lors de l'examen clinique après exposition à la 4-NQO (N=55)

Nombre de semaines après le début de l'expérimentation	Application sur la langue mobile (n=25)	Application laryngée (n=5)	Boisson (n=25)
16	-	-	-
20	Leucoplasie (n=8) Papillome (n=2)	Morts (n=5) Papillome (n=1) Carcinome épidermoïde : -laryngé (n=1) -pulmonaire (n=1)	Leucoplasie (n=10)
28 - 34	Carcinome épidermoïde (n=25)	-	Carcinome épidermoïde (n=14)



Figure 13: Leucoplasie développée sur le bord latéral droit de la langue (site d'application de la 4-NQO) (flèche).



Figure 14: Papillome développé sur la pointe de la langue (flèche).



Figure 15: Tumeur développée au niveau de la langue mobile (site d'application de la 4-NQO).

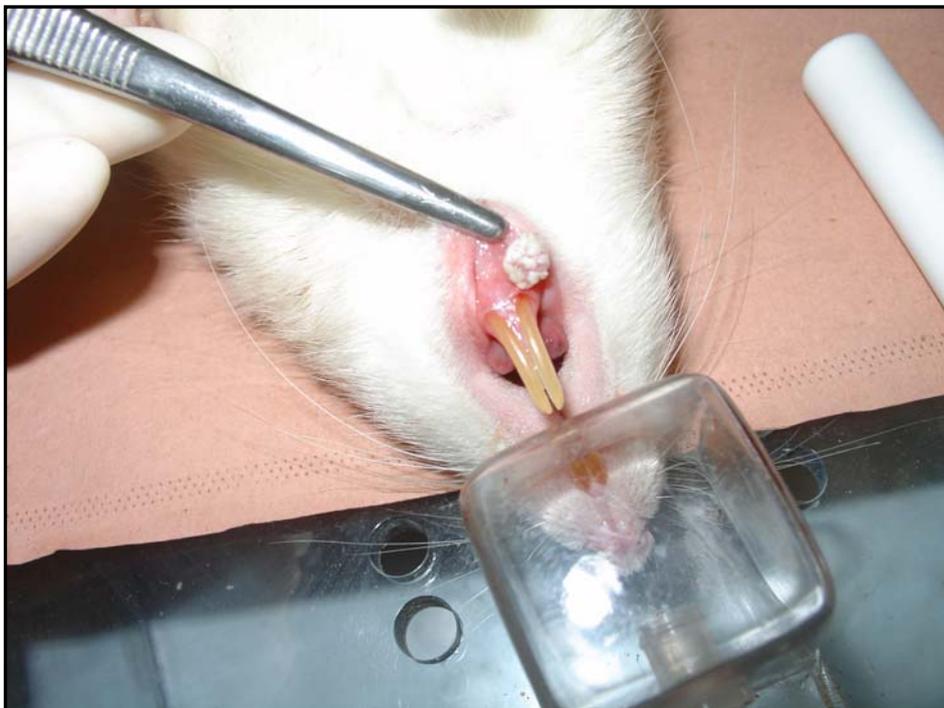


Figure 16: Présence d'une tumeur développée sur la lèvre inférieure.

b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde

Nous avons observé le développement d'une masse cervicale unilatérale chez 3 rats du premier groupe (rats greffés avec un fragment de tumeur congelée) et bilatérale chez 16 rats du deuxième groupe (rats greffés avec du tissu tumoral frais), soit respectivement 30% et 80% de succès de prise de greffe (Figure 17). Les volumes tumoraux moyens pour 10 rats ont été calculés à J7, 14, 21 et 30 après la greffe (Figure 18). Nous avons observé une progression tumorale avec un écart type faible à J7 et J14 (écart-type à $0,3 \text{ cm}^3$) et une nette augmentation de l'écart type à J30 (écart type à $5,9 \text{ cm}^3$). Le protocole de reproduction tumorale par allogreffes successives est représenté figure 19.

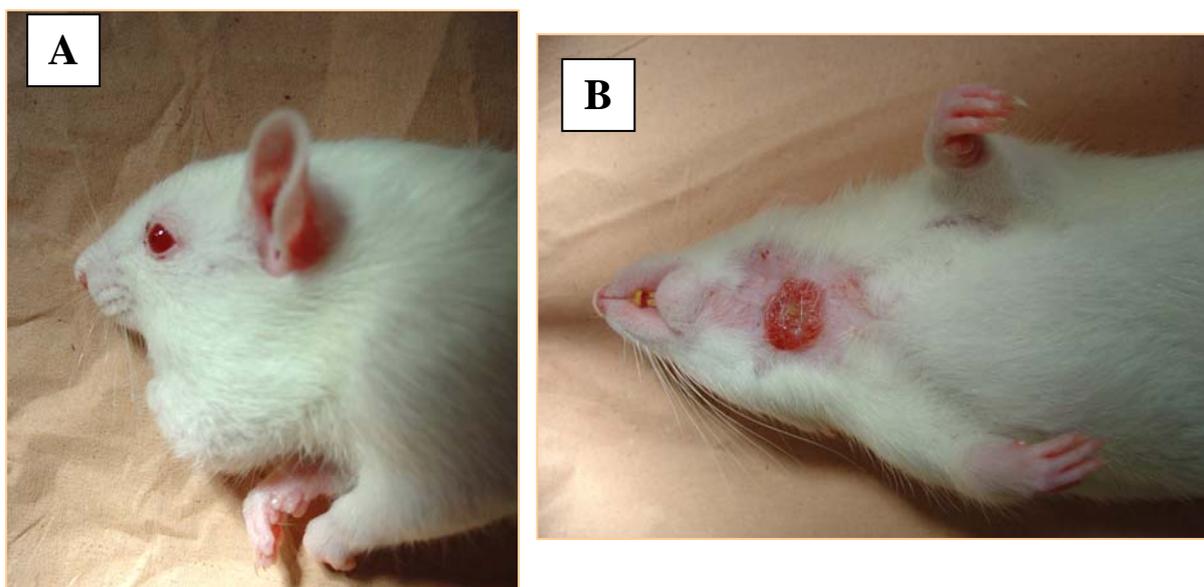


Figure 17 : (A) : Présence d'une masse tumorale développée en région cervicale à J30 après la greffe ; (B) : Présence d'un nodule de perméation.

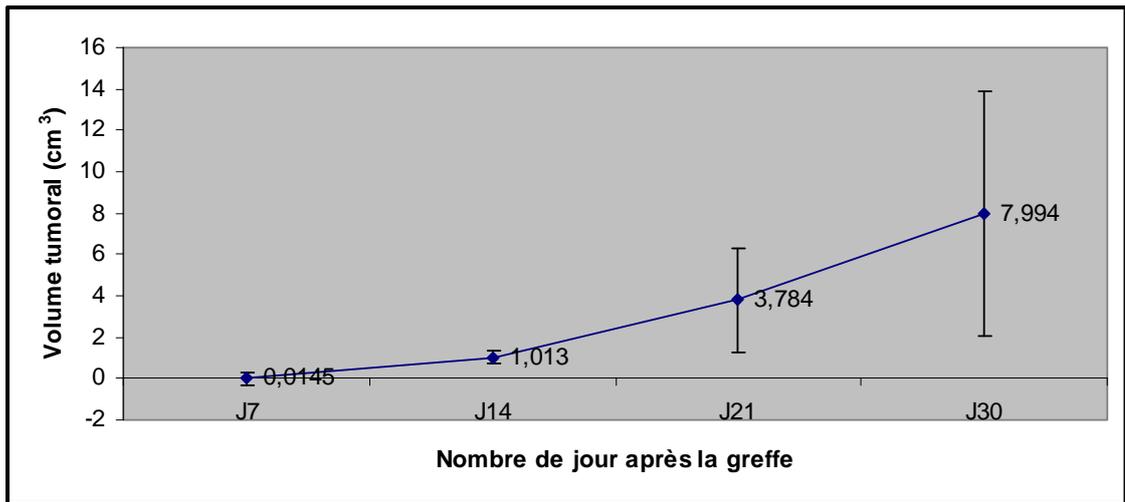


Figure 18: Courbe d'évolution du volume tumoral moyen en fonction du nombre de jour après la greffe (n=10).

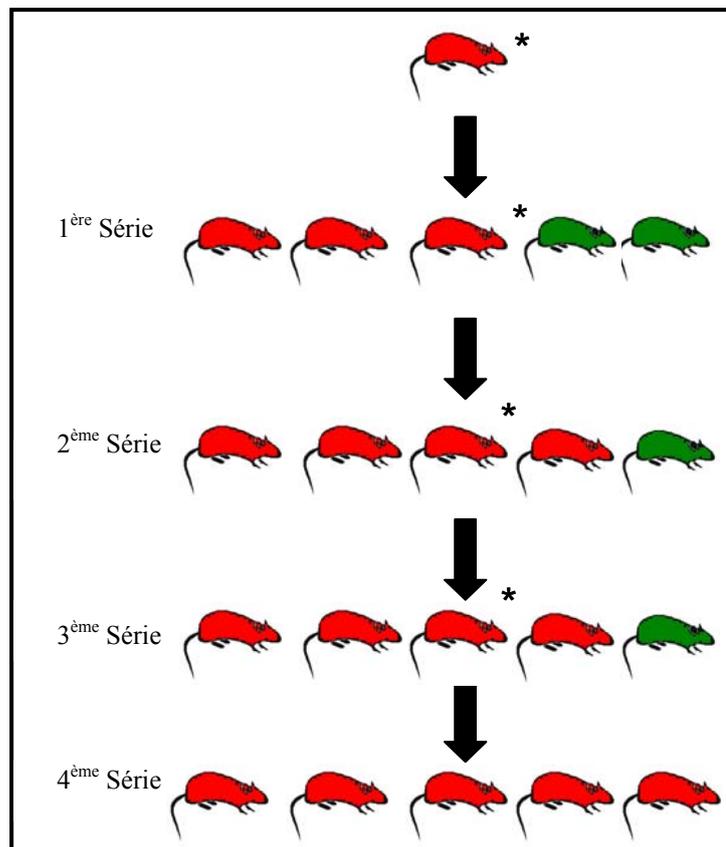


Figure 19: Schéma de reproduction et de conservation d'une tumeur par allogreffes successives sur 4 séries de 5 rats âgés de 21 jours, à 7 jours d'intervalle. (* : tumeur fraîche prélevée pour la greffe suivante). Rat rouge : prise de greffe – Rat vert : absence de prise de greffe.

III-1-2-Ostéosarcome mandibulaire

Les tumeurs greffées se sont rapidement développées en région cervicale para mandibulaire (Figure 20). Le succès de la prise de greffe était de 70% avec des fragments tumoraux congelés et de 100% avec des fragments tumoraux frais. Les volumes moyens tumoraux ont été calculés à J3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20 et 23 (n=20) (Figure 21).

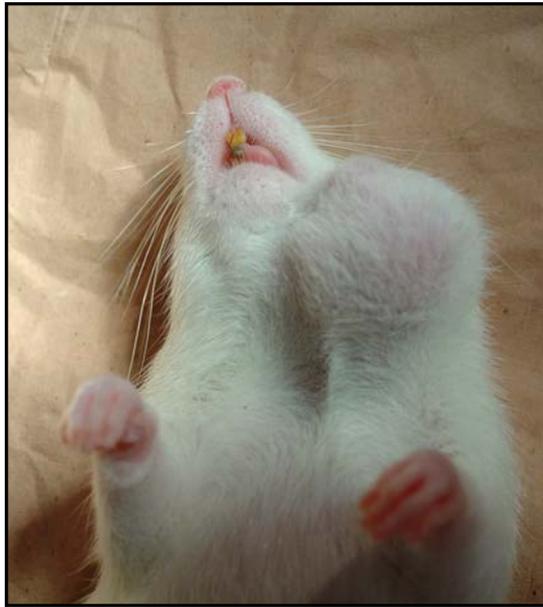


Figure 20: Présence d'une masse tumorale cervicale à J20 après la greffe.

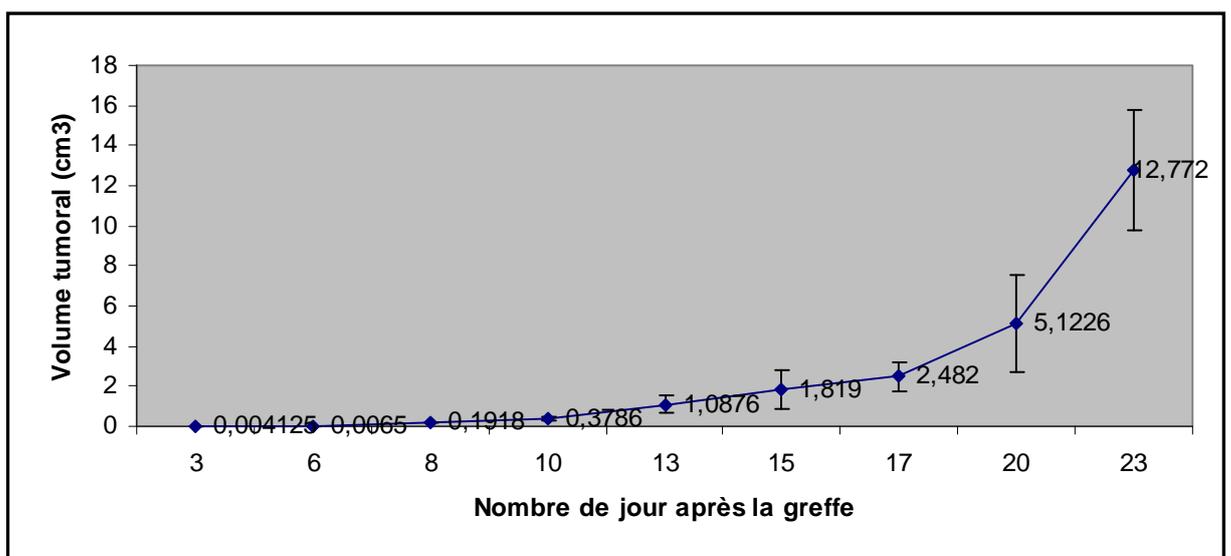


Figure 21: Evolution du volume tumoral moyen sur une période de 23 jours après la greffe (n=20).

III-2- RESULTATS DE L'IMAGERIE PAR FDG-TEP/TDM

III-2-1-Carcinome épidermoïde

a) Induction chimique de carcinome épidermoïde

La TEP a confirmé la présence des tumeurs diagnostiquées par l'examen clinique dans la cavité orale (n=3) et a permis de découvrir des localisations tumorales pharyngées localisées au niveau de la base de langue (n=3) (Figures 22, 24, 25). Cette imagerie a permis de mettre en évidence l'extension tumorale des différentes lésions et notamment la présence d'une extension rétro-orbitaire chez le rat n°2 présentant une localisation tumorale au niveau du maxillaire supérieur (Figure 23). Une seconde localisation tumorale a également été détectée par la TEP chez le rat n°1, au niveau de la base de langue. Nous avons calculé les SUV maximales et moyennes et déterminé les volumes métaboliques tumoraux selon la formule $V = 1/6 \pi a \times b \times c$ (a : longueur, b : largeur, c : épaisseur tumorale). (Tableau II).

Tableau II : Résultats de la FDG-TEP/TDM chez 5 rats du groupe boisson.

Rat N°	Localisation tumorale	Volume métabolique (mm ³)	Diamètres tumoraux métaboliques a x b x c (mm)	SUV Max	SUV Moy
1	Lèvre inférieure	19	3 x 3 x 4	1,3	1,2
	Base de langue	452	8 x 9 x 12	3,0	1,9
2	Maxillaire supérieur, extension rétro-orbitaire	78	5 x 5 x 6	4,0	3,0
3	Face interne de joue	113	4 x 6 x 9	1,4	1,1
4	Base de langue	792	7 x 9 x 24	1,4	1,0
5	Base de langue	603	6 x 8 x 24	1,6	1,4

Le volume métabolique tumoral de la plus petite lésion localisée au niveau de la lèvre inférieure était de 3x3x4 mm soit 19 mm³. Le volume métabolique tumoral de la plus grosse lésion, localisée au niveau du maxillaire supérieur avec extension rétro orbitaire, mesurait 5x5x6 mm soit 79 mm³. La distribution intra tumorale du FDG était uniforme, sans hypofixation centrale. Chez le rat n°4, présentant une tumeur de la base de langue, nous avons observé une fixation du FDG sur un ganglion lymphatique cervical. Aucune fixation du FDG n'a été observée au niveau des poumons ou du foie.

Au sein du groupe témoin, nous avons observé une fixation physiologique du FDG au niveau de la langue chez tous rats, la moyenne de la SUV maximale était mesurée à $1,967 \pm 0,723$ et la moyenne de la SUV moyenne à $1,767 \pm 0,728$.

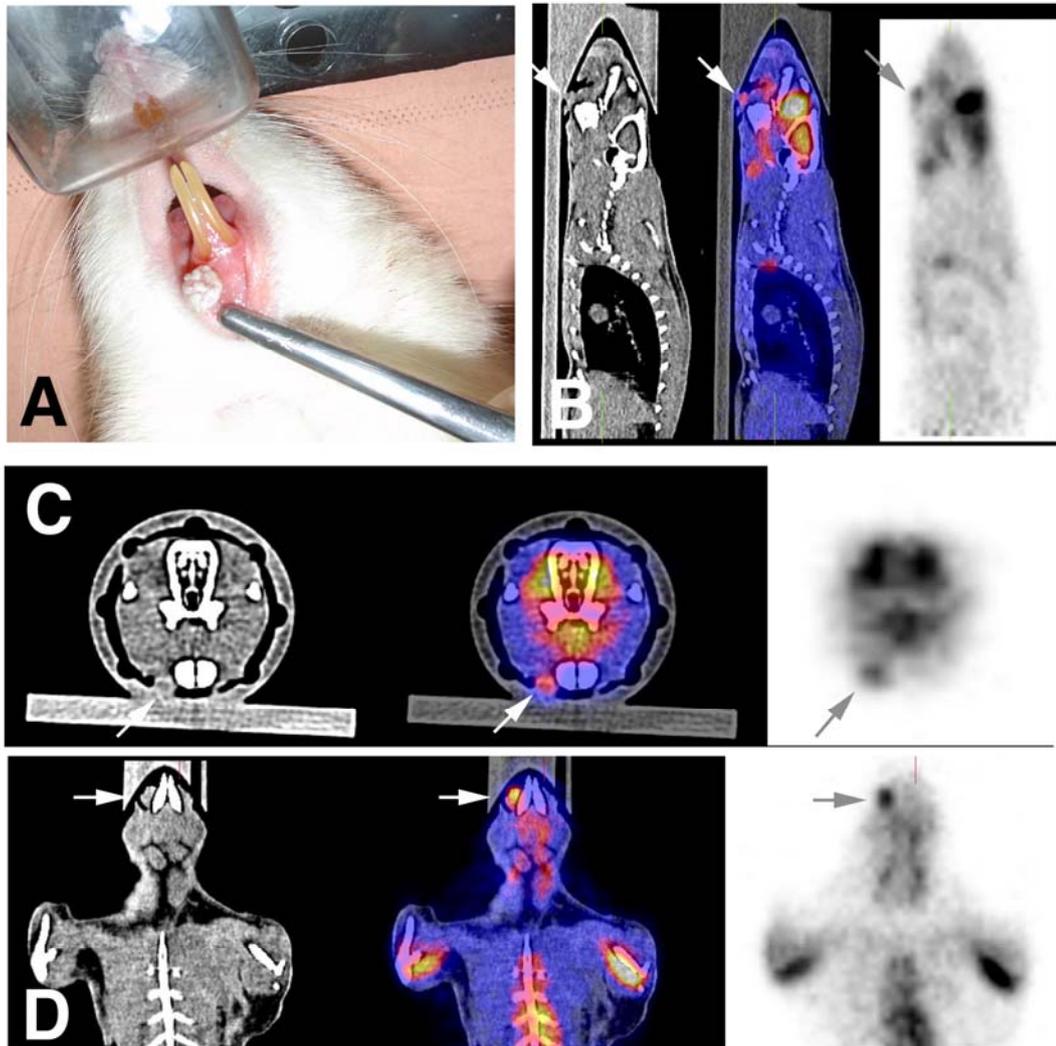


Figure 22 : Rat n°1. A: Aspect macroscopique d'une tumeur développée au niveau de la lèvre inférieure. De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en B: coupes sagittales, en C: coupes axiales et en D: coupes coronales: tumeur de la lèvre inférieure (flèches).

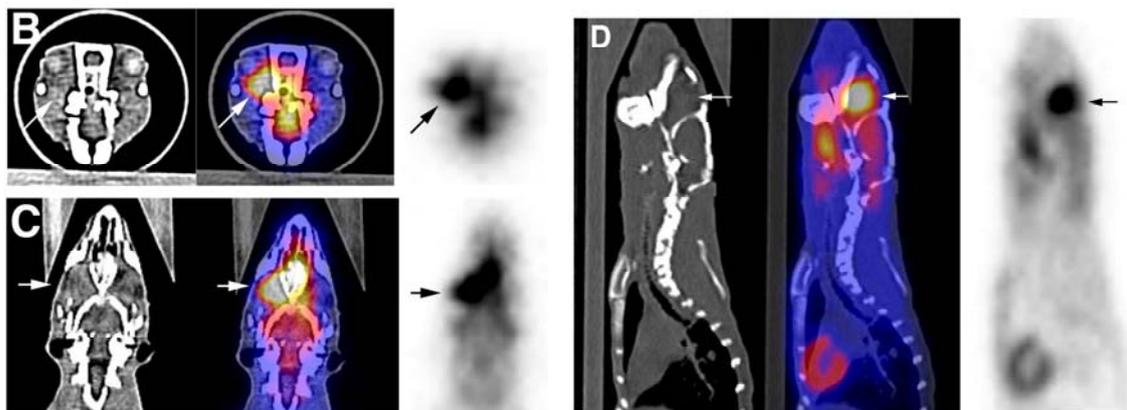


Figure 23: Rat n°2. De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en B: coupes axiales, en C: coupes coronales et en D: coupes sagittales: extension rétro-orbitaire d'une tumeur développée au niveau du maxillaire supérieur (flèches).

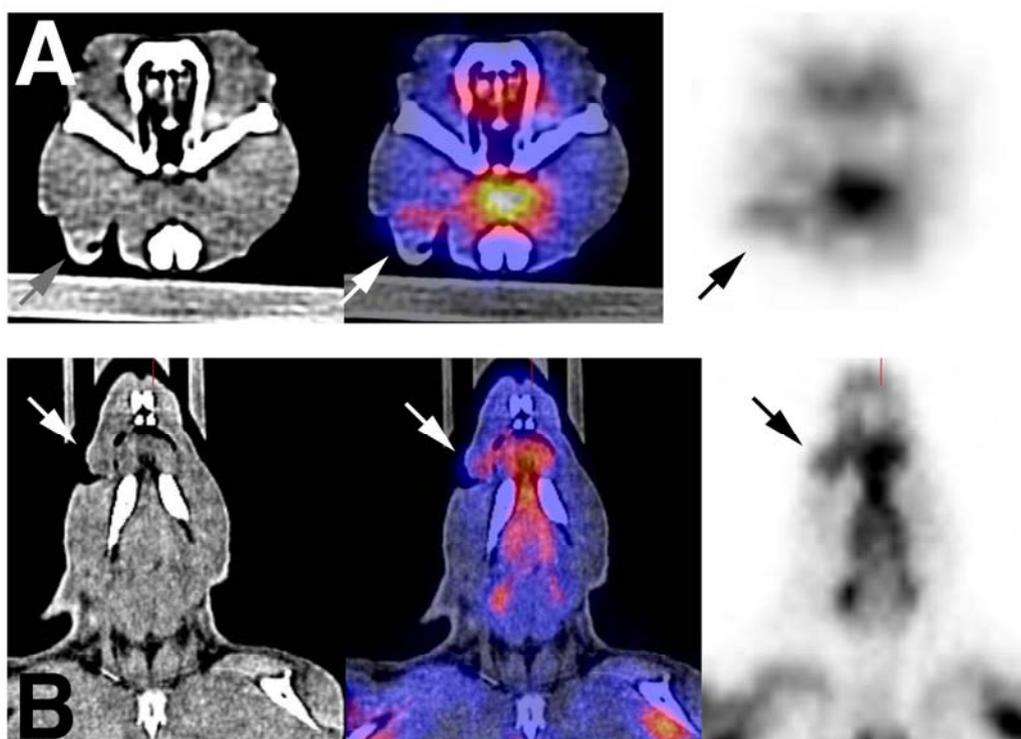


Figure 24: Rat n°3 : De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en A: coupes axiales et en B: coupes coronales: tumeur de la face interne de joue (flèches).

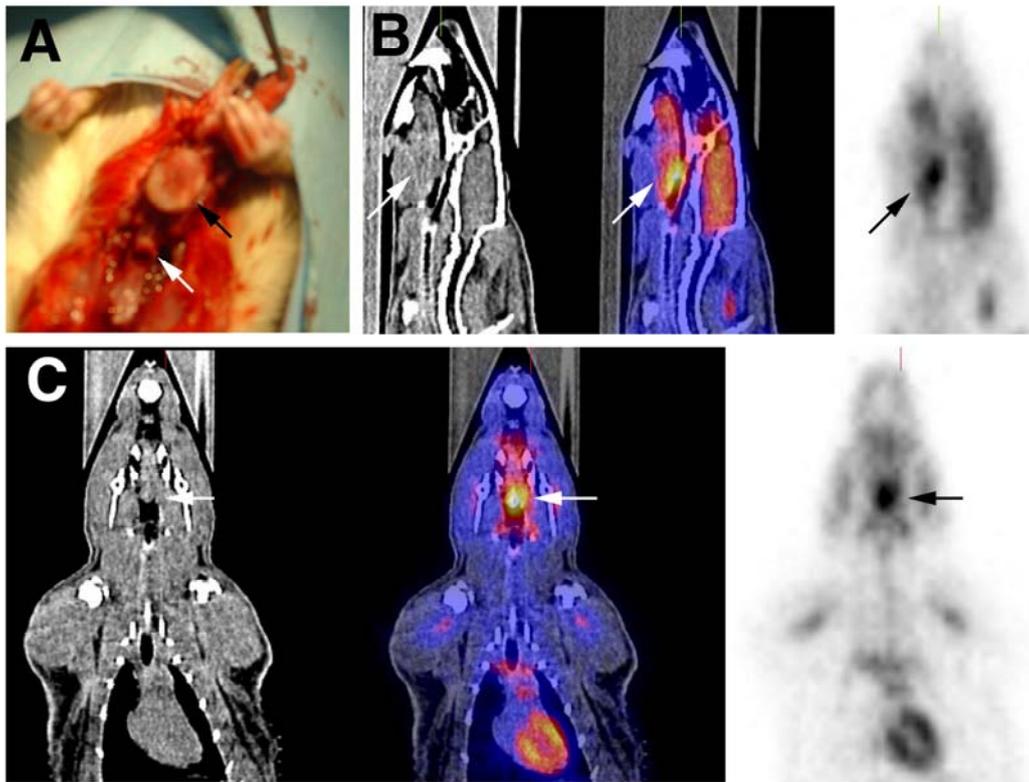


Figure 25: Rat n°4. A: Dissection autopsique (tumeur de la base de langue: flèche noire; épiglotte : flèche blanche). De gauche à droite: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP - TEP en échelle de gris inversé en B: coupes sagittales C: coupes coronales: tumeur de la base de langue (flèches).

b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde

A J14, la FDG-TEP/TDM a confirmé la présence des tumeurs diagnostiquées par l'examen clinique, par une fixation focalisée du FDG. Cet examen a permis de montrer l'extension tumorale et a montré l'évolution du volume tumoral métabolique entre J14 et J30. La distribution intra tumorale du FDG était uniforme à J14 et le volume tumoral moyen était estimé à $1.265 \pm 0.289 \text{ cm}^3$ (Figure 26). A J30, le volume tumoral moyen était de $8.267 \pm 5.407 \text{ cm}^3$ et toutes les tumeurs présentaient une hypofixation centrale du FDG témoignant d'une nécrose centrale (Figure 27). L'activité du FDG prédominait

à J30 au niveau d'une couronne périphérique avec une décroissance notable de la fixation de la périphérie au centre. Les volumes globaux et métaboliques ont été mesurés et les volumes de nécrose centrale calculés. Les moyennes de SUV maximales et moyennes ont été déterminées (Tableau III). Nous n'avons pas objectivé de fixation de FDG au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux, du foie et des poumons.

Tableau III : Données de la FDG-TEP/TDM obtenues dans le groupe d'allogreffe de carcinome épidermoïde à J14 et J30 (n=10).

Nombre de jours après la greffe	14	30
Volume tumoral global (cm³)	1,265 +/- 0,289	8,2675 +/- 5,407
Volume tumoral métabolique (cm³)	1,265 +/- 0,289	1,9625 +/- 0,758
Volume nécrotique (cm³)	0	6,305 +/- 4,771
Moyenne de la SUV maximale	2,945 +/- 1,237	2,5775 +/- 0,655
Moyenne de la SUV moyenne	1,895 +/- 0,53	1,475 +/- 0,221

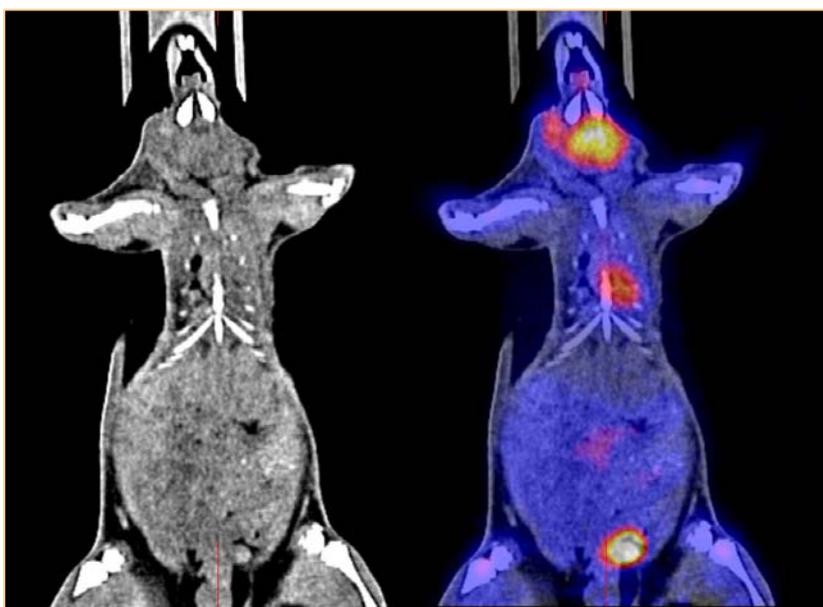


Figure 26: FDG-PET/TDM à J14 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et hot métal pour la TEP en coupes coronales: tumeur développée de manière bilatérale sur la face ventrale du cou.

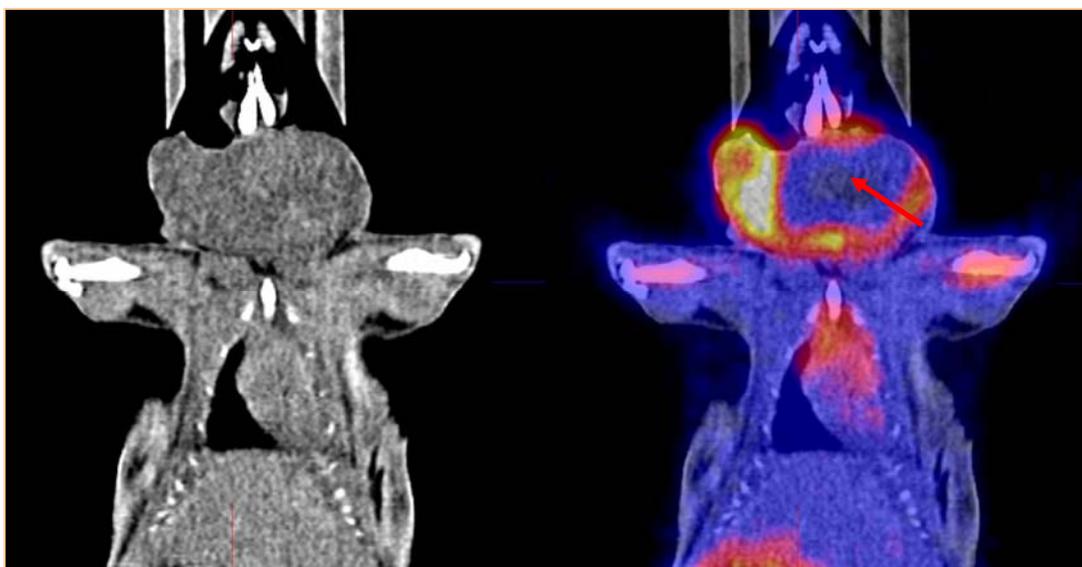


Figure 27 : FDG-TEP/TDM à J30 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes coronales: l'activité du FDG prédomine en périphérie de la tumeur ; présence d'un centre nécrotique (flèche).

III-2-2-Ostéosarcome mandibulaire

Nous avons observé une fixation du FDG au niveau des masses tumorales et la présence de calcifications caractéristiques de l'ostéosarcome sur la tomodensitométrie et sur la TEP (Figure 28). La fixation du marqueur était uniforme au 15^{ème} jour après la greffe avec un volume de 2 cm³. A partir du 15^{ème} jour nous avons observé l'apparition d'une nécrose tumorale centrale et la concentration de l'activité métabolique en périphérie. A J14, 50% des rats présentaient une fixation du marqueur au niveau pulmonaire (Figure 29).

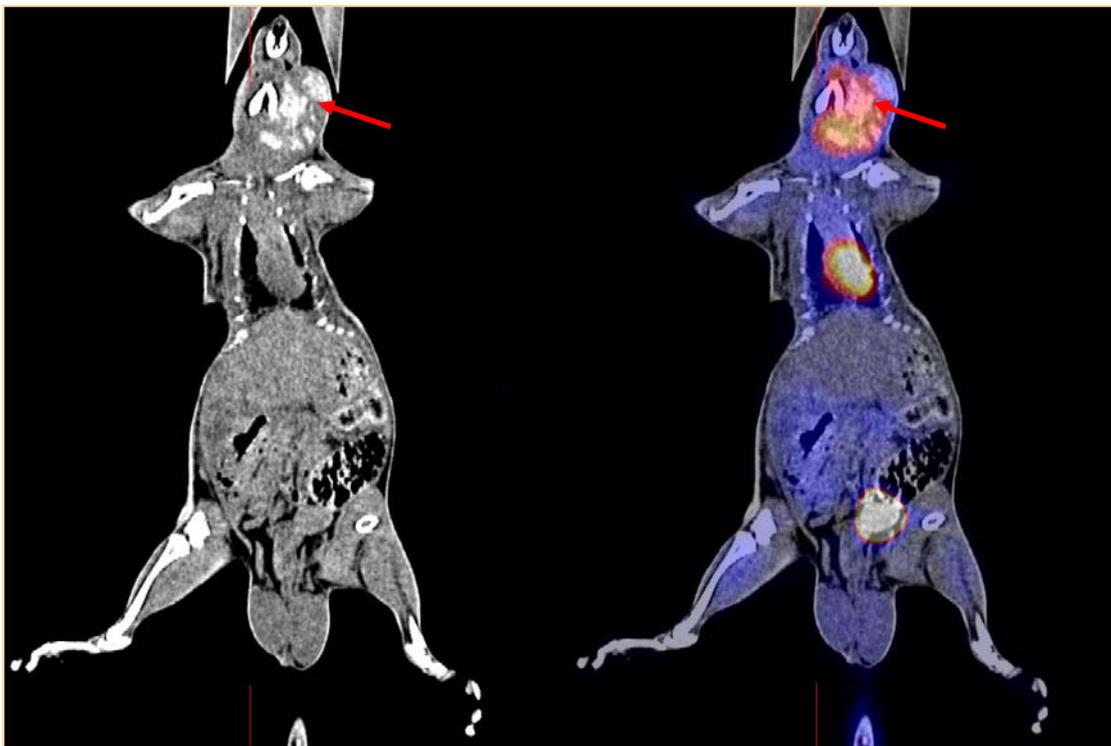


Figure 28: FDG-TEP/TDM à J15 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes coronales : présence de calcifications intra-tumorales caractéristiques de l'ostéosarcome (flèches).

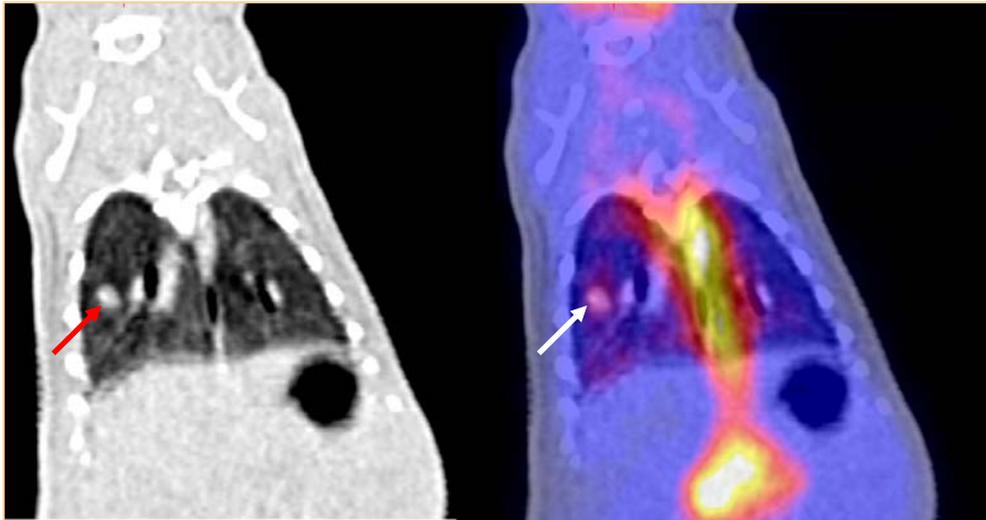


Figure 29: FDG-TEP/TDM à J15 après l'allogreffe. TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes frontales : fixation du FDG au niveau du poumon droit (flèches).

III-3-RESULTATS DE L'ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE

III-3-1-Carcinome épidermoïde

a) Induction chimique de carcinome épidermoïde

Dans le groupe témoin, l'autopsie des 5 rats n'a pas retrouvé de tumeur.

Dans le groupe application sur la langue mobile (n=25), des lésions de papillome corné, de leucoplasie, dysplasie de bas et haut grade, carcinome in situ et carcinome épidermoïde infiltrant ont été observées au niveau du site de l'application et dans sa périphérie proche (Figure 30).

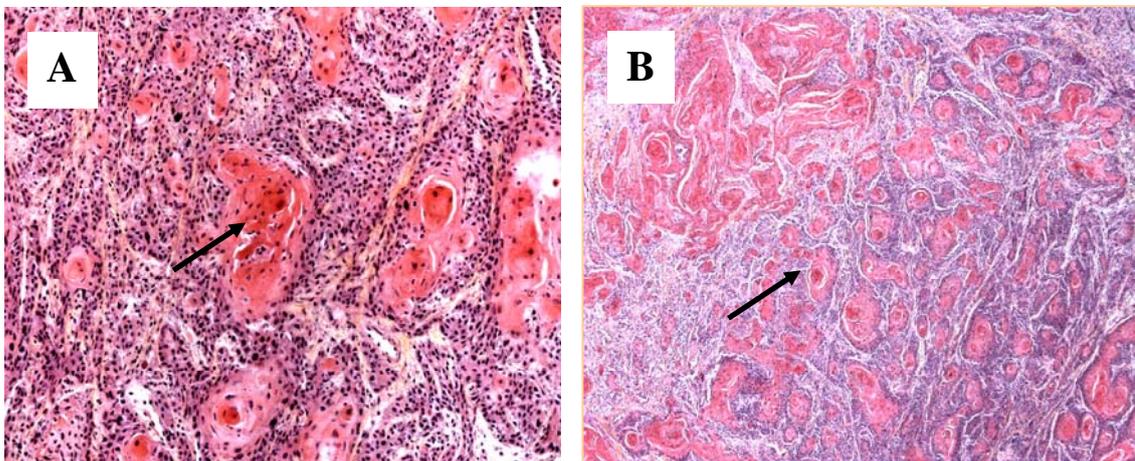


Figure 30: Comparaison de l'examen en microscopie optique après coloration à l'hématéine-eosine-safran, du carcinome épidermoïde de rat (A) (grossissement x200) et du carcinome épidermoïde humain (B) (grossissement x 100): présence de cellules épithéliales malpighiennes bien différenciées avec une architecture trabéculaire et nodulaire et de nombreux globes cornés caractéristiques du carcinome épidermoïde (flèches).

Dans le groupe application au niveau du larynx (n=5), l'examen histologique a confirmé la présence de leucoplasie dans 2 cas, de métaplasie malpighienne laryngée dans 1 cas, de carcinome épidermoïde laryngé dans 1 cas et de carcinome épidermoïde bronchique

dans 1 cas (Figure 31). L'examen des poumons a retrouvé des poumons oedémateux et congestifs avec présence de débris alimentaires dans les bronches, évocateurs de fausses routes.

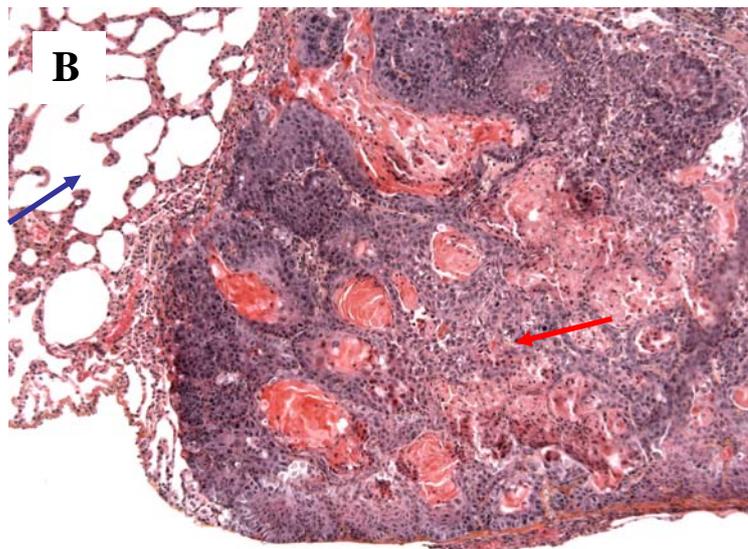
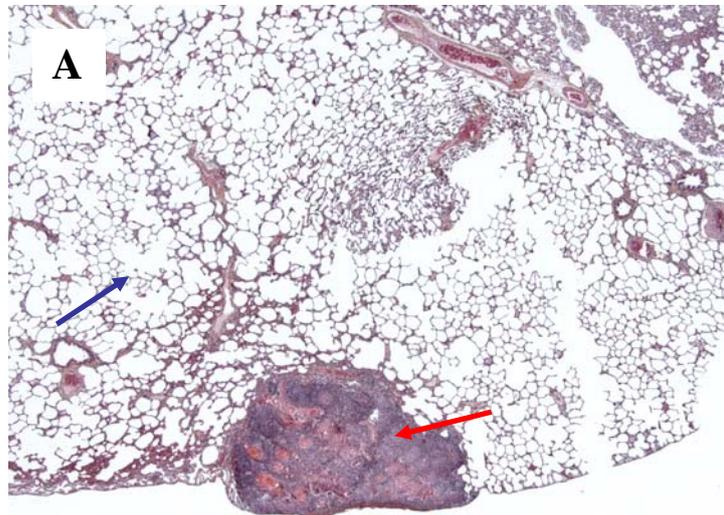


Figure 31: Examen en microscopie optique après coloration HES, grossissement x25 (A) et x100 (B) : présence d'un carcinome épidermoïde bronchique (flèche bleue : alvéole pulmonaire ; flèche rouge : amas de cellules épithéliales malpighiennes avec globes cornés).

Au sein du groupe boisson, les autopsies ont mis en évidence une tumeur macroscopique chez chaque rat et une double localisation tumorale pour 6 d'entre eux, soit 30% (Tableau IV).

Tableau IV : Tumeurs obtenues dans le groupe boisson (n=25).

Localisation tumorale	Nombre total de localisations : 31
Base de langue	15
Langue mobile	9
Joue	4
Lèvre	2
Palais	1

Sur le plan histologique, il s'agissait de carcinomes épidermoïdes bien différenciés formés de travées, d'amas et de massifs de cellules, accompagnés de globes cornés formés d'amas de kératine. Les cellules tumorales étaient des cellules épithéliales malpighiennes, pleïomorphes avec la présence de nombreuses mitoses atypiques. La tumeur s'accompagnait d'un abondant stroma fibreux. Il n'a pas été observé de nécrose au sein de la tumeur. L'examen anatomopathologique n'a pas révélé de métastase au niveau du foie ou des poumons mais des lésions de bronchopneumopathie sur inhalation bronchique ont été retrouvées chez 80% des rats. L'examen anatomopathologique du ganglion lymphatique cervical fixant le FDG à la TEP (rat n°4) ne présentait pas d'infiltration tumorale (Figure 32). Cependant une métastase ganglionnaire cervicale a été observée chez un rat, issu du groupe boisson, présentant une lésion de la base de langue (Figure 33).

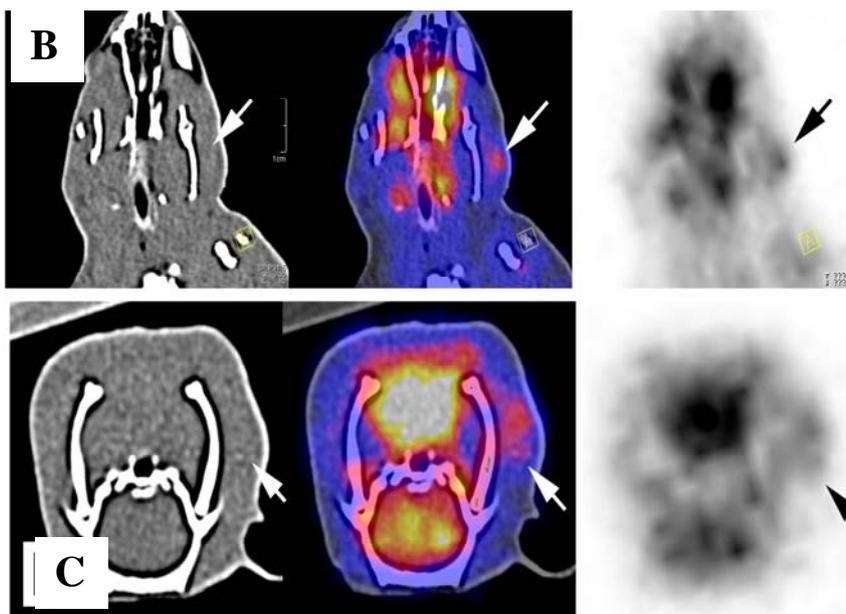
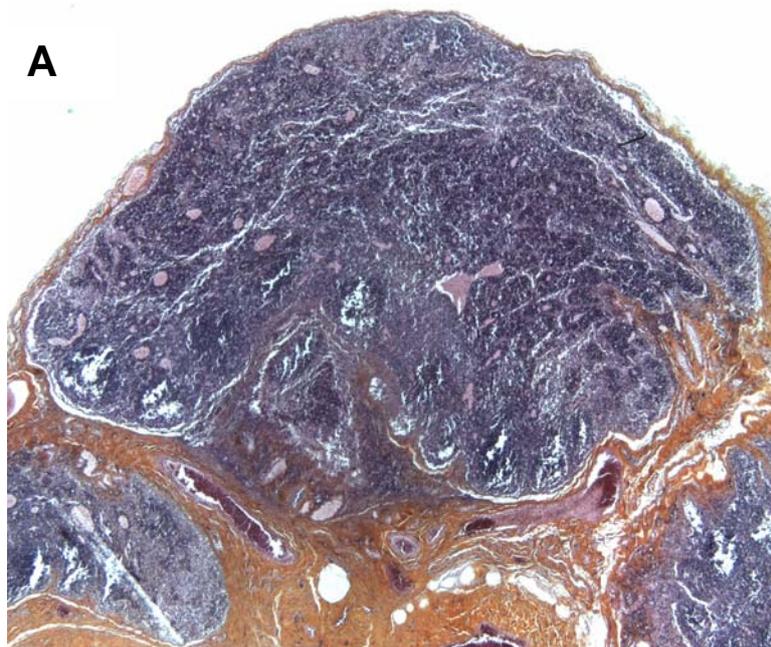


Figure 32: (A) : Examen en microscopie optique (grossissement x40) : ganglion lymphatique normal. (B – C): FDG-TEP/TDM: TDM en échelle de gris - TEP/TDM co-enregistrées en échelle de gris pour la TDM et en hot métal pour la TEP en coupes coronales (B) et axiales (C) : présence d'une adénopathie cervicale droite.

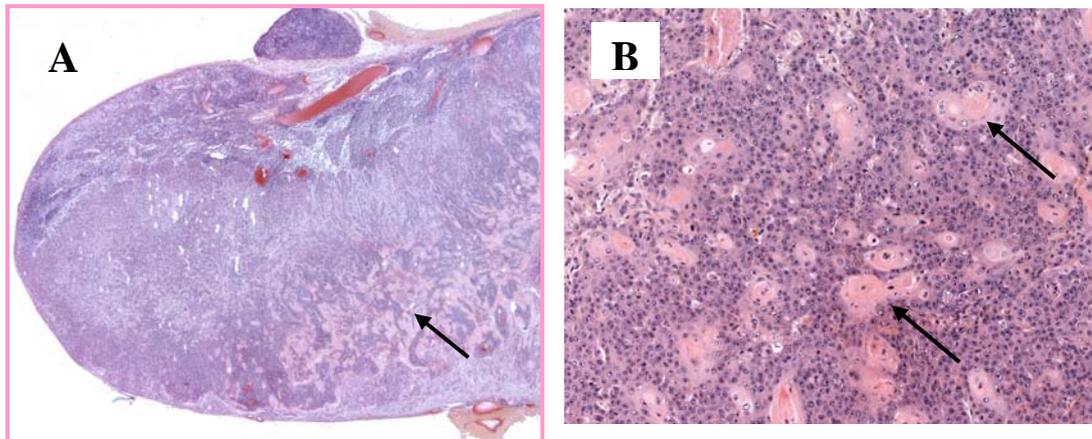


Figure 33: Examen en microscopie optique après coloration HES, grossissement x25 (A) et x200 (B) : présence d'un infiltrat de carcinome épidermoïde (flèches) au sein d'une structure ganglionnaire.

b) Allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde

Après coloration par HES, l'analyse en microscopie optique des tumeurs greffées était identique à la description du paragraphe a) à J14. A J30, la dissection tumorale retrouvait une nécrose centrale, contenant un liquide séreux. L'examen en microscopie optique objectivait des zones confluentes de nécrose centrale avec la persistance de cellules tumorales viables, en périphérie tumorale. L'analyse immunohistochimique a objectivé un marquage plus ou moins intense des cytokératines testées. Le marquage des cytokératines AE1/AE3 et 19 était moyennement dense et celui des cytokératines 5/6 et HPM très intense (Figures 34 et 35). L'examen des poumons et du foie n'a pas retrouvé de métastase tumorale.

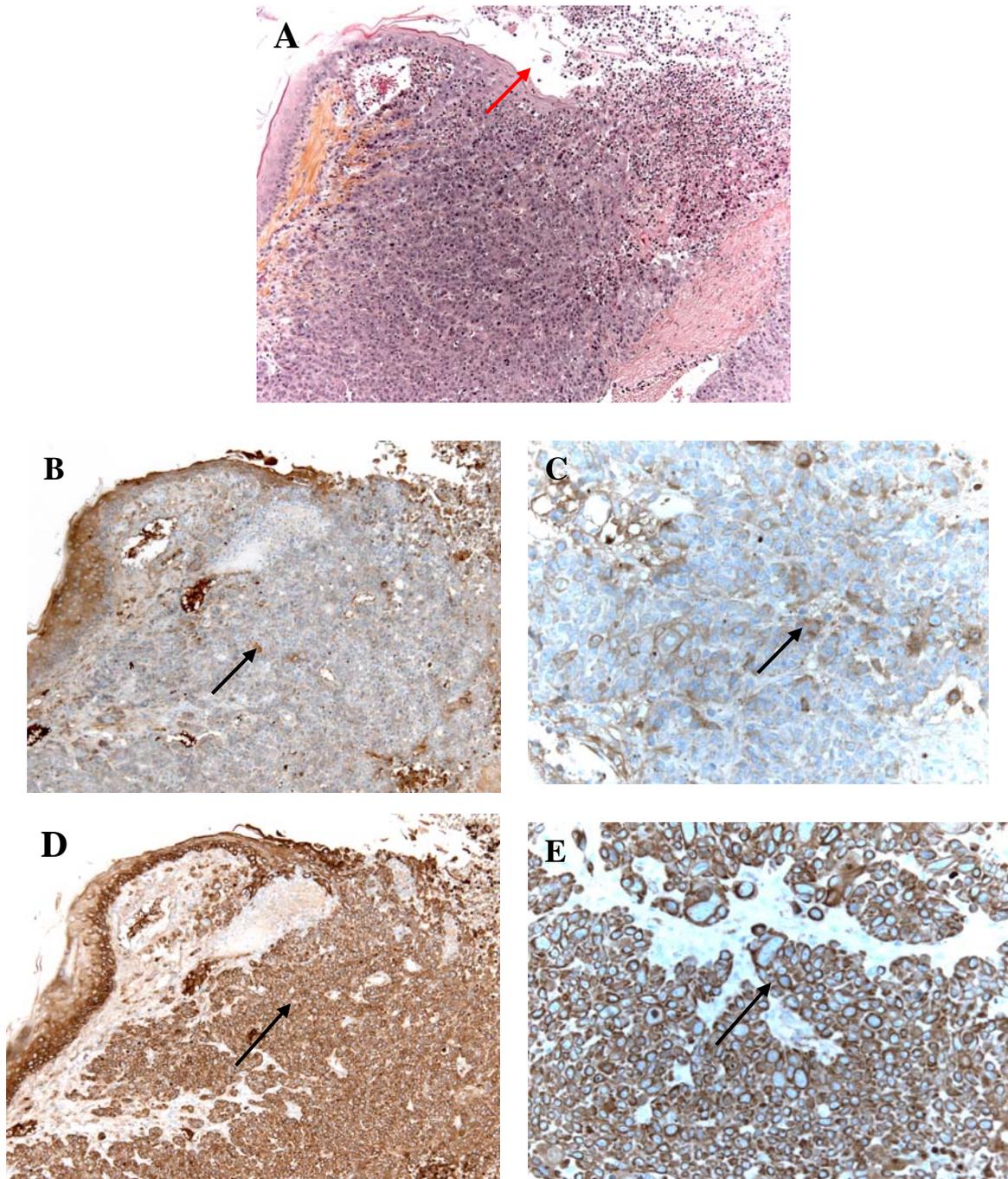


Figure 34: Examen en microscopie optique (A, B et D : grossissement x125 ; C et E : grossissement x320). (A) : coloration HES : carcinome épidermoïde avec présence d'une ulcération de surface (flèche rouge). (B et C) : marquage immunohistochimique de la cytokeratine AE1/AE3, positif au niveau du cytoplasme de quelques cellules (flèches). (D et E) : marquage immunohistochimique de la cytokeratine 5/6, intense au niveau du cytoplasme de nombreuses cellules (flèches noires).

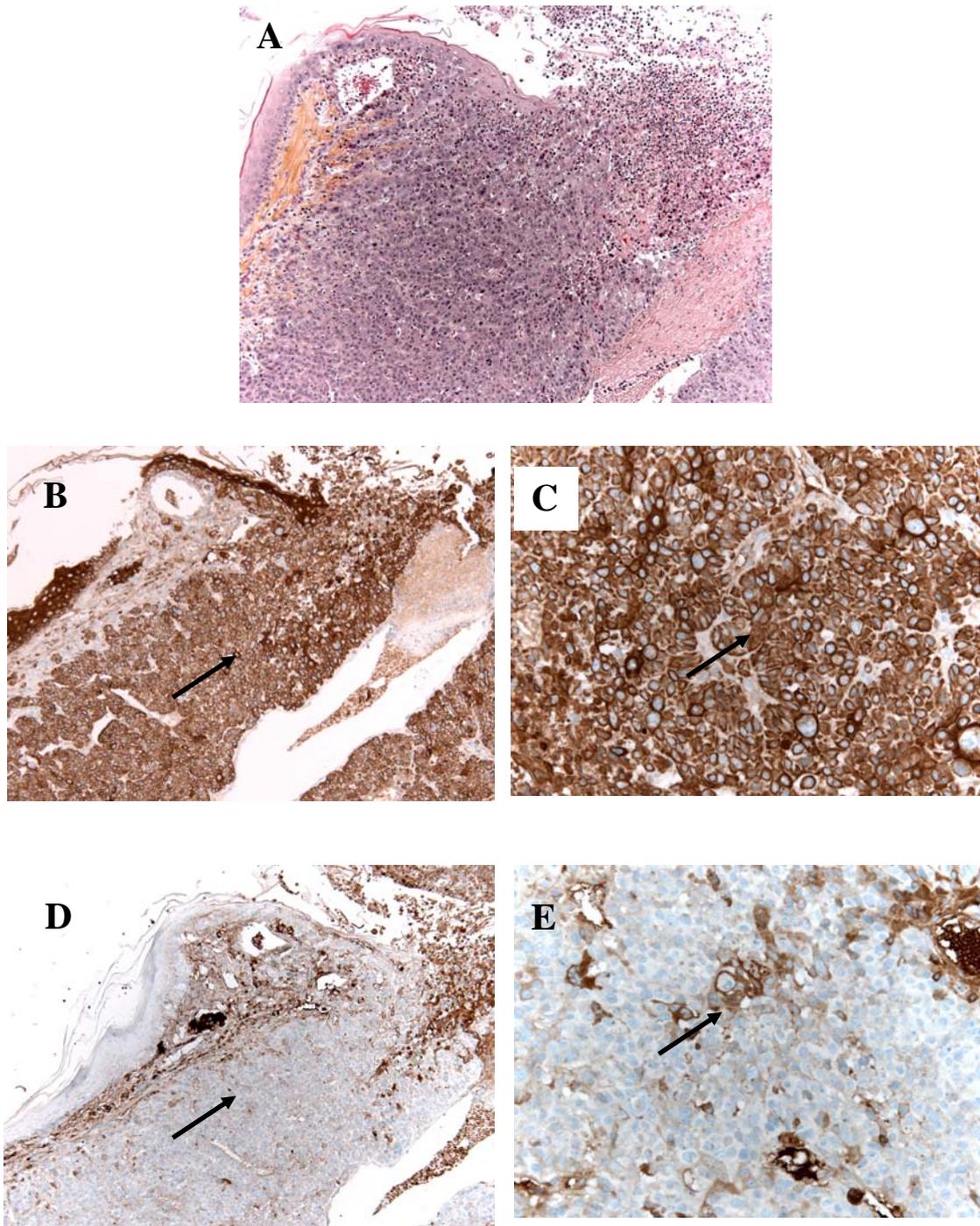


Figure 35: Examen en microscopie optique (A, B et D : grossissement x125 ; C et E : grossissement x320). (A) : coloration HES : carcinome épidermoïde. (B et C) : marquage immunohistochimique de la cytokératine CKHPM, intense au niveau du cytoplasme de nombreuses cellules (flèches). (D et E) : marquage immunohistochimique de la cytokératine 19, positif au niveau du cytoplasme de quelques cellules (flèches).

La vascularisation tumorale a été étudiée avec les marqueurs des cellules endothéliales : CD31, CD34 et facteur VIII. Nous avons observé une fixation de ces 3 marqueurs, témoignant de la présence d'un réseau vasculaire (Figure 36).

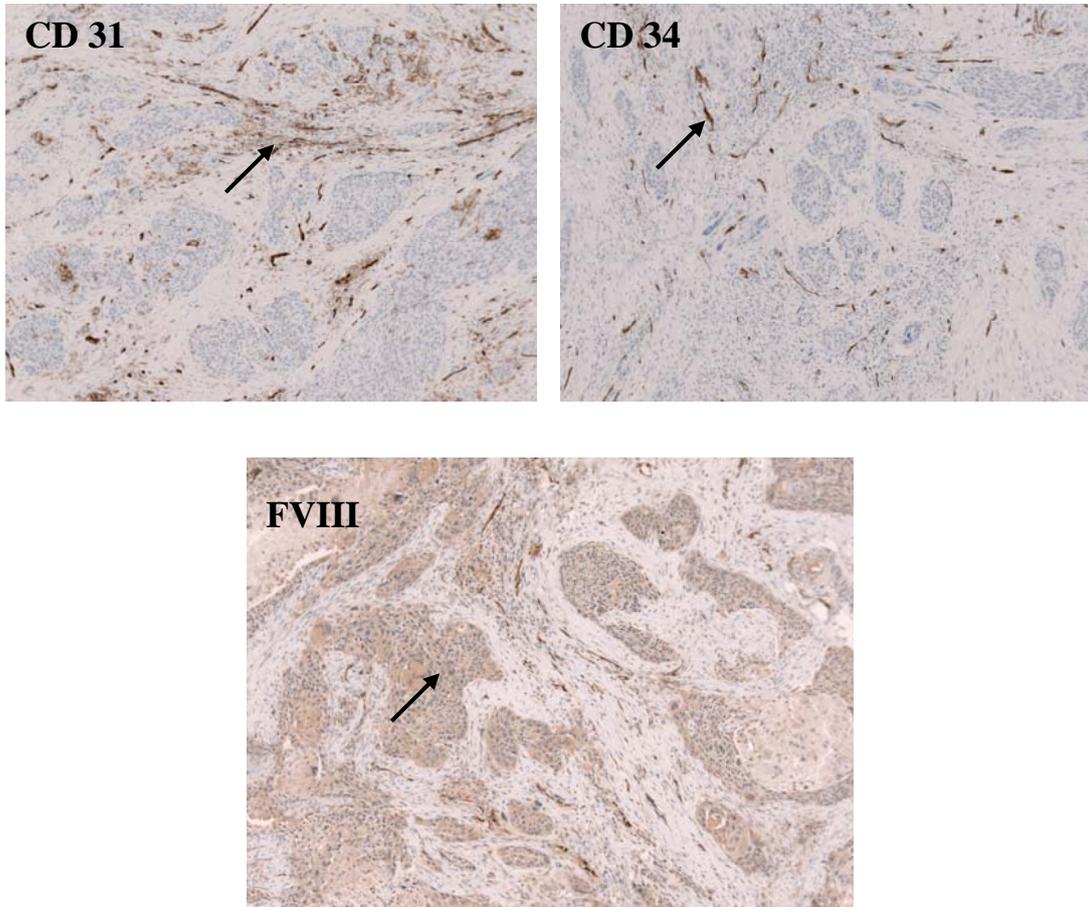


Figure 36: Examen en microscopie optique d'une lame de carcinome épidermoïde de rat. Marquage du CD 31, CD34 et facteur VIII (grossissement x50) : positif (flèches).

III-3-2-Ostéosarcome mandibulaire

Les caractéristiques histologiques de la tumeur étaient similaires à celles de l'ostéosarcome humain. La tumeur présentait une architecture solide, compacte et dense constituée de cellules tumorales de grande taille, à noyaux volumineux et irréguliers (Figure 37). Certaines tumeurs, dont le volume dépassait 2 cm³, présentaient des zones de nécrose. A J14 après la greffe, 50% des rats présentaient des métastases pulmonaires, 80% à J23 et 100% à J30 (Figures 38 et 39). Nous n'avons pas observé de métastase hépatique.

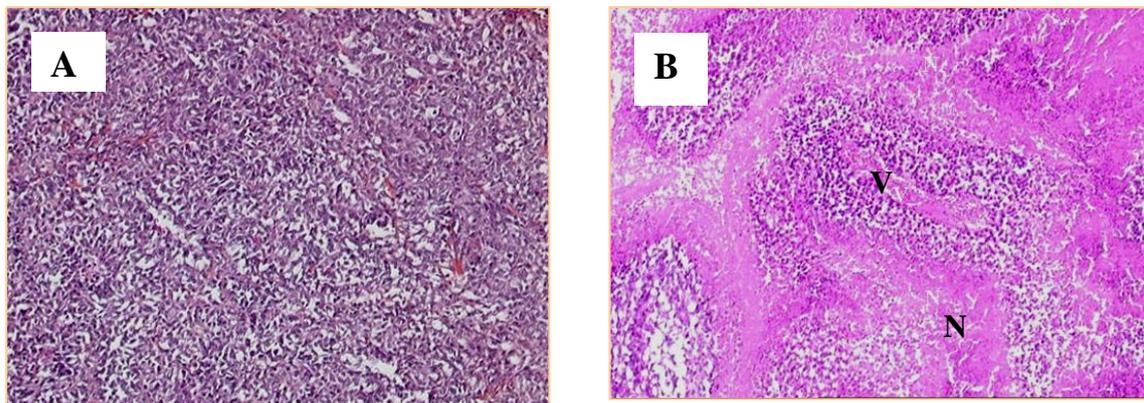


Figure 37: Examen en microscopie optique après coloration HES. (A : présence de cellules tumorales en amas denses, grossissement x50 ; B : zone centrale de la tumeur, présence de vaisseaux (V) et de nécrose (N), grossissement x50).

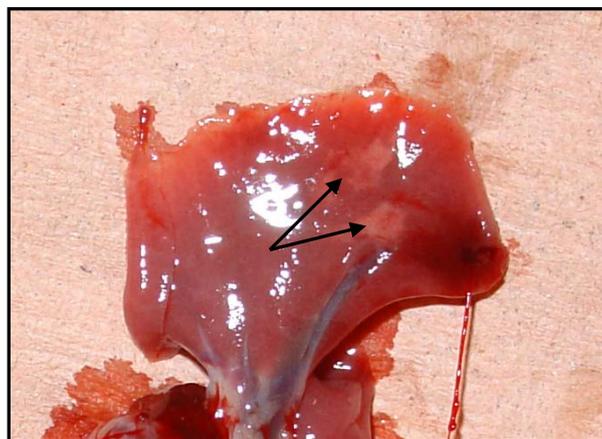


Figure 38: Examen macroscopique d'un poumon de rat porteur d'un ostéosarcome mandibulaire: présence de métastases (flèches).

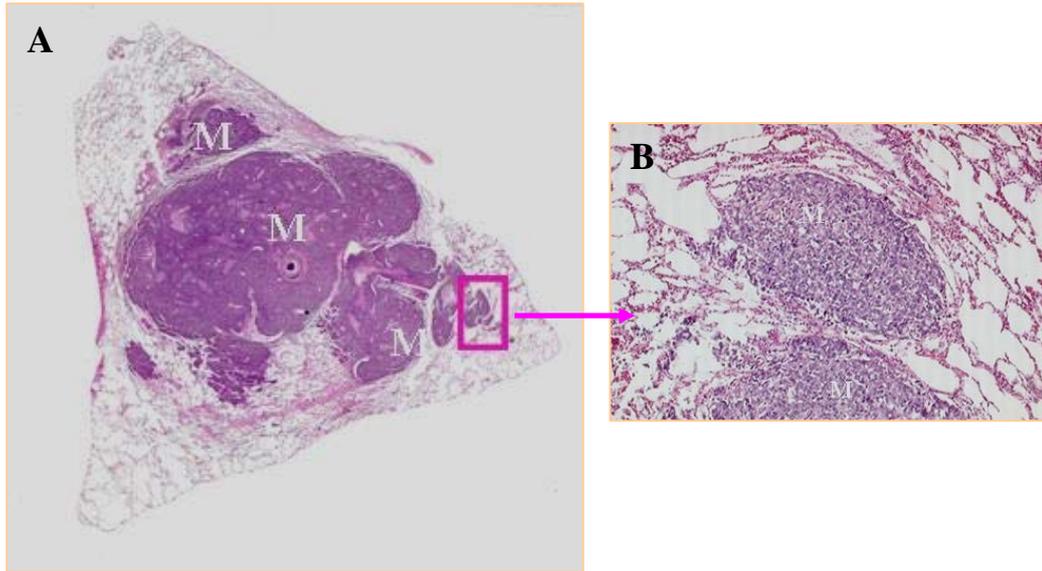


Figure 39: Examen en microscopie optique après coloration HES. **A :** section d'un poumon entier, présence de nombreuses métastases (M) ; **B :** grossissement x100 : métastase pulmonaire.

III-4-RESULTATS DE L'ESSAI THERAPEUTIQUE UTILISANT LE BEVACIZUMAB (AVASTIN®) SUR LE MODELE D'OSTEOSARCOME MANDIBULAIRE.

III-4-1-Résultats cliniques

La progression tumorale a été ralentie dans le groupe de rats traités par *bevacizumab* par rapport au groupe témoin, d'un facteur égal à 1,4 à J 10, 1,7 à J17 et 1,65 à J23. Cette modification de l'évolution a été observée à partir de J10. Selon le test statistique Mann et Whitney, il existe une différence significative des moyennes des volumes tumoraux entre les deux groupes à J8, J13, J15, J17 et J23 (Figure 41). Avec le test Anova (2 facteurs – valeurs répétitives), l'effet du *bevacizumab* est très significatif ($p < 0,1\%$). Selon le test de Friedman, il existe une différence significative ($p < 0,1\%$) de progression du volume tumoral sur toute la durée de l'étude, au sein de chacun des deux groupes pris indépendamment. Ainsi la progression tumorale s'est ralentie sous *bevacizumab* sans qu'elle ne se soit totalement arrêtée (Figure 40). L'examen anatomopathologique des poumons n'a pas mis en évidence de différence significative entre les deux groupes en ce qui concerne la présence de métastases pulmonaires.

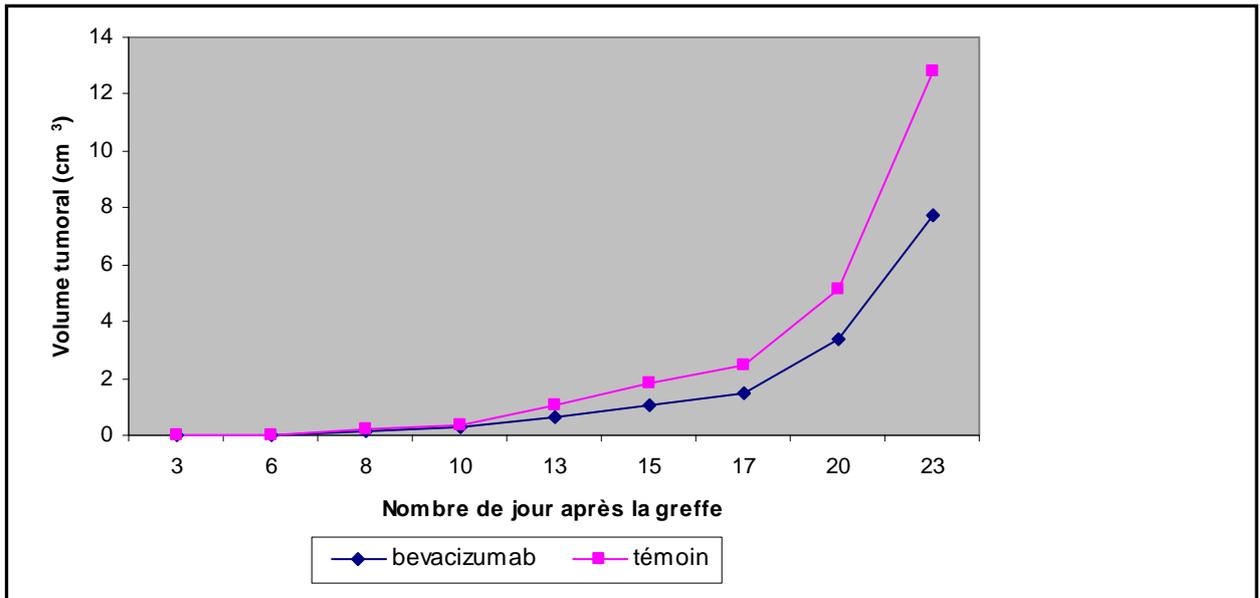


Figure 40: Etude de la progression de la moyenne des volumes tumoraux dans le groupe traité par *bevacizumab* et dans le groupe témoin.

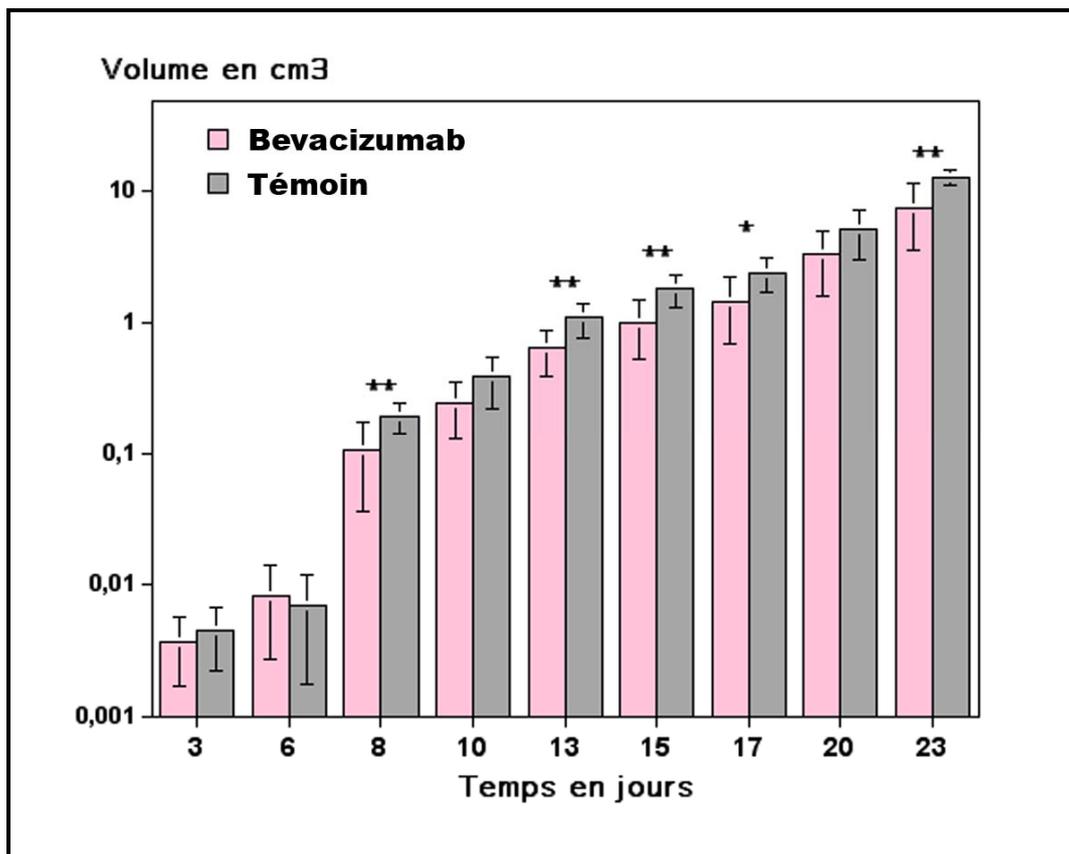


Figure 41: Evolution des volumes tumoraux exprimés en cm³ sur une période de 23 jours après la greffe tumorale : mise en évidence d'une différence significative entre le groupe témoin et le groupe traité par *bevacizumab* (* : p < 0,05 et ** : p < 0,01) à J8, J13, J15, J17 et J23.

III-4-2-Résultats de l'IRM dynamique

Les séquences dynamiques permettent d'évaluer l'intensité du signal et la vitesse de prise du produit de contraste. Nous avons mis en évidence, une différence évidente de ces paramètres entre la périphérie et le centre de la tumeur, à la fois dans le groupe témoin et le groupe traité par *bevacizumab* (Figure 42). Par contre, nous n'avons pas objectivé de différence significative de la vitesse de prise du gadolinium et de la valeur du pic de contraste entre les deux groupes, en périphérie (Figure 43) et au centre de la tumeur (Figure 44). Compte tenu du faible nombre de rats inclus dans ce protocole d'imagerie, nous n'avons pas fait d'étude statistique.

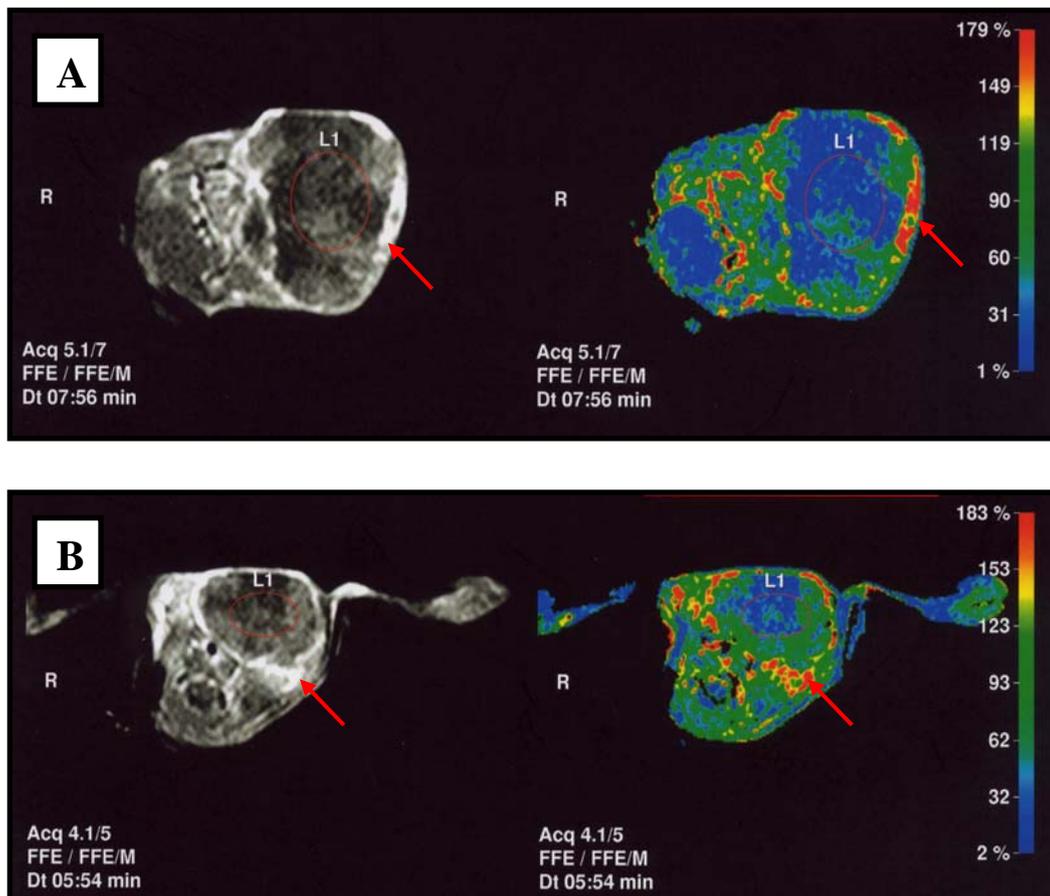


Figure 42: IRM avec clichés dynamiques en T1-écho de gradient rapide, après injection intraveineuse de Gadolinium : présence d'un rehaussement relatif plus haut en périphérie (flèche) qu'au centre de la tumeur chez un rat issu du groupe témoin (A) et chez un rat traité par *bevacizumab* (B).

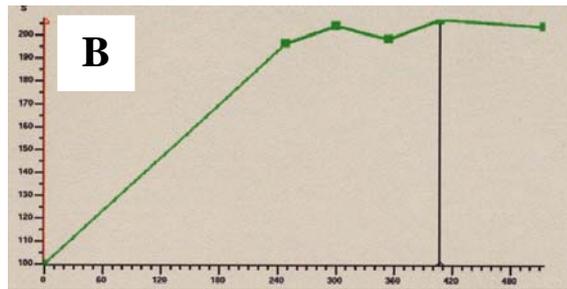
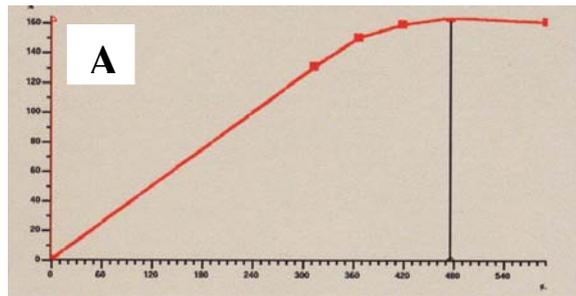


Figure 43: Courbes d'intensité du signal sur la vitesse de prise de contraste: le rehaussement du signal en périphérie tumorale se fait rapidement jusqu'à saturation, chez un rat issu du groupe témoin (A) et chez un rat traité par *bevacizumab* (B).

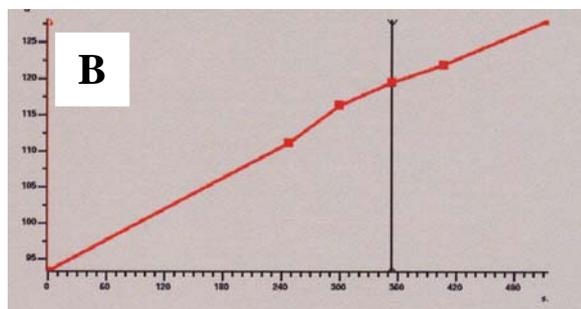
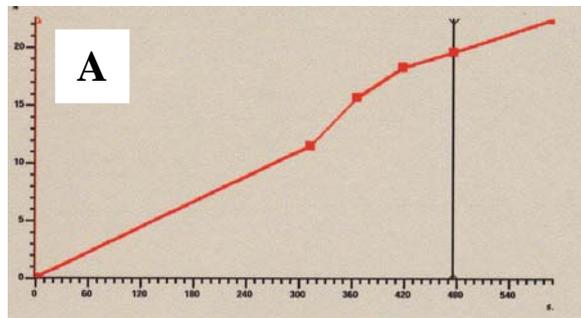


Figure 44: Courbes d'intensité du signal sur la vitesse de prise de contraste: le rehaussement du signal au centre de la tumeur se fait progressivement sans saturation, chez un rat issu du groupe témoin (A) et chez un rat traité par *bevacizumab* (B).

IV-DISCUSSION

Modèles animaux de carcinome épidermoïde ORL

La 4-NQO est un carcinogène chimique, hydrosoluble, le plus utilisé actuellement pour induire des tumeurs de type carcinome épidermoïde au niveau des VADS chez les rongeurs. C'est un modèle tumoral animal très intéressant utilisant des animaux immunocompétents contrairement aux modèles tumoraux créés par allogreffes ou xénogreffes tumorales chez des rats immunodéprimés ou génétiquement modifiés [31-45]. Nous obtenons ainsi des animaux facilement manipulables, ne nécessitant pas de conditions particulières de nursing dues à leur fragilité et reproduisant les conditions identiques à celles rencontrées dans la pratique clinique humaine. De plus, sur le plan histologique et immunohistochimique, ces tumeurs sont identiques aux tumeurs humaines [22]. Dans notre étude, nous confirmons que la 4-NQO est un puissant inducteur tumoral, qu'elle soit utilisée en application locale ou diluée dans de l'eau de boisson. Ce modèle est intéressant puisqu'il reproduit les différentes étapes de la carcinogénèse connue chez l'homme, à partir d'un épithélium malpighien normal jusqu'à l'apparition de lésions pré néoplasiques puis de carcinome in situ et enfin de carcinome épidermoïde infiltrant. L'intérêt majeur de cette tumeur, par rapport aux tumeurs obtenues par greffe, est de pouvoir étudier les différentes étapes de transformation néoplasique [24, 26]. Nous pouvons ainsi disposer de localisations variées au niveau des VADS et parfois de seconde localisation tumorale. Nous avons observé 6 cas de double localisation tumorale dans notre expérimentation mais aucune localisation oesophagienne, contrairement à d'autres publications [25]. L'inconvénient principal de ce modèle est le temps nécessaire à l'obtention des tumeurs, à savoir une latence de 34 semaines [25], ce qui le rend inutilisable pour des essais thérapeutiques [29, 30]. En effet non seulement, le délai d'apparition des tumeurs est long mais les

localisations tumorales sont variables d'un rat à l'autre ce qui aboutit à une population complètement inhomogène. Dans le groupe application au niveau du larynx, nous avons observé un carcinome épidermoïde bronchique probablement par inhalation du carcinogène. Les rats de ce groupe présentaient tous des micro-abcès pulmonaires, en relation avec des fausses routes induites par l'application locale de la 4-NQO et la non observance d'une période de jeûne. La technique utilisée pour ces applications laryngées était bien standardisée mais elle était source d'une morbidité et d'une mortalité importante. Compte tenu de la taille de la filière laryngée chez le rat (3 à 4 mm) et le diamètre de l'optique (4 mm), l'application laryngée induisait systématiquement une obstruction complète de la filière du rat suivie d'épisodes d'hypoxie nécessitant parfois une réanimation. De plus l'action directe du carcinogène a souvent entraîné un œdème laryngé responsable de mort prématurée, avant l'apparition de tumeur. Il serait certainement très intéressant de reproduire cette technique sur un animal plus gros comme le lapin, pour bénéficier d'une filière laryngée plus large. Le suivi clinique par endoscopie en serait également facilité. L'utilisation de la 4-NQO dans l'eau de boisson semble être un moyen d'oncogénèse plus satisfaisant, en limitant le nombre de manipulations et les risques anesthésiques de la technique d'application 3 fois par semaine. L'utilisation en eau de boisson permet également d'obtenir des localisations tumorales variées qui peuvent représenter à la fois un avantage mais aussi un inconvénient pour la détection de celles-ci nécessitant parfois le recours à l'imagerie. Le suivi des ces tumeurs en est alors compliqué. En somme, la réalisation d'une population uniforme n'est pas possible avec cette technique d'induction sous forme de boisson contrairement à l'application directe du carcinogène sur un site choisi. Le temps nécessaire pour l'obtention des tumeurs constitue l'inconvénient majeur de ce modèle.

En ce qui concerne notre modèle obtenu par allogreffe tumorale, il s'agit du premier modèle de carcinome épidermoïde greffé chez un rat Sprague Dawley immunocompétent. Ce modèle présente de nombreux avantages par rapport au modèle précédent, induit chimiquement par la 4-NQO. Il est obtenu très rapidement et nous disposons d'une tumeur dont le volume atteint 1 cm³ à J14 après la greffe. La position sous-cutanée en région cervicale facilite le suivi de l'évolution clinique de ces tumeurs. L'utilisation de ce protocole de greffe permet d'obtenir un modèle reproductible créant une population uniforme, indispensable pour la réalisation de tests thérapeutiques pré-cliniques. Il s'agit d'un modèle expérimental réalisé chez un rat immunocompétent, plus réaliste que les différents modèles de greffes décrits précédemment dans la littérature [31-45]. Nous démontrons dans notre étude que les caractéristiques anatomopathologiques et immunohistochimiques sont identiques à celle du carcinome épidermoïde humain. L'étude immunohistochimique (IHC) vient compléter l'analyse histologique classique et confirmer la nature de la tumeur. Elle a été faite par marquage de différentes cytokératines. Celles-ci font parties des filaments intermédiaires, à la base du cytosquelette des cellules. Les cytokératines (CK) sont constituées d'une famille multigénique hautement complexe de polypeptides. Vingt polypeptides CK différents ont été identifiés dans diverses cellules épithéliales humaines. Le marquage de la CK 5/6 a fait preuve de son intérêt pour la distinction entre les carcinomes épidermoïdes faiblement différenciés et les adénocarcinomes [57, 58]. La CK 5 est exprimée dans les couches basale, intermédiaire et superficielle des épithéliums stratifiés. La CK 6 est exprimée par l'épithélium squameux prolifératif. Le marquage de la CK AE1/AE3 est utilisé comme outil d'identification positive des cellules simples et stratifiées d'origine épithéliale [59, 60]. La cytokératine de haut poids moléculaire HPM est caractéristique des épithéliums malpighiens [61]. La cytokératine 19 est présente dans les cellules

épithéliales et s'exprime dans les cellules basales et myoépithéliales [62]. Elle est utilisée pour la différenciation et l'identification de tumeurs épithéliales. Les résultats de cette analyse IHC prouvent bien qu'il s'agit d'un carcinome épidermoïde identique à celui retrouvé au niveau de la sphère ORL chez l'homme. Dans notre expérimentation, nous avons observé que le rendement de prise de greffe était beaucoup plus important avec du tissu frais qu'avec du tissu congelé. Le taux de 80% n'a pu être obtenu que par répétition systématique des greffes tumorales tous les 7 jours sur 4 séries de 5 rats selon le protocole décrit figure 19 (III-Résultats, p 44). L'augmentation du rendement s'est faite par la sélection du fragment à greffer. Les fragments tumoraux étaient de préférence prélevés en périphérie de la tumeur, où le réseau vasculaire est le plus dense et où la présence de nécrose est plus faible. La FDG-TEP/TDM nous a aidés à augmenter ce rendement en ciblant la veille du prélèvement, les zones tumorales métaboliquement actives. Cet examen permettant le choix du prélèvement est sans doute à l'origine de l'augmentation du taux de réussite des greffes. Nous avons opté pour greffer les tumeurs de manière bilatérale au niveau cervical, afin d'augmenter ce chiffre. Nous avons cependant observé que lorsqu'il y avait prise de greffe, elles étaient toujours bilatérales. Le choix de l'âge du rat lors de la greffe présente un intérêt majeur ; en effet nous avons observé que l'âge de 21 jours, qui correspond à l'âge de sevrage du rat, était la date la plus favorable pour obtenir une prise de greffe. A cette date, le rat présente probablement une chute des anticorps transmis par sa mère et la non acquisition complète de sa propre immunité, phénomène identique observé chez le nourrisson âgé de 6 mois. Une fois la greffe prise, nous n'avons observé aucune régression tumorale ni rejet de greffe au cours de la croissance du rat. Les essais de greffe à l'âge adulte ont tous été soldés par des échecs. Par conséquent la période située autour du 21ème jour de vie semble être celle où le rat est le plus vulnérable et constitue le moment le plus

favorable à la prise de greffe. Cette étude prouve que cette lignée tumorale induite chimiquement par la 4-NQO peut être maintenue et reproduite par des transplantations tumorales successives chez des rats immunocompétents de type Sprague Dawley.

Modèle animal d'ostéosarcome mandibulaire

Nous proposons un modèle d'ostéosarcome de rat greffé au niveau de la mandibule. Il s'agit d'un modèle intéressant car greffé en position orthotopique. Cette tumeur peut être conservé à -80°C dans un milieu de conservation spécifique et la relance de la greffe est facilitée par son haut rendement de prise de greffe (80% à partir de tumeur congelée). Le rendement est de 100% à partir de tumeur fraîche. Le choix du fragment tumoral à greffer est également important et doit se faire comme pour le modèle précédant en périphérie où le réseau vasculaire est le plus dense. La croissance tumorale est rapide et des tumeurs d'un volume de $1,8\text{ cm}^3$ sont obtenues au bout de 14 jours. Nous avons observé l'apparition d'une nécrose tumorale centrale dès que le volume tumoral était supérieur à 2 cm^3 . A J14, 50% des rats présentaient des métastases pulmonaires, 80% à J23 et 100% à J30. Il s'agit d'un modèle qui présente les mêmes caractéristiques évolutives cliniques que l'ostéosarcome humain. Ce modèle est très intéressant car facilement et rapidement reproductible pour la réalisation d'essais thérapeutiques.

Reproduction de modèles animaux de cancer par allogreffe tumorale

On peut donc imaginer que cette étude puisse servir de modèle pour d'autres types de cancers et que l'on puisse proposer et travailler en oncologie expérimentale sur des animaux immunocompétents. Il importe donc de trouver le modèle d'induction d'un cancer chez le rat, qu'il soit chimique ou par exposition aux radiations ionisantes, pour ensuite pratiquer des greffes successives soit en position orthotopique soit en sous-cutanée, selon le protocole que nous avons proposé. D'ailleurs la conservation et la reproduction par greffes successives de deux néoplasies aussi différentes que le carcinome épidermoïde et l'ostéosarcome supportent cette hypothèse.

Intérêt de l'imagerie par FDG-TEP/TDM dans l'expérimentation animale

La TEP utilisant le FDG est utilisée en pratique courante chez l'homme. Le F-FDG est un analogue du glucose qui s'accumule dans les tumeurs métaboliquement actives ou en présence d'une inflammation.

En ce qui concerne les carcinomes épidermoïdes induits par la 4-NQO, l'utilisation de la TEP nous a permis de mettre en évidence des tumeurs difficiles d'accès sur le plan clinique, à savoir celles développées au niveau de la base de langue. Cette imagerie permet de détecter précocement des localisations tumorales occultes cliniquement. Elle nous a permis de déterminer l'extension tumorale et de mesurer le volume métabolique tumoral. Nous avons observé que tous nos rats, y compris ceux du groupe témoin, présentaient une fixation physiologique du FDG au niveau de la langue avec un large écart type des valeurs de SUV. Ceci peut s'expliquer par le fait que les rongeurs ont une activité de base musculaire linguale élevée mais d'intensité variable. En comparaison la présence d'une tumeur développée sur la langue n'a pas entraîné d'augmentation de la valeur globale de la SUV mais une focalisation du marquage par FDG sur le site tumorale et non plus sur l'ensemble de la langue. Ainsi nous pensons que la fixation focalisée du FDG est plus prédictible d'une localisation tumorale que la valeur de la SUV elle-même. Nous avons observé une distribution tumorale du marqueur uniforme dans l'ensemble de nos groupes de rats, ce qui corrélait avec l'examen anatomopathologique qui n'a pas retrouvé de nécrose centrale. En utilisant l'appareil de TEP/TDM dédié à la pratique clinique, nous avons obtenu un seuil de

détection proche de 3x3x4 mm (19mm³), qui correspond à la plus petite tumeur de notre population, développée sur la lèvre inférieure. Ce seuil de détection est plus bas que celui rapporté par Tatsumi [63]. L'utilisation d'un appareil de TEP/TDM dédié au petit animal devrait nous permettre d'augmenter la sensibilité de cette détection. Peu de localisations à distance ont été détectées, à savoir une seule métastase ganglionnaire. Un faux positif ganglionnaire cervical a été comptabilisé, dans le groupe des carcinomes épidermoïdes induit chimiquement par la 4-NQO (groupe boisson); nous émettons l'hypothèse d'une simple adénite lors de la FDG-TEP/TDM. Globalement nous avons observé une bonne corrélation entre autopsie/examen anatomopathologique et TEP. Cet examen reste un examen de base pour la classification tumorale, la détection de lésions secondaires et de seconde localisation avec un seuil de détection bas. Elle permet le suivi de la progression tumorale et peut être utilisée comme moyen de détection et de suivi par mesure de la distribution intra tumorale du FDG, lors d'essai thérapeutique.

Sur le modèle d'allogreffe tumorale de carcinome épidermoïde, la TEP a montré tout son intérêt pour cibler les zones tumorales actives, facilitant le prélèvement avant greffe ou congélation tumorale. L'apparition d'une zone de nécrose centrale après J14, détectée sur l'imagerie et confirmée par l'analyse anatomopathologique, nous a fait préférer prélever les greffes à J14 où la part active tumorale était plus élevée. Cet examen nous a permis de mesurer le volume tumoral métabolique et de déterminer l'extension tumorale. Nous avons observé une bonne corrélation entre la mesure clinique des volumes tumoraux et leur évaluation par la TEP/TDM à J14 et J30. Nous avons observé une distribution uniforme du FDG à J14, corrélée sur le plan anatomopathologique avec la présence d'une tumeur dense et l'apparition d'une nécrose centrale à J30. Cette nécrose centrale est retrouvée dans de nombreux modèles de

greffe tumorale [31-45]. Le volume tumoral global a été multiplié par 6,5 entre les jours 14 et 30, liée en grande partie à l'apparition de nécrose centrale (6,305 cm³ de nécrose à J30). Le volume tumoral métabolique est passé de 1,265 à 1,9625 cm³ entre J14 et J30. Nous avons observé une parfaite corrélation entre la fixation du FDG et l'examen anatomopathologique. La TEP/TDM utilisée en expérimentation animale reste ainsi un bon outil de classification tumorale et de suivi de la progression tumorale [36, 64]. Elle pourrait être utilisée sur ce modèle, en complément de l'examen clinique pour l'évaluation d'essai thérapeutique.

Sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire, la TEP a permis de montrer l'extension tumorale. L'imagerie a montré de nombreuses calcifications intra-tumorales caractéristiques de la tumeur ostéosarcomateuse. Dans notre expérimentation, la détection des métastases pulmonaires par TEP était parfaitement corrélée avec l'examen anatomopathologique. La TEP/TDM est un examen intéressant pour la classification tumorale, la détection de métastases à distance et a montré son intérêt pour le suivi de l'efficacité thérapeutique [9, 49, 51, 52].

Intérêt de l'utilisation du *bevacizumab* sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire

Le *bevacizumab* est un antiangiogénique de synthèse (anti-VEGF), actuellement utilisé dans le traitement de certains cancers. Il fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase III sur le carcinome épidermoïde. Nous l'avons testé sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire car celui-ci fut le premier modèle disponible et facilement reproductible au sein de notre unité de recherche. Son mode d'administration par injection intra péritonéale n'a pas posé de difficultés chez le rat. Nous avons obtenu une réponse intéressante au niveau des masses tumorales. La différence de progression des volumes tumoraux observée entre les deux groupes était significative, à partir du 8^{ème} jour. Par contre nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux groupes du délai d'apparition et du nombre de métastase. Cette étude permet de conclure à une efficacité du *bevacizumab* sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire mais nécessite d'être reproduite sur une population de rats plus importante. En fonction de ces résultats, on pourrait discuter le fait que ce traitement ne présente qu'un intérêt adjuvant associé à tout autre traitement et qu'on ne saurait imaginer son utilisation comme agent thérapeutique principal. D'ailleurs c'est au moment de l'initiation de la néoangiogénèse que ces traitements peuvent présenter un intérêt majeur mais alors le diagnostic de la tumeur (microscopique) n'est pas possible. Nous ne disposons pas encore de marqueurs biologiques permettant de détecter l'initiation d'une néoangiogénèse comme la mobilisation de cellules médullaires hématopoïétiques, l'activation de certaines métalloprotéinases (MMP9 en particulier), l'apparition de macrophages circulants et d'autres marqueurs possibles.

Apport de l'IRM dynamique dans l'évaluation de l'efficacité du *bevacizumab* sur le modèle d'ostéosarcome mandibulaire

Cet examen a été réalisé chez 4 rats présentant un ostéosarcome mandibulaire dont deux traités par *bevacizumab*. Il nous a permis de montrer que l'imagerie dynamique avait un intérêt dans l'étude de la vascularisation tumorale, en montrant une différence importante de prise de contraste entre la périphérie et le centre des tumeurs. Cependant l'IRM dynamique n'a pas été réalisée sur un nombre suffisant de rat pour rapporter des résultats significatifs et conclure en un quelconque intérêt dans la mesure indirecte de l'efficacité des anti-VEGF sur l'angiogénèse. Cette analyse mériterait d'être réalisée sur une population plus importante.

**V-CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

Nous disposons de trois modèles expérimentaux de tumeurs ORL intéressants. L'intérêt du modèle de carcinome épidermoïde induit par la 4-NQO réside dans l'étude des états pré-néoplasiques. Il ne peut pas être utilisé dans des essais thérapeutiques qui nécessitent de disposer rapidement d'une population de modèles uniformes. Les deux modèles d'allogreffe tumorale ont été caractérisés sur le plan histologique et radiologique, ils constituent des modèles animaux immunocompétents très intéressants pour d'éventuels essais thérapeutiques. En effet, ils sont facilement et rapidement reproductibles. Le suivi de l'efficacité thérapeutique pourrait être assuré à la fois par l'examen clinique, facilité par la position en sous-cutanée des masses tumorales et par la TEP/TDM dont le seuil de détection est bas. L'étude de l'angiogénèse par IRM dynamique mérite d'être réalisée sur une cohorte plus importante. Ce protocole de création de modèles animaux de cancers pourrait être utilisé comme modèle général afin de reproduire tout type de tumeur par réitération de greffes chez des rats immunocompétents, âgés de 21 jours.

Nous pensons que la mesure des cellules tumorales d'une part et des cellules endothéliales circulantes d'autre part, avant et pendant le traitement, pourrait être un indice d'efficacité thérapeutique et de suivi du processus tumoral.

Par ailleurs les avancées récentes sur la compréhension de l'origine cellulaire et des mécanismes moléculaires, à la base de l'initiation des cancers et de leur progression, nous orientent vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les voies de signalisation intracellulaire des cellules tumorales souches (progéniteurs) et leur microenvironnement constituent de nouvelles cibles thérapeutiques, qui associés aux thérapeutiques classiques, devraient pouvoir augmenter leur efficacité, prévenir les récurrences tumorales et augmenter la survie. Récemment, de nouveaux concepts ont proposé l'implication de ces cellules tumorales souches comme étant à l'origine de l'initiation, de la progression

de la maladie et de l'apparition d'une résistance aux thérapeutiques conventionnelles [65-72]. L'étude de Harper et al., réalisée sur des lignées cellulaires issues de carcinome épidermoïde, utilisant les marqueurs CD44, CD133 et CD29, montre la présence de cellules tumorales souches au sein de la lignée cellulaire [65]. Ainsi, cette recherche semble très intéressante et pourrait permettre de comprendre l'agressivité locale, la vitesse de progression et de dissémination à distance ainsi que la présence d'une résistance aux thérapeutiques classiques de chimiothérapie.

VI-BIBLIOGRAPHIE

1. Suarez PA, Adler-Storthz K, Luna MA, et al. Papillary squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic and molecular study. *Head Neck*, 2000, 22:360-8.
2. McKaig RG, Baric RS et Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*, 1998, 20:250-65.
3. Coeffic D, Antoine ED et Khayat D. Chimiothérapie antitumorale. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Akos Encyclopédie Pratique de Médecine*, 2-0140, 1998, 7 p.
4. Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T, et al. Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 1992, 14:8-13.
5. Le Tourneau C et Siu LL. Molecular-targeted therapies in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Curr Opin Oncol*, 2008,20:256-63.
6. Guinebretière JM, Le Cesne A, Le Péchoux C et al. Ostéosarcome de forme commune. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Appareil locomoteur*, 14-704, 2001, 13 p.
7. Thiele OC, Freier K, Bacon C, et al. CM. Interdisciplinary combined treatment of craniofacial osteosarcoma with neoadjuvant and adjuvant chemotherapy and excision of the tumour: a retrospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2008 Apr 22.
8. Clark JC, Dass CR et Choong PF. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134:281-297.

9. Dutour A, Leclers D, Monteil J, et al. Non-invasive imaging correlates with histological and molecular characteristics of an osteosarcoma model: application for early detection and follow-up of MDR phenotype. *Anticancer Res*, 2007, 27:4171-4178.
10. Mellor HR et Callaghan R. Resistance to Chemotherapy in Cancer: A Complex and Integrated Cellular Response. *Pharmacology*, 2008, 81:275-300.
11. Mehta RS, Bornstein R, Yu IR, et al. Breast cancer survival and in vitro tumor response in the extreme drug resistance assay. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66:225-37.
12. Holloway RW, Mehta RS, Finkler NJ, et al. Association between in vitro platinum resistance in the EDR assay and clinical outcomes for ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol*, 2002, 87:8-16.
13. Loizzi V, Chan JK, Osann K, et al. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189:1301-7
14. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86:353-364.
15. Faccioli N, Marzola P, Boschi F, et al. Pathological animal models in the experimental evaluation of tumour microvasculature with magnetic resonance imaging. *Radiol Med (Torino)*, 2007, 112:319-328.
16. Preda A, Novikov V, Möglich M, et al. MRI monitoring of Avastin antiangiogenesis therapy using B22956/1, a new blood pool contrast agent, in an experimental model of human cancer. *J Magn Reson Imaging*, 2004, 20:865-873.

17. Preda A, van Vliet M, Krestin GP, et al. Magnetic resonance macromolecular agents for monitoring tumor microvessels and angiogenesis inhibition. *Invest Radiol*, 2006, 41:325-331.
18. Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. *J Oral Pathol*, 1981, 10:129-146.
19. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res*, 1954, 33:253-262.
20. Kanojia D et Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol*, 2006, 42:655-667.
21. Meier JD, Enepekides DJ, Poirier B, et al. Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2007, 133:1149-1152.
22. Ohne M, Satoh T, Yamada S, et al. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1985, 59:600-607.
23. Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, et al. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 1994, 16:424-432.
24. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, et al. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck*, 1996, 18:441-449.
25. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, et al. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:301-313.

26. Ribeiro DA, Fávero Salvadori DM, da Silva RN, et al. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol*, 2004, 40:910-915.
27. Vered M, Yarom N et Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncol*, 2005, 41:337-339.
28. Wallenius K et Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy*, 1973, 24:39-48.
29. Smith LP et Thomas GR. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of transplanted xenogeneic human tumors. *Int J Cancer*, 2006, 118:2111-2122.
30. Thomas GR et Smith LP. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations part B. Transgenic mouse models. *Int J Cancer*, 2006, 118:2379-2380.
31. Blitzer A. Regional behavioral variations of epidermoid carcinoma of the head and neck: a study in an animal model. *Laryngoscope*, 1982, 92:1219-1238.
32. O'Malley BW Jr, Cope KA, Johnson CS, et al. A new immunocompetent murine model for oral cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1997, 123:20-24.
33. Hier MP, Black MJ, Shenouda G, et al. A murine model for the immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 1995, 105:1077-1080.

34. Thomas GR, Chen Z, Oechsli MN, et al. Decreased expression of CD80 is a marker for increased tumorigenicity in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*, 1999, 82:377-384.
35. Thomas GR, Chen Z, Enamorado I, et al. IL-12- and IL-2-induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co-stimulatory molecule and interferon-gamma. *Int J Cancer*, 2000, 86:368-374.
36. Bao A, Phillips WT, Goins B, et al. Setup and characterization of a human head and neck squamous cell carcinoma xenograft model in nude rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006, 135:853-857.
37. Fantozzi R, Bone R, Fernsten P, et al. Upper aerodigestive neoplasm perpetuated in the nude mouse. *Laryngoscope*, 1986, 96:621-624.
38. Baker SR. An in vivo model for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*, 1985, 95:43-56.
39. Povlsen CO et Rygaard J. Heterotransplantation of human epidermoid carcinomas to the mouse mutant nude. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*, 1972, 80:713-717.
40. Fiebig HH, Winterhalter B, Berger DP, et al. Combined in vitro/in vivo test procedure with human tumor xenografts for anticancer drug development. *Strahlenther Onkol*, 1989, 165:522-524.
41. Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer*, 2004, 40:827-836.
42. Braakhuis BJ, van Dongen GA, Bagnay M, et al. Preclinical chemotherapy on human head and neck cancer xenografts grown in athymic nude mice. *Head Neck*, 1989, 11:511-515.

43. Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, et al. Development of a new invasion and metastasis model of human oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, 1995, 31B:216-221.
44. Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, et al. Reproduction of occult metastasis of head and neck cancer in nude mice. *Clin Exp Metastasis*, 1999, 17:277-282.
45. Kurokawa H, Katsube K, Podyma KA, et al. Heparinase and tumor invasion patterns in human oral squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Sci*, 2003, 94:277-285.
46. Sato K et Horikoshi T. Experimental production of osteogenic sarcoma of the mandible in rabbits with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, 1975, 66:203-207.
47. Sato K, Nukaga H, Horikoshi T, et al. Difference in the induction of osteosarcoma in rabbit bone with single administration of three kinds of chemical carcinogens. *Gann*, 1978, 69:579-583.
48. Allouche M, Delbrück HG, Klein B, et al. Malignant bone tumours induced by a local injection of colloidal radioactive ¹⁴⁴Cerium in rats as a model for human osteosarcomas. *Int J Cancer*, 1980, 26:777-782.
49. Dutour A, Monteil J, Paraf F et al. Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma : study in a human-like rat orthotopic tumor. *Mol Ther*, 2005, 11: 311-319.
50. Charissoux JL, Grossin L, Leboutet MJ, et al. Treatment of experimental osteosarcoma tumors in rat by herpes simplex thymidine kinase gene transfer and ganciclovir. *Anticancer Res*, 1999,19:77-80.
51. Dutour A et Rigaud M. Tumor endothelial cells are targets for selective therapies: in vitro and in vivo models to evaluate antiangiogenic strategies. *Anticancer Res*, 2005, 25:3799-3807.

52. Dutour A, Rabinovich-Chable H, Kaletta C, et al. Is troponin I gene therapy effective for osteosarcoma treatment? Study on a human-like orthotopic rat model. *Anticancer Res*, 2004, 24:3977-3982.
53. Greene E.C. *Anatomy of the rat*. New York and London: Hafner Publishing Company, 1968.
54. Lippincott, Raven. *Histology for pathologists*. Mills S.E and Fechner R.E. Larynx and pharynx. p: 391-403.
55. Leroux-Robert J, De Brux J. *Histopathologie O.R.L. et cervico-faciale*. Collection d'histopathologie. Masson. Larynx et hypopharynx. p: 283-332.
56. Carlsson G., Gullberg B. et Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas. An experimental study in rats. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 1983, 105:20-23.
57. Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 1982, 31:11-24.
58. Moll R, Löwe A, Laufer J, et al. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, 1992, 140:427-447.
59. Tseng SC, Jarvinen MJ, Nelson WG, et al. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibodies studies. *Cell*, 1982, 30:361-372.
60. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, et al. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol*, 1982, 95:580-588.
61. Miettinen M. Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls.

- Pathol Annu, 1993, 2:113-143.
62. Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem*, 1998,31:205-262.
 63. Tatsumi M, Nakamoto Y, Traugher B, et al. Initial experience in small animal tumor imaging with a clinical positron emission tomography/computed tomography scanner using 2-[F-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res*, 2003, 63:6252-6257.
 64. Monteil J, Dutour A, Akla B, et al. In vivo follow-up of rat tumor models with 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose/dual-head coincidence gamma camera imaging. *Mol Imaging Biol*, 2005, 7:220-228.
 65. Harper LJ, Piper K, Common J, et al. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2007,36:594-603.
 66. Mimeault M and Batra SK. Recent Progress on Tissue-Resident Adult Stem Cell Biology and Their Therapeutic Implications. *Stem Cell Rev*, 2008, 21.
 67. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med*, 2007,11:981-1011.
 68. Mimeault M, Hauke R and Batra SK. Recent Advances on the Molecular Mechanisms Involved in the Drug Resistance of Cancer Cells and Novel Targeting Therapies. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 29, [Epub ahead of print].
 69. Mimeault M, Hauke R and Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics- recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82:252-264.

70. Bianchini C, Ciorba A, Pelucchi S, et al. Head and neck cancer: the possible role of stem cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008, 265:17-20.
71. Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, et al. Cancer stem cells - new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*, 2006, 12:443-454.
72. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104:973-978.

VII-ANNEXES

Annexe 1 : Aubry K, Labourey JL, Bessède JP, Tubiana-Mathieu N, Rigaud M. *Expression levels of thymidylate synthase, thymidylate phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in head and neck squamous cell carcinoma : preliminary study. Clinical Medicine : Oncology, 2008, 2: 27-35.*

Annexe 2 : Aubry K, Barriere G, Chable-Rabinovitch H, Dutour A, Paraf F, Monteil J, Rigaud M. *Molecular mechanisms regulating the angiogenic phenotype in tumors: clinical impact in the future. Anticancer Res, 2007, 27:3111-3119.*

Annexe 3 : Article accepté, en attente de publication dans la revue *Molecular Imaging and Biology*. Aubry K, Shao Z, Monteil J, Paraf F, Bessède JP, Rigaud M. *FDG-PET/CT of head and neck squamous cell carcinoma in rat model.*

Annexe 4 : Article accepté, en attente de publication dans à la revue *In vivo*. Aubry K, Paraf F, Monteil J, Bessède JP, Rigaud M. *Characterization of a new rat model of head and neck squamous cell carcinoma.*