

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA I



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE**

FILIERE SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité

GENETIQUE PHYSIOLOGIE

Thème

**Etude des polymorphismes des gènes (SOD2, CAT) et
dosage des paramètres du stress oxydatif (MDA, CAT, NO)
dans le cancer du nasopharynx.**

Présenté par

Mlle BRIK CHAUCHE RIM

Soutenu publiquement le 16/09/2015 devant le jury composé de :

Mr OUSSADOU L.	MAA	FSNV	Président
Mr MOHAMED SAID R.	MAA	FSNV	Examinateur
Mme AMROUN H.	MCA	IPA	Promotrice
Mme EDDAIKRA A.	MAA	FSNV	Co-Promotrice
Mme RAACHE R.	MCA	USTHB	Invitée

Promotion 2014/2015

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je remercie notre Dieu le tout puissant de m'avoir donné la volonté, le courage et la force pour accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde gratitude à ma promotrice Pr AMROUN H pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire, de m'avoir encadré et aidé pour la réalisation de ce travail.

Je remercie ma co-promotrice et enseignante Mme EDDAIKERA A pour son aide précieuse, sa patience et ses encouragements.

Je remercie également Mr OUSSADOU L pour avoir fait l'honneur de présider le jury de ce PFE et Mr MOHAMED SAID R d'avoir accepté de participer au jury et d'évaluer ce travail.

Je voudrais également adresser ma reconnaissance au personnel de l'Institut Pasteur d'Algérie, en particulier l'équipe du service d'immunogénétique Unité HLA et au personnel du service d'oncologie médicale de Centre Pierre et Marie Curie de l'hôpital Mustapha Pacha, Alger.

A mon chef d'option Mr MOHAMED SAID R qui m'a permis de suivre cette spécialité ainsi qu'à mes professeurs qui m'ont formé et encouragé, je leur dirai tout simplement Merci de m'avoir éclairé, soutenu et permis d'accéder au savoir.

Je vous exprime, ici, mes respects, ma considération et ma reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mon Père et à ma Mère qui ont su me donner une éducation exemplaire et m'ont permis, par leur soutien et leur sacrifice, de poursuivre mes études dans les meilleures conditions.

Qu'ils en soient fiers.

À toute ma famille.

À tous ceux qui de près ou de loin ont soutenu mon travail.

Et à tous les malades cancéreux à qui je souhaite un bon rétablissement.

Résumé.

Le carcinome du nasopharynx est une tumeur d'origine épithéliale localisée dans la partie postérieure du cavum. Il est ubiquitaire mais présente trois niveaux d'incidence dans le monde. L'étiologie de ce cancer incrimine trois types de facteurs : le facteur viral, les facteurs génétiques et environnementaux. L'infection par le virus d'Epstein Barr (EBV) et le contrôle des processus biologiques tels que l'inflammation ou le stress oxydatif ou les deux ont été identifiés comme des facteurs de risque pour le carcinome du nasopharynx (NPC).

Initialement, dans notre étude cas-témoins qui a inclue 56 patients atteint du NPC et 100 témoins sains, nous avons évalué l'association entre les polymorphismes fonctionnels des gènes impliqués dans la réponse anti oxydante : C 47 T (rs4880) du gène de la superoxide dismutase2 (*SOD2*) et C-262 T (rs1001179) du gène de la catalase (*CAT*), et le risque du NPC par une technique de discrimination allélique technologie Taqman .Nous avons par la suite évaluer et doser les paramètres du stress oxydatif à savoir l'activité de la catalase, le niveau du malondialdéhyde (MDA) et du monoxyde d'azote (NO) dans le sérum des malades et témoins par une technique spectrophotométrique.

L'analyse allélique et génotypique des deux polymorphismes nucléotidiques étudiés n'a révélé aucune différence significative. Par ailleurs les résultats du dosage des paramètres du stress oxydatif montrent une baisse significative de l'activité de la catalase chez les patients atteint de NPC ($p=0.024$) et que les taux élevés du MDA et du NO chez ces patients sont hautement significatifs ($p=0.001$).

Ces résultats suggèrent qu'il ya une perturbation du statut oxydant/ antioxydant chez les patients atteints du NPC comparé aux témoins.

Mots clés : cancer du nasopharynx, stress oxydant, superoxide dismutase2, catalase, malondialdéhyde, monoxyde d'azote, catalase.

Abstract.

Nasopharyngeal carcinoma is an epithelial origin tumor localized in the posterior portion of the nasopharynx. It is ubiquitous but presents three levels of incidence in the world. The etiology of this cancer blames three factors: the viral factors, genetic and environmental factors. The EBV infection and control of biological processes such as inflammation or oxidative stress or both were identified as risk factors for nasopharyngeal carcinoma (NPC)

Initially, in our case-control study that included 56 patients suffering from NPC and 100 healthy controls, we evaluated the association between functional polymorphisms of genes involved in the antioxidant response: C 47 T (rs4880) of superoxide dismutase2 gene (*SOD2*) and C-262 T (rs1001179) of the *catalase* gene (*CAT*) and the risk of NPC by a technology allelic discrimination technique Taqman .We subsequently evaluate the parameters and dose caused oxidative stress namely the catalase activity, the level of malondialdéhyde (MDA) and monoxide d'azote (NO) in the serum of patients and controls by spectrophotometric technique.

The allelic and genotypic analysis of both studied nucleotide polymorphisms showed no significant difference. In addition the assay results of oxidative stress parameters show a very significant decrease in catalase activity in patients suffering from NPC ($p = 0.024$) and that high levels of MDA and NO in these patients are highly significant ($p = 0.001$).

These results suggest that there is disturbance of the status oxidant / antioxidant in patients with NPC compared to controls.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma, oxidative stress, superoxide dismutase2, catalase, malondialdéhyde, monoxide d'azote, catalase.

الملخص

سرطان البلعوم هو ورم من أصل الظهارية المتواجد في الجزء الخلفي من الأنف. نجده في كل مكان و لكن يمثل ثلاث مستويات من الإصابة في العالم. مسببات هذا السرطان تتضمن ثلاث عوامل: عوامل فيروسية، وراثية بيئية. تم تحديد الإصابة بفيروس و التحكم في العمليات البيولوجية مثل الالتهاب أو الأوكسدة أو كلاهما كعوامل خطر لتطوير سرطان البلعوم. في إطار دراستنا من نوع مرضى شواهد (56 مريض و 100 أصحاء) ، قمنا أولاً بتقييم العلاقة بين تعدد الأشكال الوظيفية من الجينات المعينة في الاستجابة المضادة للأوكسدة :

C47T (rs4880) من الجين SOD2 C-262T (rs1001179) من الجين CAT ، و خطر الإصابة بسرطان البلعوم بتقنية التمييز الأليلي تكنولوجيا Taqman.

ثم قمنا بتقييم و تحديد عوامل الأوكسدة (نشاط الكتالاز و مستوى malondialdéhyd و monoxide d'azote) في مصل دم المرضى و الأصحاء بتقنية الطيف الضوئي .

التحليل الأليلي و الوراثة لكلا النكليوتيدات لم يكشف على أي فرق ذات دلالة إحصائية. بينما نتائج فحص عوامل الأوكسدة تظهر انخفاضاً كبيراً في نشاط الكتالاز عند المرضى المصابين بسرطان البلعوم ($P=0.024$). و أن ارتفاع مستويات malondialdéhyde و monoxide d'azote عند هؤلاء المرضى كبير للغاية ($P=0.001$).

هذه النتائج تشير إلى أن هناك اضطراب في حالة الأوكسدة / الأوكسدة المضادة عند المرضى المصابين بسرطان البلعوم بالمقارنة مع الشواهد.

كلمات مفتاحية : سرطان البلعوم. الأوكسدة. الكتالاز, superoxide dismutase2, malondialdéhyde, monoxide d'azote,

Liste des figures.

Figure1: représentation schématique de la localisation du nasopharynx.....	4
Figure2: Répartition mondiale du cancer du cavum. L'Algérie se situe dans la zone de fréquence intermédiaire.....	6
Figure 3: structure de l'EBV.....	8
Figure 4: Cycle de l'EBV.....	9
Figure 5: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.....	14
Figure 6: Rôle dommages oxydatifs à l'ADN dans la cancérogenèse liée à une inflammation.....	16
Figure 7: Localisation chromosomique du gène SOD	17
Figure 8: Localisation chromosomique du gène CAT.....	18
Figure 9 : Schéma explicatif des mécanismes cellulaires du stress oxydatif et risque du cancer	19
Figure10: Schéma représentatif du principe TaqMan.....	25
Figure 11: Formation d'adduit-TBA (1 :2).....	30
Figure 12: Formation du diazonium.....	31
Figure 13: Répartition des patients NPC selon le sexe.....	34
Figure 14: répartition des malades selon l'âge et le sexe.....	34
Figure 15: Répartition des patients selon le stade.....	35
Figure 16: Un exemple de résultat de la discrimination allélique.....	36
Figure 17: Distribution des fréquences alléliques et génotypiques C 47 T du gène <i>SOD2</i> ...37	
Figure 18: Distribution des fréquences alléliques et génotypique C-262 T du gène <i>CAT</i>38	
Figure 19: Comparaison des taux de l'activité de la catalase entre malades et témoins.....	39
Figure 20: comparaison des taux du MDA entre malades et témoins.....	39
Figure 21: comparaison du niveau de monoxyde d'azote entre patients et témoins.....	40

Liste des tableaux.

Tableau I : Caractéristiques des polymorphismes nucléotidiques étudiés.....	28
Tableau II: Association entre facteurs environnementaux et risque du NPC.....	35
Tableau III: Distribution des fréquences alléliques et génotypiques C 47 T du gène <i>SOD2</i> ...	37
Tableau IV: Distribution des fréquences alléliques et génotypique C-262 T du gène <i>CAT</i>	38

Liste des abréviations.

ADN: Acide Desoxyribo Nucleique
AJCC: American Joint Comittee on Cancer
ARN: Acide RiboNucléique
ATP: Adénosine Tri Phosphate
EBNA: Epstein-Barr virus Nuclear Antigen
EBV: Virus d'Epstein-Barr
EGFR: Epidermal Groth factor Receptor
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM : Erreur Standard Moyenne
HLA : Antigènes Leucocytaires Humains
IDC : Cardiomyopathie idiopathique
IFN γ : Interferon gamma
IL-6 : l'interleukine-6
LB : Lymphocytes B
LMP : Latent Membran Protein
LMP1 : Protéine Membranaire Latente 1
LT CD8 : Lymphocytes T CD8
MDA : MalonDiAldéhyde
MnSOD : Superoxyde Dismutases à Manganèse
NK: Natural Killer
NO: Monoxyde d'azote
NOs NO-synthase
NPC: Nasopharyngeal Carcinoma
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PIGR: *Polymeric ImmunoGlobulin Receptor*
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SOD: SuperOxyde Dismutase
TR: Terminal Repeat.
TNF α : facteur de nécrose tumorale
UCNT: Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type
UICC : Union Internationale de Lutte Contre le Cancer
VADS : Voies AéroDigestives Supérieur

Sommaire.

Introduction	1
Chapitre I : Rappels Bibliographiques.....	3
I.1- Le carcinome du nasopharynx.....	4
I.1.1- Définition.....	4
I.1.2- Localisation et histologie.....	4
I.1.3- Aspects anatomopathologiques.....	5
I.1.4- Classification.....	5
I.1.5- Epidémiologie.....	6
I.1.6- Etiologie.....	7
I.1.6.1-Facteur viral.....	7
I.1.6.2- Facteurs génétiques.....	10
I.1.6.3- Facteurs diététiques et environnementaux.....	11
I.2- Le stress oxydant.....	12
I.2.1- Définition.....	12
I.2.2- Source.....	13
I.2.3- Les antioxydants.....	14
I.3- Stress oxydant, inflammation et cancer.....	15
I.3.1- Dommages d'ADN dans la carcinogenèse liée à l'infection.....	16
I.4- Paramètres de dosage du stress oxydant.....	17
I.4.1- Superoxyde dismutase(SOD).....	17
I.4.1.1- Gène de la MnSOD (SOD2).....	17
I.4.1.2- Polymorphisme Ala-9Val (C47T) du gène SOD2.....	17
I.4.2- La catalase.....	18
I.4.2.1- Polymorphisme C-262 T du gène CAT.....	18
I.4.3- Peroxydation lipidique et malondialdéhyde (MDA).....	20
I.5- Marqueurs de l'inflammation.....	20
I.5.1- Le monoxyde d'azote NO.....	20

Chapitre II : Matériels et Méthodes.

II.1- Matériel.....	22
II.1.1- Matériel biologiques.....	22
II.1.1.1 - Prélèvements et échantillonnages.....	22
II.1.1.2 -Populations d'étude.	23
II.1.2 -Matériel non biologique.....	23
II.2- Méthodes.....	23
II.2.1 -Extraction d'ADN.....	23
II.2.1.1- Principe.....	23
II.2.1.2 -Mode opératoire.....	24
II.2.1.3-Détermination de la concentration et de la pureté d'ADN.....	25
II.2.2 - Etudes des polymorphismes nucléotidiques.	25
II.2.2.1- Principe.....	25
II.2.2.2- Caractéristiques des sondes Taqman.....	26
II.2.2.3 - Mode opératoire.....	28
II.2.3 - Dosage des paramètres du stress oxydatif.....	29.
II.2.3.1- Dosage de la catalase.....	29
II.2.3.1.1- Principe.	29
II.2.3.2- Dosage du malondialdehyde (MDA).....	29
II.2.3.2.1- Principe.....	29
II.2.3.3 - Dosage du monoxyde d'azote (NO).....	30
II.2.3.3.1- Principe.....	30
II.3 - Analyse statistique.....	31

Chapitre III : Résultats.

III.1- Caractéristiques démographiques de la population étudiée.	34
III.1.1- Répartition selon le sexe.....	34
III.1.2- Répartition des patients selon l'âge et le sexe.....	34
III.2- Facteurs environnementaux et risque du NPC.	35
III.3- Répartition des patients selon le stade.....	35
III.4- Résultats de l'analyse des polymorphismes nucléotidiques	36
III.4.1- Distribution des fréquences alléliques et génotypiques C 47 T du gène SOD2.....	37
III.4.2- Distribution des fréquences alléliques et génotypique C-262 T du gène CAT.....	38
III.5- Résultats du dosage des paramètres du stress oxydant.....	38

III.5.1- Dosage de la catalase.....	39
III.5.2- Dosage du MDA.....	39
III.5.3- Dosage du NO.....	40
Chapitre IV : Discussion.....	41
Conclusion.....	46
Annexes	
Références bibliographiques	

Introduction

Le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydatif », c'est-à-dire une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines, dont le cancer (FAVIER, 2003).

Le carcinome du nasopharynx (NPC) représente un des cancers les plus importants dans notre pays, avec une incidence moyenne de 8 à 12 cas/100 000 habitants par an. Il représente en Algérie et en Tunisie le premier cancer des voies aérodigestives chez la femme et le deuxième après le cancer du larynx chez l'homme (BENDJEMANA *et al.*, 2011).

Le NPC constitue une entité distincte des autres tumeurs de la tête et du cou de par son étiologie multifactorielle spécifique et sa répartition géographique caractéristique (RIVERA *et al.*, 2005). Les données actuelles suggèrent une interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux dont fait partie le virus EBV. En effet, l'infection par l'EBV et le contrôle génétique des processus biologiques tels que l'inflammation ou le stress oxydatif ou les deux ont été identifiés comme des facteurs de risque pour les NPC (ARIJ BEN CHAABEN, 2012). Dans l'ensemble, un changement dans l'équilibre entre la production du stress oxydatif et de réponse antioxydante est censé jouer un rôle majeur dans la susceptibilité / résistance au NPC et dans la progression tumorale.

En s'appuyant sur cette hypothèse, le but de notre étude est de :

Rechercher une éventuelle prédisposition génétique au cancer du nasopharynx, dans une population Algérienne ayant un carcinome du nasopharynx confirmé histologiquement et cela à travers l'analyse des polymorphismes nucléotidiques de deux enzymes impliqués dans la réponse au stress oxydatif à savoir *SOD2* et *CAT* et de comparer les résultats trouvés à ceux d'une population de sujets sains.

Etablir une évaluation des paramètres et métabolites issus du stress oxydant (catalase, NO, MDA) présents chez les deux groupes malades et témoins et faire la comparaison entre les deux.

Chapitre 1

Rappels Bibliographiques.

I.1- Le carcinome du nasopharynx.

I.1.1- Définition.

Le carcinome du nasopharynx (NPC) est une tumeur d'origine épithéliale localisée dans la partie postérieure du cavum, c'est l'une des tumeurs les plus agressives de la tête et du cou avec une évolution tumorale importante et un potentiel métastatique élevée (KARRAY-HAKIM *et al.*, 2009).

Ce type de tumeur est en moyenne plus radiosensible et chimio sensible que les autres carcinomes des voies aérodigestives supérieures (VADS), au moins à la phase initiale du traitement. Cependant, un fort taux de dissémination métastatique complique le traitement (BEI *et al.*, 2012, BUSSON *et al.*, 2004).

I.1.2- Localisation et histologie.

Le nasopharynx appelé cavum ou rhinopharynx est une cavité aérienne située sous la base du crâne en arrière des fosses nasales, au-dessus de l'oropharynx et en avant des deux premières vertèbres cervicales. Il communique en avant avec les fosses nasales par les choanes et latéralement avec les oreilles moyennes par les trompes d'Eustache (LEGENT *et al.*, 1969).

La muqueuse nasopharyngé est formée essentiellement d'un épithélium de surface de structure variée (pseudo stratifié cilié de type respiratoire dans la majeure partie du nasopharynx) reposant sur une lame basale et un chorion plus ou moins riche en follicules lymphoïdes (ATIF *et al.*, 2012).

Le NPC se développe dans la fossette de Rosenmüller (*figure 1*) et peut s'étendre à la cavité nasale, aux parois latérales et postérieures de l'oropharynx et à la paroi pharyngée. La survenue de métastases à distance (os, foie, poumons) est plus fréquente que pour les autres types de cancers localisés dans la même région anatomique (BOURHIS *et al.*, 1998).

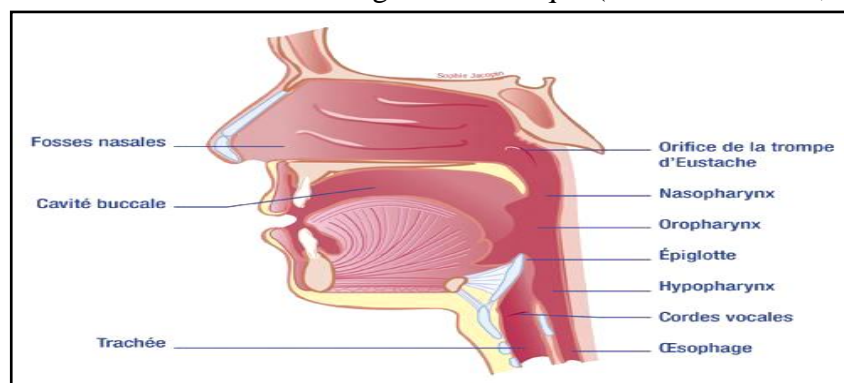


Figure1: Représentation schématique de la localisation du nasopharynx (LEGENT, 1969).

I.1.3- Aspects anatomopathologiques.

Les carcinomes du nasopharynx sont classés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en trois types histologiques selon leur degré de maturation épithéliale (RIVERA *et al.*, 2005).

- Le type I correspond au degré maximum de maturation (carcinome épidermoïde kératinisant).
- Le type II : carcinome épidermoïde non kératinisant (absence de kératine extracellulaire).
- Le type III est constitué des carcinomes indifférenciés du nasopharynx (Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type : UCNT).

Dans les zones d'endémies, l'immense majorité des carcinomes du nasopharynx se classent parmi les types II et III (JIA *et al.*, 2012), les cas de type I sont rarissimes. En dehors des zones d'endémies, notamment en France, les tumeurs de type I—bien que rares en valeur absolue — représentent 30 à 40 % des cas de carcinomes du nasopharynx (RIVERA *et al.*, 2005).

I.1.4- Classification

De nombreuses classifications ont été utilisées en clinique. Les plus importantes sont ceux de Ho (TEO *et al.*, 1991) et la classification TNM (où la lettre T désigne la tumeur primaire, la lettre N les ganglions et la lettre M les métastases) proposée par l'Union Internationale de Lutte Contre le Cancer (UICC) et l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (EDGE *et al.*, 2009, GREENE *et al.*, 2006). Cette classification permet la distinction entre 4 stades d'évolution :

Stade I : T1N0M0

Stade II :

IIA : T2aN0M0

IIB : T1N1M0, T2aN1M0, T2bN0-1M0

Stade III : T1N2M0, T2a-2bN2M0, T3N0-1-2M0

Stade IV :

IVA : T4N0-1-2M0

IVB : TtTN3M0

IVC : TtTTtNM1

I.1.5- Epidémiologie.

Le NPC est caractérisé par une répartition géographique particulière avec trois zones d'incidences (BENDJEMANA *et al.*, 2011) :

- Une zone à très **haute fréquence** avec la Chine du Sud (Canton), où l'incidence est de 30 à 80/100 000/an et celle du nord où l'incidence est de 2 à 3/100 000/an.
- Une zone à **fréquence intermédiaire** (8 à 12/100 000/an) avec Taiwan, le Vietnam, la Thaïlande, la Malaisie, les Philippines, les Caraïbes, le **bassin méditerranéen** (Maghreb et Moyen-Orient), l'Alaska et le Groenland.
- Et enfin une zone à **fréquence faible** en Europe et aux Etats-Unis (0,5 à 2/100 000/an) (MUIR *et al.*, 1987, STEWART *et al.*, 2003, YU, 1990)

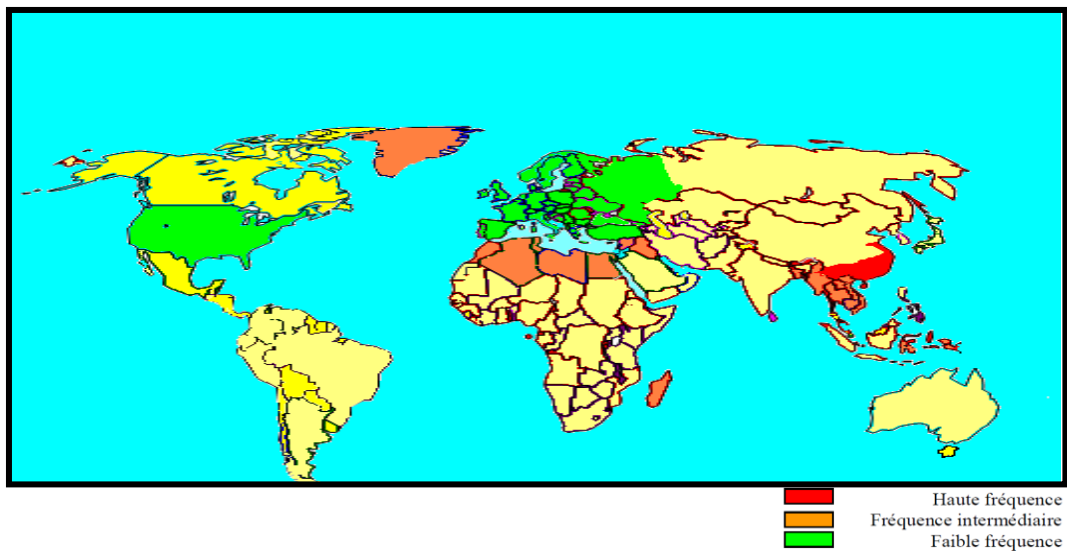


Figure2 : Répartition mondiale du cancer du cavum.

L'Algérie se situe dans la zone de fréquence intermédiaire (TATAFASA, 2009)(Tatafasa S., 2009).

Dans presque toutes les populations étudiées, l'incidence du NPC est de 2 à 3 fois plus importante chez les hommes comparés aux femmes (CHANG *et al.*, 2006).

Le carcinome du nasopharynx a la particularité d'être retrouvé pour l'ensemble du Maghreb, avec une distribution bimodale avec deux pics de fréquence. Un premier pic entre 18 et 20 ans et un deuxième entre 50 et 60 ans (BOURAS *et al.*, 2006).

Le Registre du cancer d'Alger donne une incidence standardisée du carcinome nasopharyngé de 2—6/100 000 par an avec une baisse de cette incidence ces dernières années (6 en 2003 à 4/100 000 par an en 2006 dans le sexe masculin)(BAHRIZ *et al.*, 2010).

I.1.6- Etiologie.

L'étiologie du NPC est multifactorielle et non encore totalement élucidée. Les données actuellement disponibles suggèrent l'interaction complexe de facteurs génétiques et environnementaux notamment le facteur viral dans l'apparition de la maladie (TSAO *et al.*, 2014).

I.1.6.1-Facteur viral.

Le NPC puise son originalité dans son association étroite avec le **Virus d'Epstein-Barr (EBV)** et ceci dans sa forme indifférenciée ou peu différenciée. Cette association a été établie depuis plus de 40 ans par la mise en évidence de l'ADN et protéines virales dans les cellules tumorales (KARRAY-HAKIM *et al.*, 2009).

Cette association a été également démontrée sur des critères sérologiques : en effet, on retrouve chez les malades NPC un profil sérologique particulier caractérisé par des titres élevés en IgG anti-EBV (en rapport avec une réactivation virale) et surtout des IgA anti-EBV (OLD *et al.*, 1966).

A. Caractéristiques du virus EBV.

Le virus Epstein-Barr appartient à la famille des Herpesviridae (YOUNG, 2008). Il représente deux caractéristiques essentielles qui sont l'ubiquité de l'infection et sa nature persistante durant la vie entière de l'individu. L'EBV présente deux cibles cellulaires distinctes *in vivo* qui sont les cellules lymphoïdes B et les cellules épithéliales pharyngées (LIN *et al.*, 2001).

L'EBV est associé non seulement au carcinome nasopharyngé, mais aussi au lymphome de Burkitt, au lymphome de Hodgkin et aux lymphomes des immunodéprimés (BAHRIZ *et al.*, 2010).

L'EBV est un virus à ADN linéaire à double brins de 172 Kpb et code pour 100 à 150 protéines (SEIGNEURIN, 2006).

Les virions (forme infectieuse du virus) sont constitués d'une capsid, d'un tégment et d'une enveloppe phospholipidique. Le génome virale est linéaire dans le virion et peut se circulariser dans les cellules cibles en épisode, forme sous laquelle l'EBV persiste de manière latente grâce à deux séquences terminales répétées (TR, Terminal Repeat ;Levine, 1980)

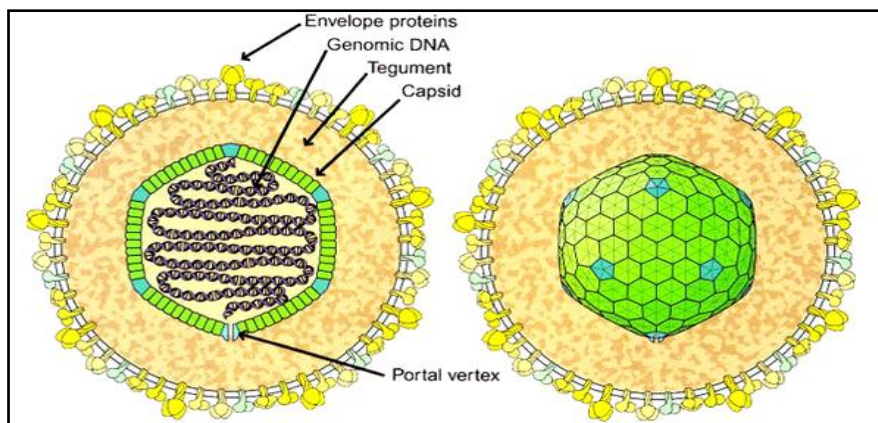


Figure 3 : structure de l'EBV (RAAB-TRAUB, 2002).

B. Cycle l'EBV.

Le cycle viral comporte une phase précoce ou infection, une phase de latence et une phase lytique (figure 4).

- Phase précoce ou l'infection.

La phase précoce débute par l'attachement du virion au lymphocyte B par le biais du CD21 et de la glycoprotéine d'enveloppe, gp350/220 ; la pénétration se fait grâce à l'action des glycoprotéines gp85, 25,42 et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II.

Au niveau de la cellule épithéliale, l'infection suit un processus similaire, ou par internalisation de complexes formés d'IgA anti-EBV et du virion, ou encore par contact direct du lymphocyte B infecté et de la cellule épithéliale via le *polymeric immunoglobulin receptor* (PIGR). Enfin l'entrée du virus se fait par endocytose, et sa progression par l'interaction des capsides libérées avec le cytosquelette (Chang, 1999)

- Phase de latence.

Durant la phase de latence, l'interaction virus-hôte permet la persistance du génome viral à long terme au cours des divisions cellulaires sans production de particules virales ; des protéines dites de latence au nombre de neuf sont synthétisées :

- Six protéines nucléaires ou Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA).
- Trois protéines membranaires ou latent membran protein (LMP).

Suivant l'expression de ces protéines, on distingue quatre types de latence :

- le type 0 dans les lymphocytes B mémoires
- le type 1 dans le lymphome de Burkitt.
- le type 2 dans le carcinome nasopharyngé et le lymphome de Hodgkin.

- le type 3 dans les lymphomes des immunodéprimés.

La phase de latence aboutit à l'acquisition par les cellules de mutations qui conduiront à leur immortalisation.

Les protéines de latence (gp350, EBNA2, 3A, 3C, 5 et LMP1) induisent la prolifération des lymphocytes, augmentent leur survie et assurent la transmission du génome viral latent au cours des divisions.

Les Epstein-Barr encoded RNA (EBER) 1 et 2 sont de petits acides ribonucléiques (ARN) non messagers abondamment transcrits, inclus dans des particules ribonucléiques au niveau des noyaux des cellules épithéliales infectées ; ils pourraient être impliqués dans la régulation de la translation et l'épissage (REYT, 2005).

- Phase lytique.

La phase lytique est marquée par la production des particules infectieuses, il n'y a plus d'expression des gènes de latence ; les gènes impliqués favorisent un environnement optimal pour la production séquentielle et en cascade de protéines constitutives et de protéines lytiques ; celles ci assurent la réplication du génome viral et la synthèse des composants virioniques et bloquent parfois les réponses antivirales des cellules infectées (REYT, 2005)

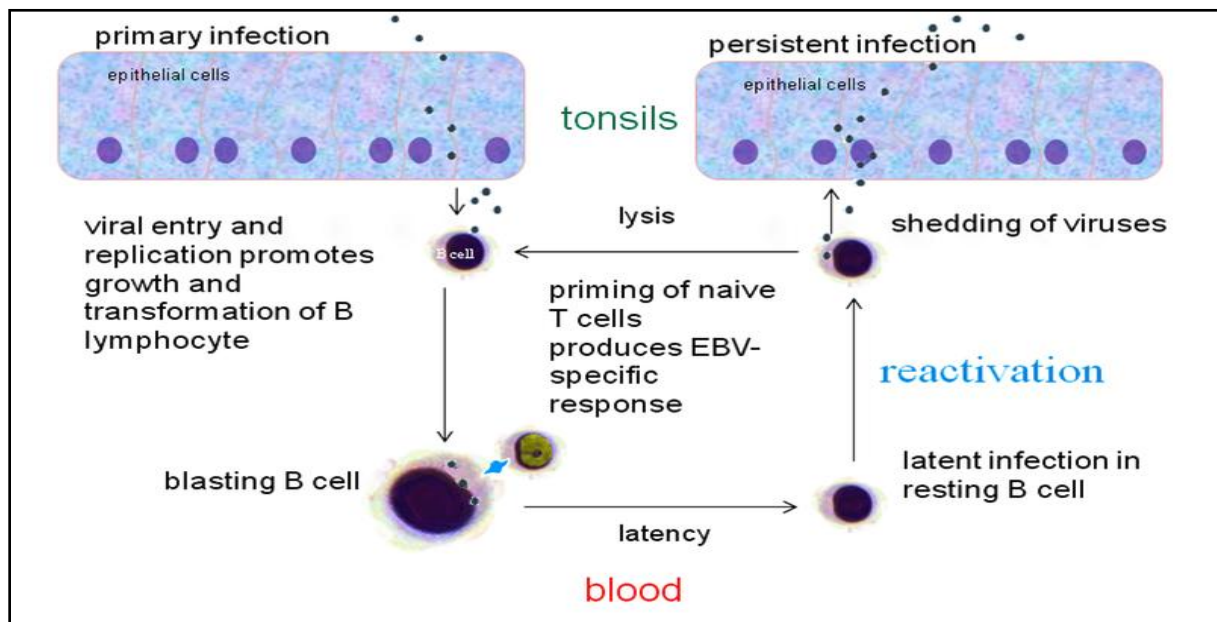


Figure 4 : Cycle de l'EBV (SEIGNEURIN, 2006)

C. Réponse immunitaire.

Les cellules natural killer (NK, cellules de l'immunité non spécifique) d'un sujet sain contrôlent dans un premier temps la prolifération des lymphocytes B infectés ; dans un deuxième temps, les lymphocytes T CD8 spécifiques de l'EBV reconnaissent les antigènes viraux précoces présents à la surface des B non-mémoires infectés et les détruisent.

Quelques cellules B infectées se différencient en B mémoires et ne sont alors plus attaquées par le système immunitaire. Il semble que la non-reconnaissance de la protéine EBNA1 à la surface des B mémoires soit due à une répétition de la séquence Gly-Ala entre les acides aminés 89 et 327 (ROWE *et al.*, 2010) ; ce motif de répétition empêcherait la protéine d'être prise en charge par le protéasome et donc d'être dégradée. Il n'y a donc pas présentation de peptides issus de la protéine virale EBNA1 sur le complexe majeur d'histocompatibilité I de la cellule infectée et donc pas de réponse immunitaire contre celle-ci. Le B mémoire infecté constitue ainsi un réservoir de latence pour le virus.

I.1.6.2- Facteurs génétiques.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des gènes codant pour les antigènes leucocytaires humains (HLA) situés sur le bras court du chromosome 6 (VOKES *et al.*, 1999).

En effet, Plusieurs allèles associés à une augmentation du risque relatif de carcinome nasopharyngé ont été identifiés : en Asie du sud-est les allèles HLA A2, B14, B46 ayant une association positive avec le carcinome nasopharyngé et HLA A11, B13, B22 ayant une association négative. En Algérie, il a été observé un risque relatif de 2,5 pour HLA B51, de 3,84 pour HLA B45, et de 2,14 pour HLA B49 (BAHRIZ *et al.*, 2010).

De plus, il a été noté un certain nombre d'anomalies chromosomiques récurrentes en rapport avec le développement du NPC telle de la délétion du chromosome 9p21-22, la délétion homozygote du locus p16, les mutations du gène p53 et le polymorphisme génétique du gène CYP2E1 (LO *et al.*, 1995).

En outre, la perte d'hétérozygotie touchant le chromosome 3, très fréquente au niveau de l'épithélium normal du nasopharynx (74%) et des lésions dysplasiques (75%) pourrait constituer une étape précoce de la tumorigenèse des NPC (CHAN *et al.*, 2004).

I.1.6.3- Facteurs diététiques et environnementaux.

L'intervention de ces facteurs a été suspectée devant la répartition géographique particulière du NPC et ses variations au sein même des différentes zones à risque.

Parmi les facteurs suspectés :

- ❖ Les nitrosamines, forment un large groupe de carcinogènes chimiques gènotoxiques pouvant affecter les cellules épithéliales de la zone du nasopharynx. Ils se trouvent dans l'alimentation humaine et dans d'autres milieux environnementaux (TRICKER *et al.*, 1997).
- ❖ Le smen provenant de la fermentation butyrique du beurre contient de l'acide butyrique ; cet élément est connu pour être un puissant réactivateur *in vitro* de l'EBV (ZENG *et al.*, 1984).
- ❖ Le piquant en général, contient aussi des amines tel que la pipéridine et la pyrrolidine qui peuvent réagir avec le nitrite de sodium, issu d'additifs alimentaires, pour former des nitrosamines (CAUSERET, 2000, SEN *et al.*, 1993).
- ❖ Les esters de phorbols contenus dans certaines préparations pharmaceutiques traditionnelles chinoise ou maghrébine sont de puissants agents promoteurs de la carcinogènèse (BOURAS *et al.*, 2006).
- ❖ La cigarette et le tabac à priser, sont significativement associés au NPC différencié, mais pas au NPC indifférencié (UCNT) en Afrique du Nord mais la consommation de cannabis est fortement associé à l'UCNT ainsi que l'alcool qui semble également être impliqué dans le genèse du cancer du cavum (AMMOR *et al.*, 2003, FENG *et al.*, 2007).

Le facteur viral (déclenchant une réaction inflammatoire et faisant intervenir les cellules du système immunitaire) ainsi que les facteurs environnementaux pourraient favoriser l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme et engendrer par conséquent une situation de stress oxydant.

I.2- Le stress oxydant.

I.2.1- Définition.

Le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, se définit comme étant un **déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants** en faveur des oxydants (ATAMER *et al.*, 2008) . Il se développe lorsque les radicaux libres, des molécules oxydantes, sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme.

Un **radical libre** est une molécule très réactive contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans ses orbitales. Il retrouvera sa stabilité en participant à des réactions chimiques dont la conséquence est :

- Oxydation des lipides membranaires,
- Oxydation des acides aminés composant les protéines
- Oxydation des glucides composant les acides nucléiques (TREMELLEN, 2008).

De façon générale, les radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne (ZOU *et al.*, 2008).

Les radicaux libres impliquant un ou des atomes d'oxygène se nomment espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est la forme primaire des ERO et est formée par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). L'anion superoxyde peut ensuite être converti en ERO secondaires telles que le radical hydroxyle (OH), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier n'étant toutefois pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non paires.

Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote, le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'azote (ONOO) étant deux espèces bien connues (TREMELLEN, 2008).

Alors que les espèces réactives de l'oxygène induisent un stress oxydatif, les espèces réactives de l'azote induisent pour leur part un stress azoté.

I.2.2- Source.

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en facteurs endogènes et exogènes.

I.2.2.1- Source endogène.

- La mitochondrie : organite utilisant de l'oxygène pour produire de l'ATP.

Au cours de la respiration cellulaire, 95 à 99% de l'oxygène consommé est réduit en eau. Toutefois, 1 à 5% de l'oxygène est transformé en anion superoxyde (O_2^{--}) dans les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons (FINAUD *et al.*, 2006). Ainsi, la production de radicaux libres est proportionnelle à la consommation d'oxygène.

- les peroxysomes, les microsomes ainsi que les leucocytes tels les granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) et les macrophages sont d'importantes sources de production de radicaux libres (ZOU *et al.*, 2008) (VALKO *et al.*, 2006).

Les granulocytes et les macrophages, grandement impliqués dans le système immunitaire de par leur rôle à éliminer certains antigènes, sont munis d'un système NADPH-oxydase capable de produire des anions superoxyde (O_2^{--}) (FINAUD *et al.*, 2006) .

- Stress psychologique, l' inflammation (infection, maladies chroniques), le cancer, l'ischémie-reperfusion et la mort cellulaire (MOLLER *et al.*, 1996).

I.2.2.2- Source exogène.

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres sont également très variés. Parmi ces facteurs, on retrouve:

- L'alimentation (antibiotiques, alcool, café, aliments riches en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique élevé, faible consommation d'antioxydants) (HU *et al.*, 2006, MOLLER *et al.*, 1996).
- Le CO₂ atmosphérique (BENTES *et al.*, 2004).
- Les polluants et les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfhydryles (-SH), ils inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre (HOUSTON, 2007).
- Les médicaments et les radiations (MOLLER *et al.*, 1996).

I.2.3- Les antioxydants.

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques (BABA *et al.*, 2008). On divise les antioxydants en deux grandes classes.

- **Les antioxydants endogènes** qui se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme.

On en compte trois principales: la superoxyde dismutase(SOD), la catalase et la peroxydase (*figure 5*), toutes trois présentes dans le cytoplasme, le milieu extracellulaire et la mitochondrie (FORSTERMANN, 2005).

- **les antioxydants exogènes** qui sont fournis par l'alimentation (vitamine E, C, ou les caroténoïdes) et agissent en piégeant les radicaux libres et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (GUEYE P *et al.*, 2006).

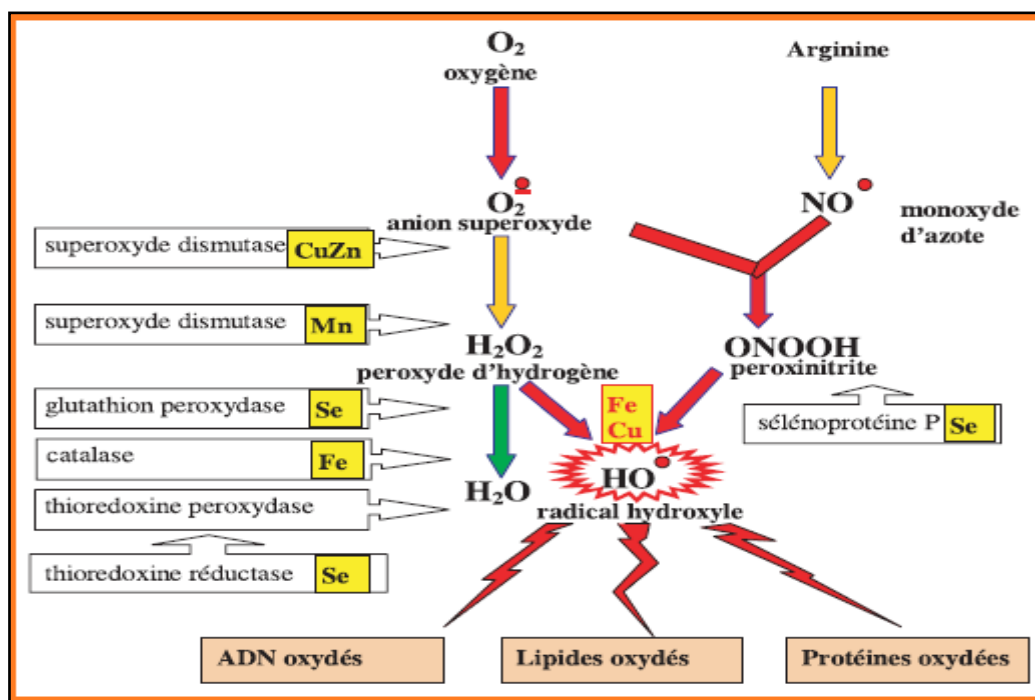


Figure 5 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (FAVIER, 2003).

I.3- Stress oxydant, inflammation et cancer.

L'inflammation chronique induite par des facteurs biologiques, chimiques, et physiques a été trouvé associé avec le risque accru de développer le cancer dans divers organes (COUSSENS *et al.*, 2002, KAWANISHI *et al.*, 2006). L'inflammation induit l'activation de cellules inflammatoires, qui déclenchent des enzymes oxydantes telles que l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), la NADPH oxydase et la myéloperoxydase pour produire des concentrations élevées de radicaux libres (*figure 6*) (COUSSENS et WERB, 2002). La surproduction de radicaux libres peut modifier l'équilibre pro-antioxydant et causer des dommages au niveau de l'ADN, l'ARN, les lipides et les protéines conduisant à l'augmentation de mutations, d'instabilité génomique, de changements épigénétiques et de dysfonctionnement de protéines jouant un rôle dans le processus de cancérogenèse en plusieurs étapes soit l'initiation, la promotion et la progression.

La 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG) est une forme majeure de dommage oxydatif à l'ADN reconnu pour être grandement impliqué dans la carcinogenèse de par sa capacité à induire une mutation, plus précisément une substitution des bases azotées complémentaires G-C (guanine-cytosine) par les bases azotées T-A (thymine-adénine) (NAKASHIMA *et al.*, 2008).

Par ailleurs l'oxyde nitrique (NO), un initiateur principal de RNS, est générée spécifiquement lors de l'inflammation par iNOS dans les cellules inflammatoire et épithéliales (OHSHIMA *et al.*, 2003). La surproduction de NO participe dans la production de peroxynitrite (ONOO), qui peut conduire à la formation de 8-nitroguanine, un indicateur de dommages nitratif de l'ADN (HALLIWELL, 1999).

I.3.1- Dommages d'ADN dans la carcinogénèse lié à l'infection.

(L'EBV dans carcinome du nasopharynx)

Le carcinome du nasopharynx est fortement associé à l'infection par le virus EBV (MCDERMOTT *et al.*, 2001). De nombreux facteurs de transcription sont connus pour participer à l'expression d'iNOS incluant des transducteurs de signal et activateurs de la transcription (STATs) tels que STAT1 α et STAT3 (LO *et al.*, 2005).

Le Récepteur de facteurs de croissance épidermique (EGFR) interagit physiquement avec STAT3 dans le noyau, conduisant à l'activation transcriptionnelle de Inos (LO *et al.*, 2005). STAT3 est activé à plusieurs reprises à travers la phosphorylation par l'intermédiaire de l'expression de la protéine membranaire latente 1 (LMP1) ainsi que EGFR, et l'interleukine-6 (IL-6) est nécessaire pour l'activation de STAT3 médié par LMP1 (CHEN *et al.*, 2003).

L'accumulation nucléaire de l'EGFR et de l'activation de STAT3 par l'IL-6 jouer un rôle clé dans l'expression d'iNOS qui favorise la production de NO et ONOO. Ce dernier conduira à la formation de 8-nitroguanine, un indicateur de dommages nitratif de l'ADN.

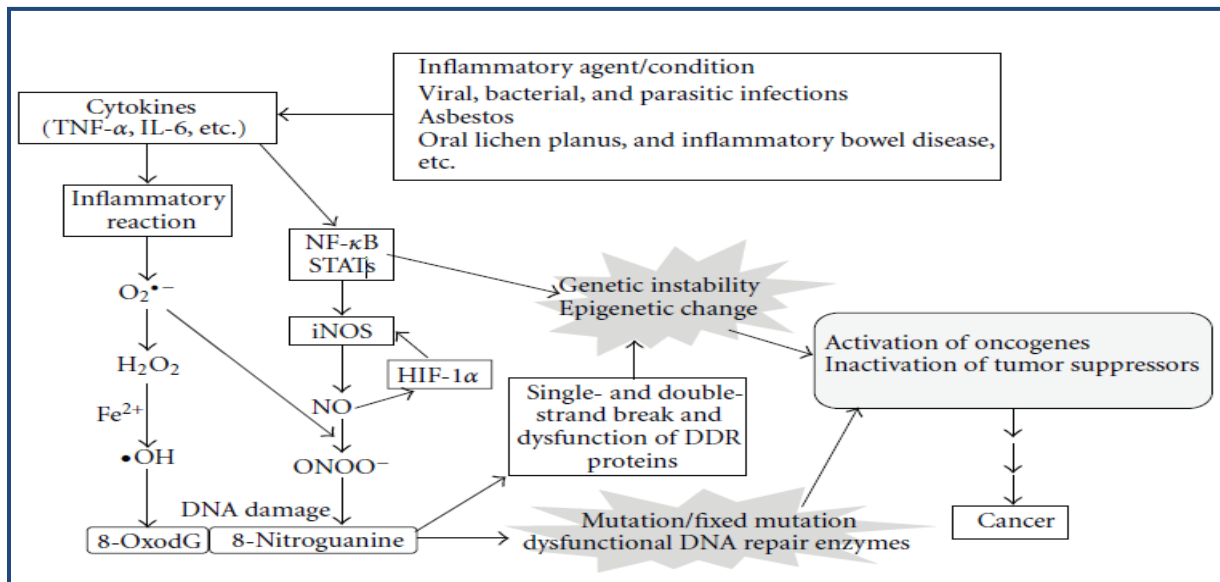


Figure 6 : rôle dommages oxydatifs à l'ADN dans la cancérogénèse lié à une inflammation (MURATA *et al.*, 2012).

I.4- Paramètres de dosage du stress oxydant.

I.4.1- Superoxyde dismutase(SOD).

Les superoxyde dismutases sont des enzymes capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène (DEFRAIGNE *et al.*, 2008).

La structure des superoxydes dismutases présente un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. La nature du métal situé au centre de l'enzyme permet de distinguer :

les superoxyde dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, de celles à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules épithéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD) (ZELKO *et al.*, 2002).

I.4.1.1- Gène de la MnSOD (SOD2).

Le gène MnSOD est situé dans la région chromosomique 6q25.3 (figure 7) et se compose de cinq exons (WAN *et al.*, 1994).

Ce gène est un membre de la famille superoxyde dismutase fer / manganèse. Il code pour une protéine mitochondriale qui forme un homotétramère et se lie à un l'ion de manganèse par sous-unité. Cette protéine se lie à des sous-produits de la phosphorylation oxydative et les convertit en le peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène diatomique.

Des mutations dans ce gène ont été associées à une cardiomyopathie idiopathique (IDC), le vieillissement prématuré, maladie du neurone moteur, et le cancer.

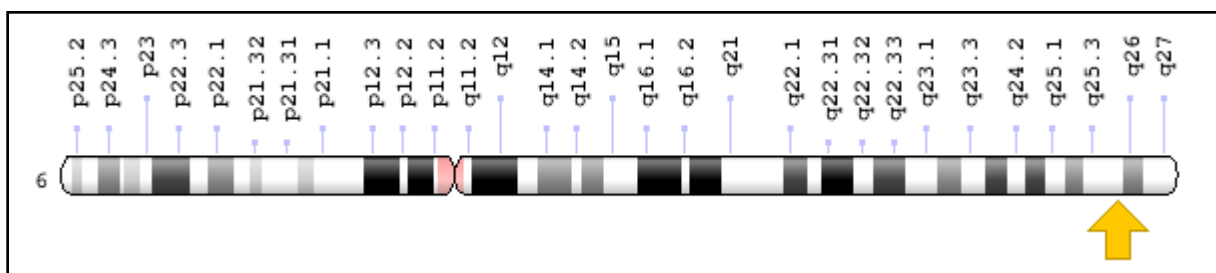


Figure 7 : localisation chromosomique du gène SOD2 (NCBI gene).

I.4.1.2- Polymorphysme Ala-9Val (C47T) du gène MnSOD.

Le polymorphisme nucléotidique de type (SNP) le plus commun de MnSOD est le Ala-9Val (C47T) situé dans le 16^{ème} codon la séquence d'adressage mitochondrial et donc au niveau du 9ème acides aminés en amont du site de clivage. On a constaté que la présence de l'allèle C réduit de 30 - 40%; l'efficacité du transport SOD2 dans les mitochondries, par conséquent, les individus avec le génotype TT ont une activité SOD2 plus élevée par rapport à ceux qui ont le génotype CC ou TC (SUTTON *et al.*, 2003). Les conséquences fonctionnelles de cette altération peuvent être une perturbation dans l'équilibre antioxydant intracellulaire, contribuant ainsi à une susceptibilité au cancer.

I.4.2- La catalase.

La catalase est une enzyme anti oxydante présente dans le peroxysome de presque toutes les cellules aérobies. Le gène de la catalase humaine a été localisé sur chromosome 11 (figure8). Il est de 34 kb de long et est divisé en 13 exons (QUAN *et al.*, 1986).

La catalase est induite par le peroxyde d'hydrogène, qui est produite par MnSOD, elle le transforme en en eau et en oxygène moléculaire, afin de protéger la cellule contre le stress oxydatif.

La catalase est composée de 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec Fe³⁺ lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH,H qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité de la catalase (BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2003).

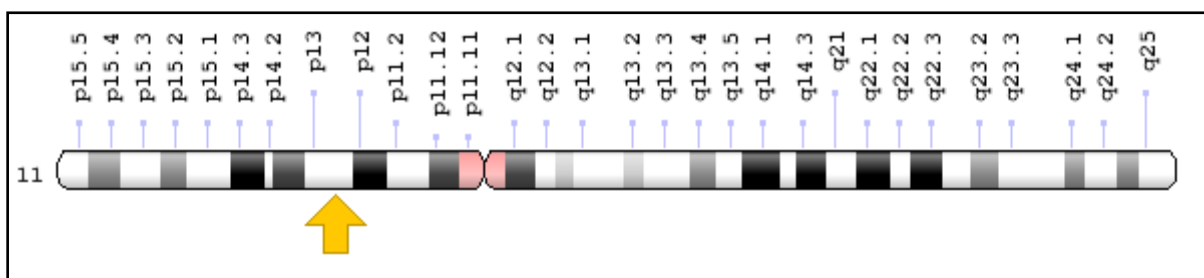


Figure 8 : Localisation chromosomique du gène CAT (NCBI GENE).

I.4.2.1- Polymorphisme C-262 T du gène CAT.

L'activité de la catalase est susceptible d'être affectée. Le SNP fonctionnelle la plus fréquente du gène de la CAT est le -262C> T (rs1001179). ce dernier est situé dans la région promotrice du gène, et, est représenté par une diminution de l'activité enzymatique (KAKKOURA *et al.*, 2015).

La réduction de l'activité de CAT peut jouer un rôle dans la réponse contre stress oxydatif. Plusieurs études sur le polymorphisme CAT C-262 T associé à plusieurs types de maladie multifactoriels, y compris certains types de cancers ont été publiées (SAADAT *et al.*, 2015). En effet, la même variante de l'allèle T a été associée à un risque accru de cancer du sein (AHN *et al.*, 2005).

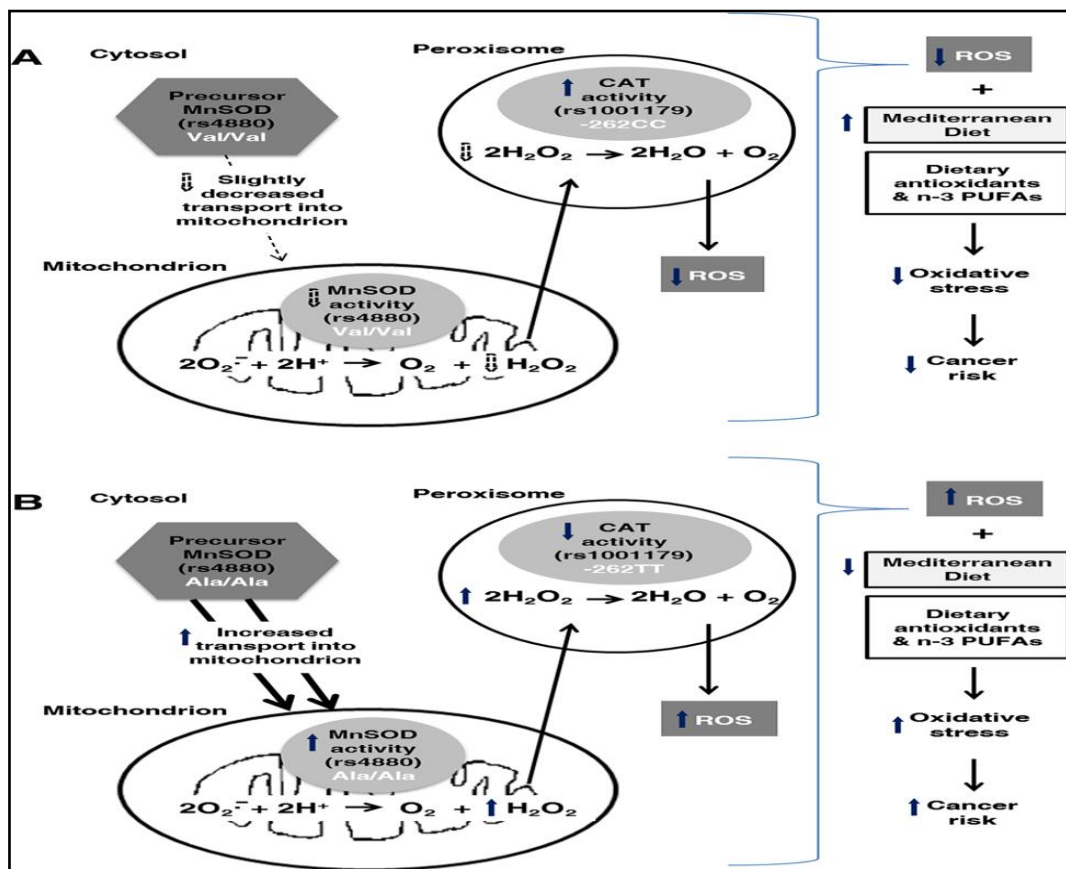


Figure 9: Schéma explicatif des mécanismes cellulaires du stress oxydatif et risque du cancer (KAKKOURA *et al.*, 2015).

A. Le diagramme montre l'effet du génotype de type sauvage de MnSOD Val16Ala (rs4880) et de la CAT -262C> T (rs1001179) sur l'activité antioxydante des enzymes MnSOD et CAT dans la cellule. L'effet des génotypes de type sauvage de ces SNP sur l'élimination de ROS est également montré (légère baisse). B. Le schéma présente l'effet de la variante Ala / Ala de MnSOD et le génotype CAT -262TT sur l'activité des enzymes MnSOD et CAT correspondant donc leur effet sur les niveaux de ROS dans la cellule.

I.4.3- Peroxydation lipidique et malondialdéhyde (MDA).

La peroxydation lipidique est un bon indicateur de la formation de radicaux libres. En effet, les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires sont les cibles principales des radicaux libres.

Ainsi, il se produit généralement une réaction en chaîne dans laquelle un radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$ capte un atome d'hydrogène sur un carbone insaturé générant alors une molécule d'eau. L'acide gras possède alors un électron célibataire capable d'interagir avec le dioxygène, formant ainsi des **peroxydes lipidiques**.

Ces derniers sont instables et se décomposent en une série de sous-produits complexes, notamment des composés carbonylés très réactifs, comme le malondialdéhyde $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ (**MDA**).

Néanmoins, à court terme l'aspect le plus important est que de par son mécanisme même la réaction radicalaire en chaîne conduit à la formation de domaines où les lipides peroxydés ne sont plus capables d'assurer la cohésion membranaire du fait de la polarité des restes peroxydes. Cela conduit à la formation de « trous » dans les membranes conduisant *in fine* à une mort cellulaire.

I.5- Marqueurs de l'inflammation.

I.5.1- Le monoxyde d'azote NO.

Le $\text{NO}\cdot$ est un composé radicalaire. En milieu biologique, son temps de demi-vie est estimé être de l'ordre de quelques secondes, voire quelques dizaines de secondes. C'est une molécule importante de la signalisation cellulaire impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques des mammifères (HOU *et al.*, 1999). Il est synthétisé à partir de la L-arginine grâce à l'enzyme NO-synthase (NOs). En présence de NADPH et d'oxygène, la NOs transforme l'arginine en hydroxyarginine qui, après réduction, est transformée en $\text{NO}\cdot$ et citrulline.

Dès sa synthèse, le $\text{NO}\cdot$ diffuse sous forme gazeuse aussi bien à travers les compartiments polaires aqueux que lipidiques (membranes) et peut donc atteindre tous les compartiments cellulaires et l'environnement extracellulaire. La synthèse et la libération sont simultanées et il n'y a priori pas de stockage de $\text{NO}\cdot$ dans les tissus. Le $\text{NO}\cdot$ exerce un grand rôle dans la vasodilatation (MONCADA *et al.*, 1993) en participant à la régulation de la pression artérielle. Il joue aussi un rôle de messager puisqu'il diffuse à travers les membranes et pénètre dans les cellules voisines

Chapitre II : Matériel et Méthodes.

L'étude que nous avons entreprise est de type cas témoins ; elle a été réalisée au niveau du laboratoire d'immunogénétique et de transplantation du département d'Immunologie de l'Institut Pasteur d'Algérie, pendant une période de 6 mois et cela à partir du 15 Février jusqu'au 10 Aout de la même année.

Elle a été réalisée sur deux types de populations : Une population malade de 56 patients atteints du NPC et une population témoin de 100 sujets sains.

Elle a été faite dans le but de :

- Rechercher une éventuelle prédisposition génétique au cancer du nasopharynx, dans une population Algérienne ayant un carcinome du nasopharynx confirmé histologiquement, à travers l'analyse du polymorphisme génétique de deux enzymes impliqués dans la réponse au stress oxydatif à savoir SOD2 et CAT et de comparer les résultats trouvés à ceux d'une population de sujets sains.
- Etablir une évaluation des paramètres et métabolites issus du stress oxydant (catalase, NO, MDA) présents chez les deux groupes malades et témoins et faire la comparaison entre les deux.

II.1- Matériel.

II.1.1- Matériel biologique.

II.1.1.1 - Prélèvements et échantillonnages.

Les prélèvements de sang sont effectués par ponction veineuse du pli du coude chez tous les sujets. 15ml de sang est recueilli dans un tube de 50ml contenant de l'EDTA étiqueté sur lequel l'identifiant du patient et la date du prélèvement ont été mentionnés. Les dossiers des malades et le questionnaire rempli le jour du prélèvement ont constitué la source d'information.

Les tubes ont été acheminés immédiatement au laboratoire :

- 5ml de sang total est centrifugé à froid afin de récupérer le plasma qui servira pour le dosage des différents paramètres du stress oxydatif.
- Les 10ml de sang restant serviront à l'étude génétique.

Les échantillons (sang et plasma) ont été ensuite congelés à -20°C jusqu'à analyse.

II.1.1.2 -Populations d'étude.

Notre étude a inclus 56 patients ayant un carcinome du nasopharynx confirmé histologiquement, recrutés au service d'oncologie médicale du professeur *K.Bouzid* du *Centre Pierre et Marie Curie* d'Alger dans une période de 3 mois. Ces sujets se répartissaient en 41 hommes et 15 femmes.

Ce groupe de patients a été comparé à une population de témoins sains (donneurs de greffe rénale), non apparentées aux malades, composée de 100 sujets dont 48 hommes, et 52 femmes, avec une moyenne d'âge de 40ans \pm 17.

II.1.2 -Matériel non biologique.

Une liste du matériel et appareillage utilisés afin de réaliser ce travail est donnée en annexe N°1

II.2- Méthodes.

II.2.1 -Extraction d'ADN par salting out

Dans notre étude, l'ADN est extrait des leucocytes par la méthode saline (précipitation des protéines en présence de forte concentration en sel) à partir de 10 ml de sang total prélevé sur EDTA.

II.2.1.1- Principe.

Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN ; pour pouvoir isoler ces leucocytes, le sang doit être initialement mélangé à une solution hypotonique pour permettre la lyse des globules rouges.

Après récupération des leucocytes, ces derniers vont être traités par un mélange représenté par une solution de lyse des GB (SLB), un détergeant (SDS) et la protéinase K et ce, dans le but de dégrader tout ce qui est protéine.

Le mélange agit sur les membranes des leucocytes et sépare les protéines qui sont associées aux acides nucléiques. Une précipitation au NaCl va éliminer les résidus protéiques. Le surnageant ainsi récupéré est traité par l'éthanol dans lequel une méduse d'ADN se forme par précipitation. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse.

II.2.1.2 -Mode opératoire.

II.2.1.2.1-Préliminaires.

Cette étape consiste à préparer nos échantillons de sang (10ml de sang prélevé sur un tube EDTA de 50ml), la reconstitution de PK à 20mg/ml qui est commercialisée sous forme lyophilisée et à la préparation des tampons: SLR, SLB, SDS, NaCl 6M (annexes N°2).

II.2.1.2.2- Lyse des globules rouges

10ml de sang total contenu dans un tube EDTA de 50ml est suspendu dans un volume de solution hypotonique (Tris 10 mM, EDTA 10 mM), incubé 20 minutes dans la glace ; et centrifugé à 2500tr/min pendant 10min à TA. Le surnageant est éliminé, et sur le culot la même opération est effectuée une deuxième fois voire une troisième fois. Au delà de cette dernière le culot doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine.

II.2.1.2.3- Lyse des globules blancs.

Le culot de globules blancs est resuspendu dans 3 ml de SLB (Tris 10 mM, EDTA 5mM) et 300µl du détergent SDS 10% (100g SDS + 1000ml eau distillée). Après l'addition de 25µl de protéinase K (10mg/ml), les cellules sont incubées une nuit entière à 37°C. A ce stade le tube contiendra ADN et lysat cellulaire dont les résidus protéiques.

II.2.1.2.4- Purification.

Les résidus protéiques vont précipiter au fond du tube suite à l'ajout d'une solution hautement saturée de NaCl 6M (35g NaCl + 100ml Eau distillé) et une centrifugation à 3500tr/mn pendant 25 min à température ambiante. L'ADN présent dans la phase aqueuse, transféré dans un nouveau tube, est précipité par l'ajout de 6ml d'éthanol absolu glacial (-20°C).

Après une légère agitation ; une méduse d'ADN apprêtera. Cette dernière est récupérée par enroulement autour d'une pipette pasteur scellée, puis dissoute dans 1ml d'éthanol 70%. Une dernière centrifugation permettra de laver la méduse de toutes les impuretés. L'ADN est ensuite séché avant être re-suspendu dans 200µl d'eau ultra pure, puis conservé à + 4 C°.

II.2.1.3-Détermination de la concentration et de la pureté d'ADN.

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN. Pour pouvoir effectuer l'étude génétique par PCR en temps réel la concentration d'ADN doit être ajusté entre 30 et 50 ng/ml.

Les protéines absorbent aussi bien à 260nm qu'à 280nm. La mesure de la densité optique de chaque échantillon à 260nm et 280nm est établie. La pureté de l'ADN est déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN. On considère que :

- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport $R = DO_{260}/DO_{280}$ est compris entre 1.8 et 2 ($1.8 < R \leq 2$).
- L'ADN est contaminé par les protéines si : $DO_{260}/DO_{280} < 1.8$.
- L'ADN est contaminé par les ARN si : $DO_{260}/DO_{280} > 2$.

II.2.2 - Etudes des polymorphismes nucléotidiques.

Dans notre étude, l'analyse des polymorphismes nucléotidique (SNP) des gènes SOD2 et CAT est réalisée par une technique de PCR en temps réel: technologie Taqman.

II.2.2.1- Principe.

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale. La technologie *Taqman* est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation /extension de la PCR (Elyse et Alain, 2002).

Les sondes utilisées sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter), par exemple, le FAM (6-Carboxyfluorocein), et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non, par exemple ; le NFQ (non fluorescent Quencher), qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. En effet le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (Elyse et Alain, 2002).

Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase grâce son activité 5'exonucléasique. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurables au moment de l'élongation (Elyse et Alain, 2002).

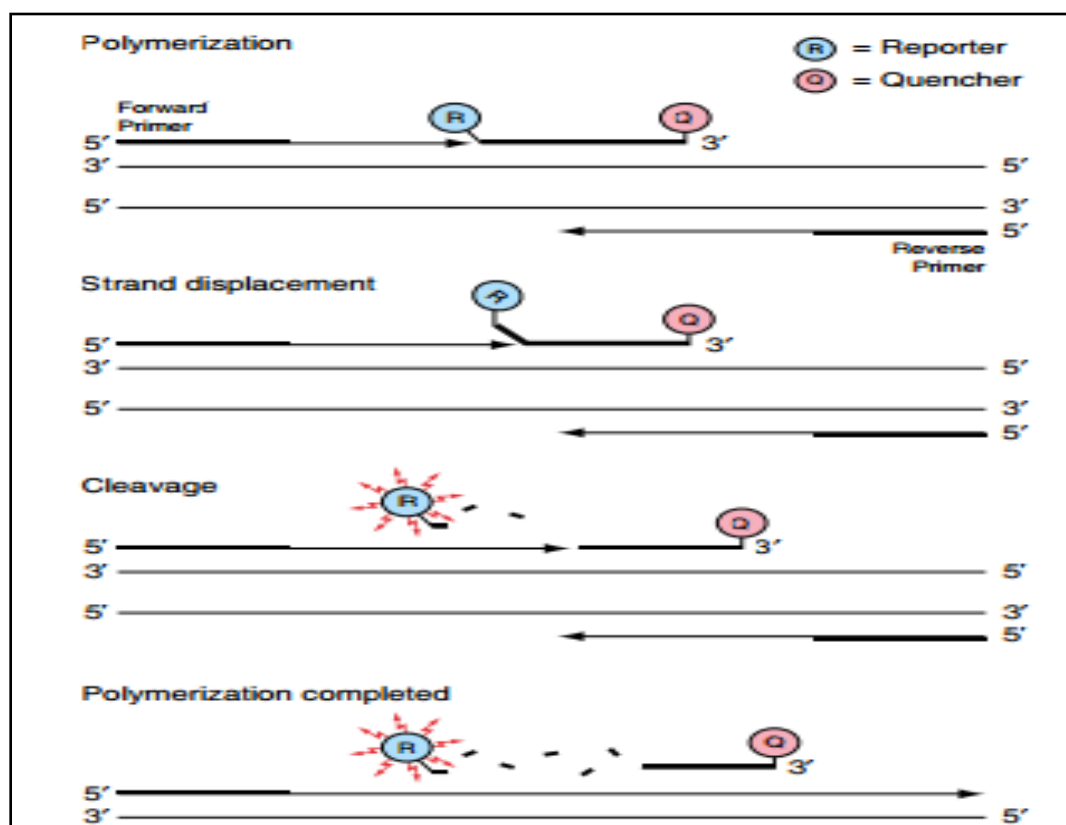


Figure 10 : Schéma représentatif du principe TaqMan.

Les sondes spécifiques d'allèles, marquée avec un fluorochrome rapporteur en 5' et par un fluorochrome suppresseur en 3', s'hybrident à des séquences complémentaires. La proximité des deux fluorochromes permet le fluorochrome suppresseur d'absorber l'émission du rapporteur. Pendant la polymérisation, la Taq polymérase se déplace et hydrolyse la sonde hybridée, le reporter émet de la fluorescence. Plus on a de sondes hydrolysées, et donc de cibles, plus on a de la fluorescence.

II.2.2.2- Caractéristiques des sondes Taqman

Les sondes *Taqman* sont dessinées de manière à s'hybrider spécifiquement à leur cible, en tenant compte de certains critères :

- Taille comprise entre 20-40 nucléotides.
- Composition en CG qui varie de 40- 60%.
- T_m de 6-10°C plus élevé que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrident avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation. En effet la majorité des sondes ont une température de dissociation (T_m) autour de 70°C ou de 5 à 10 °C plus élevée que les amorces. Par conséquent, une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C assure l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité de polymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température sub optimale.
- Absence de séquences répétées.
- Absence de séquences chevauchantes avec les amorces
- Absence d'une base G à l'extrémité 5' car la présence de dernier supprime la
- Fluorescence de l'émetteur même après clivage.

La discrimination allélique a été réalisée en ayant recours à deux sondes fluorescentes TaqMan MGB (Minor Groove Binder) bi-marquées :

- L'extrémité 5' des sondes est marquée par un fluorochrome qui peut être FAM pour l'allèle muté et VIC pour l'allèle normal.
- L'extrémité 3' des sondes est marquée par un Quencher non fluorescent (NFQ) sur lequel une molécule marquée MGB est accrochée. Cette dernière a une structure moléculaire lui permettant de s'insérer dans les petits sillons de la double hélice formée par la sonde et sa séquence cible complémentaire ce qui a pour avantage d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la technique.

Caractéristiques des polymorphismes nucléotidiques étudiés.

Tableau I : Caractéristiques des polymorphismes nucléotidiques étudiés.

Gène	SOD2	CAT
SNP ID	rs4880	rs1001179
Localisation	chr6: 160113872	chr11: 34460231
Polymorphisme	C 47 T	C-262T
Type SNP	faux-sens	Substitution
Acide aminé changé	V16A	
Référence	C__8709053_10	C__11468118_10
Composition de la sonde.[VIC/FAM]	CTGCCTGGAGCCCAGATACCCCAA [A/G]CCGGAGCCAGCTGCCTGCTGGTGCT	GGAGCCCCGCCCTGGGTTTCGGCTAT [C/T]CCGGGCACCCCGGGCCGGCGGGGCG

II.2.2.3 - Mode opératoire.

II.2.2.3.1- Etape de pré-PCR.

L'AD-Mix contenant amorces et sondes ainsi que le master-Mix, contenant tampon, dNTP et taq polymerase, doivent être équilibrés avec la température du laboratoire. Suite à cela une préparation d'un mélange réactionnel (mix) est effectuée dans un eppendorf puis vortexée. Ce dernier contiendra pour 100 échantillons : 425µl d'eau distillée, 500 µl de Master-Mix et 25 µl d'AD-Mix. 9.5 µl du Mix est ensuite déposé dans chacun des 96 puits de la plaque à PCR.

L'ADN des patients et témoins sont ensuite vortexés et 1 µl d'ADN est déposé dans chaque puits correspondants. Sachant que les deux derniers puits sont réservés aux contrôles négatifs; 1µl d'eau distillé y est déposée à la place de l'ADN.

La plaque est ensuite scellée à l'aide d'un papier adhésif, soumise à une légère centrifugation afin de s'assurer l'absence de bulles d'air et enfin introduite dans l'appareil de la PCR en temps réel (7500 Real-Time PCR System) programmé selon le protocole suivant :

- 1 cycle : 95°C 10 mn } Dénaturation totale
- 40 cycles :
 - 95°C 15 sec } Dénaturation
 - 60°C 60 sec } Hybridation et Elongation

II.2.2.3.2- Lecture des résultats.

L'analyse et la lecture de la fluorescence se fait en point final avec le logiciel 7500 software v2.01 de l'appareil ABI 7500 (Applied Biosystems) en considérant qu'une augmentation du signal :

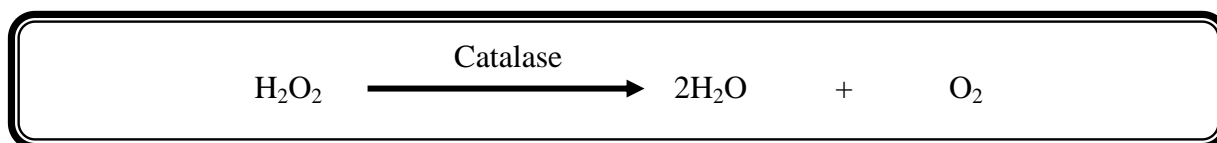
- En VIC uniquement indique une homozygotie pour l'allèle 1.
- En FAM uniquement indique une homozygotie pour l'allèle 2.
- En VIC et en FAM une hétérozygotie.

II.2.3 - Dosage des paramètres du stress oxydatif.

II.2.3.1- Dosage de la catalase.

II.2.3.1.1- Principe.

Le dosage de la catalase sérique se fait par la méthode AEBI, 1984 et CLAIBORNE, 1986. La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et dioxygène suivant la réaction ci-dessous. Ainsi, la disparition du peroxyde d'hydrogène peut être mesurée en spectrophotométrie à 240nm.



50 μ l d'échantillon (sérum) sont ajoutés à 950 μ l de tampon phosphate (50mM, pH=7,4). La réaction est déclenchée avec 500 μ l de H_2O_2 (30mM=0,3%). La lecture de la densité optique du milieu réactionnel se fait par spectrophotométrie à 240nm à l'obscurité chaque 30''.

L'activité de la catalase est calculée par la formule suivante :

$$\text{Catalase activity (U mg proteins)} = \frac{\Delta OD / \text{min}}{0,040 \times \text{mg/ml proteines}}$$

II.2.3.2- Dosage du malondialdéhyde (MDA).

La quantité des TBARS est exprimée en termes d'un équivalent biochimique qui est le Malonyl di aldéhyde « MDA », un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditée par les radicaux libres. La mesure du MDA à l'aide du TBA selon la méthode de Okhawa *et al.*, 1979 permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

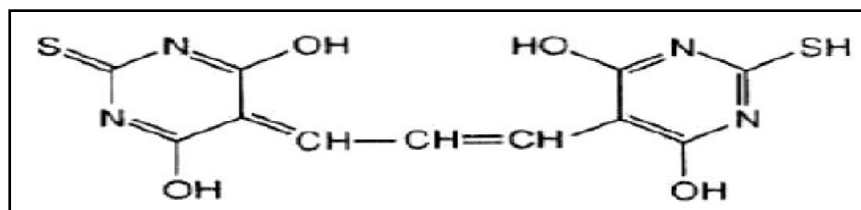


Figure 11: Formation d'adduit-TBA.

II.2.3.2.1- Principe.

Le dosage du MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C) entre une molécule du MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment coloré « rose » absorbant à 532 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

II.2.3.2.2- Mode opératoire.

100µl de plasma sont mélangé à une solution constituée de 200 µl acide thiobarbiturique à 20% et 600 µl acide-ortho-phosphorique à 1%. Le mélange est incubé pendant 1h dans un bain marie à 95°C suivit d'un refroidissement dans de la glace pour arrêter la réaction. Ensuite 900 µl de butanol sont ajoutés pour l'extraction du complexe MDA-TBA. L'ensemble est centrifugé à 5000xg pendant 10min. L'absorbance est déterminé sur le surnageant à 532nm. La concentration de TBARS est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire (1,56 x 10⁵ M⁻¹cm⁻¹). Elle est exprimée en µmol/l.

II.2.3.3 - Dosage du monoxyde d'azote (NO).

II.2.3.3.1- Principe.

La mesure du monoxyde d'azote se fait par la réaction de Griess (Green et al. 1982). Cette dernière, permet uniquement la mesure des nitrites (métabolite stable). Les nitrates devront donc être préalablement réduits en nitrites(NO₂) pour être quantifiés. La concentration ainsi mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates.

Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes: les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) (NED) pour donner un composé diazo de couleur rose vif dont l'absorbance est mesurée à 543 nm.

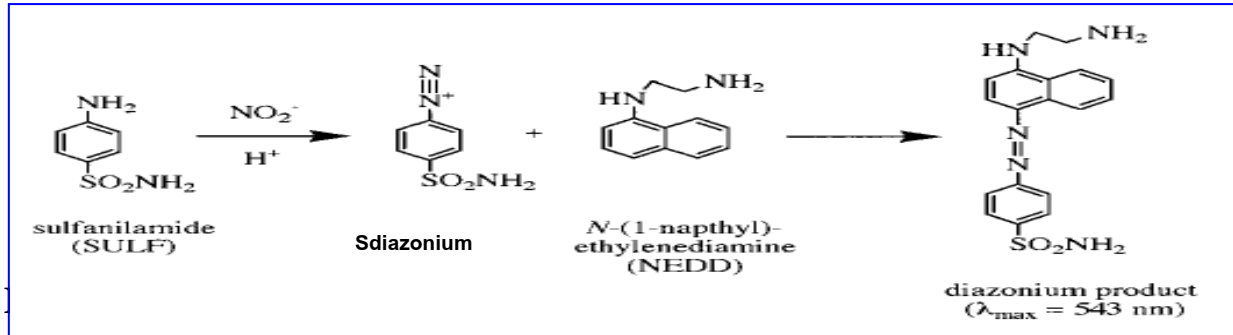


Figure 12: Formation du diazonium.

100µl de plasma sont mélangés à une solution contenant 50 µl de Griess B ,50 µl de Griess A et 800 µl PBS pH 7,4. Le mélange est centrifugé à 2000 tour par minute puis incubé à température ambiante et à obscurité pendant 15 à 20 min. La lecture de la concentration du NO se fait par spectrophotométrie à 543nm. Les concentrations du NO dans les échantillons sont ensuite déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage

II.3 - Analyse statistique.

La comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre les patients et les témoins a été effectuée avec le logiciel Compare 2. Si les valeurs « p » calculées avec le test khi-deux de Pearson sont inférieures à 0,05 (<0,05), on considère le résultat est statistiquement significative. Devant une différence statistiquement significative, on calcule l'Odds ratio (OR) et son intervalle de confiance (IC) à 95 % ; l'OR permet d'apprécier le degré de causalité de l'allèle en question avec la maladie. Quand le OR et son IC sont supérieurs à 1 (>1) on parle de prédisposition de l'allèle X, et quand l'OR et son IC sont inférieurs à 1 (<1) ou parle d'effet protecteur de l'allèle X.

Les résultats des dosages des paramètres du stress oxydatif ont été regroupés sur une base de données Excel puis traités par le logiciel *STATISTICA version 8.0*. L'analyse statistique des moyennes des différents groupes pour tous les paramètres ont été comparés aux témoins en utilisant le test « t » apparié de Student. Nos résultats sont exprimés par la moyenne X, affectée de l'erreur standard à la moyenne (SEM), dont les formules sont les suivantes :

La moyenne arithmétique (\bar{X}) des valeurs individuelles :

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$\left\{ \begin{array}{l} X_i = \text{somme des valeurs individuelles} \\ N = \text{nombre de valeurs} \end{array} \right.$

Erreur standard de la moyenne (ESM) :

$$ESM = \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

$$\delta(\text{écart type}) = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Le degré de signification

« p » lu sur la

table de Student permet de fixer le degré de signification.

La différence entre deux moyennes \bar{X}_a et \bar{X}_b est significative si :

0,01 < P < 0,001 *** hautement significatif

0,05 < P < 0,01 ** très significatif

P < 0,05 * significatif

P > 0,05 non significatif

Chapitre III : Résultats.

III.1- Caractéristiques démographiques de la population étudiée.

III.1.1- Répartition selon le sexe.

Une prédominance masculine a été notée sur la population malade, avec 73% d’hommes pour 27% de femmes et un sex-ratio de 2,73.

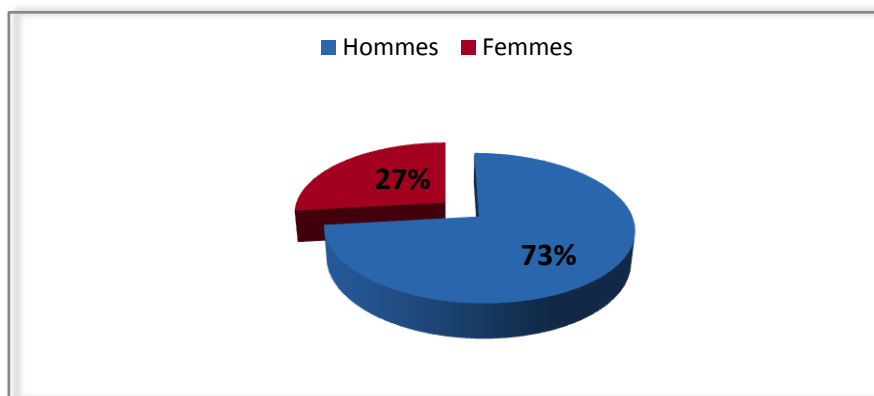


Figure 13: Répartition des patients NPC selon le sexe.

III.1.2- Répartition des patients selon l’âge et le sexe.

Le carcinome du nasopharynx se voit à tous les âges et notre analyse chez l’adulte retrouve des extrêmes allant de 15 à 66 ans avec une moyenne d’âge de 43±14.

La répartition de l’ensemble des patients selon des classes d’âge de 10 ans montre que 7 % des malades avaient un âge de moins de 20 ans et que la classe d’âge la plus touchée par cette pathologie est la classe des 40–50 ans avec un taux de 29 %.

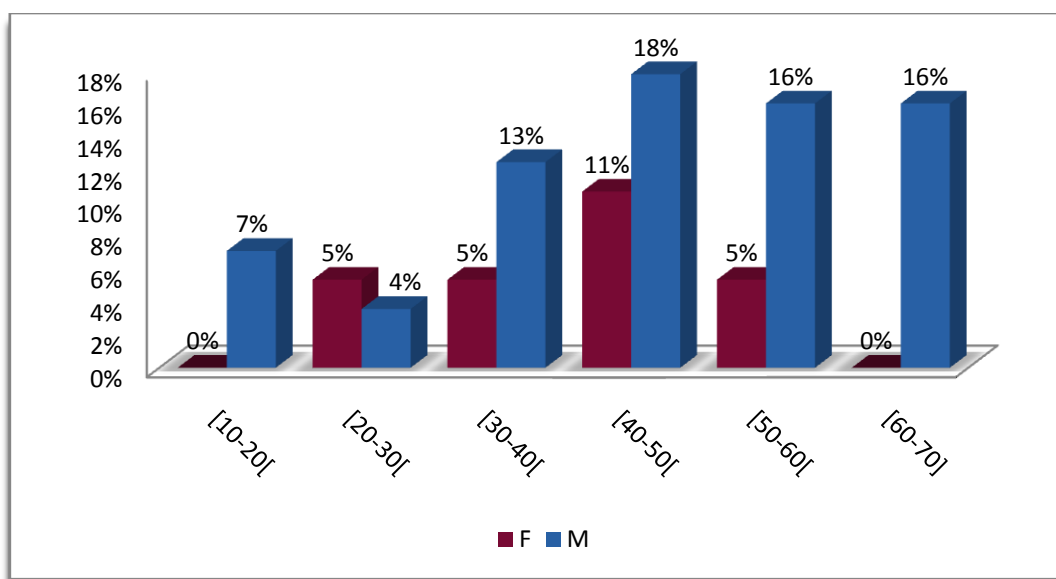


Figure 14: répartition des malades selon l’âge et le sexe.

III.2- Facteurs environnementaux et risque du NPC.

La répartition des patients selon leur mode de vie, antécédents toxiques (consommation de tabac et alcool) et habitudes alimentaires révèlent que 63% de nos patients ont une alimentation épicée ou contenant de la Harissa, 45% de cette population consomme des aliments gras dont le Smen fait partie et 41% de nos patients étaient fumeurs.

Tableau II: association entre facteurs environnementaux et risque du NPC.

Facteurs de risques	Effectifs(N)	Pourcentage (%)
Agriculture	10	18%
Elevage	8	14%
Tabac	23	41%
Alcool	9	16%
Smen	25	45%
Khlii	18	32%
Harissa	35	63%

III.3- Répartition des patients selon le stade.

La répartition des patients selon le stade de développement de la maladie révèle que le stade III est le stade le plus répondeus dans notre population.

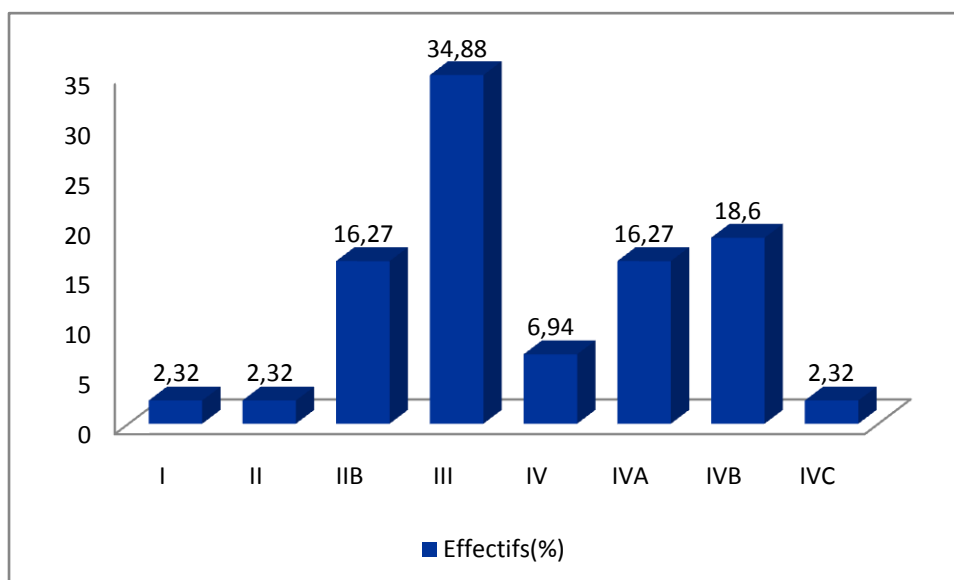


Figure 15: Répartition des patients selon le stade

III.4- Résultats de l'analyse des polymorphismes nucléotidiques.

D'après l'exemple ci-dessous, le résultat s'affiche sous forme de nuages orientés selon deux axes, l'un représentant l'allèle 1, le deuxième l'allèle 2. Ainsi, à partir de cette représentation graphique on peut distinguer trois (03) nuages, représentant 3 populations distinctes, en bleu les individus homozygotes pour l'allèle 1, en rouge les individus homozygotes pour l'allèle 2 et enfin, en vert, les individus hétérozygotes, c'est-à-dire ayant les deux allèles 1 et 2.

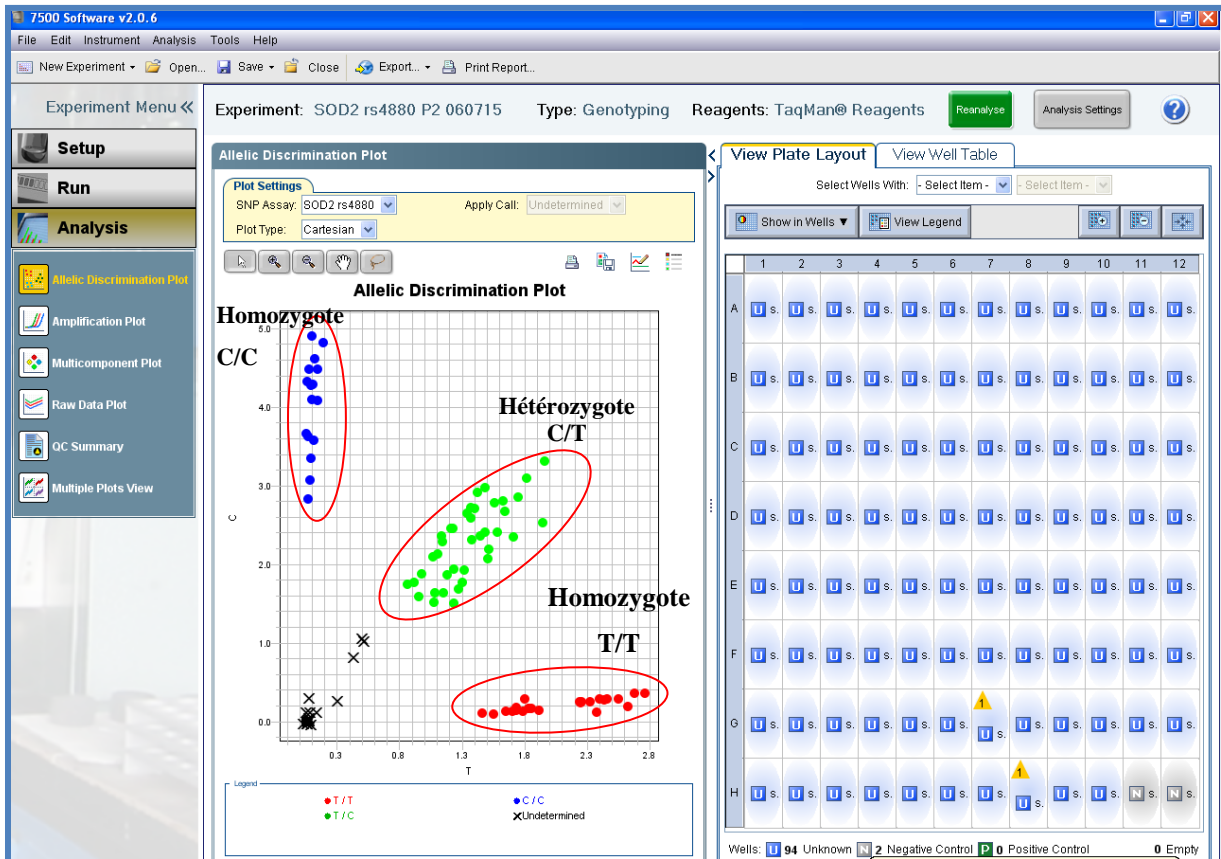


Figure 16: Un exemple de résultat de la discrimination allèlique.

III.4.1- Distribution des fréquences alléliques et génotypiques C 47 T du gène SOD2.

D'après nos résultats représentés au niveau du tableau N°III, la fréquence de l'allèle C du gène SOD2 est de 44,64% chez les patients alors qu'elle est de 45,50% chez les témoins. De plus la fréquence du génotype TT est de 33,93% chez les patients et de 30 % chez les témoins avec un $p=0,612$. La comparaison de ces fréquences alléliques et génotypiques entre patients et témoins est statistiquement non significative.

Tableau III: Distribution des fréquences alléliques et génotypiques C 47 T du gène SOD2.

	Patients : n=56		Témoins : n=100		χ^2	P	OR (IC:95%)
Allèle C	50	(44,64%)	91	(45,50%)	0,021	0,084	0,97 (0.61 à 1.54)
Allèle T	62	(55,36%)	109	(54,50%)	0.021	0.884	1,04 (0.65 à 1.65)
Génotype CC	13	(23,21%)	21	(21,0%)	0.103	0.748	1,14 (0.52 à 2.48)
Génotype CT	24	(43,00%)	49	(49 %)	0.544	0.461	0,78(0.41 à 1.50)
Génotype TT	19	(33,93%)	30	(30 %)	0.257	0,612	1,20 (0.60 à 2.40)

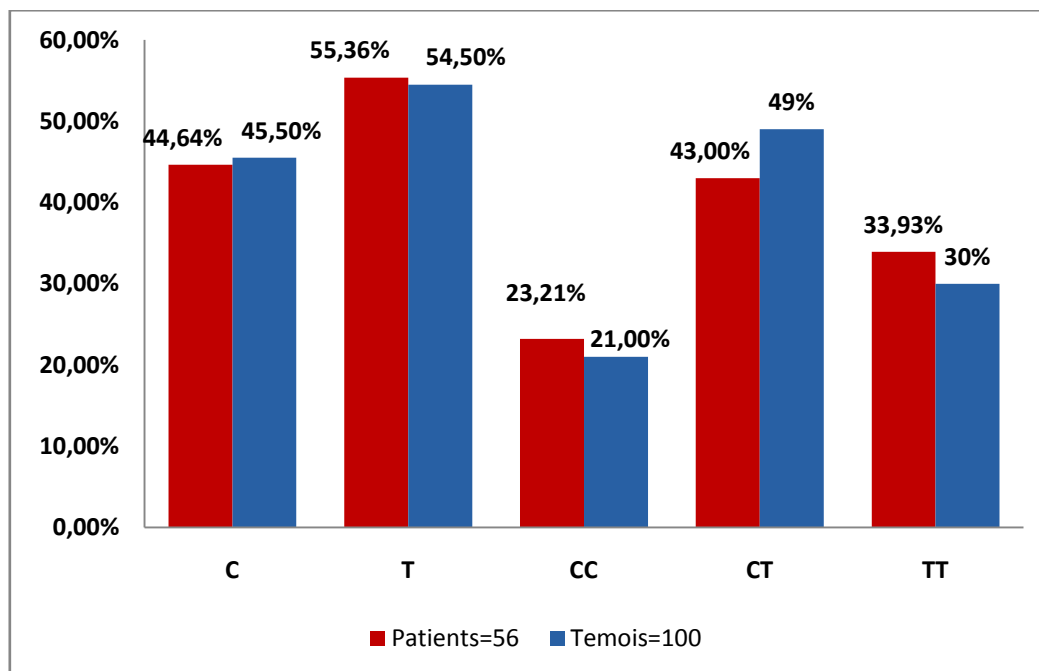


Figure 17: Distribution des fréquences alléliques et génotypiques C 47 T du gène SOD2.

III.4.2- Distribution des fréquences alléliques et génotypique C-262 T du gène CAT.

D'après nos résultats représentés au niveau du tableau N°IV, la comparaison des fréquences alléliques et génotypiques entre patients et témoins est statistiquement non significative pour le polymorphisme C-262 T du gène CAT (fréquences similaire ou proches avec un p relativement élevé).

Tableau IV: Distribution des fréquences alléliques et génotypique C-262 T du gène CAT

	Patients n=56		Témoins n=100		χ^2	P	OR (IC:95%)
Allèle C	97	(86,61%)	166	(83,30%)	0.706	0.401	1,32 (0.69 à 2.55)
Allèle T	15	(13,39%)	34	(17,00%)	0,0706	0,401	1,04 (0,39 à 1,45)
Génotype CC	41	(73,21%)	70	(70,00 %)	0,181	0,671	1,17(0.57 à 2.42)
Génotype CT	15	(26,79%)	26	(26,00 %)	0.011	0,915	0,78(0.41 à 1.50)
Génotype TT	0	(0,00%)	4	(04,00 %)	2,299	0,129	1,20(0,01 à 3,15)

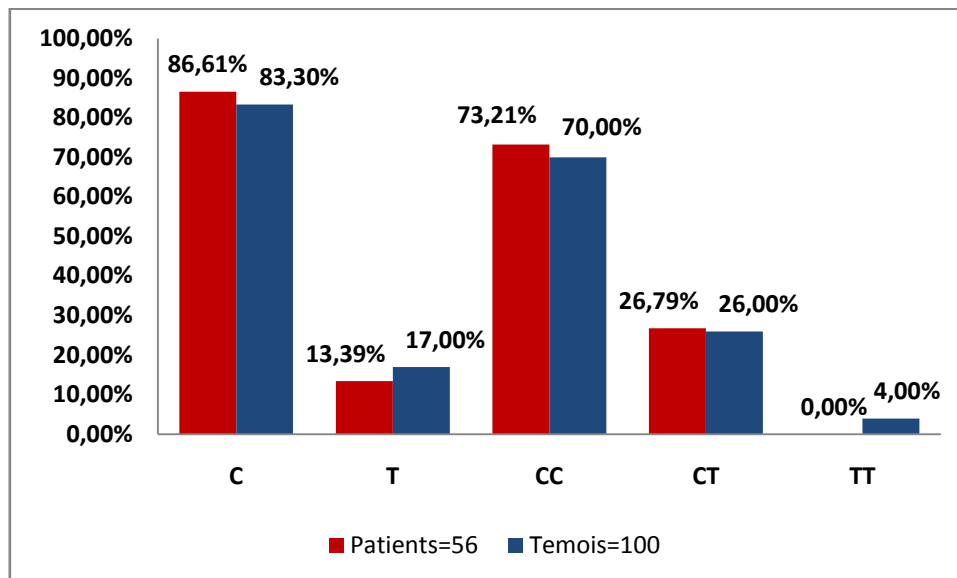


Figure 18: Distribution des fréquences alléliques et génotypique C-262 T du gène CAT.

III.5- Résultats du dosage des paramètres du stress oxydant.

Les taux de l'activité de la catalase, de la peroxydation lipidique et du monoxyde d'azote ont été mesurés dans une population de patients atteints du NPC (n=56) et comparés à une population d'individus sains (n=46).

Les valeurs sont données sous forme de moyenne.

III.5.1- Dosage de la catalase.

Les résultats montrent que le niveau de l'activité enzymatique de la catalase chez les malades est bas par rapport à celui des témoins ($10,46 \pm 8,79$ VS $70,37 \pm 14,79$).

La comparaison entre les taux de catalase entre patients témoins a révélé une valeur significative ($p=0.024$).

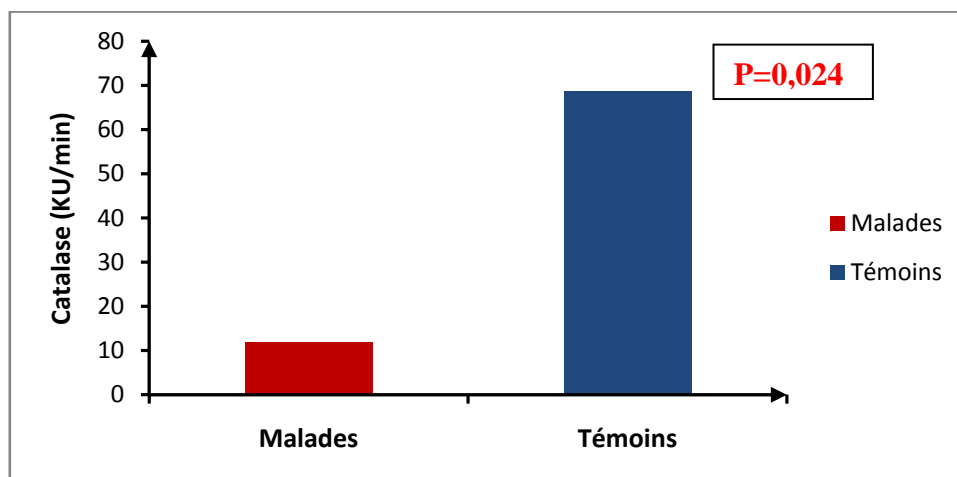


Figure 19: Comparaison des taux de l'activité de la catalase entre malades et témoins.

III.5.2- Dosage du MDA.

Les résultats montrent que le niveau du MDA est élevé chez les patients comparés aux témoins ($2,74 \pm 1,84$ VS $0,63 \pm 0,16$). Ces résultats sont la conséquence d'une peroxydation lipidique importante et la comparaison des taux de catalase entre patients témoins a révélé une valeur hautement significative ($p=0.00001$).

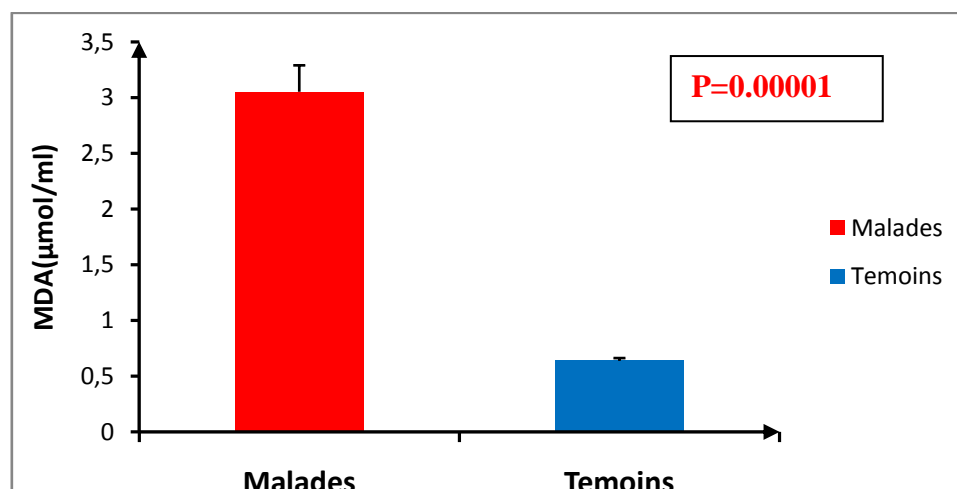


Figure 18: comparaison des taux de MDA entre malades et témoins.

III.5.3- Dosage du NO.

Nos résultats montrent que les valeurs du NO chez les patients NPC sont plus élevés comparé à ceux retrouvé chez les témoins ($0,33 \pm 0,19$ vs $0,21 \pm 0,16$). Nous constatons aussi que la différence entre ces dernières est hautement significatif ($P=0,001$).

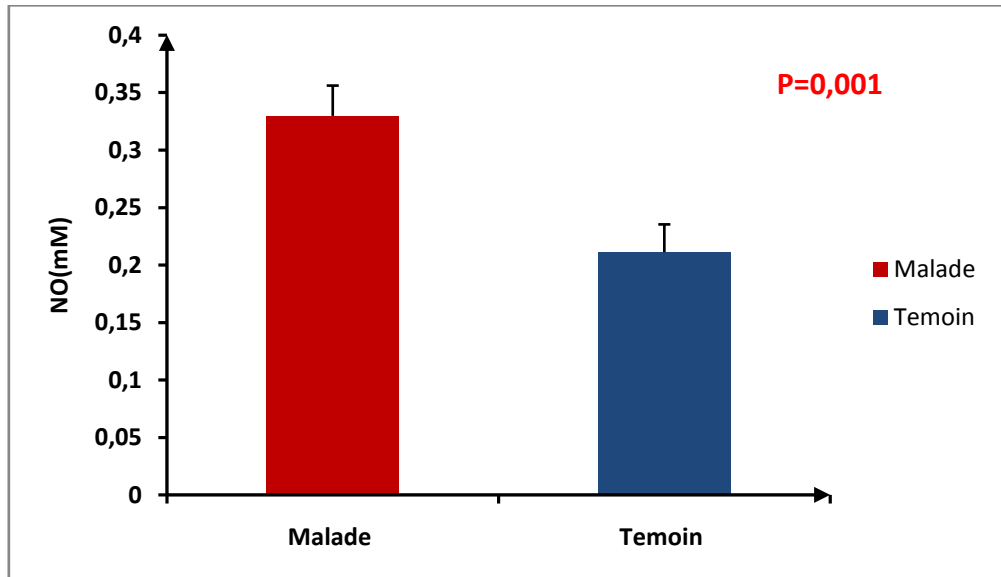


Figure 21: Comparaison des taux du monoxyde d'azote entre patients et témoins.

Chapitre IV : Discussion

Le cancer du nasopharynx représente un des cancers du carrefour aérodigestive les plus répandu dans le monde (GEARA *et al.*, 2005). Il est caractérisé par une répartition géographique particulière avec trois zones d'incidences différentes. L'Algérie, la Tunisie et le Maroc sont inclus dans la zone à moyenne incidence.

En Algérie, son incidence est estimée à 5,5 pour 100.000 habitants et par an pour le genre masculin et à trois pour 100.000 habitants et par an pour le genre féminin (TATAFASA, 2009).

Nos résultats montrent que les hommes sont plus touchés par le cancer du nasopharynx que les femmes. Andriamaholison, Arfaoui et Manantsoa avaient tous remarqué une prédominance masculine du NPC (ANDRIAMAHOLISON, 1979), (ARFAOUI *et al.*, 2007), (MANANTSOA, 1995) (Manantsoa Y., 1995). Iseh, rapportait un *sex-ratio* H/F de 2,8/1 sur une série de 30 cas de NPC (ISEH *et al.*, 2009). Avec un *sex-ratio* H/F de 2.73/1, nos constatations se rapprochent de celles de la littérature.

Par ailleurs, notre étude a montré que ce cancer trouve son maximum de fréquence chez les patients âgés entre 40 et 50 ans, ce qui est aussi en accord avec la littérature, puisque dans les pays du Maghreb, la distribution est bimodale avec un pic d'incidence précoce à 10–20 ans et un second entre 40 et 60 ans (BOUSSEN *et al.*, 2005).

La répartition des patients selon leur mode de vie, antécédents toxiques et habitudes alimentaires révèlent que 63% de nos patients ont une alimentation épicée ou contenant de la Harissa et presque la moitié de cette population (45%) consommait des aliments gras dont fait partie le Smen.

La littérature rapporte l'implication de mets tels que la harissa (TATAFASA, 2009), le «khlii» (viande séchée, salée, épicée, cuite et conservée dans un mélange d'huile et de graisses bovines fondues) et le «smen» (beurre fermenté) (SOUMIA *et al.*, 2003). L'acide butyrique, un activateur potentiel de l'EBV, serait également impliqué dans la genèse du CC, étant contenu dans des graisses de mouton ou du beurre rance (FENG *et al.*, 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), générés au cours des métabolismes cellulaires causent des dommages au niveau des membranes, des mitochondries, et des macromolécules y compris l'ADN, et sont donc des agents candidats dans le développement du cancer (MARGARET *et al.*, 2011)

Notre étude cas témoins a consisté dans un premier temps à rechercher une éventuelle prédisposition génétique au cancer du nasopharynx, à travers l'analyse du SNP **C47T (rs4880) du gène SOD2** et **C-262 T (rs 1001179) du gène CAT**.

MnSOD est une enzyme anti-oxydante importante qui catalyse la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène dans la mitochondrie (SUN *et al.*, 2012).

Un certain nombre d'études ont identifié l'association du polymorphisme génétique de MnSOD (A16V) avec différentes pathologies, y compris le cancer de la prostate, le diabète de type II (ARSOVA SARAFINOVSKA *et al.*, 2008, NAKANISHI *et al.*, 2008) et le cancer gastrique (MORADI *et al.*, 2015), mais notre étude n'a révélé aucune association entre ce polymorphisme et le cancer du nasopharynx.

La catalase est une enzyme importante pour le maintien du statut oxydatif de l'organisme et joue un rôle très important dans la protection des cellules eucaryotes. Elle catalyse la décomposition de du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène.

Le polymorphisme de ce gène a été associé à une diminution de l'activité de la catalase (PITSAVOS *et al.*, 2005).

On a supposé que ce polymorphisme pourrait être impliqué dans la modification du risque de NPC. Cependant, notre analyse n'a pas appuyé cette hypothèse et aucune valeur statistiquement significative n'a été retrouvée.

Il est possible que le lien entre le stress oxydatif mitochondriale et le carcinome du nasopharynx ne sont pas liés par la voie MnSOD et/ou Catalase et que d'autres voie(s) peuvent être impliquées.

Dans un deuxième temps nous avons essayé de doser les paramètres du stress oxydatif à savoir : l'activité enzymatique de la catalase, le niveau de la peroxydation lipidique ainsi que le taux du monoxyde d'azote.

Selon nos résultats le niveau de l'activité enzymatique de la catalase est bas comparé à celui des témoins. Paradoxalement l'étude de Hristozove *et al.* montre des taux élevés de la catalase chez les patients cancéreux comparé aux contrôles, ces résultats indiquent un effet compensatoire de la décomposition de H₂O₂ en fonction de l'augmentation de la catalase ce qui va activer l'augmentation de la production de l'anion peroxyde chez les patients cancéreux. La catalase selon ces auteurs est connue pour ne pas être essentielle pour certaines

cellules dans les conditions normales et qui joue un rôle important dans la réponse oxydative adaptative lors d'un stress.

Selon ces auteurs cette augmentation de l'activité de la catalase semble ne pas être suffisante pour inactiver l'augmentation des ROS.

En revanche l'étude réalisée par (TAKESHI SAITO, 1984) a montré une diminution de l'activité de la catalase dans un autre type de cancer (lymphome malin) ce qui corrèle avec les résultats que nous avons obtenus.

Ces études contradictoires nous pousse à suggérer que l'activité de la catalase dépend de l'état du patient qu'il soit sous ou sans traitement.

Le taux bas de l'activité de la catalase suggère une diminution de la défense oxydative.

Le Malondialdéhyde (MDA) est un produit de la peroxydation lipidique qui est mutagène et tumorigène il pourrait être un marqueur de risque de cancer chez l'homme (Yujing Zhang et al ; 2001). Nos résultats montrent une augmentation du taux du MDA chez les patients atteints du NPC comparé à ceux des témoins sains.

Une diminution du taux de MDA chez les patients atteints de cancer sera suivie d'une diminution de la production des ROS et qui pourrait contribuer à éliminer complètement les tissus cancéreux.

Nos résultats montrent des taux élevés de NO chez les patients atteints du NPC comparés à ceux des témoins. Nos résultats concordent avec ceux de (BOUROUBA *et al.*, 2012).

Le NO est un radical libre qui peut, après oxydation, entraîner des mutations à travers la formation de composés N-nitrosés cancérigènes, les oxydes d'azote sont donc susceptibles de jouer un rôle important dans les processus de cancérogenèse (Calmels Sylvie et al, 1995).

Certaines études ont trouvé une association significative entre des taux élevés de NO et la croissance des tumeurs, en revanche d'autres ont observé une association entre la réduction de la concentration du NO en cas de traitement ou de rémission de patients. Cependant des études récentes ont montré chez les patients atteints de NPC des taux élevés d' IL6, IFN γ et de TNF α (Li et al. 2007), en effet, ces cytokine régulent positivement les NOSi et le NO.

Nous suggérons que ce taux élevé de NO est en faveur d'une situation inflammatoire et donc d'une production accrue de ROS.

CONCLUSIÓN

Il est bien établi que les processus biologiques tels que l'inflammation ou le stress oxydatif ou les deux sont identifiés comme des facteurs de risque pour le NPC.

L'étude préliminaire cas-témoins, que nous avons réalisée sur une population de 56 patients atteints de NPC et de 100 témoins sains nous a permis de conclure que:

- Il existe une prédominance masculine dans le développement du NPC.
- La classe d'âge la plus touchée est celle des 40-50ans.
- Le stade le plus fréquent est le stade III.
- La consommation de harissa et de smen sont impliqués dans la genèse de ce type de cancer.
- L'analyse des polymorphismes nucléotidiques C 47 T du gène *SOD2* et C-262 T du gène *CAT* n'a rapporté aucune association entre ces polymorphismes et le NPC.
- Le taux de l'activité enzymatique de la catalase chez nos malades est bas il semble donc être en faveur d'une diminution de la défense oxydative.
- Le taux du MDA augmente chez les patients atteints du NPC ce qui indique une forte peroxydation lipidique.
- Le taux de NO est élevé chez ces patients, ceci est en faveur d'une situation inflammatoire et donc d'une production accrue de ROS.

Ces dernières constatations s'avèrent significatives et peuvent renforcer l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif est directement impliqué dans l'apparition du cancer.

En perspective nous pouvons proposer que tous nos résultats soient à confirmer sur une autre cohorte plus large et indépendante et il serait intéressant d'approfondir encore plus les investigations, ceci par l'étude d'autres polymorphismes des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif.

Mais aussi d'étudier la cinétique de réponse des marqueurs du stress oxydatif chez les patients atteints du NPC avant et pendant toute la durée du traitement et ceci en incluant d'autres marqueurs de la réponse oxydative. Il serait intéressant aussi d'étudier le fonctionnement des différentes réponses du système immunitaire en situation de stress.

Et enfin, pour quoi ne pas rechercher une voie thérapeutique impliquant les molécules de la défense oxydative directement liée à l'état nutritionnel et environnemental !

Références bibliographiques

AHN, J., GAMMON, M., SANTELLA, R., GAUDET, M., BRITTON, J., TEITELBAUM, S., AMBROSONE, C., 2005-Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *Am J Epidemiol* ,162:943–952.

ATAMER, A., BILICI, A., YENICE, N., SELEK, S., ILHAN, N., et & ATAMER, Y., 2008-The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Int Med Res.*, 36:771-776.

ATIF, F., et BOUZID, K., 2012-Carcinomes Indifférenciés du Nasopharynx localement avancés et méristatiques de l'adulte. *Ben Merabet.*, 34-35.

AMMOR, S., BAALI, A., HUBERT, A. et CHERKAOUI, M. 2003. Approche épidémiologique du cancer du rhino-pharynx dans la région de Marrakech. *Antropo*, 9, 39-47.

ANDRIAMAHOLISON, G. M. 1979.-Première approche épidémiologique de la tumeur maligne du cavum à Madagascar. *Th Doct Méd n° 50*, Antananarivo.

ARFAOUI, A., SOULAYMANI, A., QUYOU, A., HABIB, F. et CHOULLI, M. 2007- Le cancer du cavum au Maroc. Etude épidémiologique sur l'échantillon: Centre d'oncologie Al Azhar de Rabat. *Antropo*, 14: 75-82.

ARSOVA SARAFINOVSKA, Z., MATEVSKA, N., PETROVSKI, D., BANEV, S., DZIKOVA, S., GEORGIEV, V., . . . SUTURKOVA, L. 2008-Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphism is associated with risk of earlyonset prostate cancer. *Cell Biochem. Funct*, 26:771–777.

ATAMER, A., BILICI, A., YENICE, N., SELEK, S., ILHAN, N. et & ATAMER, Y. 2008. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Int Med Res* 36:771-776.

ATIF, F. et BOUZID, K. 2012-Carcinomes Indifférenciés du Nasopharynx localement avancés et méristatiques de l'adulte. *Ben Merabet*, 34-35.

BABA, L., et MCGRATH, L., 2008-Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *AdvNeonatal Care* 8:256-264.

BENTES, D. S., AM., WANG, C., CHU, C. et BRITON-JONES, C. 2004-In vitro exposure to carbon dioxide induces oxidative stress in human peritoneal mesothelial cells. *Hum Reprod* 19:1281-1286.

BABA, L. et MCGRATH, L. 2008. Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *AdvNeonatal Care* 8, 256-264.

BAHRIZ, A., KASSAA, A., TIBOUKA, A., AMIR, Z., TERKMANI, F., CHILLA, D., . . . BOUZID, K. 2010-Cancer du nasopharynx en Algérie. *Annales de pathologie* 30: 126—S129.

BABA, L. et MCGRATH, L. 2008-Oxygen free radicals: effects in the newborn period. *Adv Neonatal Care* 8:256-264.

- BAHRIZ, A., KASSAA, A., TIBOUKA, A., AMIR, Z., TERKMANI, F., CHILLA, D., . . . BOUZID, K. 2010.- Cancer du nasopharynx en Algérie. *Annales de pathologie* 30:126—S129.
- BAHRIZ, M. R., KASSA, R., TIBOUK, A., AMIR, Z. C., TERKMANI, F., CHILLA, D., . . . BOUZID, K. 2010-Cancer of the nasopharynx in Algeria. *Ann Pathol*, 30: 126-9.
- BEI, J. X., JIA, W. H. et ZENG, Y. X. 2012- Familial and large-scale case-control studies identify genes associated with nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 22: 96-106.
- BENDJEMANA, K., SATTA, D., ADJABI, K., MIALI, A., AIDDOUDI, S. et KADRI, A. 2011. Etude du profil épidémiologique et des facteurs de risque alimentaire du cancer du nasopharynx dans le Nord-Est Algérien. *J.Afr.Cancer*, 3: 59-62.
- BENTES, D. S., AM., WANG, C., CHU, C. et BRITON-JONES, C. 2004-In vitro exposure to carbon dioxide induces oxidative stress in human peritoneal mesothelial cells. *Hum Reprod* 19:1281-1286.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D., THEROND, P. et DELATTRE, J. 2003-Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Médecinesciences Flammarion Paris, 59-81.
- BOURAS, N., TAHRI, A., AMMOR, S. et BAALI, A. 2006-Nutritional and environmental risk factors of nasopharyngeal carcinoma in Morocco. *J Clin Oncology, ASCO*, 24: 18S
- BOURHIS, J., CVITKOVIC, E. et ESCHWEGE, F. 1998. *Head and Neck cancer, a multidisciplinary approach*. Ed Philadelphia.
- BOUROUBA, M., BOUKERCHA, A., ZERGOUN, A. A., ZEBBOUDJ, A., ELHADJAN, M., DJENAOUI, D., . . . TOUIL-BOUKOFFA, C. 2012. Increased production of nitric oxide correlates with tumor growth in Algerian patients with nasopharyngeal carcinoma. *Biomarkers*, 17, 618-24.
- BOUSSEN, H., BOUAOUINA, N., MOKNI-BAIZIG, N., GAMOUDI, A., CHOUCANE, L., BENNA, F. et LADGHAM, A. 2005- Les carcinomes du nasopharynx : données actuelles. *Pathologie Biologie*, 53:45-51.
- BUSSON, P., OOKA, T. et CORBEX, M. 2004. [Nasopharyngeal carcinomas and Epstein-Barr virus: from epidemiology and detection to therapy]. *Med Sci (Paris)*, 20:453-7.
- BEI, J. X., JIA, W. H. et ZENG, Y. X. 2012-Familial and large-scale case-control studies identify genes associated with nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 22:96-106.
- BENDJEMANA, K., SATTA, D., ADJABI, K., MIALI, A., AIDDOUDI, S. et KADRI, A. 2011-Etude du profil épidémiologique et des facteurs de risque alimentaire du cancer du nasopharynx dans le Nord-Est Algérien. *J.Afr.Cancer*, 3:59-62.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D., THEROND, P. et DELATTRE, J. 2003-Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Médecinesciences Flammarion Paris, 59-81.
- BOURAS, N., TAHRI, A., AMMOR, S. et BAALI, A. 2006-Nutritional and environmental risk factors of nasopharyngeal carcinoma in Morocco. *J Clin Oncology, ASCO*, 24: 18S

- BOURHIS, J., CVITKOVIC, E., et ESCHWEGE, F., 1998-Head and Neck cancer, a multidisciplinary approach. Ed Philadelphia.
- BUSSON, P., OOKA, T. et CORBEX, M. 2004-Nasopharyngeal carcinomas and Epstein-Barr virus: from epidemiology and detection to therapy]. *Med Sci (Paris)*, 20:453-7.
- CAUSERET, J. 2000. Nitrates, Nitrites, Nitrosamines: apport alimentaires et santé. *Ann Falls Exp Chim*, 77, 133-51.
- CHAN, A. T., TEO, P. et HUANG, D. P. 2004-Pathogenesis and treatment of nasopharyngeal carcinoma *semin oncol*, 31(6): 794-801.
- CHANG, E. T. et ADAMI, H. O. 2006-The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15:1765-77.
- CHEN, H., HUTT-FLETCHER, L., CAO, L. et HAYWARD, S. D. 2003-A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein- Barr virus. *Journal of Virology*, 77:4139-4148.
- COUSSENS, L. M. et WERB, Z. 2002- Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
- CHEN, H., HUTT-FLETCHER, L., CAO, L. et HAYWARD, S. D. 2003-A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein- Barr virus. *Journal of Virology*, 77:4139-4148.
- COUSSENS, L. M. et WERB, Z. 2002-Inflammation and cancer. *Nature* ,420:860-867.
- CAUSERET, J. 2000-Nitrates, Nitrites, Nitrosamines: apport alimentaires et santé. *Ann Falls Exp Chim*, 71:133-51.
- CHANG, E. T. et ADAMI, H. O. 2006-The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15:1765-77.
- CHOW, W. H., MCLAUGHTIN, J. et HRUBEC, Z. 1998-Tobacco use and Nasopharyngeal Carcinoma in cohort of us veterans. *Int. J. Cancer*, 55:538-540.
- DEFRAIGNE, J. et PINCEMAIL, J. 2008-Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liège*, 63:10-19.
- DALLE-DONNE, L., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D. et MILZANI, A. 2006-Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 52:601-623.
- EDGE, S., BYRD, D., CARDUCCI, M., COMPTON, C., FRITZ, A., GREENE, F., . . . 2009- *AJCC Cancer Staging Handbook*. Springer-Verlag New York Inc.
- ELYSE, P. & ALAIN, H. 2002- La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2:2-11.
- FAVIER, A. 2003-Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 115:108-115.
- FENG, B. J., JALBOUT, M., BEN AYOUB, W., KHYATTI, M., DAHMOUL, S., AYAD, M., . . . CORBEX, M. 2007-Dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Maghreb countries. *Int.J.Cancer*, 121:1550-55.

- FINAUD, J., LAC, G. et & FILAIRE, E. 2006-Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36:327-358.
- FORSTERMANN, U. 2005- Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat.Clin Pract.Cardiovasc Med*, 5: 338-349
- FONG, Y. Y. et WALSH, E. O. 1971-carcinogenic nitrosamines in cotonese salt-dried fish. *Lancet*, 2:7732-1032.
- GEARA, F., NASR, E., TUCHER, S. et AL, E. 2005. Nasopharyngeal cancer in the Middle East: experience of the American University of Beirut Medical Center. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 61(5): 1408–15.
- GREENE, F. et COMPTON, C. 2006- cancer staging atlas: Birkhäuser. *Cancer AJCo*, Fritz AG, Shah JP, Winchester DP. *AJCC*
- GUEYE P, M., GLASSER, N., FERARDE, G. et LESSINGER, J. M. 2006. Influence of human haptoglobins polymorphy of oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44:542-547.
- HAGHIGHI, S. F., SALEHI, Z., SABOURI, M. R. et ABBASI, N. 2015. [Polymorphic variant of MnSOD A16V and risk of diabetic retinopathy]. *Mol Biol (Mosk)*, 49:114-8.
- HALLIWELL, B. 1999. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutation Research*, 443:37–52.
- HOU, Y. C., JANCZUK, A. et WANG, P. G. 1999. *Des*. 5:417-441.
- HOUSTON, M. 2007. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. *Altern Ther Health Med*, 13: S128-133
- HU, Y., BLOCK, G., NORKUS, E., MORROW, J., DIETRICH, M. et & HUDES, M. 2006- Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. *Am J Clin Nutr*, 84:70-76.
- HAGHIGHI, S. F., SALEHI, Z., SABOURI, M. R. et ABBASI, N. 2015-Polymorphic variant of MnSOD A16V and risk of diabetic retinopathy. *Mol Biol (Mosk)*, 49:114-8.
- ISEH, K. R., ABDULLAHI, A. et MALAMI, S. A. 2009-Clinical and histological characteristics of nasopharyngeal cancer in Sokoto, North-Western Nigeria. *West Afr J Med*, 3:151-155.
- JIA, W. H. et QIN, H. D. 2012-Non-viral environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a systematic review. *Semin Cancer Biol*, 22:117-26.
- KARRAY-HAKIM, H., AYADI, W. et FEKI-BERRAJAH, L. 2009. Mise au point sur les marqueurs du virus d'Epstein Barr utilisés pour le diagnostic primaire du cavum et la détection de rechute ou métastases après traitement. *Rev tum Infectiol*, 3, 1-5.
- KAWANISHI, S. et HIRAKU, Y. 2006-Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8:1047–1058.

- KAKKOURA, M. G., DEMETRIOU, C. A., LOIZIDOU, M. A., LOUCAIDES, G., NEOPHYTOU, I., MALAS, S., . . HADJISAVVAS, A. 2015-MnSOD and CAT polymorphisms modulate the effect of the Mediterranean diet on breast cancer risk among Greek-Cypriot women. *Eur J Nutr*.
- LEGENT, F., PERLEMUTER, L. et VANDENBROUCK, C. 1969. Cahiers d'anatomie ORL 2: fosses nasales et pharynx. Paris, Masson.
- LIN, J., CHEN, K., WANG, W. et AL, E. 2001. Detection of Epstein Barr virus DNA peripherol blood cell of patients with nasopharyngeal carcinoma: relation ship to distant metastatis and survival. *J Clin Oncol*, 19:2607-2615.
- LO, K. W., HUANG, D. P. et LAU, V. M. 1995. p 16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 55(10):2039-43.
- LO, H. W., HSU, S. et AL., A.-S. E. 2005-Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway,. *Cancer Cell*, 7: 575–589.
- LOFT, S., MOLLER, P., COOKE, M., ROZALSKI, R. et OLINSKI, R. 2008-Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? . *Eur J Nutr* 47 Suppl, 2:19-28.
- MANANTSOA, Y. 1995-Contribution à l'étude clinique et thérapeutique du cancer du cavum à Madagascar. Th Doct Méd n° 3869, Antananarivo.
- MARGARET, A., SYAHRUDDIN, E. et WANANDI, S. 2011-Margaret AL, Syahrudin E, Wanandi SI (2011). Low activity of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in blood of lung cancer patients with smoking history: relationship to oxidative stress. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12:3049-53.
- MCDERMOTT, A. L. et DUTT, S. N. 2001-The aetiology of nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 26:82–92.
- MONCADA, S. et HIGGS, A. 1993. 329, 2002-2012.
- MORADI, M. T., YARI, K., RAHIMI, Z., KAZEMI, E. et SHAHBAZI, M. 2015-Manganese superoxide dismutase (MnSOD Val-9Ala) gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 485-8.
- MUIR, C., WATERHOUSE, J. et MACK, T. 1987-Cancer incidence in five continents. Lyon, JARC Scientific publication, 88
- MOLLER, P., WALLIN, H. et & KNUDSEN, L. 1996-Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem BiolInteraet Chem BiolInteraet*, 102 :17-36.
- MURATA, M., THANAN, R., MA, N. et KAWANISHI, S. 2012-Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 623019.
- NAKASHIMA, T., OKADA, T., ASAHI, J., YAMASHITA, A., KAWAI, K., KASAI, H., . . . HIRANO, T. 2008-8-hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutat Res*, 654:138-144.

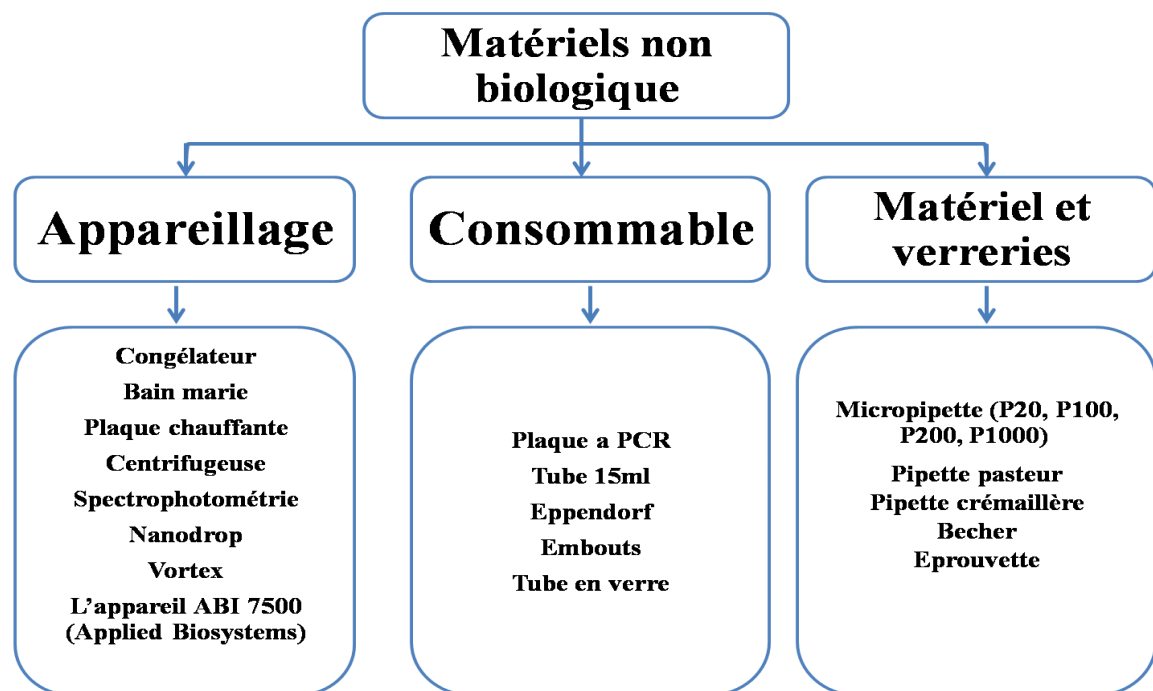
- NAKANISHI, S., YAMANE, K., OHISHI, W., NAKASHIMA, R., YONEDA, M., NOJIMA, H., . . . KOHNO, N. 2008-Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 81:381–385.
- OHSHIMA, H., TATEMACHI, M. et SAWA, M. 2003. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417:3–11.
- OLD, L., BOYSE, E. et OETTGEN, H. E. A. 1966-Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1699-704.
- PITSAVOS, C., PANAGIOTAKOS, D., TZIMA, N., CHRYSOHOOU, C., ECONOMOU, M., ZAMPELAS, A. et STEFANADIS, C. 2005- Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr*, 82(3):694–699.
- QUAN, F., KORNELUK, R. G., TROPAK, M. B. et GRAVEL, R. A. 1986-Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Research*, 14:5321-5335.
- ROSENBLUM, J. S., GILULA, N. B. et LERNER, R. A. 1996-On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93:4471–4473.
- ROWE, M., ZUO, J. et DRIVE, V. 2010-Rowe M, Zuo J, Drive V. Immune responses to Epstein-Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cell immunity. *Microbes Infect*, 12: 173—81.
- RIVERA, S., KERYER, C., BUSSON, P. et MAINGON, P. 2005-Les carcinomes du nasopharynx : de la biologie à la clinique. *Cancer/Radiothérapie*, 9: 55-68.
- SAADAT, M. et SAADAT, S. 2015. Genetic Polymorphism of CAT C-262 T and Susceptibility to Breast Cancer, a Case–Control Study and Meta-Analysis of the Literatures. *Pathology & Oncology Research*, 21:433-437.
- SOUMIA, A., ABDELLATIF, B., ANNIE, H. et MOHAMED, C. 2003-Approche épidémiologique du cancer du rhino-pharynx dans la région de Marrakech. *Antropol* 5:39-47.
- STEWART, B. et KLEIHUES, P. 2003. *World Cancer Report* chap. Head and neck cancer. Lyon, IARC Press, p322.
- SUN, G.-G., HU, W.-N. et WANG, Y.-D. E. A. 2012-Bidirectional regulation of manganese superoxide dismutase (MnSOD) on the radiosensitivity of esophageal cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13:015-23.
- SUTTON, A., IMBERT, A., IGOUDJIL, A., DESCATOIRE, V., CAZANAVE, S., PESSAYRE, D. et DEGOUL, F. 2005-The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet. Genomics*, 15.
- SUTTON, A., KHOURY, H., PRIPBUUS, C., CEPANEC, C., PESSAYRE, D. et DEGOUL, F. 2003-The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenet. Genomics*, 13:145–157.

- SEN, N., MIES, W., DONALDSON, B., PANALAKS, T. et LYENGAR, J. R. 1993-Formation of nitrosamine in meat curing mixture. *Nature*, 245(5420):104-5.
- SOTGIA, F., MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. et LISANTI, M. 2001-Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis : should we use antioxidants as key component of cancer treatment and prevention? *BMC Med*, 9:62-23.
- TATAFASA, S. 2009-Le cancer du cavum. A propos de cinq observations vues au service Oncologie du CHU d'Antananarivo. Th Doct Méd n° 7832, Antananarivo.
- TEO, P., LEUNG, S., YU, P., TSAO, S., FOO, W., SHIU, W. et 1991. A comparison of Ho's, International Union Against Cancer, and American Joint Committee stage classifications for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 67:434-9.
- TRICKER, A. R. et PREUSSMAN, R. 1997-Carcinogenic N-nitrosamines in the diet : occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res*, 259: 277-289.
- TSAO, S. W., YIP, Y. L., TSANG, C. M., PANG, P. S., LAU, V. M., ZHANG, G. et LO, K. W. 2014-Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*, 50, 330-8.
- TREMELLEN, K. 2008-Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14:243-258.
- TAYLOR. et GROUPE, F. 2009. Dietary modulation of cell signaling pathways. CRC Press, 481p.
- VALKO, M., RHODES, C., MONCOL., IZAKOVIC, M. et & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.
- VOKES, E., LIEBOWITZ, D. et WEICHSELBAUM, R. 1999-NPC etiology. *The lancet*, 350:1087-1091.
- WAN, X. S., DEVALARAJA, M. N. et ST. CLAIR, D. K. 1994-Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol*, 13: 1127-1136.
- WILLCOX, J., ASH, S. et CATIGNANI, G. 2004-Antioxidants and prevention of chronic disease. *CrU Rev Food Sei Nutr* 44:275-295.
- YOUNG, L. S. 2008- Epstein -Barr Virus: General features. Elsevier, 148-157.
- YU, M. C. 1990. Diet and nasopharyngeal carcinoma. *FEMS Microbiol Immunol*, 2(4):235-42
- ZELKO, I., MARIAN, J. et FOLZ, R. 2002-Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Bio! Med*, 33 (3):337-349.
- ZENG, Y., MIAO, X. C., LI, H. Y. et ITO, Y. 1984. Epstein-Barr Virus activation in Raji cells with ether extracts of soil from different areas in China. *Cancer Lett*, 23, 53-59.
- ZOU, Y., QIAN, Z., LI, Y., KIM, M., LEE, S. et & KIM, S. 2008- Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. *J Agric Food Chem*. AHN, J., GAMMON, M., SANTELLA, R., GAUDET, M., BRITTON,

J., TEITELBAUM, S., . . AMBROSONE, C. 2005- Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. Am J Epidemiol 162:943–952.

ANNEXES

Annexe N°1



Annexe N°2

<p><u>SLR</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • EDTA (0.5M PH08) → 10ml • Tris (1 M Ph08) → 0.5ml • Eau distillée → 500ml 	<p><u>SLB</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • EDTA (0.5M PH08) → 10mM • Tris (1 M Ph08) → 0.5ml • Eau distillée → 500ml
<p><u>SDS 10%</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • SDS → 100g • Eau distillée → 1000ml 	<p><u>NaCl 6 M</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • NaCl → 35g • Eau distillée → 100ml
<p><u>PK à 10 mg/ml</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • lyophilisat de PK • Eau distillée → 0.5ml <p>(laisser reposer au moins 15 mn. A conserver à +4°C ou à -20°C pour une longue conservation.)</p>	

