



**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR**  
**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université Saad Dahlab de Blida 1**

**Faculté des sciences de la nature et de vie**

**Département de biologie**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**  
**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire**

Intitulé :

**Détection de virus d'Epstein –Barr dans le carcinome indifférencié du nasopharynx : Apport de l'immunohistochimie**

**Présenté et soutenu par : HASSAINE SARRA      MADA ZAHIRA      Le : 02-07-2018**

**Jury d'évaluation :**

<b>Présidente :</b>	<b>ANNANE. A</b>	<b>Maitre assistant classe A</b>
<b>Examineur :</b>	<b>CHALAL. N.H</b>	<b>Maitre assistant classe B</b>
<b>Promotrice :</b>	<b>LATRECHE .B</b>	<b>Maitre de conférences classe A</b>
<b>Co- promotrice :</b>	<b>SLIMANI. A</b>	<b>Maitre de conférences classe A</b>
<b>Chef département :</b>	<b>SAADI. L</b>	<b>Maitre de conférences classe A</b>

*Année universitaire 2018 – 2019*

## **Remerciements**

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Mme Latreche B. professeur en  
anatomie*

*Pathologique au CHU Beni Messous qui a permis de réaliser ce travail sous sa  
direction.*

*Nous le remercions pour l'aide qu'il nous a apporté et le temps précieux qu'il  
nous a accordé tout au long du travail.*

*Nous remercions Mme Slimani.A pour nous avoir accueillies dans le laboratoire  
d'anatomopathologie*

*Nous tenions à remercier également tout personnel du laboratoire d'anatomie  
pathologique*

*pour leur temps plus que précieux pris pour répondre à nos questions et nous  
avoir permis de réaliser ce stage dans un cadre agréable.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos enseignants de l'université  
de BLIDA1*

*Enfin nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à*

*L'aboutissement de ce travail.*

*Dédicace*

*Nous dédions ce travail à nos parents en témoignage de notre*

*Reconnaissance et en preuve de notre profonde*

*Gratitude et de notre amour*

*Nous dédions aussi ce travail à tous nos frères et sœurs*

*ainsi*

*Qu'à nos collègues et amis pour leur soutien continu,*

*avec tout notre affection*

## Liste des figures :

**Figure N°1 :** Coupe sagittale et frontale montrant la situation du nasopharynx.

**Figure N°2 :** Epithélium cylindrique cilié haut, chorion en tissu lymphoïde.

**Figure N° 3:** Structure du Virus d'Epstein-Barr. .

**Figure N°4 :** Représentation schématique du génome EBV.

**Figure N°5 :** la protéine LMP1 d'EBV.

**Figure N°6 :** EBV et tropisme cellulaire B.

**Figure N°7 :** Répartition mondiale du cancer du cavum

**Figure N°8 :** Les voies de signalisation LMP1 dans la carcinogénèse du carcinome du nasopharynx.

**Figure N°9 :** Techniques standards d'anatomie pathologique (étapes technique)

**Figure N°10 :** Principe de la technique immunohistochimique

**Figure N°11 :** Répartition annuelle des nouveaux cas de l'UCNT pendant la période 2015-2017

**Figure N°12 :** Répartition des cas en fonction du sexe.

**Figure N°13 :** Répartition des cas en fonction de l'âge.

**Figure N°14 :** Aspect histologique de carcinome indifférencié du nasopharynx (amas de cellules tumorales + stroma lymphoïde), HE GX400.

**Figure N°15 :** Immunomarquage de la cytokératine dans les cellules indifférencié du nasopharynx.

**Figure N°16 :** Immunohistochimie : LMP1 (G X 200).

**Figure N°17 :** Immunohistochimie : LMP1 (G X 200).

**Figure N° 18 :** La répartition des cas EBV-positif selon le sexe.

**Figure N °19 :** La répartition des cas EBV- positif et négatif selon les tranches l'âge .

## **Liste des tableaux**

**Tableau N°1** : Les anticorps utilisés au cours de l'Immunohistochimie.

**Tableau N°2** : Les principales réactives utilisées au cours de l'immunohistichimie.

**Tableau N°3** : Répartition des patients selon les années.

**Tableau N°4** : Répartition des patients selon le sexe.

**Tableau N°5** : Répartition des malades par tranche d'âge.

**Tableau N°6** : les résultats de l'immun marquage de l'EBV.

## **Résumé :**

La relation entre le virus d'Epstein-Barr (EBV) et le cancer du cavum (ou rhinopharynx) est bien établie. Pourtant, les mécanismes de l'oncogenèse mise en œuvre dans l'apparition de la tumeur, aussi bien que son diagnostic ou son traitement continuent à poser de nombreuses questions qu'il est utile de revoir brièvement à la lumière des dernières données scientifiques et médicales.

L'infection EBV des cellules épithéliales du nasopharynx est un événement précoce et pré-invasif de la carcinogenèse des NPC. Cette corrélation a été démontrée par plusieurs auteurs. L'association EBV –UCNT est notée dans 100% des cas.

Pour cibler le rôle du virus dans la carcinogénèse d'UCNT, l'objectif de notre étude s'est focalisé sur la mise en évidence de la protéine membranaire virale LMP1 par technique immunohistochimique en utilisant l'anticorps anti-LMP1.

IL s'agit d'une étude rétrospective, intéressant 15 patients porteurs d'UCNT diagnostiqués sur des prélèvements biopsiques par technique anatomopathologique standard.

Une analyse immunohistochimique a été réalisée par l'anticorps anti -LMP1 sur des prélèvements biopsiques fixé au formol et inclus en paraffine.

Les résultats ont objectivé une prédominance masculine avec un sexe ration de 4 , la tranche d' âge la plus atteinte étant entre 40 et 49 .

73% des cas exprimé le LMP et 27% des cas avec EBV –négatif, l'atteinte masculin est plus témoinnant de la présence de l'EBV importante avec 91% que les femmes (9 ,9%) Concernant l'âge, l'infection à l'EBV se trouve en maximum chez les sujets âgés.

**Mot clé :** Carcinome indifférencié du nasopharynx UCNT, Virus d'Epstein-Barr EBV

La protéine membranaire latente LMP1.

## **Abstract :**

The relationship between Epstein-Barr virus (EBV) and cancer of the cavum (or nasopharynx) is well established. However, the mechanisms of oncogenesis implemented in the appearance of the tumor, as well as its diagnosis or treatment, continue to pose many questions that it is useful to review briefly in the light of the latest scientific and medical data. .

EBV infection of epithelial cells of the nasopharynx is an early and pre-invasive event of carcinogenesis of NPCs. This correlation has been demonstrated by several authors the association EBV-UCNT is noted in 100% of cases

To target the role of the virus in the carcinogenesis of UCNT, the objective of our study focused on the detection of the LMP1 viral membrane protein by immunohistochemical technique using the anti-LMP1 antibody.

This is a retrospective study of 15 patients with UCNT diagnosed on biopsy specimens by standard pathological technique.

Immunohistochemical analysis by anti-LMP1 antibody on formalin-fixed and paraffin-embedded biopsy specimens.

The results showed a male predominance with a sex ration of 4, with the most affected age group being between 40 and 49.

73% of cases expressed PML and 27% of cases with EBV-negative, the male involvement is more evidence of the presence of EBV important with 82% than women (18%) Regarding age, infection EBV is highest in the elderly.

**Keyword:** Undifferentiated carcinoma of the nasopharynx UCNT, Epstein-Barr EBV Virus

The latent membrane protein LMP1.

## الملخص

العلاقة بين فيروس EBV ابستن بار وسرطان البلعوم الأنفي مثبتة. ومع ذلك، فإن دور آليات التسرطن في ظهور الورم ، وكذلك تشخيصه أو علاجه ، لا تزال تطرح العديد من الأسئلة التي من المفيد استعراضها بإيجاز في ضوء أحدث البيانات العلمية والطبية.

عدوى ابستن بار EBV للخلايا الظهارية من البلعوم الأنفي يحدث قبل ظهور السرطان. وقد بين هذه العلاقة العديد من المؤلفين و هذا ظاهر في 100% من الحالات.

الهدف من دراستنا هو استهداف دور الفيروس في تطور سرطان البلعوم الأنفي الغير متميز و ذلك بالكشف عن بروتين الغشاء الفيروسي الكامن LMP1 بواسطة التقنية المناعية باستخدام الأجسام المضادة ضد البروتين الغشائي الكامن دراستنا استرجاعية تضم 15 مريضا حاملين لسرطان البلعوم الأنفي الغير متميز تم تشخيصها على عينات الخزعة من خلال تقنية قياسية مرضية.

التقنية المناعية (immunohistochemical) انجزت باستعمال أجسام المضادة ضد LMP1 على عينات خزعة ثابتة بالفيبرمالين ومحتواة في الباغفين

اظهرت النتائج هيمنة الذكور مع نسبة جنسية تقدر ب 4 رجال مقابل امرأة واحدة ، مع الفئة العمرية الأكثر تضررا بين 40 و 49

73 % من الحالات تم التعبير عنها ب ابستان بار ايجابي مع 27% من الحالات ابستان بار سلبي و اصابة مهمة للذكور بنسبة 91% فيما يتعلق بالعمرفان عدوى ابستان بار تكون اعلى لدى المسنين

الكلمة المفتاح

سرطان البلعوم الانفي غير متميز ابستن بار البروتين الغشائي الكامن



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.

**ARN** : Acide Ribonucléique.

**BART** : BamHI fragment A Rightward Transcript

**C** : Cytoplasme

**CYP2E1** : cytochrome P450 2E1

**CTAR** : C-Terminal Activating Region.

**CTL** : lymphocytes T cytotoxiques

**CD 40** : cluster de différenciation

**CD** : Cellule Dendritique

**CNP** : Carcinome de Nasopharynx

**EA** : Early Antigen

**EBV** : Epstein Barr Virus

**EBNA** : EBV Nuclear Antigen

**EBERs** : EBV encoded RNA

**Gps** : Glycoprotéine

**HLA** : Human Leukocyte Antigen

**ICAM** : Inter-Cellular Adhesion Molecule

**IF** : Immuno-Fluorescent

**Ig** : Immunoglobuline

**IR** : Internal Repeats

**LMP** : latente membrane protéine

**MP** : membrane plasmique

**NK** : Natural Killer

**NPC** : Cancer de Nasopharynx

**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor-kappa B

**Ori p** : Origine de répliation Plasmidique

**Ori lyt** : Origine de répliation Lytique

**OMS** : l'Organisation mondiale de la santé

**PI3K** : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinas

**TR** : Région Terminal

**TNM**: Tumor Node Metastases

**TNF** : Tumor Necrosis Factor

**TNF-R** : Tumor Necrosis Factor Receptor

**TRAF** : TNF-R Associated Factors

**TRADD** : TNF-R Associated Death Domain

**TLR** : Tolle Like Receptors

**US** : Unique Short

**UL** : Unique Long

**UCNT** : Undifferentiated Carcinome of Nasopharyngeal Type

**VCA** : Viral Capsid Antigen

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VADS** : Voies Aéro-digestives Supérieures

## Glossaire

**Les biopsies** : désignent un prélèvement d'une portion de tissus sous contrôle Visuel par deux voies : au cours d'un examen endoscopique ou par examen sous anesthésie locale ou générale d'une partie de la lésion dont on souhaite l'examen histo -pathologique.

**Chorion** : c'est un tissu conjonctif lâche avec fibres élastiques.

**Les tonsilles, ou amygdales** : sont probablement les organes lymphatiques les plus simples. Elles forment un anneau de tissu lymphatique autour de l'entrée du pharynx

**Les anticorps monoclonaux** : sont produits, le plus souvent chez la souris, par un seul clone de lymphocytes B (technique des hybridomes).

**Les anticorps poly clonaux** : sont un mélange d'anticorps obtenus en injectant l'antigène à un animal (lapin surtout, chèvre .....).

**Latence viral** : c'est un statut repose sur la répression de cycle lytique et le maintien de génome viral en situation intranucléaire sous forme épisomale et l'expression des gènes de la latence.

**Radiothérapie** : est la stérilisation (destruction –éradication) des cellules cancéreuses par des rayonnements ionisants

# Tables des matières

## Chapitre I : Synthèse bibliographiques

Introduction.....	1
I. Rappels.....	4
I. 1.Rappel anatomique.....	4
I.2.Rappel embryologique .....	5
I.3. Rappel histologique .....	5
II. Virus d'Epstein Barr .....	6
II.1.Définition .....	6
II .2 .Structure.....	6
II.3. Organisation du génome viral .....	7
II.4.Protéines et antigènes viraux.....	8
II .4.1 . Protéines de la latence .....	8
II .4 .1 . 1. La protéine oncogène LMP1 du virus d'Epstein Barr .....	8
II .4 .2. Protéines du cycle productif lytique .....	9
II.5. Physiopathologie de l'infection EBV .....	9
III. Le cancer du nasopharynx .....	11
III.1. Définition.....	11
III.2. Etude anatomopathologique et classifications .....	11
III.3. Epidémiologie descriptive .....	12
III.3 .1.La répartition géographique.....	12
III.3.2. Répartition selon l'âge et le sexe .....	14
III.4. Etiologie .....	14
III.4.1. Facteurs étiologiques non viraux .....	14
III.4.1.1.Facteurs génétiques .....	14
III.4.1.2.Facteurs environnementaux et diététiques.....	15

<b>III.4.2. Facteur étiologique viral .....</b>	<b>15</b>
<b>III.4.Virus d'Epstein Barr et la tumogénèse des CNP.....</b>	<b>16</b>
<b>III.5.L'interaction entre l'immunité de l'hôte et le virus d'Epstein-Barr chez les patients atteints de cancer de nasopharynx .....</b>	<b>17</b>
<b>III.5.1.EBV et réponse innée .....</b>	<b>17</b>
<b>III.5.2.EBV et réponse adaptative.....</b>	<b>17</b>
<b>III.5.2.1. La réponse humorale.....</b>	<b>17</b>
<b>III.5.2.2. La réponse cellulaire.....</b>	<b>17</b>
<b>III . 5 . 2 . 2. 1. Lymphocytes T CD8+.....</b>	<b>17</b>
<b>III . 5 . 2 . 2. 2. Lymphocytes T CD4+.....</b>	<b>18</b>
<b>III.6. Mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire .....</b>	<b>18</b>
<b>III .7. Cancer du nasopharynx et biomarqueurs .....</b>	<b>18</b>
<b>III.8. Diagnostic.....</b>	<b>19</b>
<b>III.9. Traitement.....</b>	<b>20</b>
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>22</b>
<b>Chapitre III : Résultats .....</b>	<b>33</b>
<b>Chapitre IV : Discussion.....</b>	<b>42</b>
<b>Chapitre VI : Conclusion.....</b>	<b>48</b>

---



# Introduction

### **Introduction :**

Les cancers du nasopharynx sont des proliférations néoplasiques malignes, développées à partir des structures histologiques de la paroi nasopharyngée ; 90% d'entre elles naissent à partir de l'épithélium appelés carcinomes.

Le carcinome indifférencié de nasopharynx (l'UCNT) est de loin le sous type histologique le plus fréquent (**Madouri, 2012**).

Il diffère des autres carcinomes de la tête et du cou par sa présentation clinique, son aspect histologique caractéristique, sa répartition géographique avec une incidence élevée dans la chine de sud –Est et le bassin méditerranéen, et particulièrement sa relation avec le virus d'Epstein-Barr (EBV). (**Moudane, 2012**).

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus transformant appartenant à la sous-famille des  $\gamma$ -herpès virus (**Anaïs et al., 2013**) infecte la majorité de la population adulte mondiale. Suite à l'infection primaire, l'individu reste porteur du virus à vie (**Lawrence et al, 2003**), ce virus est associé à un très large spectre de pathologies bénignes et malignes (**Dhafer, 2013**). Sa présence dans les cellules épithéliales est un facteur important de la formation du carcinome de nasopharynx, (**Nicholls et al., 1997**).

L'EBV se maintient le plus souvent dans sa phase de latence dans les cellules épithéliales nasopharyngées, il exprime ainsi les gènes impliqués dans cette phase tels que les EBERs (Epstein-Barr encoded RNA), l'EBNA 1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1), LMP1 (latent membrane protéine 1) et la LMP2A (**Chan et al, 2003**). La fonction de ces gènes est essentielles dans la détermination du rôle de l'infection virale dans le processus de carcinogène (**Lawrance et al., 2014**), car toutes ces particules virales ont une activité oncogénique in vitro et sont impliquées dans le phénotype malin des cellules de NPC in vivo (**Tsao et al, 2015**).

LMP1 est considéré comme l'oncogène majeur d'EBV, elle présente des propriétés immortalisantes et transformantes grâce à sa signalisation, et elle est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par l'EBV (**Young et al., 2000**). (**Wang et al, 1985**), s (**Dhafer, 2013**) et pourrait contribuer à la progression tumorale en activant diverses voies de signalisation (**Eliopoulos et al., 1999**).

L'objectif principal de notre étude était de vérifier l'association UCNT- EBV par l'expression de la protéine LMP1 mise en évidence par technique immunohistochimique à

l'aide de l'anticorps anti-LMP1 dans une population algérienne porteuse de carcinomes indifférenciés du nasopharynx .Nous avons également étudié le profil clinique de cette population et réévalué les aspects histologiques.





**GENERALITES**

**I .Rappels**

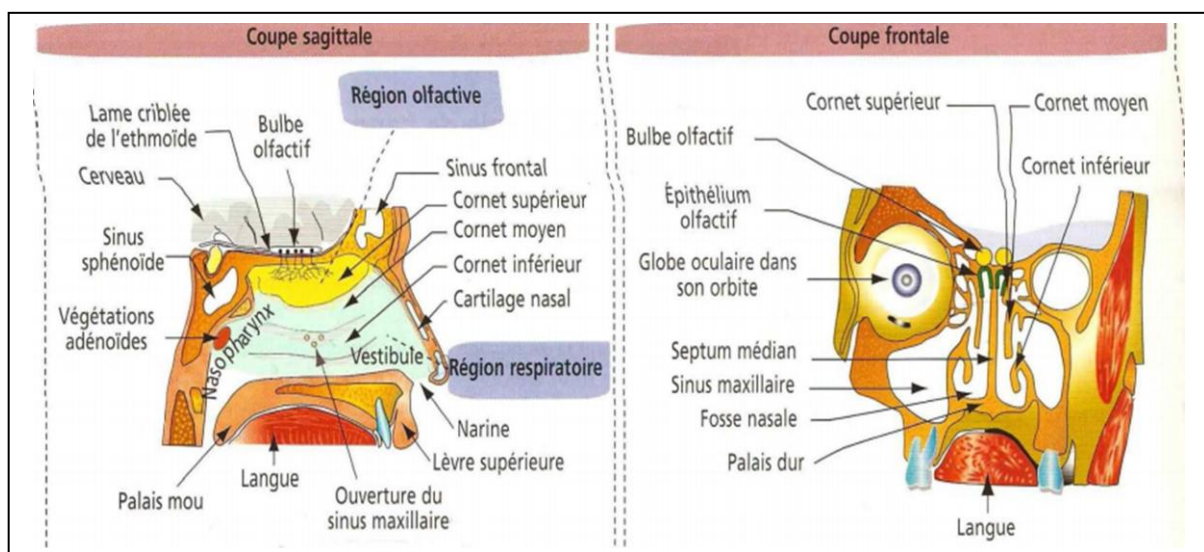
**I. 1.Rappel anatomique**

Le pharynx, organe musculo-membraneux, fait partie des voies aériennes supérieures et représente un carrefour entre les voies respiratoires et digestives. **(Si-Salah, 2010)**

Il se divise en trois sections : le nasopharynx (ou partie nasale du pharynx), l'oropharynx(ou partie orale du pharynx) et le laryngo-pharynx (ou partie laryngée du pharynx) .

Le nasopharynx est un organe impair, médian prenant la forme d'un cube comportant six parois **(Crépy, 2005)** . Il est situé sous la base du crâne, en arrière des fosses nasales, au-dessus de l'oropharynx et en avant des deux premières vertèbres cervicales. En haut, il est en rapport avec le sinus sphénoïdal et, plus latéralement, avec le sinus caverneux. En avant, le cavum communique avec les fosses nasales par les choanes et, en bas, avec l'oropharynx.

**(Si-Salah, 2010)** **(Figure 1)**. Il mesure chez l'adulte 04 centimètres de hauteur, 02à 03 cm sur l'axe antéro-postérieur et 04 cm dans son axe transverse **(Elaine, 1999)**



**Figure 01 : coupe sagittale et frontale montrant la situation du nasophaynx (Abraham, 2002)**

### I.2. Rappel embryologique :

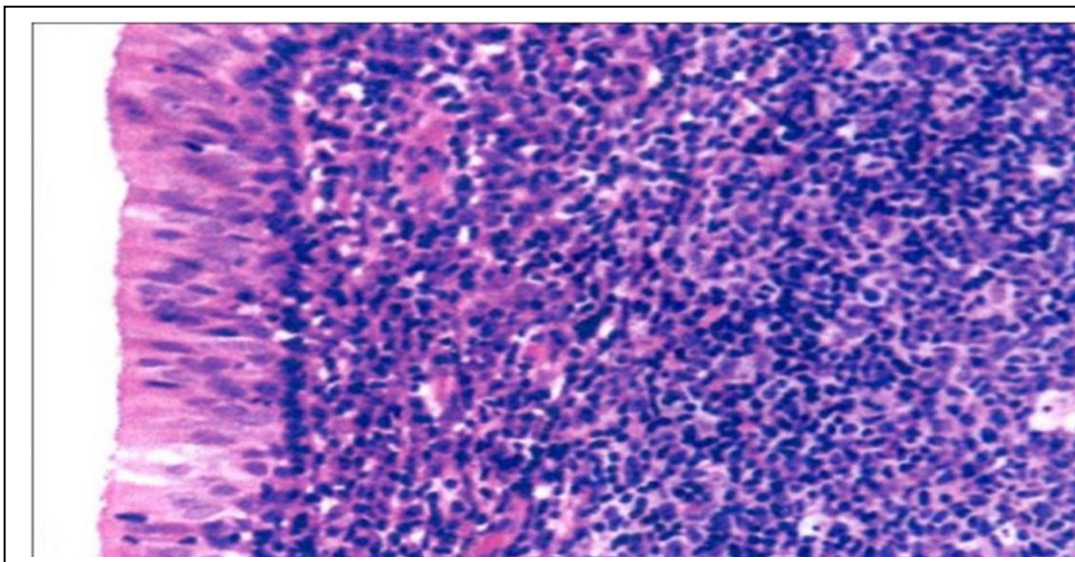
Le nasopharynx dérive en effet pour  $\frac{3}{4}$  postéro –inférieur de l'intestin primitif et pour  $\frac{1}{4}$  antéro-supérieur de sinus naso buccal (Keith, 2007).

### I.3. Rappel histologique :

La muqueuse nasopharyngée est tapissée d'un épithélium reposant sur un chorion. L'épithélium est dans sa majeure partie pseudo-stratifiée ciliée de type respiratoire.

Dans quelques régions (face postérieure du nasopharynx, sommet des plis de l'amygdale pharyngienne), il est malpighien, stratifié non kératinisé (Nicholls, 1997).

Le chorion abrite des follicules lymphoïdes (végétations adénoïdes, les tonsilles pharyngiennes) associées aux muqueuses, formant l'anneau de Waldeyer et se localisent dans les régions postérieure et supérieure du nasopharynx. Il s'y associe aussi des glandes muqueuses et séro-muqueuses (Abraham, 2002) (figure2).



**Figure 02 : Nasopharynx : Epithélium cylindrique cilié haut, chorion en tissu lymphoïde (Stevens et Lowe, 2006)**

**II. Virus d'Epstein-Barr :**

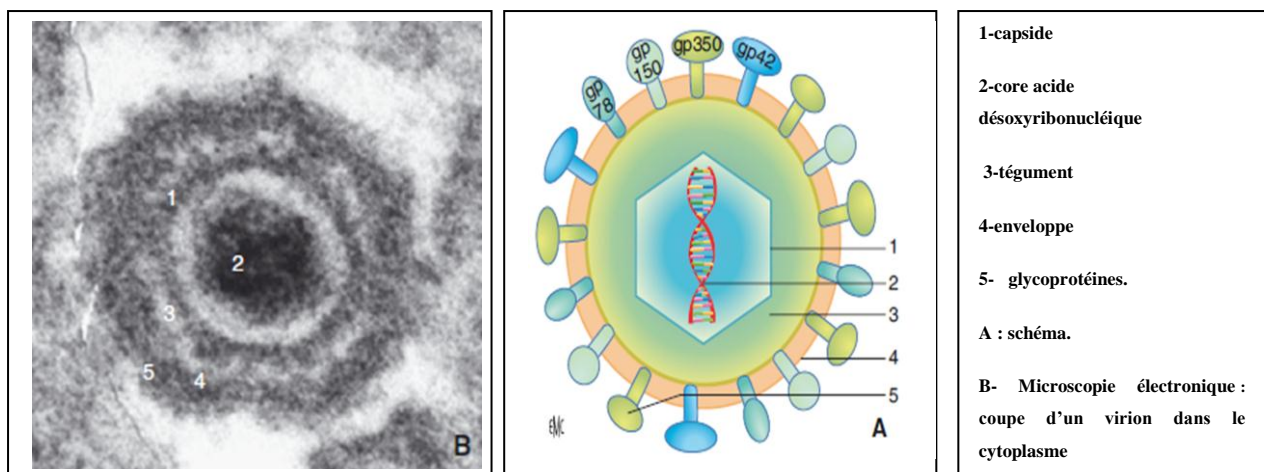
**II .1 .Définition :**

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus transformant qui appartient à la sous-famille des  $\gamma$ -herpès virus. Sa découverte en 1964 fut l'aboutissement de plusieurs années de recherche menées par les virologues Anthony Epstein et Yvonne Barr en collaboration avec le chirurgien Denis Burkitt (Anais et al, 2013).

L'EBV est un agent infectieux omniprésent, infectant de manière latente 95%de la population mondiale ( James et al., 2001 ), il a été classé par l'IARC( international agency for research on cancer) en 1997 comme carcinogène de groupe 1, à la lumière de son association à certains tumeurs d'origine lymphoïde et épithéliales notamment le lymphome de Burkitt, le lymphome immunoblastique , la maladie de Hodgkin , lymphome à lymphocytes T , le carcinome nasopharyngé et le cancer de l'estomac ( Baumforth et al., 1999 ; Cruchley et al., 1997 ).

**II .2 .Structure :**

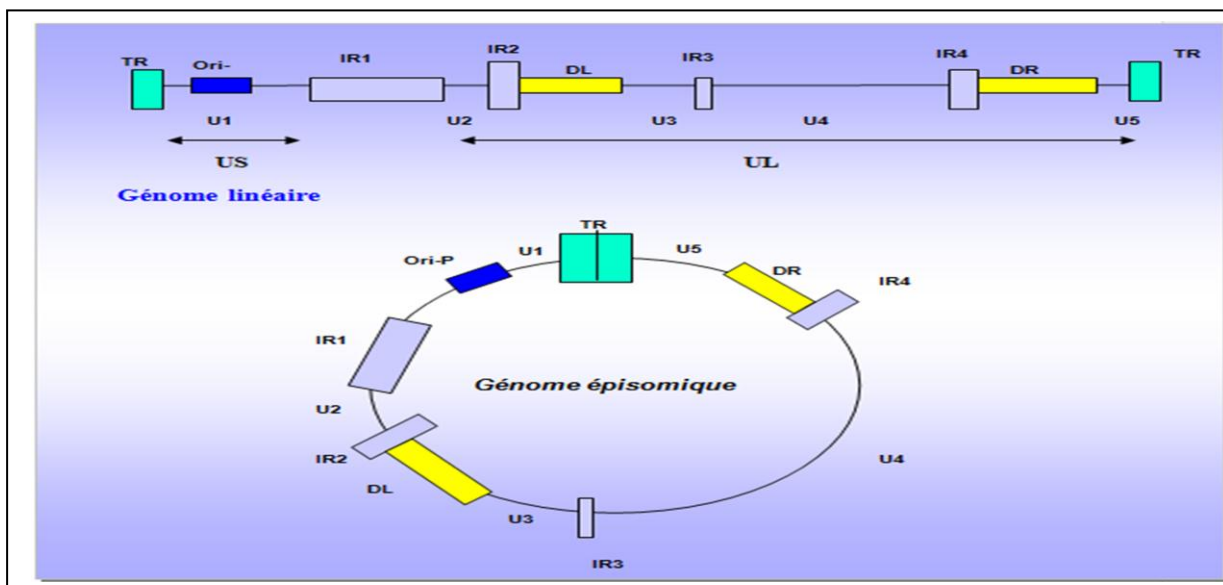
L'EBV est constitué d'un génome d'ADN double brin linéaire entouré d'une capside icosaédrique qui est entourée par le tégument et une enveloppe dérivée de la membrane de la cellule hôte incorporée avec des glycoprotéines virales (gps) (Farrell, 2001), Cette enveloppe externe constitue l'élément de fragilité du virus, et son pouvoir infectieux peut être diminué si cette enveloppe est altérée (Anais et al, 2013) (Figure 03)



**Figure 03 : Structure du Virus d'Epstein-Barr (Germi et al., 2016)**

**II. 3 .Organisation de génome EBV :**

Le génome d'EBV est une molécule d'ADN d'un peu plus de 172000 paires de bases , a une capacité de codage 100 à 150 protéines .Il est divisé en plusieurs domaines uniques , séparés par des répétitions internes (IR pour Internal Repeats) (IR1-IR4) , la séquence IR1 de 3000 pb divise le génome en un domaine unique long (UL pour Unique Long) et un domaine unique court (US pour Unique Short) , chaque extrémité comporte des répétitions terminales qui permettent la circularisation du génome dans certaines circonstances lors de la réplication de l'ADN. A l'intérieur du virion, la molécule d'ADN se présente toujours sous linéaire (Ballout, 2005) (figure 4).



**Figure 04 : Représentation schématique du génome EBV (Ballout, 2005)**

**II .4. Protéines et antigènes viraux :**

L'EBV code d'une part des protéines associées à la latence virale et d'autre part des protéines responsables de la production des nouveaux virions et du cycle lytique.

### II .4 .1 . Protéines de la latence :

Elles comprennent 6 protéines nucléaires (EBNAs) et 3 protéines membranaires (LMPs) ; de plus 2 gènes sont transcrits en grande quantité, (Epstein-Barr Encoded small RNAs, ou EBERs), mais non traduits en protéines. Leurs fonctions actuellement connues sont répertoriées dans le tableau (**Annexe VII, Tableau 4**) (**Ballout, 2005**)

L'analyse des gènes mutés ou délétés a montré que certaines de ces protéines sont indispensables à la transformation cellulaire (ou immortalisation), en particulier EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C et LMP-1 (**Jean et al., 2006**).

#### II .4 .1 . 1. La protéine oncogène LMP1 du virus d'Epstein Barr:

##### II .4 .1 . 1.1.Définition :

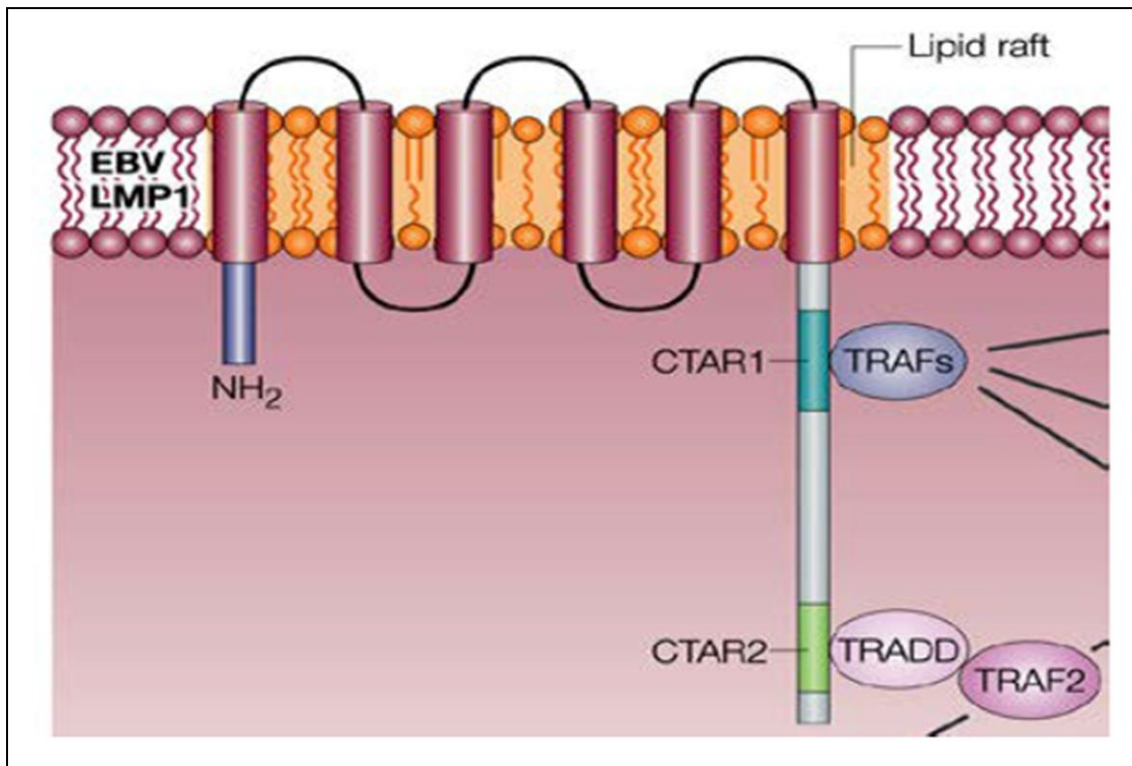
LMP1 C'est une protéine membranaire, encodée par le gène BNRF-1 et contient 386 acides aminés avec une masse moléculaire de 63 kDa (**Vera-sempere et al., 1996 ; Baumforth et al, 1999**) .Elle est fortement associée au cytosquelette et forme constitivement des agrégats dans la membrane plasmique même en l'absence de facteur de croissance exogène ou d'autres protéines (**Dahfar, 2013**).

Fonctionnellement, LMP1 ressemble à CD40 (membre de la famille des TNF récepteur) fournissant à la fois des réponses de croissance et de différenciation dans les cellules B (**uchida et al, 1999**) et son expression induit une dérégulation des voies de signalisations impliquées notamment dans des processus prolifératifs ou de résistance à l'apoptose, donc elle est considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV (**Eliopoulos et young, 2001**)

##### II .4 .1 . 1 . 2. Structure :

La protéine LMP1 comprend 6 domaines transmembranaires et une terminaison car-boxy contenant 2 domaines de signalisation appelés régions d'activation C-terminale 1 et 2 (CTAR 1 et 2) et une terminaison N-terminal cytoplasmique. Les domaines transmembranaires permettent à LMP1 de s'associer à la membrane hôte ,alors que les régions CTAR activent directement un certain nombre de voies de signalisation incluant le facteur nucléaire NF-Kb et la phosphoinositol-3- kinase (PI3K) (**Ozyar et al, 2004**) .les médiateurs proximaux de ces voies de signalisation TRAF (TNF-R Associated Factors) et TRADD (TNF-R Associated Death Domain) interagissent directement avec LMP1,ils sont caractérisés par leu

interaction avec les membres de la famille des récepteurs au TNF(TNFR) ( Dahfar, 2013)(Figure 5).



**Figure 05: la protéine LMP1 d'EBV (Young and Rickinson, 2004).**

#### **II .4 .2. Protéines du cycle productif lytique :**

L'expression des gènes du cycle lytique est séquentielle : les produits des gènes très précoces activent l'expression des gènes précoces qui induisent la réplication du génome viral nécessaire la transcription des gènes tardifs. Les produits des gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses (sylvie, 2010) (Tableau 5, Annexe VII)

#### **II .5. Physiopathologie de l'infection par EBV :**

Le virus d'Epstein Barr présente un tropisme distinct pour les lymphocytes B et les cellules épithéliales (Clair et al, 2011). Les lymphocytes B naïfs quiescents sont infectés par l'EBV en premier (Thorley-Lawson, 2005), grâce aux interactions gp350-CR2 et gH/gL/gp42-CMH2 (Clair et al, 2011), ils entrent dans le cycle cellulaire, et se différencient jusqu'au stade des lymphocytes B mémoires quiescents. Qui n'expriment aucune protéine de latence

(EBNA1 seul), ils s'échappent donc à tout contrôle immunitaire, ce sont ces cellules qui entrent dans la circulation sanguine périphérique (Thorley-Lawson, 2005) (Figure 06).

Pour obtenir une persistance à long terme l'EBV colonise le pool de cellules B mémoire, et toute perturbation de cette interaction entraîne des tumeurs à cellules B associées au virus (Lawrence et Christopher, 2014)

Lors d'une stimulation antigénique, les cellules B mémoire se différencient en plasmocytes provoquant la réactivation de virus et l'initiation de cycle lytique. Les virions produits peuvent infecter les lymphocytes B naïfs ou mémoire ou les cellules épithéliales de l'oropharynx (Hamdi, 2013)

L'infection des cellules épithéliales est également considérée comme importante dans le cycle de vie normal de l'EBV, est certainement associée à la pathogenèse de certaines tumeur épithéliales (Claire et al., 2011). L'attachement de ce virus sur les cellules épithéliales fait intervenir la glycoprotéine virale gH. Par contre l'entrée implique un complexe composé uniquement des deux glycoprotéines gH/gI car la plupart des virions produits par les lymphocytes B perdent la protéine gp42 à leur surface. En effet, cette dernière est séquestrée par le CMH de classe 2 présent à la surface des lymphocytes B, ceci accroît donc le tropisme du virus pour les cellules épithéliales, à l'opposé, l'absence du CMH 2 à la surface des cellules épithéliales va influencer le tropisme du virus vers les lymphocytes B (Borza et Hutt-Fletcher, 2002) (Figure 06).

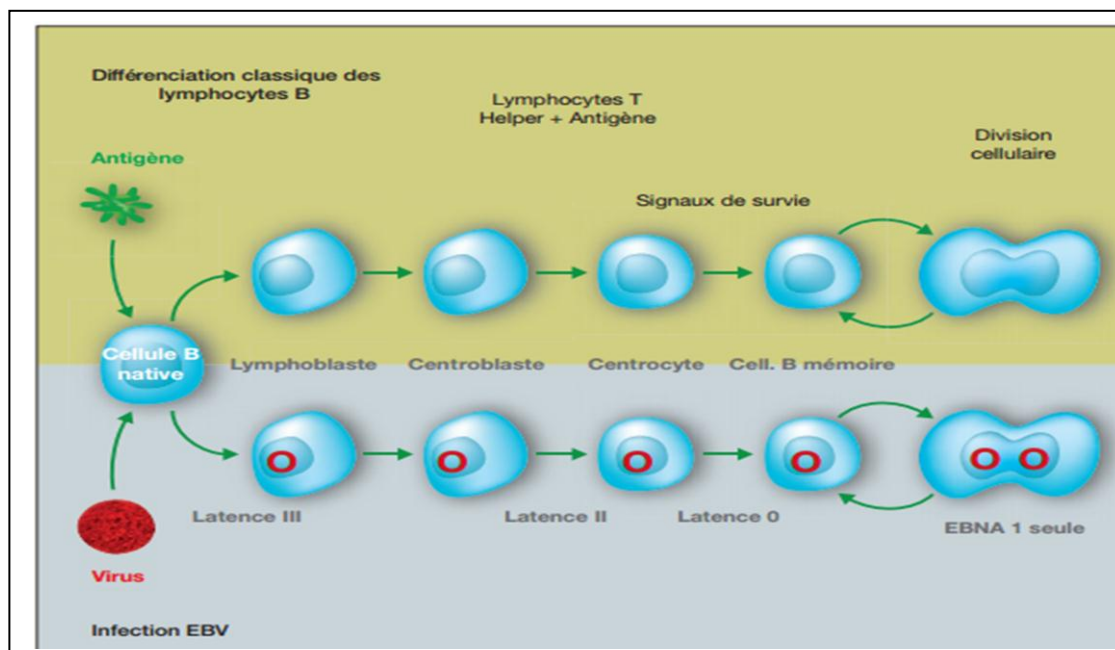


Figure 06 : EBV et tropisme cellulaire B d'après (Thorley-Lawson, 2005)



## III. Le carcinome du nasopharynx :

### III .1. Définition :

Les carcinomes nasopharyngés sont des tumeurs épithéliales malignes dérivant de la muqueuse qui tapisse la cavité rhinopharyngée (François-Régis et pierre, 2013)

### III .2 . Aspect de la tumeur du cavum au nasofibroscope/ formes macroscopiques :

La tumeur est souvent très difficile à détecter, souvent recourir à des biopsies à l'aveugle de la zone nasopharyngée, en particulier dans la fosse de Rosenmüller quand le diagnostic est suspecté.

Les aspects décrits sont :La forme bourgeonnante ,exophytique et infiltrante

La tumeur occupe rapidement le nasopharynx et envahit les structures .elle est composé de végétations friables et hémorragiques

Forme ulcérée : ulcération centrale de la masse tumorale d'aspect induré avec bords irréguliers et in

Forme infiltrante : la muqueuse peut paraître normale alors que la tumeur s'est déjà étendue au delà du naso adéno pathie tumoral sans primitif connu parfois masse ou un épaissement

### III .2.Etude anatomopathologique et classification :

Le diagnostic de certitude du cancer du nasopharynx est anatomo-pathologique. Il s'effectue à partir des prélèvements biopsiques orientés sur la tumeur visible à l'endoscopie pharyngée.

Les aspects macroscopiques décrits sont :

**Forme bourgeonnante exophytique et infiltrante :** la tumeur occupe le nasopharynx et envahit les structures, elle est composé de végétations friables et hémorragiques

**Forme ulcérée :** ulcération centrale de la masse tumorale d'aspect induré avec bords irréguliers.

**Forme infiltrante :** la muqueuse peut paraître normale alors que la tumeur s'est déjà étendue dans une adéno pathie.

Plusieurs systèmes de classification des carcinomes du nasopharynx, principalement :

**La classification TNM** : fournit des éléments pronostiques capitaux ( la taille de la tumeur T , l'atteinte ganglionnaire N , l'existence de métastase à distance M , cette classification permet la distinction entre 4 stades d'évolution .( **Annexe III**)

**La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs** : actuellement c'est la classification la plus utilisée, basé sur le degré de différenciation des cellules malignes, trois types de tumeurs ont été décrits :

**Les carcinomes bien différenciés ou type 1** : est caractérisé par des cellules bien différenciées qui produisent de la kératine (**Spano et al, 2003**).

**Les carcinomes non kératinisant ou type 2** : varie dans la différenciation cellulaire mais ne produisent pas de kératine (**Fandi et al, 1994**).

**Les carcinomes indifférenciés ou type 3 de type UCNT** : d'aspect indifférencié ne produisant pas de kératine (**Fandi et al, 1994**).

L'aspect au microscope optique de l'UCNT se traduit par 2 types architecturaux :

Le premier est constitué d'amas bien limités de cellules épithéliales entourées par du tissu fibreux et un infiltrat lymphoïde.

Le deuxième présente une architecture diffuse et un mélange intime entre les cellules néoplasiques et les cellules inflammatoires, ce qui peut entraîner une confusion avec un lymphome malin à grandes cellules.

Les noyaux du carcinome nasopharyngée sont le plus souvent vésiculaires, ronds ou ovales à contours lisses, avec un gros nucléole éosinophile.

L'immunohistochimie permet par ailleurs d'établir le diagnostic différentiel avec certains lymphomes ou autres tumeurs malignes en utilisant un marqueur des cellules épithéliales telle que la cytokératine AE1 AE3 (**Wei, 2005**)

### **III .3 . Epidémiologie descriptive :**

#### **III .3.1 . La répartition géographique :**

La répartition géographique des NPC à travers le monde est en rapport avec l'interaction de facteurs étiologiques : génétiques, environnementaux, diététiques et viraux.

Ce qui laisse présager l'intervention des facteurs socioculturels dans la genèse de ces cancers.

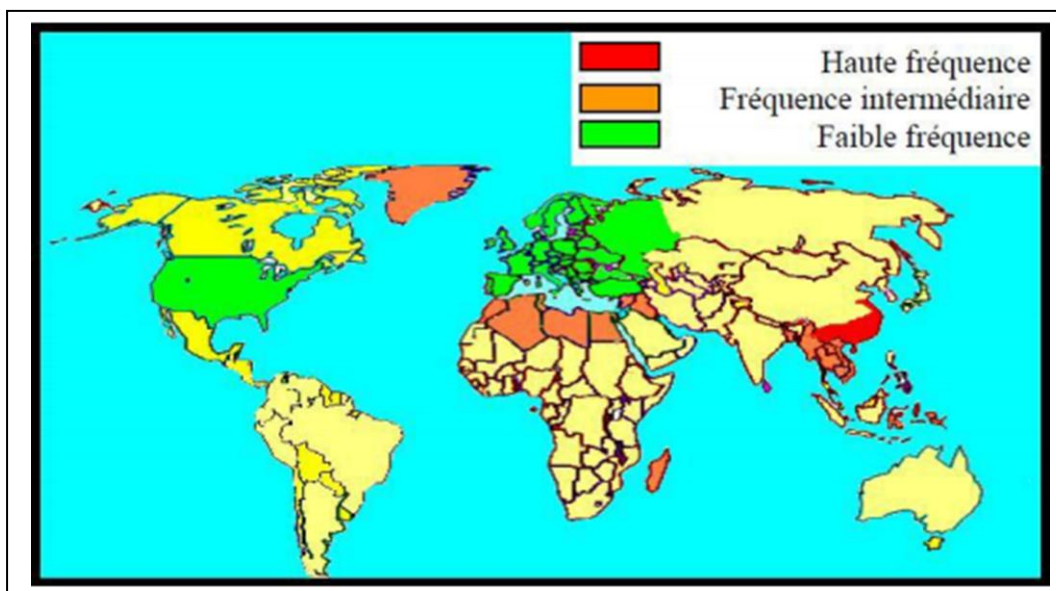
**On distingue 3 niveaux de fréquence :**

**Zones à Haut risque :** Cette maladie est endémique dans les régions où prédomine la forme histologique indifférenciée ou UCNT, tel que le sud –est asiatique et le sud de la chine (Canton) (**Fandi et al., 1994**), Ainsi, dans la région de Canton où l’incidence atteint 25 à 50/100 000 an (**Rivera et al., 2005**).

**Zones à taux intermédiaires :** avec des taux d’incidence qui varient entre 1,5 et 9 cas pour 100 000 habitants/an, sont représentées par le Moyen-Orient, le pourtour méditerranéen, notamment les pays du Maghreb (**Eschwège et al., 2001**)

- **En Tunisie :** l’incidence est de 2,89 nouveaux cas /100 000 habitants par an, chez l’homme et elle est de 1,01 nouveaux cas /100 000 habitants /an chez la femme (**Ellouz et al ., 1991**).
- **Au Maroc :** comme c’est le cas des autres pays du Maghreb, l’incidence du NPC est élevée, avec 5,7 nouveaux cas /100 000 habitants par an (**El Gueddari et Chaouki, 1991, Zeng 1985**)
- **En Algérie :** l’incidence annuelle est de 5.5/105 habitants pour le sexe masculin et de 3/105 habitants pour le sexe féminin (**Salhi, 2009**)

**Une zone à fréquence faible :** En Europe et aux Etats-Unis, le NPC est une maladie plus rare et sporadique avec une incidence inférieure à 1/100000 habitants/an (**Altun et al, 1994**) (**Figure 07**).



**Figure 07 : Répartition mondiale du cancer du cavum (Rakotoarisoa, 2010)**

### III .3.2.La répartition selon âge et sexe :

L'âge moyen de survenue des NPC varie selon la zone géographique et le type histologique indifférencié ou non. Dans les pays du Sud-est asiatique, les NPC sont observés à partir de l'âge de 20 ans avec un pic aux alentours de 50 ans (**Yu et Yuan, 2002 ; Chan et al., 2004 ; Lee et al., 2005**). Dans les zones à risque intermédiaire, comme le Maghreb, la répartition est bimodale avec un premier pic entre 10 et 24 ans et un deuxième à 50 ans (**Jmal et al., 2005 ; Gharbi et al., 1996**). L'atteinte masculine est plus fréquente et le sex-ratio est de 2-3 (**Ayan et Altun, 1996 ; Laskar et al., 2004 ; Daoud et al., 2003**).

### III. 4. Etiologie :

La répartition géographique est en rapport avec l'interaction complexe de facteurs étiologiques génétiques, environnementaux, diététiques et viraux : (**Fandi et al., 1994 ; Boussen et al., 2010**).

#### III. 4. 1 .Facteurs étiologique non viraux :

##### III. 4. 1 .1 .Facteurs génétiques :

L'observation de cas familiaux de CNP suggère une prédisposition génétique au cancer du cavum, en effet il est caractérisé par un ensemble d'anomalies chromosomiques durant son développement et sa progression, en particulier les gains et les pertes du matériel génétique qui proposent l'implication des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur (**Bing-Jian, 2013**).

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 chez les patients chinois (**Chan et al., 2004 ; Feng et al., 2002**). Cette délétion 3p se produit dans la région 3p21.3, zone du gène RASSF1A, ayant un rôle dans la réparation de l'ADN et le contrôle de la prolifération cellulaire dépendante de la voie Ras (**Lo et al., 2002 ; Claudio et al., 2000**).

Les cellules exprimant le cytochrome P450 2E1 CYP2E1 sont très sensibles à la cytotoxicité et aux dommages de l'ADN. Le fait que le nasopharynx exprime le CYP2E1 suggère que ce dernier pourrait jouer un rôle important dans le processus de CNP par des nitrosamines indirectement carcinogènes (**De-Fu et al, 2007**).

Des études cas-témoins sur les antigènes de classes I et II du système HLA (Human Leucocyte Antigène) ont mis en évidence différents marqueurs de susceptibilité pour le NPC. (**Goldsmith et al., 2002**).

### **III. 4. 1. 2. Facteurs environnementaux et diététique:**

Un certain nombre de facteurs environnementaux sont considérés comme favorisant la formation d'un CNP. Historiquement, les facteurs de risque alimentaires ont été suspectés et analysés les premiers (**Yu et al., 1986**).

Le risque alimentaire est particulièrement important lorsque les aliments suspects sont consommés dans la petite enfance, surtout si l'ingestion débute sans transition immédiatement après le sevrage. Il faut ajouter également le risque lié à un régime pauvre en fruits et en légumes (**Feng, 2013**).

Des carcinogènes environnementaux tels que les N-nitrosamines, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines aromatiques qui retrouvent dans les poissons salés, dans de nombreux aliments conservés et dans le tabac, contribueraient à la forte incidence des CNP dans les régions endémiques (**Dhafer, 2013**). Par exemple, pour l'Afrique du Nord, les enquêtes cas-témoins ont montré que la consommation de légumes ou de condiments conservés dans la saumure, ou encore de beurre rance, augmentait le risque de CNP (**Feng, 2007**). Le tabac est également un facteur de risque important dans le cancer du nasopharynx (**Bendjemana et al., 2011**).

### **III. 4. 2 .facteur étiologique viral :**

Les arguments en faveur du rôle étiologique d'EBV dans les CNP sont solides. Les deux principaux : d'une part, la constance d'association entre EBV et les CNP de forme typique indifférenciée (UCNT) quelle que soit l'origine géographique des patients et d'autre part, la présence dans les cellules malignes de produits viraux dont l'activité oncogénique est démontrée expérimentalement (**Gourzones et al., 2013**).

Certains de ces gènes viraux codent des ARN messagers et des protéines, notamment une protéine de localisation nucléaire EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigène 1) et fréquemment 2, protéines de localisation membranaire (LMP1 et 2) (**Gourzones et al, 2013**). Par exemple : L'EBNA 1 est exprimée dans 100 % des cellules tumorales sur des biopsies de NPC (**Khabir et al., 2003**).

III .4. Virus Epstein-Barr et la tumorigenèse des CNP:

L'EBV a un potentiel tumorigène dû à un ensemble unique de gènes latents: les protéines membranaires latentes (LMP1, LMP2A et LMP2B) et les antigènes nucléaires (EBNA1 et EBNA2) sont les protéines principales exprimées dans les NPC (Brooks et al, 1992).

LMP1 est la principale protéine transformante de l'EBV .Elle est présent dans 80% à 90% des CNP ( Wang et al ., 1985) et est détectée principalement dans des lésions préinvasives y compris des dysplasie et le carcinome in situ mais pas au stade tardif ce qui suggère que son expression peut être un évènement précoce ,initiateur de la CNP (Lin et al ., 2008 ; Lee et al, 2000 ) .son expression dans les cellules épithéliales est associée à une gamme d'effets phénotypiques, y compris l'hyperprolifération, l'induction de cytokines pro-inflammatoires, la résistance à l'apoptose, et la motilité accrue des cellules tumorales(Dawson et al ., 2012).

Elle fonctionne comme un membre constitutivement activé de la superfamille du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), activant un certain nombre de voies de signalisation d'une manière indépendante du ligand (Mosialos et al ., 1995) (Figure 08).

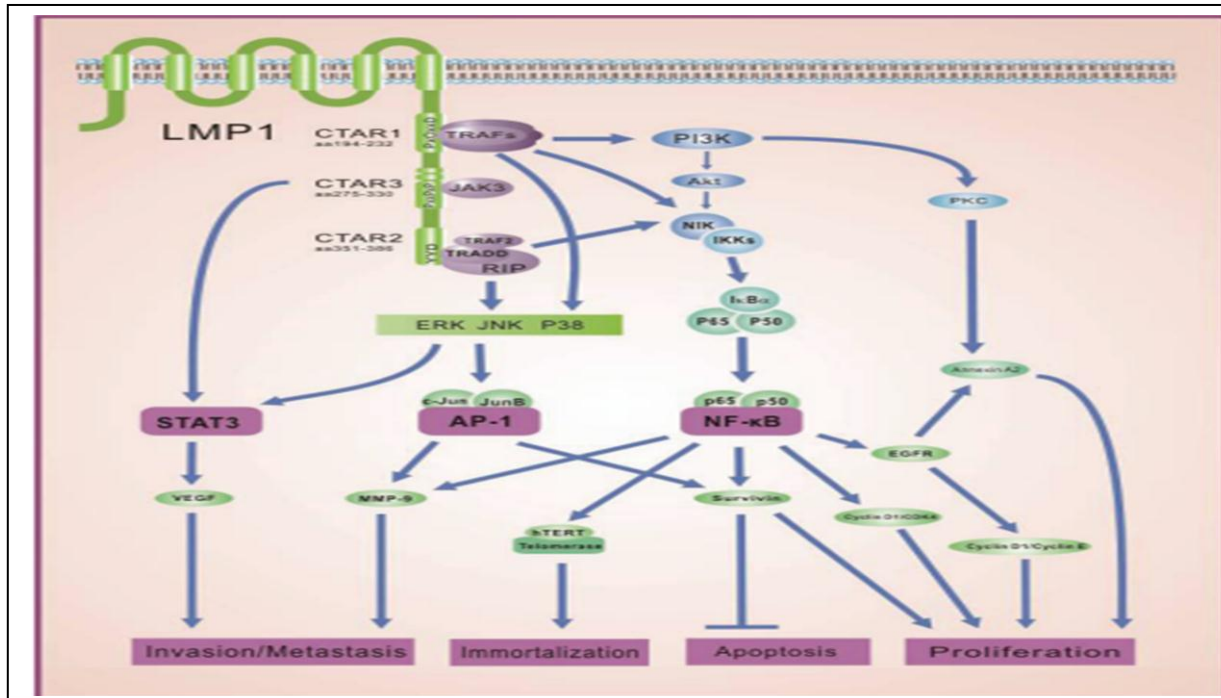


Figure 08: Les voies de signalisation LMP1 dans la carcinogénèse du carcinome du nasopharynx (Hui et al ., 2007).

### **III .5 . L'interaction entre l'immunité de l'hôte et le virus d'Epstein-Barr chez les patients atteints de cancer du nasopharynx :**

#### **III .5 . 1. L'EBV et la réponse innée :**

Les cellules NK sont une composante clé de la réponse immune innée à de nombreux agents infectieux (**Braud et al ., 2002**). Des résultats suggèrent que les cellules NK spécialisées des amygdales, site d'entrée mucosal de EBV, peuvent être efficacement stimulées par les CD activées par EBV et ainsi de limiter la transformation induite par EBV jusqu'à ce que s'établisse le contrôle immunitaire EBV-spécifique (**Dhafer, 2013**).

Les DC conventionnelles (CDC) et les DC plasmacytoïdes (CDP) sont les deux principaux sous-ensembles des DC humains qui détectent les produits de l'EBV à travers les récepteurs de type Toll (**Fiola et al, 2010**) et peuvent favoriser la cytotoxicité des cellules NK à travers les IFN de type I (**Granucci et al ., 2004**).

#### **III .5 . 2. L'EBV et la réponse adaptative :**

##### **III .5 . 2 .1 . La réponse humorale :**

Les anticorps IgG et IgA sont les principales immunoglobulines anti-EBV détectés dans les sérums des patients atteints de CPN qui reconnaissent diverses cibles d'EBV, y compris les antigènes structuraux, lytiques et les antigènes latents (**Young et al ., 2015**). Une élévation de ces anticorps est toujours observée au cours du NPC et un titre élevé est de mauvais pronostic (**Dardari, 2001**)

##### **III .5 . 2 .2. La réponse cellulaire :**

###### **III .5 . 2 .2. 1. Lymphocytes T CD8+ :**

Les lymphocytes cytotoxiques spécifiques de l'EBV circulants peuvent être détectés chez les patients atteints de CNP. Ils sont majoritairement spécifiques des épitopes issus des protéines du cycle lytique, et très peu sont spécifiques d'épitopes d'antigènes latents (**Lee et al., 2000 ; Lin et al., 2008**).

### III .5 . 2 .2. Lymphocytes T CD4+ :

Les cellules T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle central dans le soutien de la production d'anticorps de haute affinité, en maintenant le nombre et la fonction biologique des CTL (**Lin et al, 2008**). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de EBNA1, LMP et BARP1 peuvent être détectés chez les patients atteints de CPN, mais à de faibles niveaux (**Brown, 2010 ; Martorelli et al., 2008**).

### III .6 .Mécanismes d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire :

**Sengupta et al** ont décrit une forte inhibition de l'expression des gènes des molécules de CMH de classe I dans les CNP, qui est fortement corrélée à l'expression des gènes d'EBV (EBNA1, EBNA2, EBNA3, EBNA3B, LMP1, et LMP2A) ce qui suggère une inhibition directe de la présentation antigénique des antigènes d'EBV et facilite l'échappement immunitaire des cellules tumorales.

L'antigène nucléaire EBNA1 est séparé en domaines amino et carboxy terminal par une séquence répétée glycine-glycine-alanine (gly-gly-ala) ; cette séquence est un inhibiteur actif de la présentation restreinte au CMH de classe I et semble fonctionner en inhibant le traitement de l'antigène via la voie ubiquitine/protéosome (**Rowe, 2010**).

Une immunosuppression est observée au site de la tumeur malgré la présence d'une forte proportion de CTLs spécifique de LMP1 et de LMP2. Ceci est dû à la présence des cellules T régulatrices (Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) exerçant un effet immuno-modulateur par la sécrétion de TGFβ (**Kanegane et al., 1999**).

Des études menées sur des exosomes tumorales sécrétées dans les pathologies associées à EBV, notamment dans le CNP, ont montré qu'ils avaient des capacités immunosuppressives et qu'ils constitueraient un des mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire (**Keryer et al., 2006**).

### III .7 .CNP et biomarqueurs :

Un dépistage sérologique extensif a permis d'identifier des titres d'anticorps spécifiques à l'EBV élevés dans les zones à forte incidence; en particulier, les anticorps IgA dirigés contre l'antigène capsidique EBV (VCA) et les antigènes précoces (EA), et ceux-ci se sont avérés utiles dans le diagnostic et dans le contrôle de l'efficacité de la thérapie (**Zeng, 1985** ). En effet, ces modifications sérologiques constituent des biomarqueurs très sensibles, mais trop peu spécifiques (**Gourzones et al ., 2013**).



L'ADN EBV extra-cellulaire est également détecté dans le sang de la plupart des patients ayant un cancer de cavum (**Lo et al., 1999**) indiquant la présence d'un relargage viral dans le sang (**Feng et al., 2000**). Chez les patients initialement positifs, une décroissance rapide de la charge virale pendant la radio-chimiothérapie et dans les jours qui suivent est un élément de bon pronostic. Une autre possibilité d'amélioration pourrait consister à les combiner à d'autres marqueurs viraux non sérologiques, par exemple le dosage des microARN viraux circulants (**Gourzones et al., 2013**).

### III .8. Diagnostic clinique et paraclinique

#### ▪ **Circonstances de découverte :**

Le diagnostic est souvent tardif en raison de la topographie profonde basicranienne peu accessible à l'examen de ce cancer. Cependant, les signes cliniques révélateurs restent variables correspondent à des :

**Symptômes cervicaux :** adénopathie (50 à 90 % des cas) de topographie haute et postérieure, retro mandibulaire et sous-mastoïdienne, souvent bilatérale.

**Symptômes otologiques** (25 % des cas) traduisant une obstruction tubaire unilatérale : hypoacousie et bourdonnements. Toute otite séreuse unilatérale doit faire rechercher un cancer du cavum.

**Symptômes rhinologiques** (20 % des cas) obstruction nasale et épistaxis ou rhinorrhée séro sanglante.

**Symptômes neurologiques** (10 à 15 % des cas) à type d'algies (neuralgies du V ou du IX, céphalées persistantes) ou de paralysies oculomotrices.

#### ▪ **Examen clinique**

L'examen du cavum par rhinoscopie antérieure et postérieure est facilité par l'emploi d'un fibroscope. (Endoscopie nasopharyngée). La tumeur est visualisée :

-Sa localisation est le plus souvent latérale ou postero-supérieure.

-Son aspect est ulcéro-bourgeonnant ou infiltrant.

- La tumeur est par la suite biopsiée

#### ▪ **La biopsie**

Le diagnostic du NPC est établi à partir des prélèvements biopsiques du site tumoral suspecté réalisés sous endoscopie nasopharyngée (NP), l'étude histologique permet le diagnostic de certitude et précise le type histologique. Actuellement, une évaluation de l'implication de l'EBV, incluant l'évaluation des petits ARN codés EBV (EBER), la protéine

membranaire latente 1(LMP1) et l'antigène nucléaire EBNA1 sont recommandés (**Xiao et al, 2015**)

### ▪ Bilan d'extension

Il a pour objectif d'évaluer l'extension locale, régionale et à distance du cancer du cavum, ce bilan est indispensable pour évaluer le stade de la maladie et guider la conduite thérapeutique. Il est fait en milieu spécialisé et doit rechercher des signes d'envahissement des structures voisines, notamment une atteinte osseuse basicranienne par les examens cliniques (adenopathie, atteinte des paires crâniennes), audiométriques et imagerie (TDM avec contraste et IRM) ; des métastases principalement osseuses mais également pulmonaires et hépatiques (scintigraphie osseuse et échographie abdominopelvienne) (**Pr. Latreche**).

### III. 9. Traitement :

Pour les CNP ,le traitement standard est la radiothérapie (**Al-Sarraf et al ., 1998** ) ,Pour les formes localisées, la guérison a un prix élevé en raison des séquelles de la radiothérapie (sécheresse buccale, sclérose sous-cutanée et musculaire cervicale) (**François et Pierre, 2013**) .mais la chimiothérapie adjuvante concomitante améliore les taux de survie ( **Al-Sarraf et al., 1998** ) ,elle a progressé pour son propre compte, notamment grâce à l'utilisation des dérivés du platine, des taxanes ou de la gemcitabine, mais sans empêcher toutes les rechutes métastatiques viscérales ou osseuses (**François et Pierre, 2013**)



# **Matériel et méthodes**

L'étude a été réalisée au niveau du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du centre Hospitalo-Universitaire Issad Hassani de Béni Messous, durant une période de 5 mois de février à juin 2018.

Notre travail a ,dans un premier temps , porté sur la collecte des données à partir des fiches de renseignements correspondant à 15 patients colligés en rétrospectif sur une période de 03 ans (2015-2017) et par la suite à la réévaluation histologique des cas d'UCNT déjà diagnostiqués par technique anatomopathologique standards (coloration d'hématéine-éosine) appuyée par une analyse immunohistochimique au besoin.

Nous avons étudié principalement l'expression de la protéine par technique immunohistochimique à l'aide de l'anticorps anti -LMP1sur des prélèvements biopsiques fixés au formol et inclus en paraffine.

Le profil sociodémographique de la population a été également étudié.

### **I. Matériel :**

#### **I.1. Matériel biologique**

Il s'agit d'une étude rétrospective, ayant intéressée 15 cas porteurs d'UCNT diagnostiqués sur des prélèvements biopsiques.

#### **I .2 .Matériel non biologiques :**

Les appareils, les réactifs et les solutions utilisés sont mentionnés dans (**Annexe I et VIII**).

### **II. Méthodes**

- Technique usuelle (standard) et coloration hématoxyline-éosine (HE) pour une 2<sup>ème</sup> lecture histologique (diagnostic positif du carcinome indifférencié de nasopharynx).
- Immunohistochimie diagnostique à l'anticoprs anti CKAE 1 AE3 pour la mise en evidence des cellules tumorales
- Expression de la protéine virale LMP1 par l'anticorps anti-LMP 1 par technique immunohistochimique.
- Etude statistique réalisée à partir d'une fiche d'exploitation des données anatomocliniques (âge, sexe, type histologique de cancer, l'expression immunohistochimique de protéines cellulaire) annexe.

### II .1. Mode opératoire :

Les prélèvements biopsiques ont été enregistrés et ayant reçu un numéro d'identification unique. Celui-ci est retranscrit sur les blocs et les lames, qui ont été examinées au microscope après le traitement technique du prélèvement.

La technique de base (standard) comporte plusieurs étapes : la fixation, la circulation l'inclusion en paraffine, la confection de coupes et leur coloration.

### II .2.Etude histologique de l'UCNT :

#### II .2.1.Définition :

L'étude histologique représente une étape cruciale de l'analyse anatomopathologique, à l'aide de la coloration HE (coloration standard de routine), elle consiste à observer au microscope optique les prélèvements tissulaires.

L'étude a été réalisé sur des prélèvements biopsiques de 15 patients atteints d'UCNT dans le but de confirmer le diagnostic, de préciser le type histologique UCNT, d'identifier la nature et l'architecture des cellules tumorales et ainsi que de déterminer le stroma tumoral au sein de la tumeur.

#### II .2.2. Mode opératoire :

**1-Fixation des prélèvements :** La fixation est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate. Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible (dessiccation et/ou autolyse du tissu).

Elle est destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires, dans un état aussi proche que possible de leur état vivant.

Le fixateur le plus utilisé est le formol à 10 %, son principe repose sur le fait qu'il réagit avec les groupements aminés des protéines et altère le moins les sites antigéniques.

Les principales exigences de la fixation des prélèvements :

- ✓ Immersion dans un liquide.
- ✓ Rapport pièce /fixateur : 1/10
- ✓ Fixateurs performants.
- ✓ Formol à 10%
- ✓ Epaisseur inférieur à 5 ou 10 mm

- ✓ La durée de fixation est variable (quelques heures suffisent donc pour fixer les petits fragments).

(Une surfixation ou une fixation insuffisante altère les sites antigéniques)

Etapes techniques :

Une fois la fixation achevée, les fragments biopsiques sont déposés dans des cassettes en plastique bénéficient des étapes techniques :

### **1-Mise en circulation :**

La circulation est une étape qui consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides grâce à l'appareil de circulation automatique.

Les étapes de la circulation :

### **Déshydratation :**

Elle consiste à débarrasser le tissu de l'eau pour préparer le terrain à la paraffine qui n'est pas miscible à l'eau de fixateur, par passage dans des bains d'alcool éthylique à concentration croissante (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°).

Facteurs influant sur la déshydratation :

La concentration de l'alcool (croissante) ; volume total de l'agent déshydratant (grandes quantités d'éthanol) ; agitation (déshydratation plus rapide) ; durée ; chaleur ; taille de l'échantillon.

#### ▪ **Eclaircissement :**

Elle Consiste à remplacer l'éthanol dans le tissu par le toluène (passage dans 3 bains de toluène), solvant désalcoolisant, car l'alcool éthylique n'est pas miscible à la paraffine, ce qui permet l'imprégnation à la paraffine à 56 °c et l'obtention d'un tissu plus transparent.

#### ▪ **Imprégnation :**

C'est la Pénétration de paraffine liquide à 56°C dans le tissus (passage dans 2 bains de la paraffine fondue);pour obtenir une bonne consistance du tissu.

### **2-Enrobage (inclusion) :**

C'est une étape qui suit la circulation et permet de fournir un support externe pendant et après la coupe.

### Principe :

- ✓ La mise en blocs nécessite des moules qui peuvent être de plusieurs types : ceux utilisés au service sont en métal, qui sont chauffés légèrement à 45°C sur une plaque chauffante.
- ✓ Les prélèvements sont déposés dans les moules à l'aide de pinces chauffées. Puis la paraffine est placée dans ces petits moules, à température ambiante, ce qui provoque la rigidification des fragments tissulaires qui sont mis ensuite dans des cassettes pour obtenir des blocs de paraffine.

### 3- Coupe et étalement :

Les prélèvements tissulaires inclus en paraffine sont coupés au microtome en rubans de 4 à 5 µm d'épaisseur.

Ces derniers sont étalés dans un bain marie pour dissoudre la paraffine, puis on les récupère avec les lames (sans oublier de graver le numéro de dossier sur les lames).

Le séchage des lames se fait dans l'étuve à 58 °c pendant 1h pour favoriser l'adhésion de ces rubans sur les lames et pour le déparaffinage externe.

### 4-Coloration :

L'hématéine éosine (HE) c'est une coloration de base (coloration de routine) qui permet de colorer les noyaux en bleu et le cytoplasme en rose.

Elle reconnaît 3 étapes :

#### 1-E tapes préparatoires à la coloration:

##### Déparaffinage:

Cette étape sert à enlever la paraffine du tissu pour que les colorants puissent le pénétrer, pour cela on utilise du toluène (3 bacs de toluène, 5 min).

##### Réhydratation :

Elle a pour but de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau. On utilise de l'éthanol à concentration décroissante (100% ,90%, ,70% ,2 bacs d'alcool 100% ,1 bac

d'alcool 90% ,1 bac d'alcool 70 % 3 min pour chaque un) et on termine par un traitement de 3 à 5 minutes à l'eau courante pour éliminer l'alcool.

### 2-Etape de la coloration:

Coloration avec l'Hématéine de Harris pendant 15min puis Lavage à l'eau du robinet pendant 5min

Coloration dans la solution d'Eosine pendant 15 secondes à 2 min, suivi d'un rinçage à l'eau courante.

Déshydratation en utilisant 4 bacs d'alcool de concentration croissante (70%, 90% ,100% ; 1min pour chaque'un) puis éclaircissement par immersion dans des bacs de toluène (3fois)

### 3- Etape préparatoire au montage :

Etape qui consiste à fixer à l'aide d'une substance (Eukit), une lamelle sur un prélèvement après la coloration afin de fixer le parenchyme sur la lame.

### 4- Lecture au microscope optique et interprétation des cas

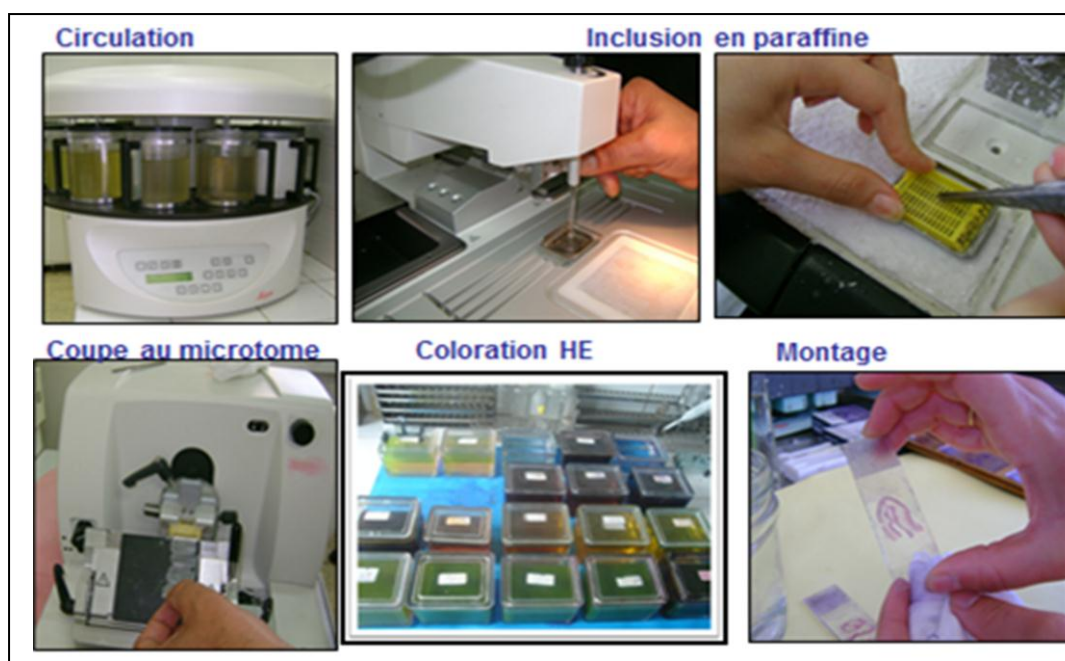


Figure 09: Techniques standards d'anatomie pathologique (étapes technique)



### II .3. Immunohistochimie :

Nous avons eu recours à l'immunohistochimie dans un but de diagnostic des cas pour confirmer la présence des cellules tumorales et l'origine épithéliale par l'anticorps anti Cytokératine AE1/AE3 p (Tableau)

Tous les cas ont bénéficié de la recherche de la protéine virale LMP1.

#### II. 3. 1. Principe d'Immunohistochimie :

L'immunohistochimie est une méthode morphologique permettant de localiser des antigènes dans les tissus ou les cellules ,par des anticorps mono- ou polyclonaux dirigés de façon spécifique contre ces antigènes, et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré.

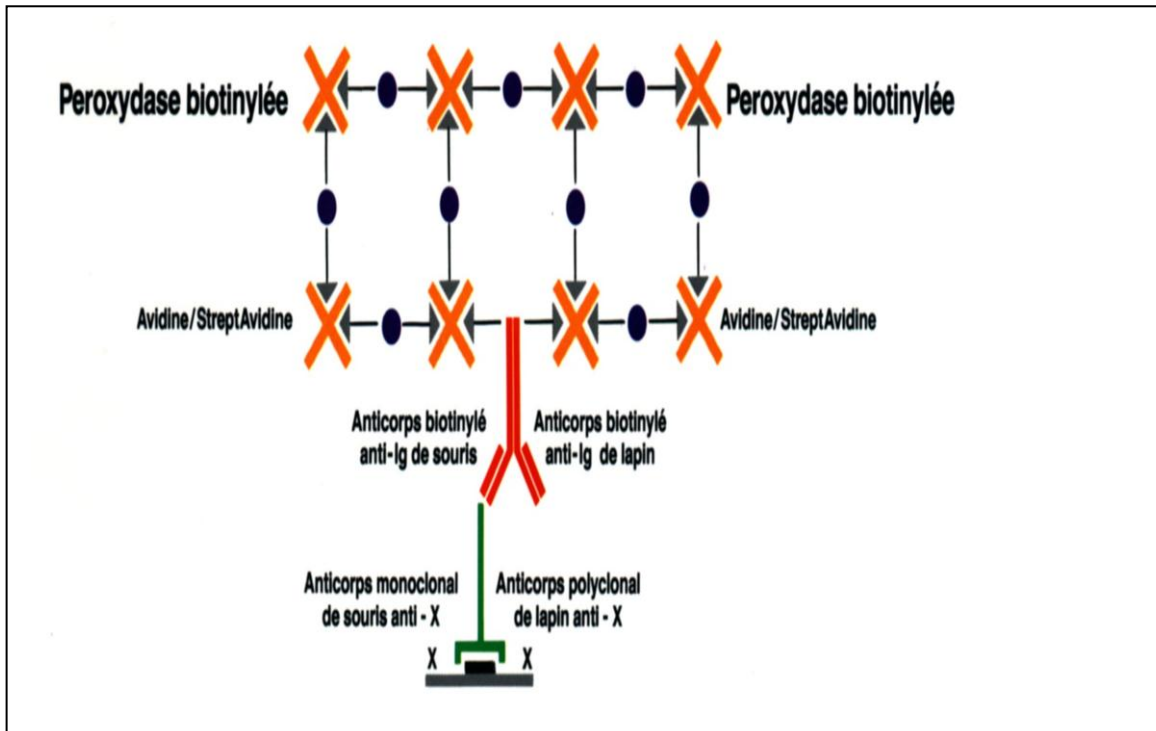


Figure 10 : Principe de la technique immunohistochimique

### II. 3. 2. Mode opératoire

#### Etape 1 : Préparation des lames

##### Coupe et étalement :

Les coupes histologiques sont réalisées à partir des blocs de paraffine préalablement préparé pour l'étude histologique. Chaque coupe doit avoir une épaisseur appropriée (environ 3  $\mu\text{m}$ ) et être placée sur une lame silanisées (chargée positivement, pour une meilleure adhérence des tissus) puis incubées dans l'étuve à 50°C pendant 24 h (séchage).

##### Déparaffinage et Réhydratation :

Les coupes de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine doivent être soumises à un déparaffinage au toluène (3 bains, 5 min pour chacun), et une réhydratation à l'éthanol de concentration décroissante (100%, 90%, 70% 3 bains, 5 min pour chacun) puis un rinçage à l'eau distillée pendant 5 min pour éviter la contamination de TRS (Target Retrieval Solution).

##### Démasquage antigénique par la chaleur au bain marie (prétraitement) :

- Transférer les lames dans le bac de solution de démasquage préchauffée TRS, puis incuber dans le bain marie à 95°C, 98°C pendant 35 min, cette étape vise à briser les ponts créés par le formol lors de la fixation afin de rendre des sites antigéniques accessibles.
- Sortir le bac du bain marie et laisser refroidir sur la paillasse pendant 30 min.
- Transférer le portoir dans un bac d'eau distillée afin d'éviter un choc thermique
- Lavage en TBS (solution de lavage) .

#### Etape 2 : immunomarquage : la protéine virale LMP1

Les coupes sont cerclées à l'aide du DAKO Pen pour éviter le débordement des différents réactifs lors de la manipulation.

##### ▪ Blocage de peroxydase endogène :

Les peroxydases endogènes sont des enzymes responsables de l'apparition d'un marquage non spécifique faussant l'interprétation du profil IHC, d'où la nécessité de bloquer leur activité en utilisant une solution de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### Principe :

- ✓ Appliquer suffisamment de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour recouvrir le tissu et mettre à incuber pendant 5 minutes dans le peroxyde d'hydrogène puis rincer en eau distillée (1min)
- ✓ Placer les lames dans un bain de TBS propre (lavage).
- **l'anticorps primaire anti-LMP1 :**
- ✓ Appliquer l'anticorps primaire (Anti- LMP1) sur les coupes pendant 35min (Dans une chambre humide).
- ✓ Rincer en TBS (3 bacs successives).

- **l'anticorps secondaire HRP :**

Appliquer l'anticorps secondaire HRP (LABELLED polumer-HRP anti-mouse) sur les lames pendant 30 min (une chambre humide).

Rincer au TBS (3 bacs successif 5min).

**Tableau 1: les anticorps utilisés au cours de l'immunohistochimie :**

L'anticorps	Clone	Type	Laboratoire	Référence	Dilution
Primaire (anti-LMP1)	CS ,1-4	Monoclonal Mouse	Dako	IR735	Pré dilué
Secondaire(HRP)		Polymère d'enzyme	Dako	SM802	pré dilué

- **Révélation :**

La révélation est réalisée en utilisant un mélange dilué constitué d'une goutte de chromogène brun et 1 ml de la solution DAB (Diamine Benzidine, Référence K8000).

Le but est d'oxyder le DAB par HRP qui est en cas de positivité aboutit à l'apparition d'un précipité brun visible en microscopie optique dont l'intensité est d'autant plus importante que l'antigène est présent à la surface membranaire.

### Principe :

Appliquer la DAB sur les lames pendant 5 à 10 min

Rincer à l'eau distillée.

▪ **La contre coloration à l'hématoxyline :**

Cette étape rend possible le repérage topographique du marquage IHC et permet la mise en évidence des autres constituants cellulaires.

**Principe :**

Contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer

Rinçage à l'eau courant

Différenciation à l'eau ammoniacuée et rinçage à l'eau distillée afin de colorer le noyau en bleue.

Déshydratation à l'alcool et éclaircissement au toluène.

▪ **Montage**

Les coupes de tissus colorées sont montées à l'aide d'un milieu de montage aqueux de type Eukit et une lamelle (20x40mm) est ensuite posée sur les lames.

▪ **Lecture :**

Observation sous microscope optique au grossissement (x10, x40, x100) et iconographie.

**Tableau 2 : Les principaux réactifs utilisés au cours de l'immunohistochimie**

Les réactifs	Référence	Rôle	laboratoire	dilution
<b>TRS</b> (TARGET RETRIEVAL SOLUTION)	DM828	Démasquage antigénique	Dako	Prédilué (50X)
<b>TBS</b> (Wash Buffur)	K8000/K8002 K8007/ K8010 K		Dako	prédilué
<b>Peroxidase Blocking</b>	SM801	L'accessibilité de site antigénique par l'élimination des groupements chimiques.	Dako	prédilué

## Matériel et méthodes

<b>DAB</b>	+	K8000	Révélation	Dako	Une goutte de substrat /1ml de solution
<b>Chromogène</b>		K8002			
		K8010			
		K8012			
		K8023			
		K8024			



**RESULTATS**

## I .Difficultés et limites de l'étude :

La limite de ce travail est la petite taille de l'échantillon et son caractère rétrospectif, en particulier le manque de certaines données tels que les détails sur l'origine géographique, le niveau socio-économique, les antécédents et certains paramètres biologiques.

## II. Caractéristiques épidémiologiques :

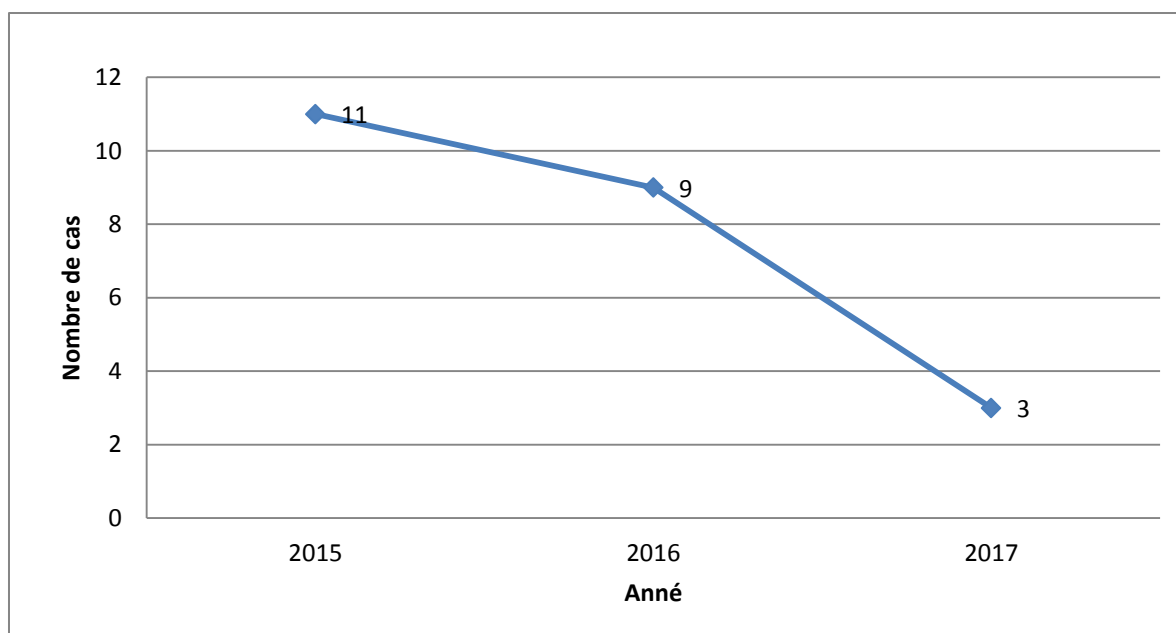
### II.1. Répartition selon les années :

**Tableau 3: Répartition des patients selon les années**

	2015	2016	2017
Nombre des cas	11	9	3

Le nombre total de nouveaux cas de l'UCNT recruté dans le centre CHU Issaad Hassani de Beni Messous atteint 23 cas entre 2015 et 2017. En raison de la disponibilité d'anticorps, on a sélectionné seulement 15 cas pour l'étude.

En ce qui concerne l'évolution annuelle du nombre de nouveaux cas de l'UCNT reste variable d'une année à l'autre avec un maximum de cas retrouvé en 2015 (11 cas), a diminué de manière observable en 2017 (**Figure 11**).



**Figure 11 : Répartition annuelle des nouveaux cas de l'UCNT pendant la période 2015-2017**

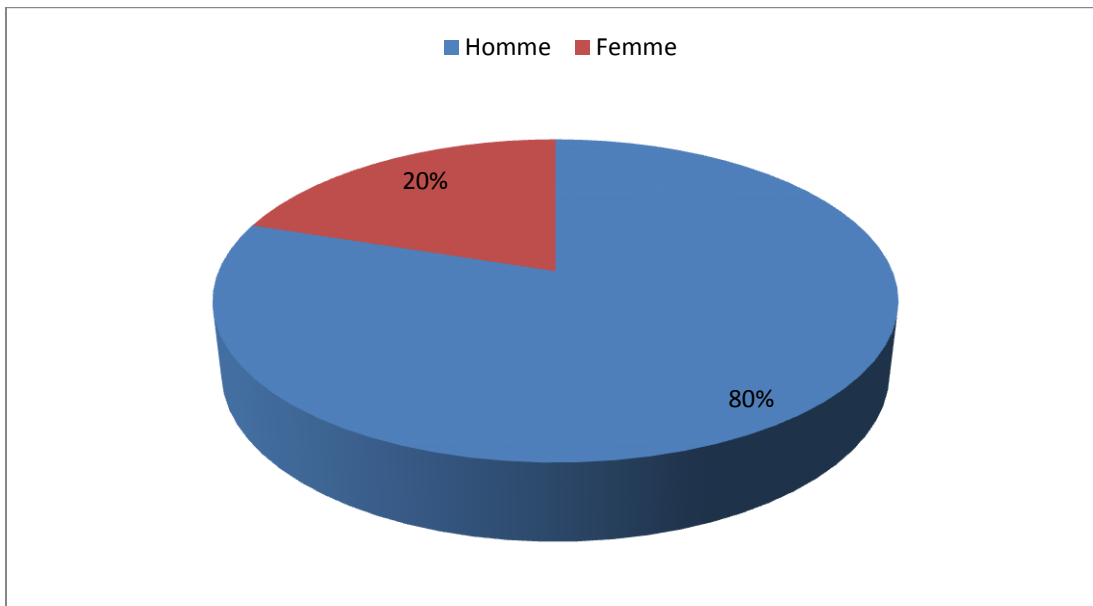
## II. 2. Répartition des patients selon le sexe :

**Tableau 4 : Répartition des patients selon le sexe.**

Sexe	Nombre des cas	Pourcentage
Homme	12	80%
Femme	03	20%
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>100%</b>

La répartition des cas selon le sexe montre que le cancer l'UCNT est plus fréquent chez les hommes avec 80%( 12 cas) que chez les femmes avec 20% (3 cas), un sexe-ratio de 4 H/F (figure 12)





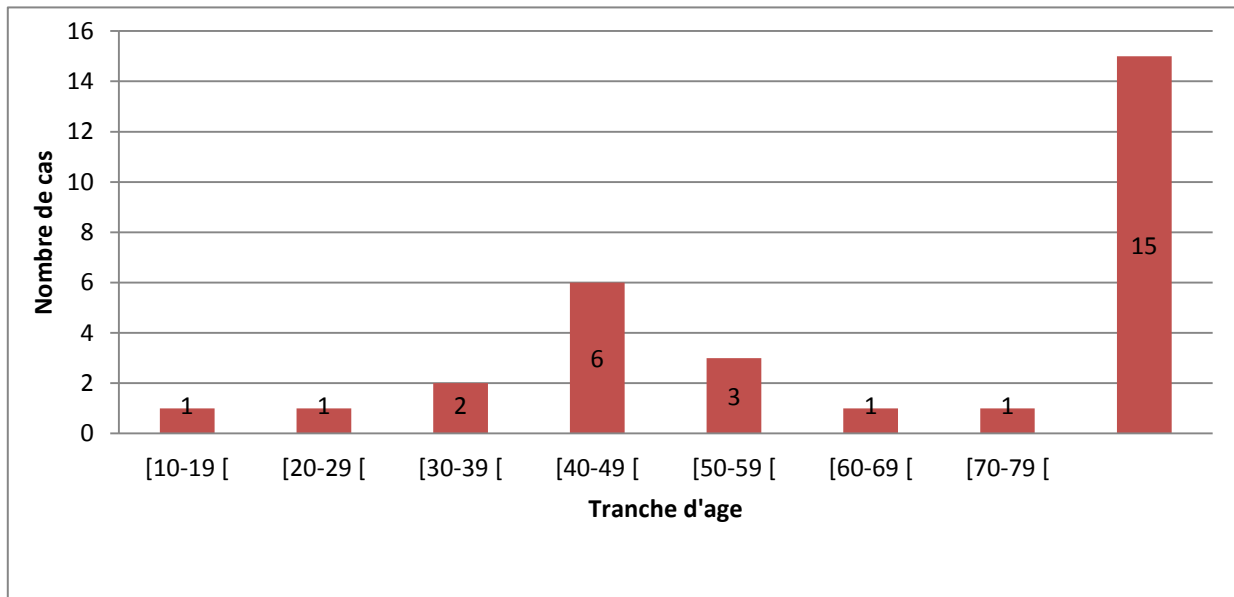
**Figure 12 : Répartition des cas en fonction du sexe.**

**II. 3. Répartition des patients en fonction de l'âge :**

Tranche d'âge	Nombre	Pourcentage %
[10-19[	1	6.6%
[20-29[	1	6.6%
[30-39[	2	13.3%
[40-49[	6	40 %
[50-59[	3	20 %
[60-69[	1	6.6%
[70-79[	1	6.6%

**Tableau 5 : Répartition des malades par tranche d'âge**

La moyenne d'âge est de 40,8 ans avec des extrêmes de 10 et 67 ans ; les tranches d'âge 40-49 et 50-59 étant les plus atteintes avec des fréquences respectives de 40 % et 20% (Tableau 5, Figure 13).

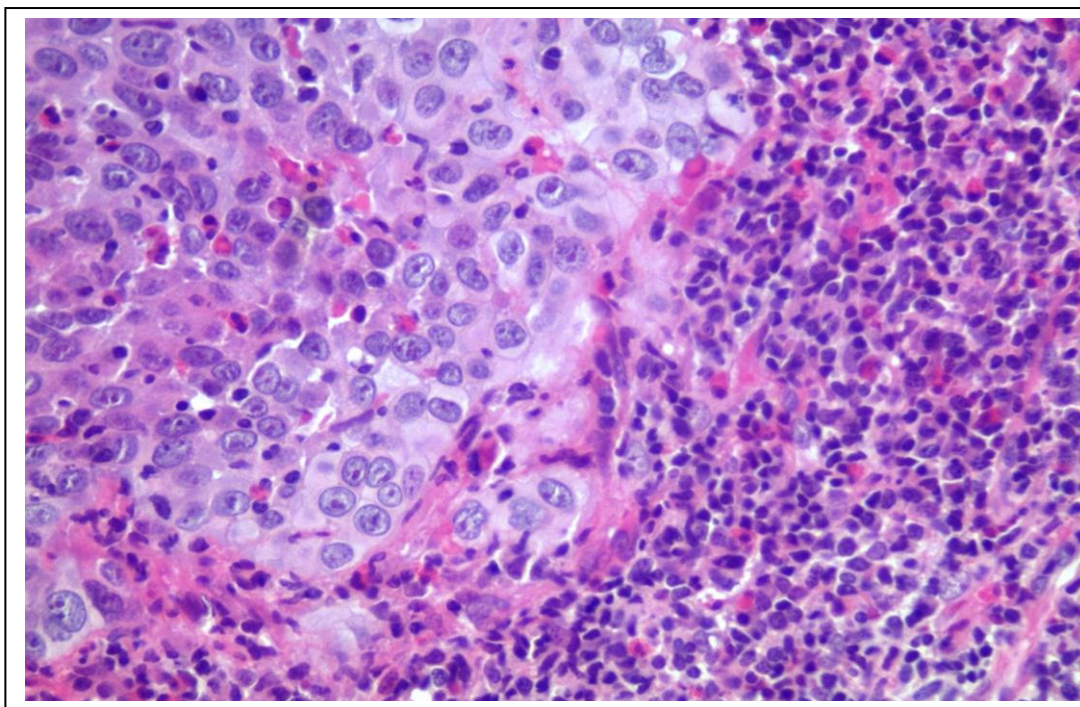


**Figure 13 : Répartition des cas en fonction de l'âge**

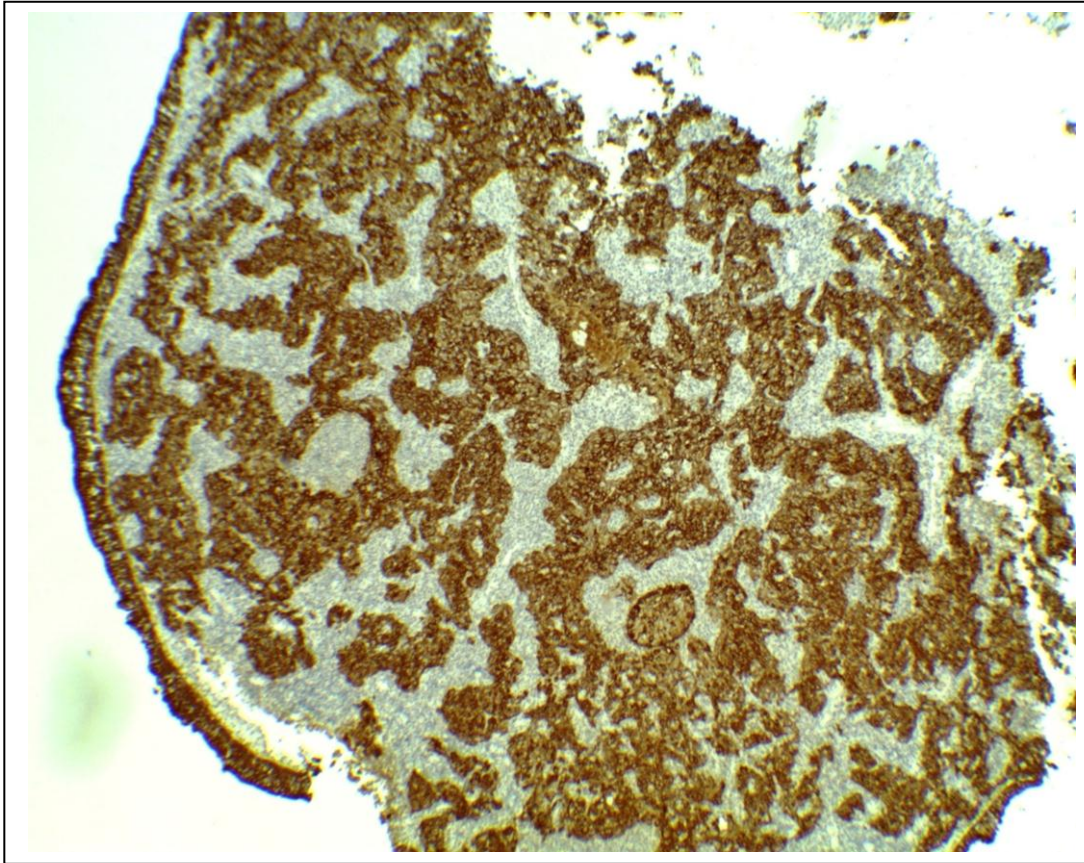
### III .Caractéristiques anatomopathologiques

#### III .1. Evaluation histologique

- Le type histologique UCNT a été confirmé chez les 15 patients à l'aide de la coloration HE (**Figure 14**).
- 09 cas d'entre eux ont été validés par la CK AE1 AE3 (**figure 15**).



**Figure 14 : Aspect histologique de carcinome indifférencié du nasopharynx (amas de cellules tumorales + stroma lymphoïde), HE GX400**



**Figure 15 : Immunomarquage de la cytokératine dans les cellules indifférencié du nasopharynx**

### **III .2. La mise en évidence de l'EBV par la technique d'immunohistochimie :**

L'évaluation des coupes en immunohistochimie est basée sur la présence ou l'absence d'un marquage positif se traduisant par une coloration marron membranaire et cytoplasmique.

**Tableau 06 : les résultats de l'immunomarquage de l'EBV**

	N° de patient	Age	Sexe	Histologie	Immunomarquage EBV
<b>1</b>	15/754	53	M	UCNT	+
<b>2</b>	15/10163	10	F	UCNT	+
<b>3</b>	15/3398	44	M	UCNT	+
<b>4</b>	15/1580	64	M	UCNT	+
<b>5</b>	15/4308	46	M	UCNT	-
<b>6</b>	15/2006	/	M	UCNT	+
<b>7</b>	16/4690	/	F	UCNT	-
<b>8</b>	16/10315	51	M	UCNT	+
<b>9</b>	16/4810	76	M	UCNT	-
<b>10</b>	16/1216	42	F	UCNT	-
<b>11</b>	16/4918	45	M	UCNT	+
<b>12</b>	16/11053	34	M	UCNT	+
<b>13</b>	17/6985	22	M	UCNT	+
<b>14</b>	17/3576	/	M	UCNT	+
<b>15</b>	17/5514	/	M	UCNT	+

## III .2. 1 .EBV et l'UCNT :

Sur les 15 cas, 11 cas expriment la protéine LMP1 soit 73% EBV+ et 4 cas ne l'expriment pas soit 27% EBV- (Figure16, Figure17)

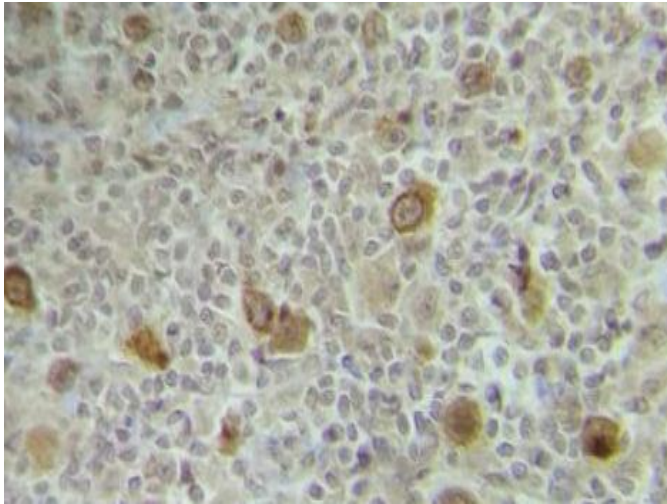


Figure16 : IHC :

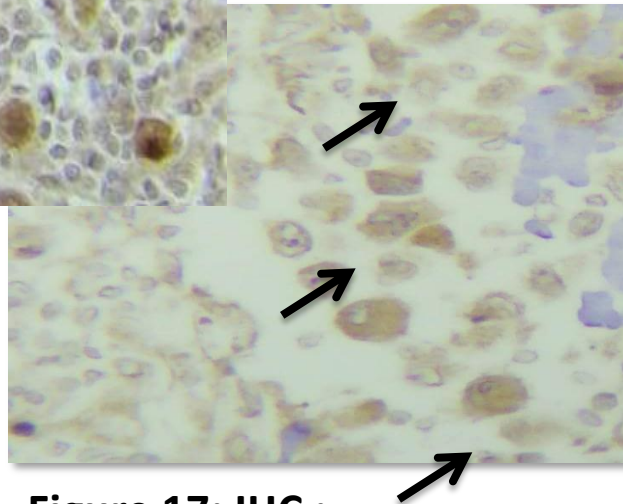


Figure 17: IHC :

## III .2. 2 .EBV et sexe :

- L' EBV-positif domine chez les hommes avec 90% des cas.
- L'EBV n'est exprimé qu'est plus élevé que les femmes avec 9,09 %.

	EBV+	EBV-	total
F	1	2	3
H	10	2	12
Total	11	4	15

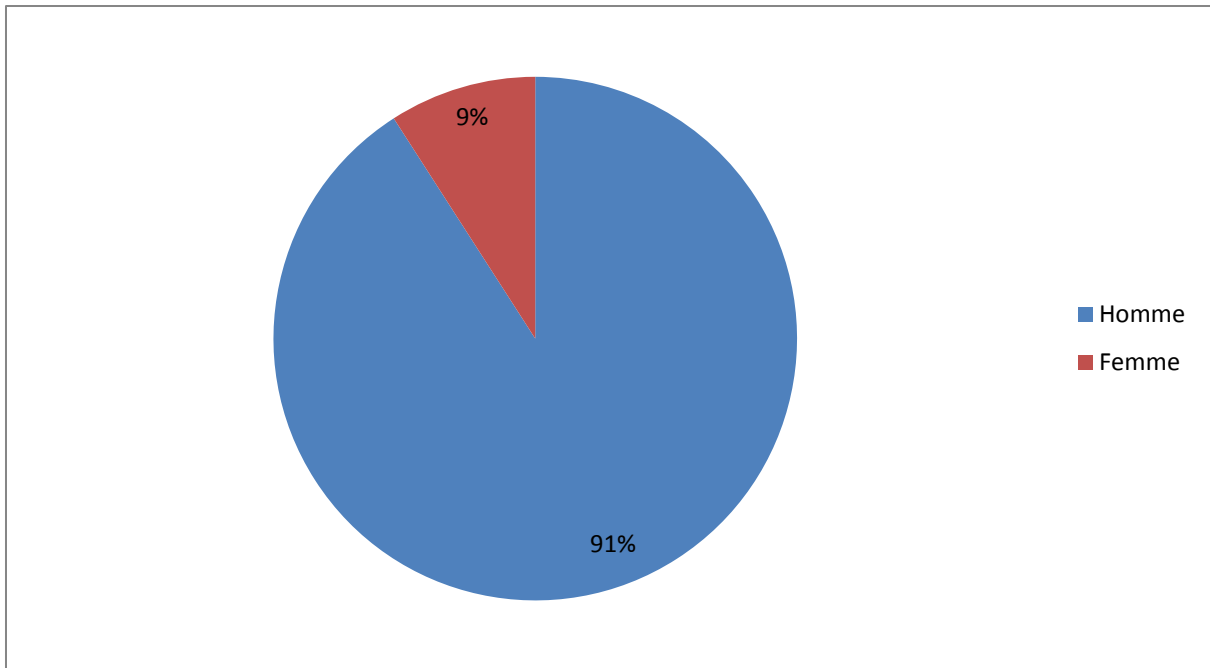


Figure 18 : La répartition des cas EBV-positif selon le sexe

III .2. 3. EBV et l'âge :

La répartition des cas EBV –positif selon les tranches d'âge montre que la classe [40-49[est la plus infectée par l'EBV (Figure 19 ).

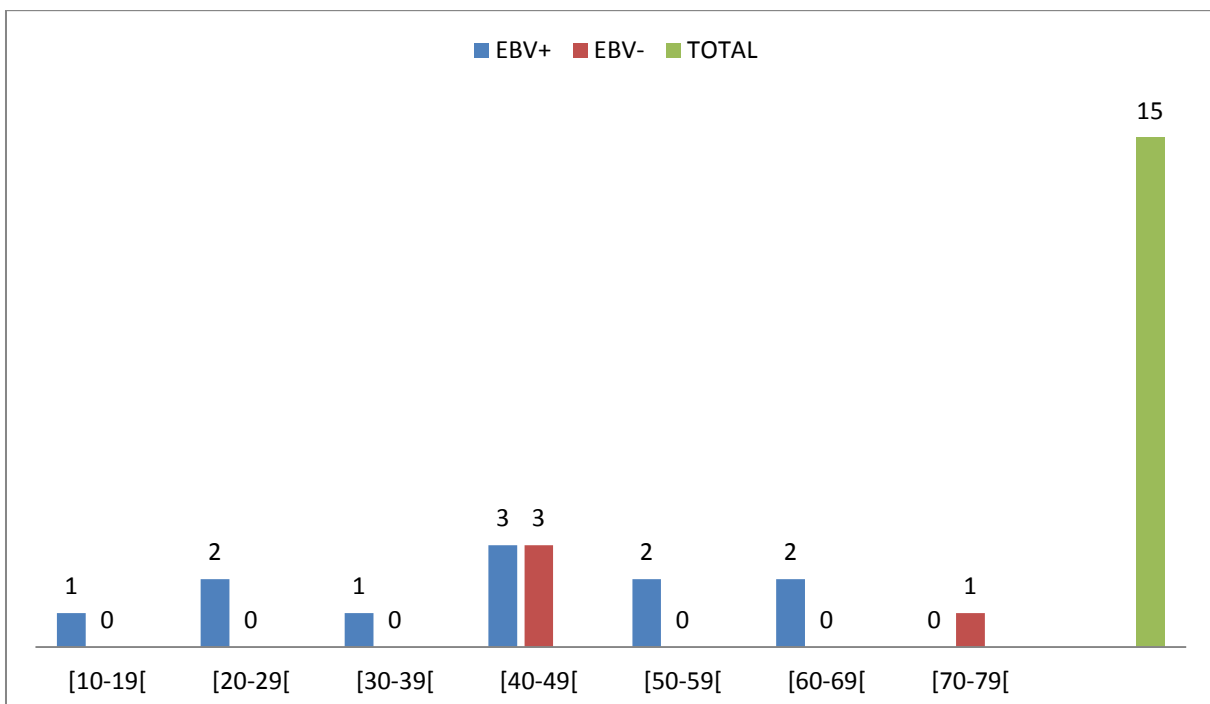


Figure 19 : la répartition des cas EBV- positif et négatif selon les tranches l'âge



**DISCUSSION**

### **Discussion :**

L'infection par le virus d'Epstein Barr est un événement important dans la pathogénèse du carcinome du nasopharynx en particulier dans le sous type non kératinisant indifférencié appelé communément UCNT. Une tumeur maligne de la lignée épidermoïde cervico-faciale, considéré comme le type histopathologique dominant dans les zone à haute risque.

La protéine membranaire latente LMP1 codée par l'EBV est connue pour avoir des propriétés oncogénique lors de l'infection latente dans les NPC.

Notre travail a porté sur des prélèvements biopsiques de 15 patients porteurs d'UCNT.

L'objectif principal était l'étude de l'expression de la protéine virale LMP1 par technique immunohistochimique sur tissus fixés et inclus en paraffine, témoignant du rôle oncogène de l'EBV.

### **I. Les caractéristiques sociodémographiques :**

#### **I.1. L'aspect épidémiologique de l'UCNT :**

Le carcinome du nasopharynx pose un réel problème de santé publique dans le monde, il se distingue des autres tumeurs de la tête et du cou par ses aspects histopathologique, ses caractéristiques cliniques et son spectre épidémiologique qui lui sont propres.

La fréquence de ce type de cancer dans le monde est répartie selon un mode endémique avec des zones de haut, intermédiaire et bas risque (**khanfir, 2006**), principalement les foyers de haute incidence se situent en Extrême-Orient et en Chine du sud où l'incidence est de 30 à 80/100000.

Il existe également des zones d'incidence intermédiaire telle que les pays de bassin méditerranéen (Maghreb) (**Arfaoui, 2007**).

En Algérie, l'UCNT est l'un des cancers les plus important voire le premier cancer ORL avec une incidence moyenne de 8 à 12 /100000 habitants (**Bendjemana et al, 2011**) et de 5,5 /100000 habitants pour le sexe masculin, 3/100000 habitants pour le sexe féminin.

La population masculine est significativement plus atteinte avec 80 % que la population sexe féminine avec 20 % (sex-ratio=4)

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature (**Sidler et al, 2010**), l'étude a porté sur une série de 34 patients atteints d'UCNT entre 1990-2005 , indique que le nombre



des hommes est plus élevé avec 70,58 % (24 cas) que les femmes avec 29,41 % (10 cas) et un sex-ratio= 2,4 .

La moyenne d'âge est de 40,8 ans avec des extrêmes de 10 et 67 ans avec une prédominance dans la tranche 40 et 49 ans,

Nos données restent superposables avec l'étude de **Bouzidi et Lounici, 2014**, malgré la taille de l'échantillon qui est plus importante : 127 patients, tranche d'âge [40-49[ atteinte dans 28,34% suivie de la tranche d'âge [50-59[ avec 23,6% des cas.

L'étude de **Bendjemana et al, 2011** a rapporté une association entre la consommation du tabac et le risque de développer un NPC,

**Amour et al, 2003** rapportent que l'alcool à lui seul ne serait pas cancérigène mais il facilite le contact entre les cellules profondes (basales) des muqueuses aérodigestives supérieures et les cancérigènes chimiques contenus dans la fumée du tabac ou les aliments.

Malheureusement, nous n'avons pas pu vérifier ces facteurs de risque en raison du manque de renseignements informatifs et le caractère rétrospectif de l'étude.

### **I.2. L'EBV :**

La relation entre le virus d'Epstein-Barr (EBV) et certains cancers e provenant à la fois de cellules lymphoïdes et épithéliales est bien établie.

Environ 95% de la population mondiale souffre d'une infection asymptomatique à vie avec l'EBV. Le virus persiste dans le pool de lymphocytes B mémoires d'individus normaux en bonne santé, et toute perturbation de cette interaction entraîne des tumeurs à cellules lymphoïdes B associées au virus tels que le lymphome de Burkitt et les syndromes myélo-prolifératifs.

L'association de ce virus avec les tumeurs à point de départ des cellules épithéliales, spécifiquement le carcinome du nasopharynx (NPC), est actuellement causée par l'établissement aberrant de la latence virale dans les cellules épithéliales (**Lawrence et al, 2014**).

#### **I.2.1. L'EBV et sexe :**

Notre étude suggère que l'infection par l'EBV est significativement plus fréquente chez les hommes avec 91 %, que les femmes avec 9,09 %. Ces résultats peuvent être expliqués par la

consommation accrue de tabac par les hommes qui est un facteur de risque impliqué dans la carcinogénèse des NPC. Récemment une étude basée sur des données épidémiologiques et expérimentales *in vitro* a montré que le tabagisme entraîne une activation de l'EBV ( **ai-di et al, 2012**).

### **I.2.2. L'EBV et l'âge :**

Les patients appartenant à la tranche d'âges 40 et 49 sont les plus infectés par l'EBV, Ces résultats peuvent être expliqués par l'exposition permanente avec l'âge aux facteurs de risque environnementaux et diététiques qui provoquent des changements génétiques et épigénétiques, cela prédispose à une infection latente par l'EBV.

### **2-Aspect histopathologique :**

Le diagnostic de l'UCNT s'effectue sur des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine. En revanche, le recours aux marqueurs épithéliaux tels que les cytokératines conforte le diagnostic de l'UCNT.

L'examen microscopique des coupes histologiques montre une prolifération néoplasique maligne de nature épithéliale sans kératinisation. Elle est faite de cellules tumorales aux limites cytoplasmiques indistinctes, au cytoplasme abondant éosinophile et au noyau arrondi vésiculeux fortement nucléolé. Les atypies cyto-nucléaires et les mitoses anormales sont marquées. Ces cellules s'agencent en amas syncytiaux ou en cellules isolées qui se disposent dans un stroma lymphoïde très abondant.

Ce stroma lymphoïde (préexistant dans la muqueuse nasale) se caractérise par sa richesse en cellules lymphoïdes et en cellules inflammatoires. Ce tissu lymphoïde préexistant agit comme une réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre la tumeur ( **Niedobitek, 2000** ).

Il a tendance à masquer les cellules malignes rendant le diagnostic de cancer difficile sur des coupes histologiques usuelles.

L'immunohistochimie aux marqueurs épithéliaux tels que la CKAE1/AE3, la CK 903, la CK5/6 et autres, apportent une aide précieuse.

Dans notre série, parmi les 15 UCNT, 09 cas ont été validés par CKAE1/AE3 ;

Le choix de l'anticorps dépend de la disponibilité des réactifs et des habitudes pratiques du laboratoire.

L'étude immunohistochimique ,que nous avons réalisé a ciblé la protéine membranaire virale LMP1 au sein des cellules du carcinome indifférencié de nasopharynx , a objectivé la présence de l' EBV dans 73 % des cas .

Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Young et al** qui indiquent une expression de LMP1 dans 65% des cas.

**Le centre international de recherche sur le cancer (IARC), 1997** rapporte que l' entité tumorale n'est associée à l'EBV que dans le carcinome nasopharyngé non kératinisant (UCNT), et pratiquement tous les cas sont positifs à l'EBV quel que soit l'origine géographique, et le virus est présent dans toute les cellules tumorales et non pas les cellules lymphoïdes comme pour les autres cancers . Des études in vitro ont démontré également qu'une infection stable par EBV des cellules épithéliales nécessite un phénotype indifférencié.

Dans la série étudiée, 27% des cas étaient négatifs à l' anticopr anti LMP1 ; ceci serait en rapport probable avec la qualité des prélèvements (fixation, taille de la biopsie ...) ou la qualité de la technique et les anticopr utilisés ; il est nécessaire d'optimiser la technique .

Des études menées par **Tao et al ,1995., Sam et al, 1993., Knox et al, 1996** suggèrent que l'EBV est absente dans les cellules épithéliales nasopharyngiennes normales adjacentes à un NPC positif à l'EBV mais présente dans les états préinvasifs (carcinome in situ du nasopharynx) .

D'après **Knox et al ,1996**, l'infection à l'EBV a lieu avant que la croissance invasive , et ne représente probablement pas la première étape dans la pathogénèse de la NPC .

Cependant les altérations génétiques de l'épithélium nasopharyngé précancéreux associées à une stimulation inflammatoire de la muqueuse nasopharyngée jouent vraisemblablement un rôle essentiel dans l'établissement d'une infection latente par l'EBV dans les cellules épithéliales nasopharyngées infectées au cours de développement précoce de NPC (**Chi et Sai,2015**).

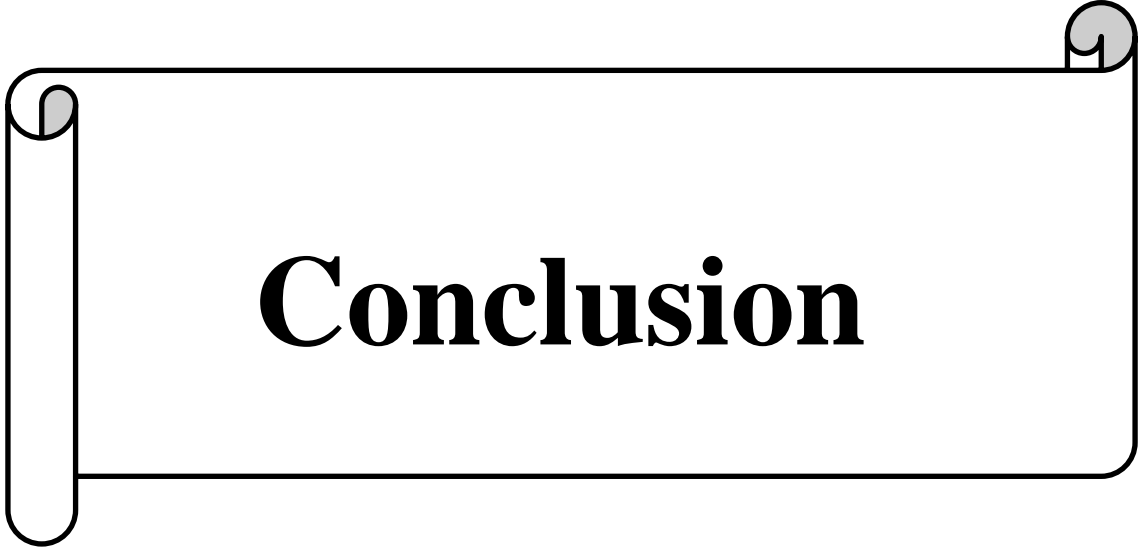
Des études montrent également que les délétions 3p et 9p ont été identifiées en l'absence d'infection par EBV dans des lésions dysplasiques de bas grade , et dans l'épithélium nasopharyngien normale chez les individus à haute risque de NPC , ces événements génétiques surviennent tôt dans la pathogénèse des NPC qui peuvent être à la suite d'une exposition à des cofacteurs environnementaux tels que des composants alimentaires (poisson salé) (**Imai et al, 1999., Bejarano et al, 1998**) , en outre la surexpression de la cycline D1(

conséquence de la délétion P16 sur le chromosome 9p et amplification de locus cycline D1 sur le chromosome 11q ) facilite l'infection persistante par l'EBV des cellules épithéliales nasopharyngées immortalisées (**Busson et al ,1989**) , cette possibilité est confirmée par des données in vitro démontrant que l'infection latente stable par l'EBV des cellules épithéliales nécessite un environnement cellulaire altéré et indifférencié (**Herbst et al , 1997**).

Une fois que les cellules ont été infectées, les gènes latents d'EBV en particulier la protéine membranaire LMP1, fournissent des avantages de croissance et de survie, ce qui entraîne le développement de NPC, donc des modifications génétiques et épigénétique supplémentaires se produisent après l'infection par EBV (**Lawrence et Christopher, 2014**).Des études montrent que la principale voie activé par LMP1 c'est la voie NF-Kb, par la liaison des facteurs associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF) ( **Mainou et al, 2005** ) , donc la dérégulation de cette voie est l'un des composants les plus importants de la tumorigénèse des NPC ,illustrée par le fait que presque toutes les tumeurs de NPC présentent une surexpression de NF-Kb( **Lo et al,2006. , Shi et al, 2006** ) , la régulation positive du ce dernier entraîne l'activation d'un certain nombre de signaux prolifératifs, y compris BCL-2, et le facteur de croissance endothéliale, il provoque également une accumulation de P53 et induit un arrêt de phase G2/M dans les cellules NPC (**Deng et al, 2003. , Murono et al, 2001**) .

**Song et al** suggèrent que les lignées cellulaires de NPS ont de faibles niveaux de p16 en raison de l'hyperméthylation de ce dernier .Cependant, cette altération épigénétique peut être médiée par la formation induite par LMP1 d'un hétérodimère c-Jun / Jun, qui provoque l'activation de l'ADN méthyltransférase.

Malgré la petite taille de l'échantillon, on peut considérer que nos résultats sont en accord avec les données de la littérature qui suggèrent que l'infection par l'EBV dans les cellules épithéliales du nasopharynx est un facteur important impliqué dans la carcinogénèse des NPC.



**Conclusion**

### **Conclusion :**

Le virus d'Epstein Barr est le facteur étiologique le plus important, impliqué dans la carcinogénèse des NPC, il est associé de manière systématique dans les régions endémiques.

La détection de l'EBV dans l'UCNT a été confirmée par plusieurs résultats. Dans notre étude, l'analyse immunohistochimique a montré une expression de la protéine membranaire LMP1 dans la plupart des cas avec 73% (11 cas parmi les 15 cas), au sein de l'échantillon d'étude ce résultat indique une forte corrélation entre l'EBV et le carcinome indifférencié du nasopharynx. Cette corrélation est associée à d'autres facteurs environnementaux, génétiques qui jouent un rôle crucial dans le développement de NPC.

La détection de l'EBV est plus observée chez les hommes (82%) par rapport aux femmes (18%) ce qui suggère que le sexe masculin est plus sensible à l'infection par ce virus,

Concernant l'âge, l'infection à l'EBV trouve son maximum de fréquence chez les sujets âgés entre 40 et 49 ce qui indique que les facteurs environnementaux et génétiques prédisposent avec l'âge à une infection par l'EBV

L'étude de l'EBV et de son rôle dans les carcinomes permet une compréhension plus large de la pathogénèse pour développer de nouvelles approches thérapeutiques (la thérapie ciblées contre le cancer) et diagnostiques.



**Annexes**

### **Annexes :**

#### **Annexe I :**

##### **Matériels et Appareillages :**

Lames silanisées / Lamelles

Lames en verre

Appareil d'inclusion en paraffine (Leica Microsystemes)

Appareil de circulation automatique (Leica)

Bacs en verre avec panier en verre

Etuve thermostatées

Bain marie

Microtome (Leica, RM 2235)

Minuteur

Portes lames

Réfrigérateur

Stylo délimitant : DAKO Pen

Microscope photonique

Cassettes en plastique

Les moules en métal



### Annexe II :

#### Préparation de l'héματοxyline de Harris :

- Première solution : Acide sulfurique concentré (0,8 ml) + Alun de fer (1g) + Eau distillée (50ml)
- Deuxième solution : Héματοxyline (0,5 g) + Alcool 95° (50 ml)
- Après dissolution, mélanger les 2 solutions, laisser reposer pendant 1 h, se conserver pendant 3 mois.

### Annexe III :

**Tableau 1 : Classification tumor –nodes -métastases (TNM) des carcinomes du nasopharynx (Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 2002).**

<b>M0</b>	Pas de métastase
<b>M1</b>	Présence de métastase à distance

<b>T1</b>	Tumeur limitée au nasopharynx
<b>T2</b>	Extension tumorale aux tissus mous de l'oropharynx et /ou le fosse nasale
<b>T2a</b>	Sans extension parapharyngée
<b>T2b</b>	Avec extension parapharyngée
<b>T3</b>	Envahissement des structures osseuses et /ou des sinus paranasaux
<b>T4</b>	Tumeur avec extension endocrânienne et /ou atteinte des nerfs crâniens et /ou de la fosse infratemporale et / ou de l'hypopharynx et /ou de l'espace masticateur.

<b>N0</b>	Absence de ganglions cervicaux
<b>N1</b>	Atteinte unilatérale d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques < 6 cm son plus grand diamètre, au dessus du creux sus-claviculaires
<b>N2</b>	Atteinte bilatérale d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques, <6 cm dans son plus grand diamètre, au dessus du creux sus-claviculaires
<b>N3</b>	Atteinte d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques >6 cm, dans le creux sus-claviculaires

Stade I	T1 N0 M0
Stade IIA	T2a N0 M0
Stade IIB	T1 N1 M0 , T2a N1 M0, T2b N0 ; N1M0
Stade III	T1N2 M0 , T2a ; T2b N2 M0, T3 N0 ; N1 ; N2 M0
Stade IVA	T4 N0 ; N1 ; N2 M0
Stade IVB	tous T , N3 M0
Stade IVC	tous T , tous N, M1

### Annexe IV :

**Tableau 2 : Latences virales et pathologies associées**

Type de latence	Profil d'expression des gènes de latence	Pathologies associées
<b>Type 0</b>	EBER1/2, BARTS, +- LMP2a et EBNA1	-Lymphocytes B quiescents
<b>Type I</b>	EBER1/2, BARTS, EBNA1	- Lymphocytes B quiescents
<b>Type II</b>	EBER1/2, BARTS, EBNA1, LMP1, LMP2a  LMP2b	-Carcinome du nasopharynx  -Lymphome NK/T  -Maladie de hodgkin
<b>Type III</b>	EBER1/2, BARTS, EBNA1, EBNA2,  EBNA3A ,3B ,3C, EBNA1P, LMP1,  LMP2a et LMP2b	- syndromes  Lymphoprolifératifs des  Sujets immunodéprimés

**Annexe VI :****Tableau 3 : Principaux marqueurs d'Epstein –Barr virus (EBV) utilisés pour le diagnostic de cancer du nasopharynx.**

<b>Marqueurs</b>	<b>Echantillon</b>	<b>Méthodes</b>
Anticorps VCA, EBNA1 1-2, EA, ZEBRA	Sérum	<b>Sérologie ;IF ou Elisa</b>
Antigènes LMP, EBNA-2, ZEBRA	Cellules (apposition ou biopsie)	Immunohistochimie
Génome viral(détection)	Salive ,Biopsie	PCR ,Southern blotting PCR ,hybridation in situ
Génome viral (quantification)		
ARN EBER		
Virus infectieux		Culture sur lymphocytes
Lymphocytes infectés	Lymphocytes du sang périphérique	Culture spontanée

## Annexe VII :

**Tableau 4 : Nomenclature des protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions.**

<b>Protéines virales</b>	<b>Latence</b>	<b>Localisation</b>	<b>Fonctions principales</b>
EBNA1	I, II, III	Nucléaire	Maintien du génome viral sous forme épisomale
EBNA2	III	Nucléaire	Immortalisation des LB, activateur de transcription cellulaire et virale
EBNA3A (ou EBNA3)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation des LB
EBNA3B (ou EBNA4)	III	Nucléaire	Inconnue, se lie à RBP-Jkappa
EBNA3C (ou EBNA6)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, action sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation
EBNALP (ou EBNA5)	III	Nucléaire	Cofacteur de EBNA2, interagit avec p53 et Rb
LMP1	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Transducteur de signaux via TRAF vers NF-KB et JNK, induit bcl2
LMP2A	II, III	Membranaire	Prévient la réactivation virale
LMP2B	II, III	Membranaire	Inconnue

**Tableau 5 : Exemples de protéines du cycle lytique et leurs fonctions ou caractères**

<b>Les protéines du cycle lytique</b>	<b>Fonction ou caractère de la protéine</b>
<b>Les protéines précoces</b>	
BSMLF1 et BMRF1	Transactiver l'expression d'autres gènes EBV précoces
BALF2	Protéine majeure de liaison à l'ADN
BHRF1 EA-R nuclear antigen	Composant du complexe antigène précoce
BALF5	ADN polymérase ADN-dépendante
BORF2 et BaRF1	Ribonucléotide réductase
BXLF1	Thymidine kinase
BGLF5	Exonucléase alcaline ou ADNase
BKRF3	Uracile ADN-glycosidase
BGLF4	Protéine kinase Sérine/thréonine
BRRF1, BKRF4 et autres	n'ont pas de fonction connue
<b>Quelques protéines tardives</b>	
BNRF1	Protéine du tégument
BXRF1	Protéine de fusion
BILF2	glycoprotéine
BLLF1	gp350/220
BALF4	glycoprotéine B
BXLF2	glycoprotéine H
ILF2	gp55/80
BDLF3	gp42

Annexe VIII :

Les principaux appareils et réactifs utilisés :



Appareil de circulation automatique (Leica)



Automate d'inclusion (Leica)



Microtome Leica (RM 2235)



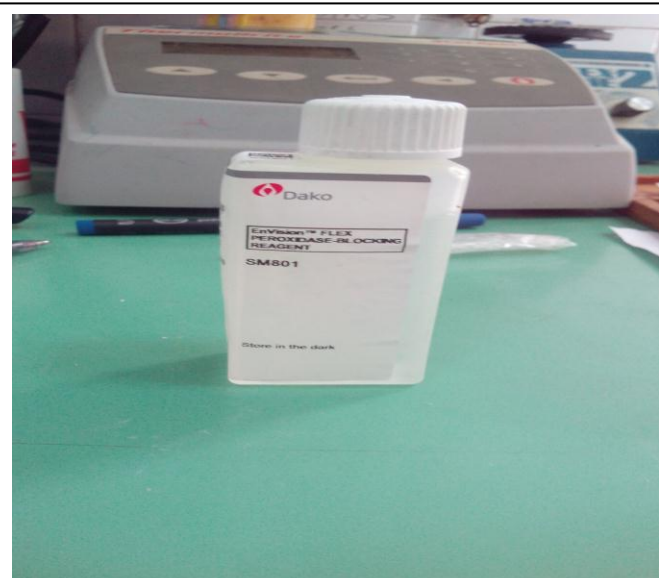
Bain marie



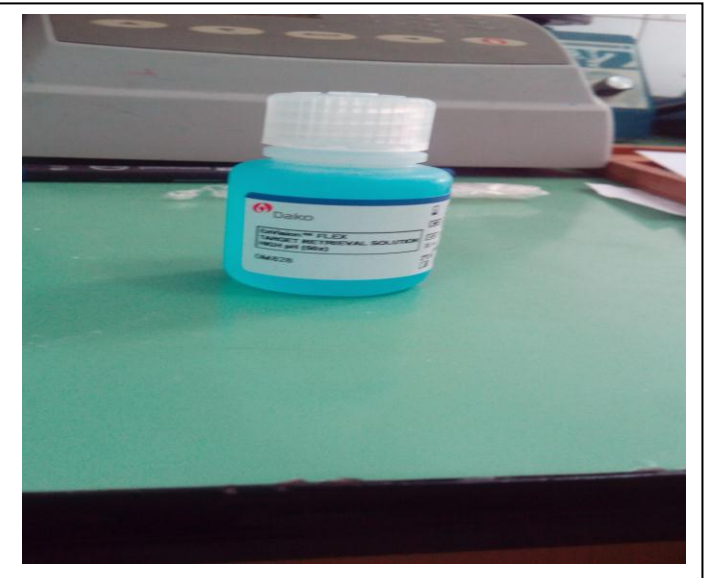
**Microscope photonique (Leica)**



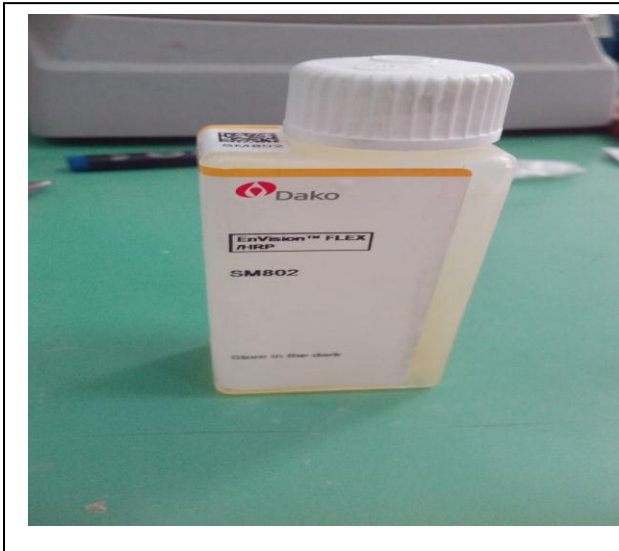
**Anti -Epstein Barr virus LMP1 (Clones CS 1-4, Monoclonal Mousse)**



**PBS (Peroxidase –Blocking Reagent ) (SM801)**



**TRS (Target Retrieval Solution) (DM 828)**



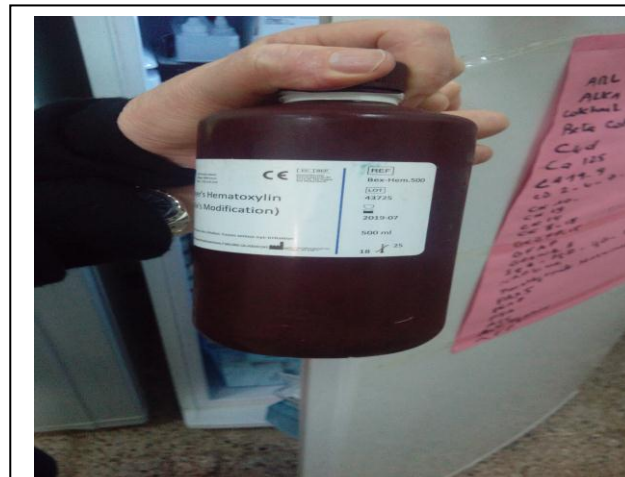
**HRP (polymère d'enzymes) (SM802)**



**Substrat Buffer (SM803), DAB + Chromogène**



**TBS (Wash Buffer) (DM 831) (20X)**

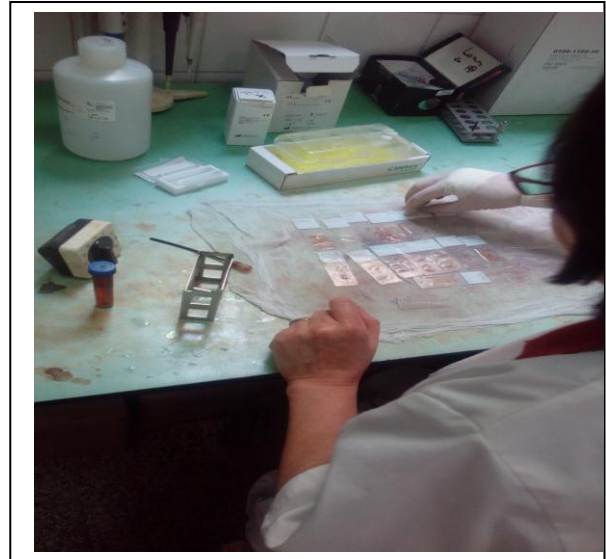


**Hématoxyline de Mayer (Bex-Hem. 500)**





**Coloration HE**



**Immunohistochimie**

## Annexe V :

	N° de patient	Age	Sexe	Histologie	IHC
1	15/754	53	M	UCNT	P63 ; CK 5 et 6 (+)
2	15/10163	10	F	UCNT	CK AE1/AE3 (+)
3	15/3398	44	M	UCNT	/
4	15/1580	64	M	UCNT	CK5 et6 : faiblement (+)
5	15/4308	46	M	UCNT	/
6	15/2006	/	M	UCNT	CKAE1 ; AE2(+)
7	16/4690	/	F	UCNT	CKAE1/AE3(+)
8	16/10315	51	M	UCNT	/
9	16/4810	76	M	UCNT	P40(+)
10	16/1216	42	F	UCNT	/
11	16/4918	45	M	UCNT	CKAE1 ; AE3(+)
12	16/11053	34	M	UCNT	CKAE1 ; AE3(+)
13	17/6985	22	M	UCNT	Pancytokératine(+), diffuse des éléments tumoraux
14	17/3576	/	M	UCNT	/
15	17/5514	/	M	UCNT	Cytoponction(+)



**REFERENCE**

### Référence :

Anais P, Philippe G, Joëlle W. Propriétés oncogéniques du virus d'Epstein-Barr et pathologies malignes associées. *Onco-théranostic* 2013 ; **2**(2) : 80-84.

Al-Sarraf M, Leblanc M, Giri P. Superiority of chemotherapy vs radiotherapy in patients with locally advanced nasopharyngeal cancer : preliminary results of intergroup 0099(SWOG, RTOG, ECOG). *Proc Am Soc Clin Onco* 1996 ; **15** : 882p.

Abraham LK . *Histologie et Biologie Cellulaire*. 1<sup>ier</sup> édition américaine par Pierre Validire – Charpy, 2002 ; 609P.

Ai D G , Mu S Z , Chao NQ. Les critères pour confirmer le rôle du virus d'Epstein-Barr dans l'initiation du carcinome nasopharyngé *Int J Mol Sci* 2012 ; 13 (10): 13737-13747.

Arfaoui A, Abdelmajid S, Ali Q ,Faouzi H, Mohamed KC. Le cancer du cavum au Maroc. Etude épidémiologique sur l'échantillon: Centre d'oncologie Al Azhar de Rabat 2007 ; **14** : 75-82.

Ayan I, Altun M. Nasopharyngeal carcinoma in children: retrospective review of 50 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996 ; **35** : 485-92.

Altun M, Azli N, Armand JP, Fandi A, Cvitkovic E. Nasopharyngeal cancer: epidemiology, staging and treatment. *Semin Oncol* 1994 ; **21** : 382-397.

Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Transcription du gène latent du virus Epstein-Barr dans les cellules du carcinome du nasopharynx: coexpression des transcrits EBNA1, LMP1 et LMP2. *J Virol* 1992; **66** : 2689-2697.

Busson P, Braham K, Ganem G, et al. EBV containing epithelial cells from nasopharyngeal carcinoma produce IL-1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 ; 84 : 6262-6.

Boussen H, Bouaouina N, Daldoul O, Benna F, Gritli S, Ladgham A. Update on medical therapies of nasopharyngeal carcinoma. *Bull Cancer* 2010 ; **97** : 417-26.

Bejarano MT, Masucci MG. Interleukin-10 abrogates the inhibition of Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation by memory T-cell responses. *Blood* 1998 ; **92**: 4256-62.

## REFERENCE

---

- Bendjemana K, et al. Etude du profil épidémiologique et des facteurs de risque alimentaires du cancer du nasopharynx dans le Nord-Est Algérien. *Journal Africain du Cancer* 2011 ; **3**(1) : 59-62.
- Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* 2002 ; **8**(6) : 594-9.
- Brown DM. Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell Immunol.* 2010; 262:89–95.
- Banko AV, Lazarevic IB, Folic MM, Djukic VB, Cirkovic AM, Karalic DZ, et al. Characterization of the Variability of Epstein-Barr Virus Genes in Nasopharyngeal Biopsies: Potential Predictors for Carcinoma Progression. *PLoS ONE* 2016 ; **11**(4): e0153498.
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein –Barr virus genome. *Nature* 1984 ; **310** : 207-11.
- Baumforth KRN, Young LS, Flavell KJ, constandinou C, Murry PG. The Epstein –Barr virus and its association with human cancers .*J clin pathol : Mod Pathol* 1999 ; **52** :307-22.
- Bing JF. Descriptive, environmental and genetic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma, in Pierre Busson (eds), *Nasopharyngeal Carcinoma Keys for Translational Medicine and Biology*, Bioscience and Springer Science Business 2013 : 23-60 .
- Braud V M, Tomasec P ,et al. Viral evasion of natural killer cells during human cytomegalovirus infection .*Curr Top Microbiol Immunol.* 2002 ; **269** :117-29.
- Ballout M, Evaluation par PCR de l'activité antivirale des inhibiteurs de l'ADN polymérase du Virus d'Epstein-Barr. Thèse de l'obtention du grade de docteur de l'université .2005 ; 183p.
- Cruchley AT, Williams DM, Niedobitek G, Young LS. Epstein Barr virus : biology and disease. *Oral Diseases* 1997 ; **3** : 156-63.
- Crépy C. Anatomie cervico-faciale. 2005 ; **1** (3): 258-263.

## REFERENCE

---

Claudio PP, Howard CM, Fu Y, Cinti C, Califano L, Micheli P et al. Mutations in the retinoblastoma related gene RB2/p130 in primary nasopharyngeal carcinoma .Cancer Res 2000 ; **60** :8-12 .

Chan KH, Gu YL, Ng F, et al. EBV specific antibody-based and DNA-based assays in serologic diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. Int. J. Cancer 2003;**105**:706–709.

Chan AT, Teo PM, Huang DP. Pathogenesis and treatment of nasopharyngeal carcinoma. Semin Oncol 2004 ; **31**: 784-801.

Claire SL, Martin R. Infection par le virus Epstein-Barr des cellules épithéliales polarisées via la surface basolatérale par une infection de transfert à médiation cellulaire B. PLoS Pathog 2011 ; 7 (5): e1001338.

Dhafer M. Evaluation d'une stratégie d'immunothérapie peptidique anti-viral dans le carcinome du nasopharynx associé au virus d'Epstein Barr : de l'expérimentation in vitro à la proposition de nouveaux essais thérapeutiques. Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Thèse de l'obtention du grade de docteur de l'université de Lille 1, 2013, 230 p.

Dardari R, Khayatti M, Jouhadi H, Benide A, Ettayeb H, Kahlail A et al. Study of human leukocyte antigen class I phenotype in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. Int Cancer. 2001 ; 92:294-297 .

Daoud J, Toumi N, Bouaziz M, Ghorbel A, Jlidi R, Drira MM, et al. Nasopharyngeal carcinoma in childhood and adolescence: analysis of a series of 32 patients treated with combined chemotherapy and radiotherapy. Eur J Cancer 2003 ; **39** : 2349-54.

Dawson CW, Port RJ, Young LS. The role of EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. Sem Cancer Biol. 2012 ; **22** : 144–153

De-Fu H, et al. Expression of CYP2E1 in human nasopharynx and its metabolic effect in vitro. Molecular and Cellular Biochemistry 2007 ; **298**(2) : 93-100.

Dhouib H, Mnejja M, Bouayed W, et al. Formes histologiques particulières du cancer du nasopharynx. J TUN ORL 2007 ; (19) : 47-51.

Deng I, Yang J, Zhao X, et al. Les cellules en phase G2 / M ont augmenté dans la lignée cellulaire de carcinome du nasopharynx humain par EBV-LMP1 par activation de NF-KB et AP-1. *Cell Res.* 2003 ; **13** : 187-194.

Eschwège F, Gueddari B, Bourhis J. Carcinomes du nasopharynx: aspects cliniques, indications et résultats de la radiothérapie transcutanée et de la curiethérapie. *Cancer Radiother* 2001 ; **5** : 189-194.

Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 16085-16096.

Elaine NM .Anatomie et physiologie humaines.4<sup>e</sup> édition américaine par Jean-Pierre Artigau, France Boudreault, Annie Desbiens , Marie –Claude Désorcy ,1999 ; 1191P

Ellouz R, Daoued J, Maalej M. Cancer du nasopharynx. *Cancerologie pratique* 1991 ; 161-169.

El Gueddari B, Chaouki N. Approche épidémiologique descriptive du cancer au maroc à travers l'activité de l'institut national d'oncologie (1986-1987) . *Bul Cancer Paris*1991 ; **78**: 603-609.

Fiola S, Gosselin D, Takada K, et al. Le TLR9 contribue à la reconnaissance de l'EBV par les monocytes primaires et les cellules dendritiques plasmacytoïdes. *J Immunol.* 2010; 185: 3620-3631

Farrell PJ. Virus d'Epstein-Barr : La carte de contrainte B95-8. *Méthodes en biologie moléculaire* 2001; **174** : 3-12.

François RF, Pierre B. Carcinomes nasopharyngés associés au virus d'Epstein-Barr : de la biologie fondamentale aux applications diagnostiques et thérapeutiques. *Onco Théranostic* 2013 ; **2** (2) : 72-78.

Fandi A, Alturn M, Azli N. Carcinomes indifférenciés du nasopharynx :aspect épémiologique, clinique et thérapeutiques. *Bull cancer* 1994 ; **81** : 571-586.

## REFERENCE

---

- Feng BJ, Huang W, Shugart YY, Lee MK, Zhang F, Xia JC, et al. Génome -wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4. *Nat Genet* 2002 ; **31**: 395-399.
- Feng BJ. Descriptive environmental and genetic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. In: Bussson P, ed. *Nasopharyngeal carcinoma -Keys for translational medicine and biology*. Austin/New York : Landes/Springer 2013 : 23-41.
- Feng BJ, Jalbout M, Ayoub WB, et al. Dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Maghrebian countries. *Int J Cancer* 2007; **121** : 1550-5.
- Feng P, Ren EC, Liu D, Chan SH, Hu H. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J Gen Virol* 2000 ; **81** : 2417-23.
- Farrell PJ .Tumor viruses-could they be an Achilles 'heel of cancer ? . *Eur J Cancer* 2002 ; **38**(14) :1815-6.
- Fandi A, Altun M, Azli N, Arn-iand JP, Cvitkovic E. Nasopharyngeal cancer epidemiology, staging and treatment. *Semin Oncol* 1994.
- Granucci F, Zanoni I, N Pavelka, et al. Contribution de l'IL-2 dérivée des cellules dendritiques murines pour l'activation des cellules NK. *J Exp Med*. 2004; **200** : 287-295
- Gharbi MK, Gritli S, Boussen H, Benna F, Ben Abdallah M, El May A, et al. Rétrospective study of 2010 cases of nasopharyngeal carcinoma seen at the institute Salah Azaiz from 1969 to 1988. *Proceedings ASCO (American Society of Clinical Oncology)* 1996 ; **15** :197-99
- Gourzones C, Busson P, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus and the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. In: Busson P, ed. *Nasopharyngeal carcinoma - Keys for translational medicine and biolog*. Austin/New York : Landes/ Springer 2013:42-60.
- Goldsmith DB, West TM, Morton R. HLA association with nasopharyngeal carcinoma in Southern chinese .meta-analysis *clin otolaryngeal Allied* 2002 ; **27**: 61-67 .
- Germi R , Baccard M, Seigneurin JM , Morand P . *Infections à virus Epstein –Barr*. Elsevier Masson SAS 2016 ;1-14 .
- Herbst H, Samol J, Foss HD, et al. Modulation of interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virus. *J Pathol* 1997; **182** : 299-306.



Haguenoer J, et al. Les cancers professionnels, 1982, Paris (France), Lavoisier (technique et documentation) : 608p.

Hui Z, Lili L, Duosha H, Xiyun D, Ya C. Role of Epstein-Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1 in the Carcinogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma. Cellular et Molecular Immunology 2007 ; **4**(3) : 185-195.

Hamdi L. Facteurs de risque de risque immunologique associé au lymphome hodgkinien de l'enfant. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université paris -SUD11 2013 ; 114.

Imai T, Nagira M, Takagi S, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. Int Immunol 1999; **11**: 81-8.

James JA, Neas BR, Moser KL, et al. Le lupus érythémateux disséminé chez l'adulte est associé à une exposition antérieure au virus d'Epstein -Barr. Arthrite et rhumatisme 2001 ; **44** :1122-1126.

Jean MS, Samira FK, Monique B, Patrice M. Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection. Cahier de formation Bioforma 2006 ; **36** : 2-111

Jmal A, Boussen H, Gara S, Ghanem A, Abaza H, Gara S, et al. Le cancer du nasopharynx de l'enfant en Tunisie : étude rétrospective épidémiologique, clinique et biologique à propos de 48 cas. Bull Cancer 2005 ; **92** : 977-81.

Kanegane H, Miyawaki T, Yachi A, et al. Developement of EBV positive T cell lymphoma following infection of peripheral blood -cells with EBV .leuk lymphoma. 1999 ; **34** :603-607.

Kanegane H, Miyazaki T, Yachi A, et al. Developement of EBV positive T cell lymphoma following infection of peripheral blood -cells with EBV. leuk lymphoma 1999 ; **34** : 603-607.

Keith M, Persaud TVN : the developing human chimiacaly orented embryology 8th edition 2007.

Khabir A, Ghorbel A, Daoued J, Drira MM, Laplanche A, et al. Similar BCL-X but different BCL-2 levels in the two age groups of north african nasopharyngeal carcinomas.cancer detec prev 2003 ; **27** : 250-255.

## REFERENCE

---

- Knox PG, Li QX, Rickinson AB, et al. Production in vitro de clones stables de cellules épithéliales positives au virus d'Epstein-Barr qui ressemblent à l'interaction virus: cellule observée dans le carcinome du nasopharynx. *Virologie* 1996 ; 215 : 40-50.
- Keryer BC, Pioche DC, et al. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulating protein galectin 9. *BMC Cancer* 2006 ; 6 : 283-86
- Khanfir A, et al. Les cancers métastatiques du nasopharynx ; étude clinique et résultats de 965 cas ; *cancer/Radiothérapie* 2006 ; 10 : 545-549 .
- Lawrence SY, Paul GM. Virus d'Epstein-Barr et oncogénèse : des gènes latents aux tumeurs. *Cancer Research* 2003 ; 22 : 5108-5121.
- Lawrence SY, Christopher WD. Virus d'Epstein-Barr et carcinome nasopharyngé. *Chin J Cancer* 2014 ; 33(12) : 581-590.
- Laskar S, Sanghavi V, Muckaden MA, Ghosh S, Bhalla V, Banavali S, et al. Nasopharyngeal carcinoma in children: ten years experience at the TATA Memorial Hospital, Mumbai. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004 ; 58 : 189-95.
- Lo KW et Huang DP. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Semin cancer Biol* 2002 ; 12(6) : 451-62.
- Lee AW, Sze WM, Au JS, Leung SE , Chua DT, Zee BC et al. Treatment results for nasopharyngeal carcinoma in the modern area: The Hong Kong expérience, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005 ; 61:1107-16.
- Lee SP, Chan AT, Cheung ST et al. CTL control of EBV in nasopharyngeal carcinoma (NPC): EBV-specific CTL responses in the blood and tumors of NPC patients and the antigen-processing function of the tumor cells. *J Immunol* 2000 ; 165 : 573–582.
- Lin X, Gudgeon NH, Hui EP et al. CD4 and CD8 T cell responses to tumour-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:963–975.
- Lo YM , Chan LY , Chan AT , Leung SF , Lo KW , Zhang J , Lee JC , Hjelm NM , Johnson PJ ,and Huang DP. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free

Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999 ; **59** : 5452-5.

Martorelli D, Houali K, Caggiari L, et al. Spontaneous T cell responses to Epstein-Barr virus-encoded BART1 protein and derived peptides in patients with nasopharyngeal carcinoma: bases for improved immunotherapy. *Int J Cancer*. 2008; 123:1100–1107.

Madouri R .Place de l'association de radiothérapie chimiothérapie concomitante (ARCC) dans la stratégie thérapeutique des cancers du cavum. Mémoire de doctorat en Médecine, université d'Oran faculté de médecine 2012 ; 228p.

Mouden K. UCNT chez l'enfant . Mémoire de doctorat en Médecine, centre d'hématologie et d'oncologie pédiatrique de Rabat, 2012 ; 141p.

Murono S, Inoue H, Tanabe T, et al. L'induction de la cyclo-oxygénase-2 par la protéine 1 de la membrane latente du virus d'Epstein-Barr est impliquée dans la production du facteur de croissance endothélial vasculaire dans les cellules de carcinome du nasopharynx. *Proc Natl Acad Sci US A* 2001 ; **98** : 6905-6910 .

Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*. 1995 ; **80**: 389–399.

Mainou B, Everly D, Raab-Traub N. La protéine membranaire latente du virus Epstein-Barr 1 CTAR1 médie la transformation des rongeurs et des fibroblastes humains par l'activation de PI3K. *Oncogène*. 2005 ; **24** : 6917-6924.

Niedobitek G .Infection par le virus d'Epstein-Barr dans la pathogenèse du carcinome du nasopharynx *Mol Pathol* 2000 ; **53** (5) : 248-254.

Nicholl JM, Agathangelou A, et al. The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol* 1997 ; **183**(2) : 164-8.

## REFERENCE

---

Ozyar E, Ayhan A, Korcum A, Atahan I. Rôle pronostique de l'expression de la protéine membranaire 1 et de l'interleukine-10 du virus Epstein-Barr chez les patients atteints de carcinome du nasopharynx. *Cancer Invest* 2004 ; **22** : 483-4910.

Rivera S, Keryer C, Bousson P, et al. Les carcinomes du nasopharynx de la biologie à la clinique. *cancer/radiothérapie* 2005 ; **9** (55-68).

Rowe M. Immune responses to Epstein Barr virus molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cells immunity *Microbes infect* 2010 ; **12**(3) :173-181.

Rakotorisoa, AHN. Aspects épidémiologique du cancer du cavum observés au centre hospitalier universitaire d'Antananarivo. 2010

Sylvie L. Inhibition du cycle lytique du Virus Epstein-Barr par ARN interférence. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université Joseph-Fourier ; 2010 : 74p.

Salhi B, Meziani A, et al. Le cancer indifférencié du cavum chez l'enfant et l'adolescent de l'est algérien à propos de 284 cas traités au centre hospitalier universitaire IBN BADIS de constantine, résultats à long terme. *abstracts/cancer/radiothérapie* 2009 ; **13** :644-697.

Shi W, Bastianutto C, Li A, et al. Plusieurs voies dysrégulées dans le carcinome du nasopharynx révélées par le profil d'expression génique. *Int J Cancer*. 2006; 119 : 2467-2475.

Sam CK, Brooks LA, Niedobitek G, et al. Analyse de l'infection par le virus Epstein-Barr dans les biopsies du nasopharynx d'un groupe à haut risque de carcinome du nasopharynx. *Int J Cancer* 1993 ; **53** : 957-62.

Sidler D, Ralph w, Gerhard H, Stephan K. Undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type (UCNT): a Swiss single-institutional experience during 1990-2005. *SWISS MED WKLY* 2010 ; **140** (19 – 20) : 273 – 279 .

Stevens A, Lowe J. *Histologie humaine* Paris (France), Elsevier 2006 : 459 p (3<sup>e</sup> édition).

Thornley-Lawson DA. Virus d'Epstein-Barr: exploitation du système immunitaire. *Revue de la nature immunologie* 2001; **1** (1) : 75-82.

Thorley-Lawson DA. EBV the prototypical human tumor virus –just how bad is it? *J Allergy Clin immunol*.2005 ;116 : 251-61 .

## REFERENCE

---

Tsao SW, Tsang CM, To KF et al. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2015 ; **235** : 323–333 .

Tao Q, Srivastava G, Chan ACL, et al. Preuve de l'infection lytique par le virus Epstein-Barr dans les lymphocytes de la muqueuse au lieu des cellules épithéliales rhinopharyngées chez les individus normaux. *J Med Virol* 1995 ; 45 : 71-7.

Uchida J, Yasui T, Takaoka SY, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub NKH . Epstein-Barr Virus. *Science* 1999 ; **286** : 300-303.

Vera-sempere FJ, Burgos JS, Botella MS, Cordoba J, Gobernado M. Immunohistochemical expression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP1) in paraffine sections of EBV associated nasopharyngeal carcinoma in Spanish patients . *Oral Oncol Eur J Cancer* 1996 ; **32** :68-8.

Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005 ; **365** (9476) : 2041- 54.

Wang D, Liebowitz D, Kieff E. Une protéine membranaire EBV exprimée dans les lymphocytes immortalisés transforme les cellules de rongeurs établies. *Cellule* 1985 ; 43 : 831-840.

Xiao HZ, Li XL, Xi ZL, Wei HJ. Quantification de la charge d'ADN du virus d'Epstein-Barr dans les échantillons de brossage du nasopharynx dans le diagnostic du carcinome du nasopharynx dans le sud de la Chine .*cancer science* 2015 ; 106 (9) :1196-1201.

Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2002 ; **12** : 421-9.

Young L et Rickinson AB. Epstein-Barr virus : 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004 ; **4**(10) : 757-68.

Yu MC, Ho JH, Lai SH, Henderson BE. Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong Kong. *Cancer Res* 1986 ; **46** : 956-61.

Yong S, Suzhan Z, Ren S, Tingting W, Jing Q. Comprendre l'interaction entre l'immunité de l'hôte et le virus d'Epstein-Barr chez les patients atteints de CPN. *Emerg Microbes Infect.* 2015 ; 4 (3) : e20.

Young, L. S. , C. W . Dawson, et al. (2000). « the expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes . » *Mol Pathol* **53**(5) :238-47.

## REFERENCE

---

Zeng Y. Sero epidemiological studie and nasopharyngeal carcinoma in china .Adv cancer res 1985 ; **43** :121-138.

Zur Hausen H , Schulte H, Klein G, Henle W , Henle G ,et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx . Nature 1970 ; **288** : 1056-8