

ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucleique.

ANTI-FITC : Anti-IsouthioCyanate de Fluorescéine.

AP-1: Activator Protéine 1.

ARN: Acide Ribonucléique.

BARTs: BamHI-A Right ward Transcripts.

Bcl-2: B-cell Lymphoma 2.

BCIP/NBT: 5-Bromo-4-Chloro-3-IndolylPhosphate (BCIP) and NitroBlueteTrazolium.

BHRFI: BamHI Rightward Reading Frame I.

BRCA1: BReast Carcinoma-1.

CCI: Carcinome Canalaire Infiltrant.

c-myc: Cellular Proto-oncogène.

CISH: Chromogenic *In Situ* Hybridization.

CNP: Carcinome Nasopharyngé.

Cox-2: Cyclooxygénase 2.

CRS : Cellules de Reed Sternberg.

CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques.

EA: Early Antigen.

EBERs : Epstein-Barr Encoded RNA.

EBNA: Epstein-Barr Nuclear Antigen.

EBV: Epstein – Barr Virus.

EGF: Epithelial Growth Factor.

Env: Glycoprotein de l'enveloppe

FGF: Fibroblast Growth Factor.

FISH: Fluoreceine In Situ Hybridazation

GH: Growth Hormona.

gp: Glycoprotéine.

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2.

HIS: Hybridation *in situ*.

HPL: Hormone Lactogene Placena

HPV: Human Papilloma Virus.

IEA: Immediate Early Antigen.

IGF: Insulin Growth Factor.

IgG: Immunoglobuline G.

IR: Internal Repeat.

LA: Late Antigen.

LMP: Latent Membrane Protein.

MEC : Matrice extra Cellulaire.

Ki-67 : marqueur de prolifération.

MDGF-1 :Mammary-Derived Growth Factor 1.

MMPs : Métallo Protéases Matricielles.

MMTV : Mousse Mammary Tumor Virus.

MNI: MonoNucléose Infectieuse.

Ori-Lyt : Origine de réplication Lytique.

Ori-P : Origine de réplication latente.

PDGF: Platelet derived Growth Factor.

PCR: Polymérase Chain Reaction.

PKR: Protéine Kinase R.

PNA: Peptide Nucleic Acid.

PTLD : Posttransplant Lymphoproliferative Disease.

SBR : Scarff-Bloom et Richardson :

TBS: Tris Buffer Saline.

TGF- β : Transforming Growth *Factor*.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

TNM: Tumor-Node-Metastasis.

TR: Terminal Repeat.

US: Unique Short.

UL: Unique Long.

UTDL: U Terminal Ducto-Lobular

VCA: Viral Capsid Antigen.

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

ZEBRA : BamH1 Z Epstein-Barr virus Replication Activator.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la glande mammaire : Représentation schématique d'une coupe sagittale du sein.	5
Figure 2 : Représentation schématique d'un lobe mammaire.....	6
Figure 3 : Développement de la glande mammaire.....	8
Figure 4 : schéma représentant les différentes localisations et les différents types de cancer du sein.	11
Figure 5 : Particules de l'EBV visualisée en microscopie électronique.....	26
Figure 6 : Schéma de la structure de l'EBV.....	28
Figure 7 : Structure linéaire schématique de l'organisation du génome de l'EBV.....	30
Figure 8 : Cycle de réplication de l'EBV.....	35
Figure 9 : Cycle biologique de l'infection par l'EBV.....	40
Figure 10 : Répartition de la population selon l'âge des patientes.....	60
Figure 11 : Répartition de la population selon le statut hormonal des patientes.....	61
Figure 12 : Répartition de la population selon le grade SBR.....	62
Figure 13 : Répartition de la population selon le statut ganglionnaire.....	63
Figure 14 : Répartition de la population selon le nombre des ganglions atteints.....	63
Figure 15 : Répartition de la population selon le statut des récepteurs oestrogéniques....	64
Figure 16 : Répartition de la population selon le statut des récepteurs progestéroniques..	65
Figure 17 : Répartition de la population selon le statut HER1.....	66
Figure 18 : Répartition de la population selon le statut HER2.....	67
Figure 19 : Répartition de la population selon le statut Ki67.....	68
Figure 20 : Répartition de la population selon la classification moléculaire.....	69
Figure 21 : Graphes représentatifs des densités optiques des IgG anti- EBNA / IgG anti-VCA des 23 cas étudiés.....	71
Figure 22 : Graphe représentatif des densités optiques des IgG anti- EBNA/ IgG anti VCA chez les témoins du cancer du nasopharynx (témoins négatifs).....	71
Figure 23 : Répartition des patientes selon le profil sérologique des IgG anti- VCA.....	72
Figure 24 : Répartition des patientes selon le profil sérologique des IgG anti- EBAN-1 ..	73
Figure 25 : Micrographies des résultats du marquage immunohistochimique des LMP-1	74
Figure 26 : Micrographies du marquage immunohistochimique de la protéine EBNA-1 dans des CCI.....	75

Figure 27 : Répartition des cas selon le statut des EBERs au niveau de la tumeur	76
Figure 28 : Répartition des cas selon le statut des EBERs en dehors de la tumeur	77
Figure 29 : Répartition des cas selon le statut des EBERs en fonction du Ki67 négatif....	78
Figure 30 : Répartition des cas selon le statut des EBERs en fonction du Ki67 positif.....	79
Figure 31 : Répartition des cas selon le statut des EBERs et HER2 positif	80
Figure 32 : Répartition des cas selon le statut des EBERs et HER2 négatif	81
Figure 33 : Micrographies montrant le marquage positif des EBERs à la Florescence (FISH)	82
Figure 34 : Micrographies montrant le marquage positif des EBERs en utilisant un chromogène (CISH).....	82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Profil d'expression des protéines virales selon le type de latence	39
Tableau II : Liste des anticorps utilisés dans l'étude immunohistochimique	57
Tableau III : Relation entre le profil sérologique des IgG anti-VCA et anti- EBNA ..	83
Tableau IV : Relation entre l'étude immunohistochimique des LMP-1 et anti- EBNA-1	83
Tableau V : Relation entre les LMP-1 et profil phénotypique, Ki67, HER2, IgG anti-VCA, IgG anti EBNA-1, IHC EBNA et le statut des EBERs.....	84
Tableau VI : Relation entre le profil sérologique des IgG anti-VCA et le phénotype moléculaire, Ki67, HER2, IHC LMP-1 et le statut des EBERs	85
Tableau VII : Relation entre le profil sérologique des IgG anti- EBNA-1 et le phénotype moléculaire, Ki67, HER2, IHC LMP-1 et le statut des EBERs	86

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	
<i>Dédicaces</i>	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
ABREVIATIONS.....	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX.....	
Introduction	1

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La glande mammaire et sa cancérisation	4
I.1.1. La glande mammaire normale.....	4
I.1.1.1. Anatomie de la glande mammaire	4
I.1.1.2. Evolution de la glande mammaire	7
I.1.2. Le cancer du sein.....	9
I.1.2.1. Définition	9
I.1.2.2. Classification du cancer du sein	12
I.1.2.2.1. Classification histopathologique des carcinomes mammaires selon l’OMS	12
I.1.2.2.2. Classification TNM du cancer du sein.....	13
I.1.2.2.3. Classification SBR.....	16
I.1.2.2.4. Classification moléculaire	16
I.1.2.3. Facteurs de risque	17
I.1.2.3.1. Facteurs génétiques.....	18
I.1.2.3.2. Facteurs de risque hormonaux.....	18
I.1.2.3.3. Facteurs pronostiques et survie.....	18

I.1.2.3.4. Facteurs de risque environnementaux.....	19
I.1.2.3.5. Le facteur viral.....	20
I.1.2.4. Mécanisme de la carcinogénèse mammaire.....	21
I.1.2.4.1. Initiation de la progression tumorale	22
I.1.2.4.2. Promotion Tumorale	22
I.1.2.4.3. Métastase des carcinomes mammaires	23
I.1.2.4.4. Angiogénèse	24
I.1.2.4.5. Invasion	25
I.2. Virus et cancer du sein.....	25
I.2.1. Les Herpesvirus Humains : Le Virus Epstein-Barr.....	25
I.2.1.1. Historique.....	25
I.2.1.2. Taxonomie d'EBV.....	27
I.2.1.3. Structure du virus.....	27
I.2.1.4. Le génome de l'EBV	29
I.2.1.5. Transmission	31
I.2.1.6. Cellules cibles.....	31
I.2.1.7. Cycle de multiplication de l'EBV	31
➤ Phases précoces	31
➤ Phase de latence.....	36
a. Les protéines de latence	36
b. Les ARN de latence	37
c. Les types de latence	38
I.2.1.8. Oncogénèse virale de l'EBV	41
I.2.1.8.1. Les lymphomes.....	44
➤ Lymphome de Burkitt	44
➤ Maladie de Hodgkin.....	45
➤ Lymphomes T	46
I.2.1.8.2. Les carcinomes	46
➤ Le carcinome indifférencié du nasopharynx	46
➤ Le carcinome gastrique	47
➤ Le carcinome mammaire	47

I.3. Les Rétrovirus Endogènes Humains	48
I.3.1. Les Rétrovirus	48
I.3.2. Les rétrovirus endogènes	49
I.3.3. Organisation génomique et classification	50
I.3.4. Expression des rétrovirus endogènes.....	51
I.3.4.1. Le Rétrovirus endogène HERV-K et pathologies associées.....	51
➤ Cancer du sein	52

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Population d'étude	53
II.2. Méthodes d'étude.....	54
II.2.1. Etude de l'expression virale.....	54
II.2.1.1. Etude sérologique par la technique ELISA (enzyme-lynkedimmunoessay)	54
II.2.1.2. Etude phénotypique	56
II.2.1.2.1. Immunohistochimie	56
II.2.1.3. Etude génomique.....	57
II.2.1.3.1. Hybridation <i>in situ</i> des EBERs.....	57

III. RESULTATS

III.1. Population générale.....	60
III.1.1. Age des patientes	60
III.1.2. Statut hormonal des patientes	61
III.1.3. Grade SBR.....	61
III.1.4. Statut ganglionnaire	62
III.1.5. Statut des récepteurs hormonaux	64
III.1.5.1. Statut des récepteurs ostrogéniques	64
III.1.5.2. Statut récepteurs progéstéroniques.....	64
III.1.6. Statut HER1	65
III.1.7. Statut HER2.....	66
III.1.8. Expression du Ki67	67
III.1.9. Sous types moléculaires des tumeurs.....	68
III.2. Résultats de l'étude virale	69
III.2.1. Résultats de l'étude sérologique	69

III.2.2. Résultats de l'étude immunohistochimique des LMP-1 et EBNA-1	73
III.2.3. Résultats De l 'hybridation in situ en utilisant la sonde PNA	76
III.2.3.1. Statut des EBERs au niveau de la tumeur	76
III.2.3.2. Statut des EBERs en dehors de la tumeur	77
III.2.3.3. Statut des EBERs en fonction de Ki67 (-).....	77
III.2.3.4. Statut des EBER en fonction de Ki67 (+)	78
III.2.3.5. Statut des EBERs en fonction de HER2 (+)	79
III.2.3.6. Statut des EBERs en fonction de HER2 (-)	80
III.3. Résultats de l'étude statistique	83
IV. DISCUSSION	87
V. CONCLUSION	96
Références Bibliographiques	99
Annexes	
Article scientifique	

Introduction

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) estime qu'il y avait, pour l'année 2018, 18,1 millions de nouveaux cas de cancer, 9,6 millions de décès dus au cancer. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie, et un homme sur huit et une femme sur 11 meurent de cette maladie. A l'échelle mondiale, le nombre total de personnes vivant avec un cancer dans les cinq ans suivant le diagnostic, appelé prévalence à cinq ans, est estimé à 43,8 millions.

Les cancers du poumon, et du sein chez la femme, sont les principaux cancers dans le monde en termes de nombre de nouveaux cas : on estime à environ 2,1 millions le nombre de diagnostics de chacun de ces cancers en 2018, qui représentent environ 11,6 % du fardeau total de l'incidence du cancer.

Le cancer du sein est le cancer le plus souvent diagnostiqué chez les femmes (24,2 %, soit environ un sur quatre des nouveaux cas de cancer diagnostiqués chez les femmes dans le monde) et ce cancer est le plus fréquent dans 154 des 185 pays couverts par GLOBOCAN 2018. Le cancer du sein est également la principale cause de décès par cancer chez les femmes (15,0 %),

En Algérie, le cancer du sein occupe la première place en terme d'incidence et de mortalité, en comparaison avec les autres types de cancer, des chiffres alarmants, selon lesquels, environ 3500 femmes décèdent par an et 11 000 nouveau cas sont enregistrés chaque année (**GLOBOCAN, 2018**).

De nos jours, plusieurs facteurs de risque de développement du cancer du sein sont reconnus, tels que les risques génétiques liés aux antécédents familiaux de cancer du sein, l'âge avancé, la puberté précoce, la ménopause tardive, la nulliparité et l'obésité. Mais, aucun facteur n'a pu être impliqué directement dans l'étiopathogénie de ce cancer, à l'exception de la transmission héréditaire de certains gènes de prédisposition, en particulier les gènes BRCA1 et BRCA2, impliqués dans 5-10% des cas de cancer du sein. Néanmoins, certains facteurs étiologiques sont de plus en plus soupçonnés de contribuer au développement du cancer du sein et les virus restent à l'heure actuelle les pathogènes associés aux cancers les plus étudiés.

En effet, l'implication de nombreux virus est aujourd'hui reconnue dans le développement de différents cancers tels que les associations HPV (Human Papillomavirus) et cancer du col utérin, HHV8 (Human Papillomavirus-8) et sarcome de Kaposi, EBV (Epstein-Barr Virus), HERV (Human Endogenous Retrovirus) et lymphome de Burkitt ou carcinome indifférencié du cavum.

De nombreux virus ont été soupçonnés dans l'étiologie des cancers du sein, et cela depuis la découverte par Bittner (1936) que l'induction des tumeurs mammaires chez la souris est causée par un virus appelé MMTV pour « Mouse Mammary Tumor Virus ». Des séquences homologues au gène *env* du MMTV ont récemment été mises en évidence dans une proportion importante de cancers du sein sporadiques chez l'Homme, indiquant une étiologie virale possible du cancer du sein.

Depuis de nombreuses années, l'hypothèse selon laquelle un rétrovirus homologue au HERV-K soit impliqué dans l'étiologie du cancer du sein chez l'homme a fasciné les scientifiques, mais cela n'a jamais pu être démontré de manière convaincante. L'intérêt pour cette hypothèse s'est largement amplifié avec le développement des techniques de la biologie moléculaire et surtout de la PCR en temps réel, qui ont permis à Wang et ses collaborateurs de trouver que l'expression des transcrits *env* HERV-K était de 5 à 10 fois plus élevée dans les lignes cellulaires du cancer du sein traitées avec l'œstradiol et progestérone.

Durant ces dernières années, d'autres équipes ont aussi signalé que le virus EBV pourrait être associé à la pathogenèse de cas sporadiques de cancer du sein chez l'homme. Utilisant différentes techniques de PCR, d'hybridation *in situ* et d'Immunohistochimie, l'EBV a été retrouvé dans 2 à 66% de cas de cancer du sein (**Gaffey *et al.*, 1993 ; Bonnet *et al.*, 1999 ; Lespagnard *et al.*, 1995 ; McCall *et al.*, 2001 ; Serraino *et al.*, 2001 ; Preciado *et al.*, 2005 ; Perkins *et al.*, 2006**), mais cette association reste à ce jour un sujet de large controverse.

L'objectif de ce travail est de rechercher s'il existe une association entre l'EBV et les CCI.

Pour répondre aux objectifs de cette étude nous avons dressé la méthodologie suivante afin de déterminer les paramètres à étudier et les techniques à mettre en œuvre et préciser les critères inclusifs et exclusifs.

Le présent manuscrit est constitué de trois volets.

Le premier volet correspond à une revue bibliographique comprenant des généralités sur le sein, les Virus et cancer du sein.

Le deuxième volet traite l'aspect pratique.

Le troisième volet aborde les résultats obtenus et leur discussion suivie d'une conclusion et perspectives qui feront suite à ce travail.

I.1. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION

I.1.1. La glande mammaire normale

I.1.1.1. Anatomie de la glande mammaire

Le sein est un organe constitué principalement d'un tissu adipeux qui repose sur les muscles pectoraux auxquels il est lié à l'aide de ligaments appelés ligament de Cooper. Chez la femme, sa principale fonction est la lactation alors que chez l'homme, les seins demeurent immatures et n'ont pas de rôle physiologique. La glande mammaire humaine consiste en une structure tubulo-alvéolaire composite formée par 15 à 25 lobes irréguliers irradiant à partir du mamelon. La peau qui entoure le mamelon, l'aréole, est pigmentée et contient des glandes sébacées (glandes de Morgani) qui s'hypertrophient à la grossesse et prennent alors le nom de tubercule de Montgomery. Les sécrétions de ces glandes participent probablement à la protection du mamelon et de l'aréole lors de l'allaitement. Les lobes qui forment la glande mammaire sont séparés par une couche de tissu conjonctif dense et se trouvent enfouis dans du tissu graisseux. Un canal unique, le canal galactophore, draine chaque lobe par l'intermédiaire d'un orifice propre à la surface du mamelon. Juste avant de s'ouvrir à la surface, le canal galactophore forme une dilatation appelée sinus lactifère. Le mamelon contient des travées de muscles lisses orientées parallèlement aux galactophores et circulairement près de sa base. A l'intérieur de chaque lobe, le canal principal se ramifie en de nombreuses branches pour former les canaux terminaux, aboutissant chacun à un lobule constitué de multiples acini ou alvéoles (Netter, 2007) (Figure 1 et 2).

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

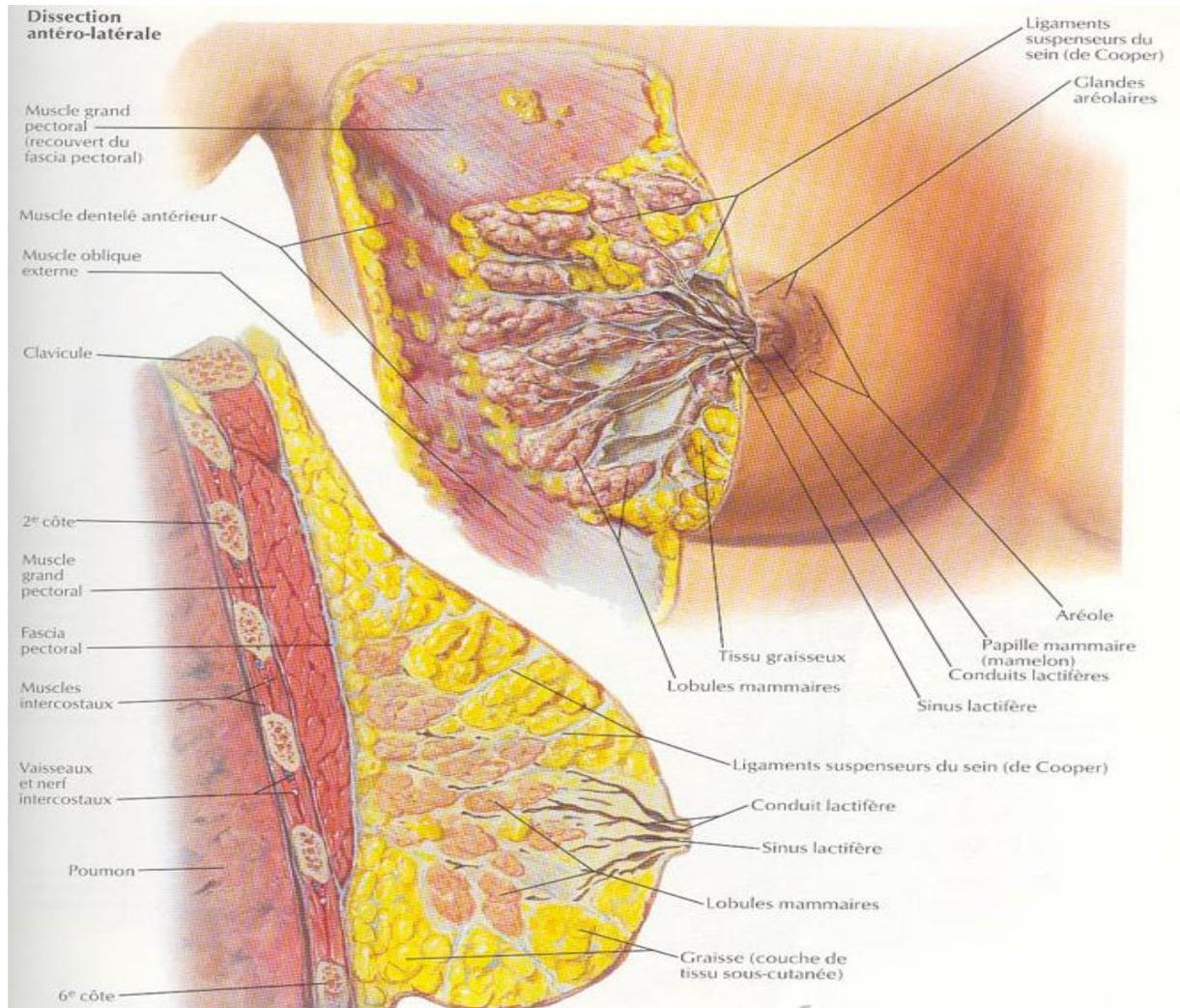


Figure 1 : Sein. Coupe sagittale et frontale (Netter, 2007).

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chaque canal terminal forme avec le lobule associé une unité terminale ducto-lobulaire (UTDL). Ces unités sont très sensibles aux variations hormonales et il est admis que la plupart des lésions mammaires mastosiques et carcinomateuses se développent à partir de l'UTDL. Les lobules sont séparés les uns des autres par du tissu conjonctif inter lobulaire moyennement dense, tandis que le tissu conjonctif intra lobulaire entourant les canaux à l'intérieur de chaque lobule est moins fibreux et plus vascularisé. (Netter, 2007).

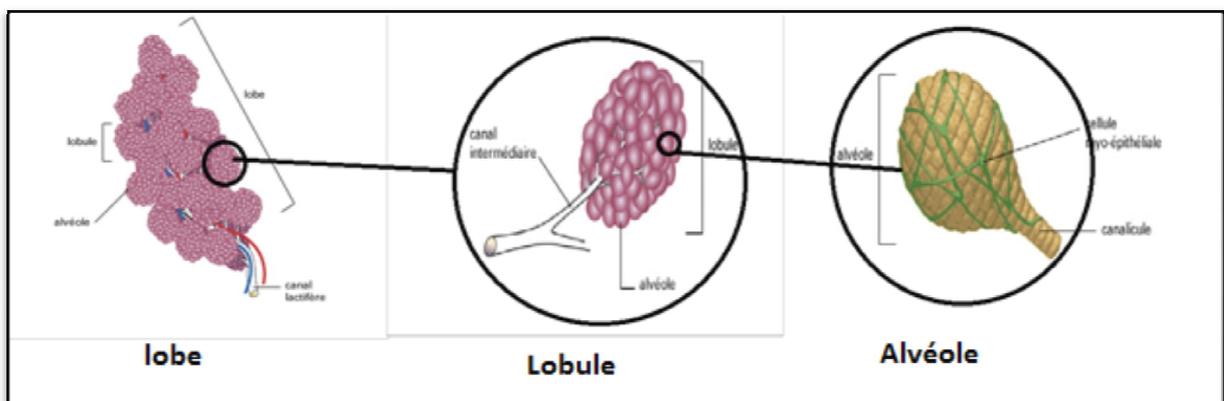


Figure 2: Représentation schématique d'un lobe mammaire.

Un lobe mammaire compte environ 20 à 40 lobules eux-mêmes formés de 10 à 100 alvéoles. Les alvéoles sont composées d'un épithélium sécrétoire qui éjecte le lait dans la lumière de l'alvéole vers les canalicules jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales. (Adapté de www.santeallaitementmaternel.com)

La glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires bien distincts. Bien que le système canalaire constitue la composante fonctionnelle, le tissu fibro-adipeux entourant les canaux représente la majeure partie du sein. Le système canalaire, dans son ensemble, est bordé par deux couches cellulaires: une couche interne de cellules épithéliales sécrétrices de lait entourée par une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces deux couches cellulaires sont délimitées par une membrane basale et baignent dans le stroma, ou tissu palléal, formé de matrice extracellulaire (notamment des fibres de collagène), de cellules fibroblastiques, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins nécessaires au développement de l'épithélium mammaire. L'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires et enfin galactophores, se fait en réponse au stimulus de succion qui provoque la contraction des cellules myoépithéliales. (Netter, 2007).

I.1.1.2. Evolution de la glande mammaire

La glande mammaire est en constante évolution au cours de la vie d'une femme. L'essentiel de sa croissance a lieu après la puberté et elle ne se termine qu'au cours de la première grossesse menée à terme. A la naissance, les structures mammaires sont rudimentaires. Le sein reste quiescent pendant l'enfance et la croissance se limite à quelques canaux qui se terminent par des bourgeons constitués de cellules épithéliales. Au moment de la puberté, sous l'influence des stéroïdes sexuels (œstrogènes, progestérone) mais aussi de l'hormone de croissance et de corticostéroïdes, survient une phase de croissance des canaux et du stroma. Il y a cependant peu de développement des alvéoles, et la majeure partie de l'augmentation de volumes des seins est attribuable aux dépôts lipidiques. C'est au cours de la grossesse que les alvéoles se développent activement, prenant la place du tissu adipeux qui s'atrophie. En effet, pendant la gestation, les concentrations plasmatiques de progestérone, d'œstrogènes et d'hormone lactogène placentaire (hPL) sont élevées. La progestérone et les œstrogènes agissent directement au niveau des cellules souches épithéliales situées à l'extrémité des canaux mammaires favorisant ainsi leurs proliférations.

Des facteurs de croissance comme le TGF α (Transforming Growth Factor), le MDGF-1 (Mammary Derived Growth Factor), l'IGF-1 (Insulin Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) sont également impliqués dans cette prolifération. (Netter, 2007).

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A la fin de la grossesse, les cellules épithéliales alvéolaires se polarisent et deviennent ainsi fonctionnelles. Cependant, la progestérone, en inhibant la prolactine, inhibe la lactation jusqu'à l'accouchement. Après celui-ci, le placenta qui est une source de grandes quantités d'hormones stéroïdes est éliminé, on assiste alors à un renversement de l'équilibre progestérone/prolactine en faveur de la production du lait.

Lors des tétées, la succion du mamelon va permettre d'une part, l'entretien de la sécrétion de prolactine par l'adénohypophyse, et d'autre part, la sécrétion d'ocytocine responsable de la contraction des cellules myoépithéliales nécessaire à l'éjection du lait.

Après la période d'allaitement, la glande mammaire involue: l'activité sécrétoire cesse et la glande retourne à un état moins différencié grâce à l'apoptose des cellules épithéliales, myoépithéliales et des fibroblastes (**Figure 3**). (Netter, 2007).

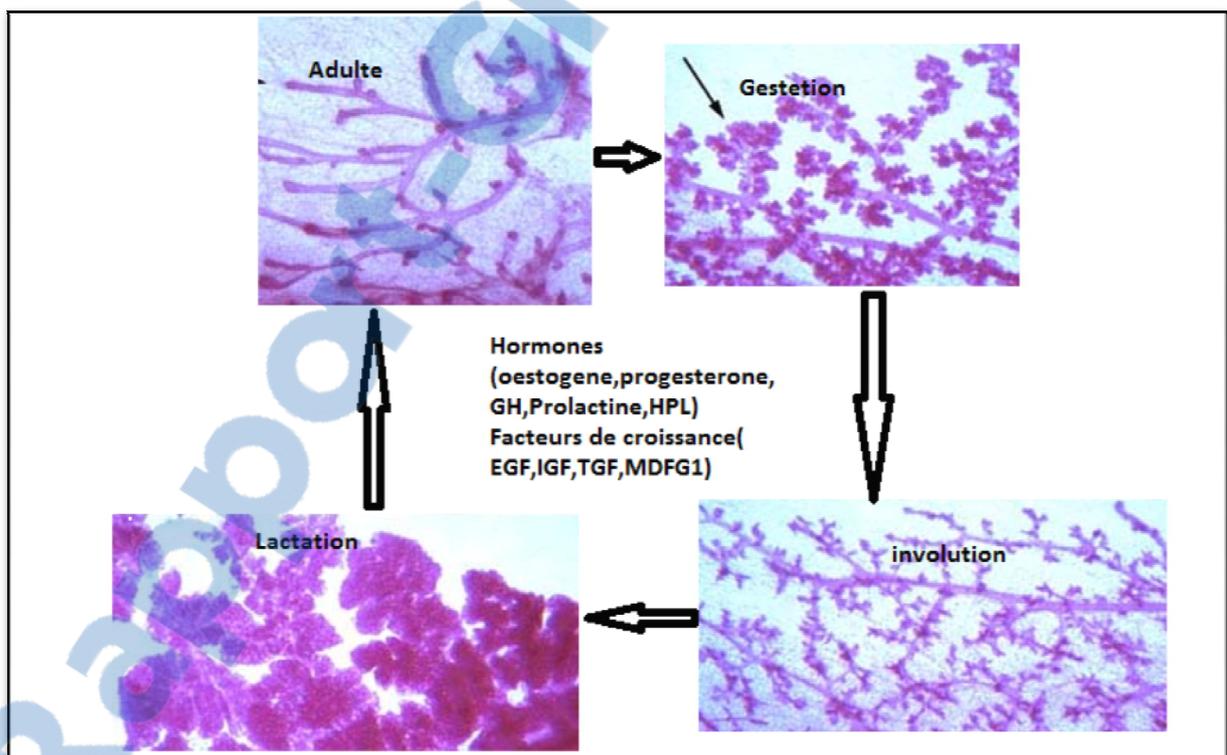


Figure 3 : Développement de la glande mammaire. <http://mammary.nih.gov/reviews/>

A la puberté, la glande mammaire subit l'influence de diverses hormones et facteurs de croissance provoquant le développement des canaux et du stroma. Lors d'une grossesse, les cellules épithéliales des alvéoles prolifèrent et se différencient en vue de la production de lait. Après l'allaitement, le sevrage entraîne la disparition de ces cellules et l'involution de la glande. Photos de glandes mammaires murines issues de *Biology of the mammary gland* (<http://mammary.nih.gov>).

I.1.2. Le cancer du sein

I.1.2.1. Définition

La notion de « cancer du sein » relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif. Le terme de « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes, potentiellement agressives, du sein tandis que le terme de « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes.

Le terme « carcinome » ou « épithélioma » est parfois utilisé, comme synonyme de « cancer ». En réalité le carcinome est un terme spécifique de morphologie microscopique (histologique) qui désigne les types les plus fréquents du cancer du sein d'origine épithéliale. La plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir des cellules épithéliales des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores (carcinomes canaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome in situ sans rupture de la lame basale, par opposition au carcinome infiltrant (**Saglier et Antoine, 1996**). Il existe 4 types architecturaux de carcinomes canaux in situ (massif, cribriforme, papillaire et comédo) dont le pronostic est favorable. Malheureusement, le carcinome est souvent infiltrant, ses formes les plus fréquentes sont le carcinome canalaire infiltrant (85%) et le carcinome lobulaire infiltrant (5%) (**Figure 4**).

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Mais il existe d'autres formes rares de carcinomes infiltrants, tels que les carcinomes médullaires, les carcinomes mucineux (ou colloïdes), les carcinomes tubuleux, les carcinomes apocrines et la maladie de Paget (tumeur du mamelon).

Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares, elles représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes non hodgkiniens primitifs du sein (**Tubiana et Koscielny, 1987; 1990**)

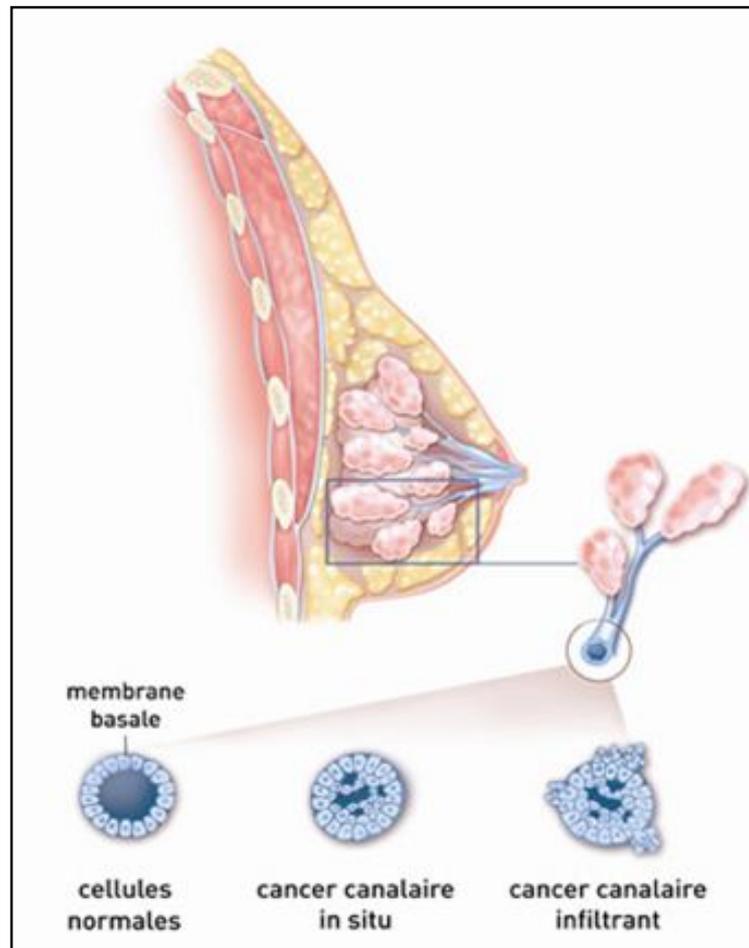


Figure 4 : schéma représentant les différentes localisations et les différents types de cancer du sein. D'après www.arcagy.org

I.1.2.2. Classification du cancer du sein

I.1.2.2.1. Classification histopathologique des carcinomes mammaires selon l’OMS (Tavassoli et al, 2003).

Tumeurs épithéliales non infiltrantes

Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)

Carcinome lobulaire in situ (CLIS)

Tumeurs épithéliales infiltrantes

Carcinome canalaire infiltrant de forme commune

Carcinome canalaire infiltrant avec composante intra-canalaire prédominante

Carcinome lobulaire infiltrant

Carcinome mucineux

Carcinome médullaire

Carcinome papillaire

Carcinome tubuleux

Carcinome adénoïde kystique

Carcinome sécrétant juvénile

Carcinome apocrine

Carcinome métaplasique de type épidermoïde

Carcinome métaplasique de type à cellules fusiformes

Carcinome métaplasique de type chondroïde et osseux

Carcinome métaplasique de type mixte

Maladie de Paget du mamelon

II.1.2.2.2. Classification TNM du cancer du sein, 7e édition 2010, et stade UICC

Le système TNM distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté "cTNM" et le stade anatomopathologique postchirurgical noté "pTNM"

Tumeur Primaire T

Tx: la tumeur primitive ne peut pas être évaluée

T0 : la tumeur primitive n'est pas palpable•

Tis : carcinome in situ•

Tis (DCIS) : carcinome canalaire in situ•

Tis (CLIS) : carcinome lobulaire in situ•

Tis (Paget) : maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente•

NB : la maladie de Paget associée à une tumeur est classée en fonction de la taille de la tumeur

T1 : tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension.

T1mic : micro-invasion ≤ 1 mm dans sa plus grande dimension.

T1a : $1 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ mm}$ dans sa plus grande dimension.

T1b : $5 \text{ mm} < \text{tumeur} \leq 1 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension.

T1c : $1 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 2 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension.

T2 : $2 \text{ cm} < \text{tumeur} \leq 5 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension.

T3 : tumeur $> 5 \text{ cm}$ dans sa plus grande dimension.

T4 : tumeur, quelle que soit sa taille, avec une extension directe soit à la paroi thoracique (a), soit à la peau (b).

T4a : extension à la paroi thoracique en excluant le muscle pectoral.

T4b : œdème (y compris peau d'orange) ou ulcération de la peau du sein, ou nodules de perméation situés sur la peau du même sein.

T4c : T4a + T4b.

T4d : cancer inflammatoire.

Ganglions lymphatiques régionaux pN

Nx : l'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux ne peut pas être évalué (par exemple déjà enlevés chirurgicalement ou non disponibles pour l'analyse anatomopathologique du fait de l'absence d'évidement).

N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique et absence d'examen complémentaire à la recherche de cellules tumorales isolées.

N0 (i-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, étude immunohistochimique négative (IHC).

N0 (i+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, IHC positive, avec des amas cellulaires $\leq 0,2$ mm (considéré comme sans métastase ganglionnaire).

N0 (mol-) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire négative (RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction).

N0 (mol+) : absence d'envahissement ganglionnaire régional histologique, biologie moléculaire positive (RT-PCR).

N1mi : micrométastases $> 0,2$ mm et ≤ 2 mm.

N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou/et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique.

N1a : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires.

N1b : envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique.

N1c : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique (pN1a + pN1b).

N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire.

N2a : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires avec au moins un amas cellulaire > 2 mm.

N2b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire.

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires (niveau III axillaire) ou envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique ou envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux.

N3a : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires (avec au moins un amas cellulaire > 2 mm) ou envahissement des ganglions sous-claviculaires.

N3b : envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la CMI détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique.

N3c : envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux.

Métastases à distance (M)

Mx : renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance.

M0 : absence de métastases à distance.

M1 : présence de métastase(s) à distance.

Classification par stade UICC

0Tis N0 M0.

I T1 N0 M0.

IIA T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0.

IIB T2 N1 M0 ; T3 N0 M0.

IIIA T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0.

IIIB T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0.

IIIC Tous T N3 M0.

IV Tous T Tous N M1.

I.1.2.2.3. Classification SBR

Le type histologique d'un cancer et son degré de différenciation sont les facteurs les plus anciennement connus ; plus une tumeur est différenciée, plus l'évolution est favorable. Les signes inflammatoires sont par contre un facteur très défavorable. La forme commune canalaire infiltrante représentant 65 % des carcinomes mammaires, d'autres facteurs ont été définis. Le grade SBR ou le "grading" de Scarff-Bloom et Richarson est le plus souvent utilisé. Cette méthode appliquée aux carcinomes infiltrants consiste à noter trois paramètres:

- La formation de tubules ou degré de différenciation
- Le pléomorphisme nucléaire ou degré d'anisonucléose
- La fréquence des mitoses.

Un score allant de 1 à 3 est attribué à chacun de ces paramètres. Les différents scores sont additionnés pour obtenir le grade histologique global :

- Grade I = score 3-5 (pronostic favorable)
- Grade II = score 6-7 (pronostic intermédiaire)
- Grade III = score 8-9 (pronostic sombre)

Les cancers de grade I sont mieux différenciés, tandis que les cancers de grade III le sont moins. Les cancers indifférenciés ont habituellement une évolution plus grave et plus rapide que les cancers différenciés (**Amat et al., 2002**).

I.1.2.2.4. Classification moléculaire

Les études fondatrices proviennent des travaux de (**Sorlie, 2001**) :

Utilisant un panel de 534 gènes, Sorlie et al, ont analysé les profils d'expression génique de 115 tumeurs indépendantes du sein et classé les tumeurs mammaires en cinq groupes. Les tumeurs lumineales A et B caractérisées par l'expression des récepteurs aux œstrogènes, du GATA 3 et distinguées par la prolifération faible pour les A et élevée pour les B et l'expression du récepteur alpha-prédominante pour les A. Des tumeurs dites « normal like » expriment les constituants habituels de la glande mammaire. Les tumeurs surexprimant HER2 peuvent également exprimer des œstrogènes et de la progestérone.

Des tumeurs de phénotype basal, n'exprimant ni les récepteurs hormonaux, ni le HER2 présentent un profil d'expression protéique qui est de plus en plus détaillé dans la littérature. Les deux dernières catégories présentant un pronostic plus sombre que les autres catégories. La catégorie « normal like » se répartit dans les trois autres catégories. Ces profils ont ensuite été confirmés dans des études évaluant le profil de plus de 300 tumeurs mammaires associé aux données cliniques, sur trois séries indépendantes.

– **Profil luminal** : il concerne les patientes présentant une réceptivité hormonale importante et exprimant les cytokératines lumineales 8, 18 et 19 et le gène GATA 3 (**Sorlie, 2006**). Ce gène est impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER+. Le récepteur aux œstrogènes alphas est moins exprimé dans la classe lumineale B (**Kaklamani, 2006**). Une forte prolifération dans le phénotype luminal (catégorie B) entraîne un risque relatif de 19 (IC 95 %) par rapport aux tumeurs lumineales de faible prolifération (A) (**Perreard, 2006**). La conséquence est simple : les tumeurs lumineales A sont des tumeurs hormono sensibles pures et bénéficient de monothérapie antihormonale. Les lumineales B devraient bénéficier en plus de l'introduction de la chimiothérapie.

– **Profil HER2** : les études de Pérou et Sorlie confirment bien la catégorisation des tumeurs HER2+ en différentes catégories selon la réceptivité hormonale (**Pérou, 2000; Kaklamani, 2006**). Les travaux de Park et al. ont montré que l'amplification de myc (15,4 %) était associée à une amplification de HER2 (23,3 %) ($p < 0,001$) et associée à une importante prolifération tumorale définie par le Ki67 ($p = 0,010$).

I.1.2.3. Les Facteurs de risque

Le risque de développer un cancer du sein étant très inégal à travers le monde, nous pouvons faire l'hypothèse que les facteurs de risque varient considérablement d'une population à une autre. De nombreux facteurs de risque ont déjà été identifiés, même si l'étiologie du cancer du sein demeure incomplètement connue.

I.1.2.3.1. Facteurs génétiques

La prédisposition génétique : elle est responsable de 5 à 10% des cas et se caractérise par une transmission héréditaire d'une anomalie génétique au niveau des gènes BRCA1 (BRCA1 Carcinoma) ou BRCA2, impliqués dans les processus de cancérisation. En effet, BRCA-1 est muté dans 40 à 45% des cas de cancers du sein héréditaires (**Goldberg and Borgen, 2006**). Le risque relatif d'apparition d'un cancer du sein est multiplié par 2 ou 3 pour une femme ayant une parente au premier degré (mère, sœurs, filles) qui a déjà eu un cancer du sein.

I.1.2.3.2. Facteurs de risque hormonaux

L'exposition prolongée aux hormones endogènes (l'E2 en particulier), liée notamment à une puberté précoce (avant 12 ans), à une ménopause tardive (après 55 ans), à une absence de grossesse (**Keen and Davidson, 2003; Oldenburg et al., 2007**) favorise les cas de cancer du sein. De plus, l'exposition à des hormones exogènes, comme la prise d'un traitement hormonal substitutif, ou encore la prise de contraception orale, augmente également les risques de cancer du sein (**Oldenburg et al., 2007**) ; le rôle des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause est débattu. En revanche, une grossesse avant l'âge de 24 ans ainsi que l'allaitement semblent diminuer ces risques (**Russo et al., 2005**).

I.1.2.3.3. Facteurs pronostiques et survie

Un grand nombre de facteurs interviennent dans l'établissement d'un pronostic de survie. L'âge joue un rôle très important : en absence de métastases, la survie à 5 et 10 ans d'une patiente est respectivement de 67% et 52% lorsqu'elle a moins de 35 ans, de 79% et 63% entre 35 et 65 ans; pour les femmes de plus de 75 ans la survie passe à 51% et 25%. L'évolution de la maladie est d'autant plus sévère que la taille de la tumeur est volumineuse. Le taux de survie à 5 ans est de 99 % si la tumeur est de 1 cm ou moins, alors qu'il n'est plus que de 86 % pour une taille comprise entre 3 et 5 cm (**Donegan et al., 1997**).

L'envahissement ganglionnaire axillaire est le meilleur indicateur de survie des patientes atteintes d'un cancer du sein. Le nombre de ganglions infectés et leur niveau d'envahissement suffisent à prédire le taux de survie. En effet, le taux de survie à 5 ans est de 73 % pour des patientes ayant de 1 à 3 ganglions infectés, de 45,7 % pour 4 à 12 ganglions et de 28,4 % pour 13 ganglions ou plus. Les formes d'emblée métastatiques ont un très mauvais pronostic à 5 et 10 ans : de 15 % et 5 %. Enfin, la surexpression des récepteurs hormonaux a aussi valeur de facteur pronostic. La survie à 5 ans pour un cancer du sein non métastatique est de 74 % en présence de récepteurs des œstrogènes α et de 66 % en leur absence. Pour les récepteurs à la progestérone, la survie à 5 ans est de 81 % en leur présence et de 73 % en leur absence. Ces facteurs sont plutôt favorables, parce que l'expression de ces récepteurs est indicatrice de la sensibilité des cellules tumorales à l'hormonothérapie d'une part, et par ailleurs de nombreuses études montrent que les récepteurs des œstrogènes diminuent les capacités invasives des cellules tumorales.

Le grade histologique est aussi un facteur pronostic important. Il est basé sur l'identification de l'état de différenciation glandulaire, le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses par champ, dans la coupe histologique **(Cianfrocca et al., 2004)**.

I.1.2.3.4. Facteurs de risque environnementaux

Le rôle des facteurs alimentaires avec excès de graisse animale, souvent source d'obésité, est discuté et expliquerait l'incidence croisée avec le cancer de l'endomètre. L'obésité après 50 ans augmente le risque de cancer du sein d'environ 20%.**(Krajinovic et al., 2001)**.

- Le rôle de l'irradiation a été prouvé par les explosions atomiques d'Hiroshima, ainsi que les expositions professionnelles aux polluants environnementaux et les agents chimiques.**(Krajinovic et al., 2001)**.

- Le niveau socio-économique : il est mis en évidence par la plupart des études que les femmes qui ont un niveau de vie élevée ont un risque multiplié par 2.- Le tabagisme et la consommation d'alcool augmenterait le risque de 200% **(Krajinovic et al., 2001)**.

I.1.2.3.5. Le facteur viral

De multiples études sont en cours dans ce domaine étant donné qu'une implication virale a déjà été prouvée pour plusieurs tumeurs : les papillomavirus et le cancer du col utérin, le virus d'Epstein-Barr et le lymphome de Burkitt et le cancer du Nasopharynx, le virus de l'hépatite B et le cancer primitif du foie, le virus HTLV1 et certaines leucémies et lymphomes T, le virus HIV et le sarcome de Kaposi. En effet, les virus ont la faculté d'intégrer leur génome dans l'ADN des cellules hôtes. On peut donc comprendre dans quelle mesure, ils peuvent être impliqués dans cette pathologie, puisqu'ils pourraient générer des mutations génétiques engendrant le cancer. L'implication du virus MMTV dans le développement du cancer mammaire chez la souris est bien admise (**Medina et al., 1976, Clarke et al., 1990**). En effet, cet agent infectieux se transmet de génération en génération par le lait maternel et peut s'intégrer dans le génome de la cellule perturbant l'activité des proto-oncogènes et accélérant la croissance cellulaire (**Medina, 1996**). Des séquences d'ADN montrant une homologie avec celles du virus MMTV ont été détectées dans le cancer du sein humain ce qui suggère que ce virus nommé MMTV-like pourrait être la forme humaine du virus de la tumeur mammaire de souris (**Ford et al., 2003, Wang et al., 1985, 1998**). Ces découvertes n'ont pas été confirmées par d'autres auteurs (**Witt et al., 2003, Mant et al., 2004**). Une association entre les papillomavirus humains (HPV) et le cancer du sein est très controversée.

Certaines études ont décrit la présence des HPV dans le cancer du sein dans des proportions variables (**Di Lonardo et al., 1992 ; Yu et al., 1999**), d'autres études montrent qu'ils ne sont pas impliqués (**Bratthauer et al., 1992 ; Wred et al., 1992 ; Gopalkrishna et al., 1996 ; Czerwenka et al., 1996**). Depuis quelques années, l'étude du virus d'Epstein-Barr (EBV) prend de plus en plus d'importance. Ce virus a déjà été associé au développement de différents cancers : le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, et le carcinome du nasopharynx. Mais, les différentes études sur le cancer du sein menées jusqu'à présent sont contradictoires. En effet, certaines études n'ont pas trouvé de corrélation entre ce virus et le cancer du sein (**Glaser et al., 1998 ; Chu et al., 1998 ; Lespagnard et al., 1995**), d'autres ont constaté une association significative (**Bonnet et al., 1999 ; Grinstein et al., 2002 ; Labrecque et al., 1995**).

Le rétrovirus humain *HERV-K env* ont été détectés dans plusieurs lignés cellulaires du cancer du sein et les tissus tumoraux mammaires, mais pas dans les tissus mammaires bénignes. L'expression des *HERV-K-env* transcriptions a été de 5 à 10 fois plus élevée dans les lignés du cancer du sein de cellules qui ont été traitées avec l'œstradiol et la progestérone, par rapport aux cellules non traitées. L'expression des *HERV-K-env* était significativement plus élevée dans la plupart des tissus du cancer du sein que dans les tissus mammaires normaux. (Wang et al., 2003). une étude de cas-témoins de tissus provenant de 239 donneuses comparant l'exposition au BLV chez les femmes atteintes d'un cancer du sein par rapport à celles sans cancer du sein. L'exposition au BLV dans l'épithélium mammaire était déterminée par une détection par PCR in situ du biomarqueur ADN du BLV. Les taux d'ADN du BLV dans l'épithélium mammaire de femmes atteintes d'un cancer du sein (59 %) étaient significativement supérieurs à ceux des témoins normaux (29 %) (rapport de cotes = 3,07, p = 0,0004). Les taux d'ADN du BLV dans l'épithélium mammaire de femmes présentant des changements pré-malins dans le sein (38 %) étaient intermédiaires entre ceux des témoins normaux et ceux des femmes atteintes d'un cancer du sein. L'ampleur de l'association entre l'ADN du BLV et le cancer du sein est similaire à celle de facteurs de risques établis, tels que les antécédents de reproduction, les hormones et le mode de vie (Buehring et al., 2015).

I.1.2.4. Mécanisme de la carcinogénèse mammaire

La glande mammaire est un organe en évolution permanente ce qui le rend plus susceptible aux transformations cancéreuses. Comme tout mécanisme tumoral, la carcinogénèse mammaire résulte de l'acquisition par les cellules d'un certain nombre de propriétés :

- Une autonomie vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire,
- Une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire,
- Un échappement au système de mort cellulaire programmée (apoptose),
- Un potentiel de réplication illimité,
- Une capacité à susciter l'angiogénèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif (Polyak, 2001).

Ces caractéristiques sont acquises par les cellules tout au long de la croissance tumorale. Le développement d'un cancer d'origine épithéliale peut se résumer en 5 grandes étapes :

I.1.2.4.1. Initiation de la progression tumorale

Elle se caractérise par une accumulation d'altérations géniques que les systèmes de réparation, débordés ou défectueux, ne peuvent plus compenser. De telles transformations cellulaires ont pour conséquence une surexpression des facteurs pro-oncogéniques. La cellule reste tout de même contrôlée par l'environnement cellulaire grâce aux jonctions « gap ».

Les facteurs pro-oncogéniques sont généralement des facteurs de croissance sécrétés par les cellules de carcinomes mammaires. Une fois synthétisés, ces facteurs stimulent les cellules cancéreuses et les cellules du stroma via des mécanismes auto- et paracrines. Les facteurs de croissance identifiés incluent l'EGF (Epithelial Growth Factor), le TGF- β , le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'IGF-2, le PDGF (Platelet derived Growth Factor) et le FGF (Fibroblast Growth Factor). L'EGF, le TGF- β , l'IGF-1 et l'IGF-2 sont exprimés et sécrétés par des lignées cellulaires et des tissus de carcinomes du sein et représentent des agents mitogènes pour la composante épithéliale de ces tumeurs. Le PDGF et le FGF sont également produits par les cellules tumorales et sont responsables de la prolifération stromale retrouvée dans beaucoup de carcinomes mammaires.

Les autres oncogènes fréquemment retrouvés surexprimés dans les carcinomes mammaires regroupent les membres de la famille de récepteurs à l'EGF (EGFR) incluant notamment erbB-2, HER-2, HER-3 et HER-4, ainsi que des membres des familles ras et myc [Eccles, 2001 ; Neve et al., 2001].

Les mécanismes de cancérisation sont aussi provoqués par la perte des fonctionnalités de gènes suppresseurs de tumeur tels que p53, RB1 ou BRCA1 et BRCA2.

I.1.2.4.2. Promotion Tumorale

Les cellules mammaires génétiquement anormales échappent aux contrôles de leur multiplication cellulaire et de leur apoptose, suite à la perte de fonctionnalité d'anti-oncogènes. Elles perdent également leur capacité de communication intercellulaire.

La prolifération d'une cellule transformée peut aboutir à la formation d'une tumeur qui ne franchit pas la membrane basale et reste localisée au niveau de l'épithélium : on parle alors de carcinome *in situ*.

Cette première étape de transition d'un épithélium normal à un carcinome *in situ* est caractérisée par un indice mitotique élevé et une absence de différenciation cellulaire.

Durant plusieurs mois voire plusieurs années, l'apoptose et la prolifération des cellules tumorales peuvent s'équilibrer et le carcinome rester circonscrit à l'épithélium sans franchissement de la membrane basale (**Rampanou, 2009**).

I.1.2.4.3. Métastase des carcinomes mammaires

Au sein du foyer tumoral primaire certaines cellules peuvent acquérir la capacité d'envahir le tissu sous-jacent et de former des métastases à distance de la tumeur d'origine. Cette capacité d'invasion nécessite l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques par les cellules tumorales. Elles subissent notamment une désorganisation des jonctions intercellulaires favorisant ainsi la désolidarisation des cellules de l'épithélium et leur progression dans le tissu sous-jacent. Les cellules acquièrent un phénotype proche des cellules mésenchymateuses ainsi que la capacité à migrer et dégrader les constituants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC). Ceci est rendu possible grâce à l'expression de diverses protéases parmi lesquelles on retrouve les métalloprotéases matricielles (MMPs), qui ont la capacité de dégrader la majorité des éléments de la MEC et la membrane basale. Les cellules tumorales s'infiltrèrent alors dans le stroma sous-jacent et se divisent activement.

Lorsque la tumeur grossit, l'apport en oxygène et en nutriments ne peut plus alors se faire par simple diffusion et cet état entraîne une hypoxie intratumorale.

Cette hypoxie induit une surexpression de gènes angiogéniques et va déclencher un processus de néo-vascularisation qui va favoriser la progression tumorale (**Kerbel et Folkman, 2002 ; Pugh et Ratcliffe, 2003**).

En effet, du fait de l'angiogenèse qu'elles ont induite, les cellules tumorales se trouvent fréquemment à proximité de néovaisseaux. Certaines d'entre elles vont digérer la membrane basale des néovaisseaux ou la paroi lymphatique et pénétrer lors d'un processus d'extravasation dans la circulation sanguine ou lymphatique. Quelques cellules se fixeront à la paroi des capillaires où le flux sanguin est faible et formeront des agrégats ou embolus cellulaires. Les cellules tumorales quittent ensuite ces vaisseaux au cours de l'extravasation pour envahir d'autres organes où elles prolifèrent et créent des métastases.

Les organes les plus fréquemment atteints lors des métastases des cancers du sein sont les poumons, les os et le foie ; souvent, les patientes développent également des métastases multiples aux organes (**Rampanou, 2009**).

I.1.2.4.4. Angiogenèse

L'Angiogenèse est un processus dynamique au cours duquel de nouveaux capillaires sanguins sont formés à partir du réseau vasculaire préexistant. Elle constitue un événement physiologique, intervenant lors de la croissance, la réparation tissulaire mais peut aussi être impliquée dans des états pathologiques comme certains cancers. En pathologie tumorale, l'angiogenèse est reconnue comme étant un élément indispensable à la croissance tumorale et à la diffusion métastatique. En effet, la croissance tumorale requiert la mise en place d'une connexion vasculaire, faisant intervenir deux types tissulaires : la tumeur et le réseau vasculaire (cellules endothéliales), qui interagissent pour former des néovaisseaux (**Bikfalvi, 2003**).

L'Angiogenèse peut se dérouler selon trois mécanismes : par bourgeonnement, par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés, ou encore par septation (les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés) (**Carmeli, 2000**).

I.1.2.4.5. Invasion

L'invasion tumorale constitue la caractéristique majeure des cancers et les distingue des tumeurs bénignes qui restent localisées et n'envahissent pas les tissus voisins. Alors que les épithéliums sains sont caractérisés par des alignements de cellules orientées, unies entre elles par différentes jonctions, les cellules cancéreuses se séparent les unes des autres, perdent leurs jonctions, puis envahissent la membrane basale. L'invasion tumorale nécessite une dégradation de la membrane basale, de la matrice extracellulaire, et de toutes les protéines de structure de ces composants. Dans un premier temps, dit pré-invasif, les cellules tumorales perdent les contacts avec les cellules voisines, mais leur prolifération et leur désorganisation restent limitées au compartiment épithélial d'origine, séparées du reste de l'organisme par une membrane basale, riche en collagène de type IV et en laminine (**Rampanou, 2009**).

On appelle cette prolifération initiale carcinome *in situ*. Dans un second temps, les cellules cancéreuses franchissent la membrane basale, devenant carcinome micro-invasif puis invasif. Elles forment une masse tumorale et peuvent envahir secondairement les vaisseaux lymphatiques et sanguins, et aboutir à la formation de métastases. En général, les cellules tumorales humaines invasives ne sont pas en contact direct avec le tissu conjonctif normal, mais sont enchâssées dans un stroma conjonctif. Ainsi, de nombreux cancers humains présentent deux composantes : l'une épithéliale, composée de cellules malignes, l'autre stromale, composée de cellules conjonctives réactionnelles particulières (**Rampanou, 2009**).

I.2. Virus et cancer du sein

I.2.1. Les *Herpesvirus* Humains : Le Virus Epstein-Barr

I.2.1.1. Historique

En 1958, Denis Burkitt a décrit des cas de lymphomes à localisation maxillaire chez les enfants d'Afrique de l'Est où sévit le paludisme. Il a suggéré que l'étiologie de ces lymphomes est infectieuse.

En 1964, Epstein, Ashong et Barr ont découvert par microscopie électronique sur des cultures lymphomateuses issues de lymphomes de Burkitt des particules virales avec les mêmes caractéristiques morphologiques que les herpes-virus (**Figure 5**) (**Epstein et al., 1965**).

Des études immunologiques et antigéniques menées par Henlé et ses collaborateurs ont alors mis en évidence qu'il s'agissait d'un nouveau membre de la famille *Herpesviridae*, qui fut dès lors nommé virus d'Epstein-Barr (EBV).

En 1968, une technicienne du laboratoire de Gertrude Henlé, séronégatif pour EBV, développa une mononucléose infectieuse (MNI), puis fit une séroconversion EBV. Grâce à cet événement, l'EBV fut reconnu comme l'agent étiologique de la MNI (**Sueur, 2011**).

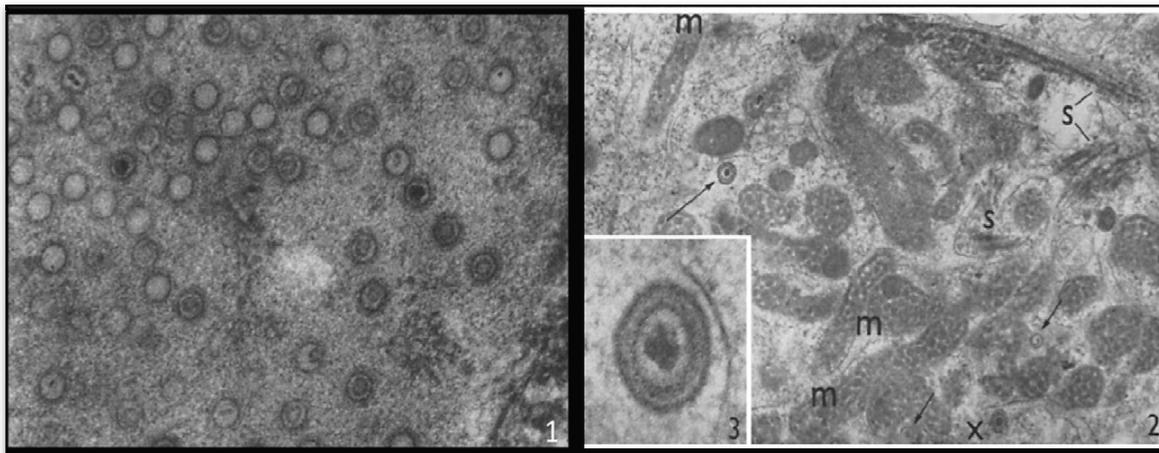


Figure 5 : Particules de l'EBV visualisée en microscopie électronique (Epstein et al., 1965)

(1) Coupe de lymphoblaste contenant de nombreuses particules immatures d'environ 75nm de diamètre, délimitées par une simple membrane et de profil hexagonal (x76500) (2) Coupe de lymphoblaste contenant des particules immatures (flèche courte) et une particule mature (longue flèche) de 110nm de diamètre, avec une double membrane et un nucléoïde dense (x42000) m désigne les mitochondries et s désigne des faisceaux de microtubules (3) Détail d'une particule virale mature de 115nm de diamètre avec une double membrane et un nucléotide central dense de 45nm (x213500).



I.2.1.2. Taxonomie de l'EBV

Famille : *Herpesviridae* (Herpès qui vient du grec – herpein - et qui signifie accrocher de façon permanente).

Sous-famille : *Gammapherpesvirinae*.

Genre : *Lymphocryptovirus* (virus caché dans les lymphocytes).

Espèce: HHV-4 (Human Herpes Virus type 4).

Nom commun : Epstein-Barr Virus (EBV).

I.2.1.3. Structure du virus

L'EBV est un virus de 122 à 180 nm de diamètre possédant une structure commune à tous les *Herpesvirus*. Il est composé de :

- Une molécule d'ADN double brin linéaire enroulée autour de structures protéiques fibrillaires, appelées « core » (**Young et Murray, 2003**).
- Une capsidie protéique icosaédrique, à 162 capsomères dont la protéine majoritaire étant la protéine VCA pour Viral Capsid Antigen (immunogène).
- Un tégument, structure protéique fibrillaire entre l'enveloppe et la capsidie.
- Une enveloppe dérivée de la membrane nucléaire et portant des glycoprotéines virales (**Figure 6**).

Parmi ces glycoprotéines, la gp350/220 permet l'adhésion cellulaire grâce à sa liaison au récepteur CR2, appelé également CD21, ce qui correspond à la toute première étape de l'infection virale des lymphocytes B (**Szakonyiet al., 2006**).

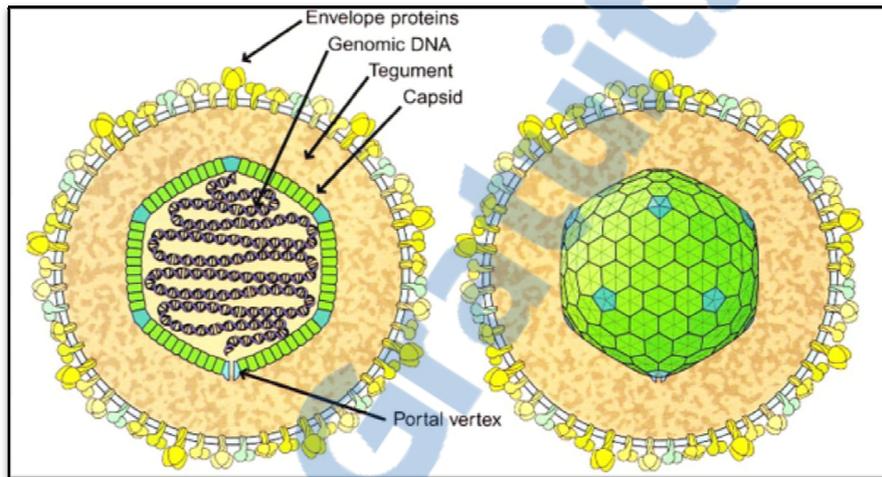


Figure 6: Schéma de la structure de l'EBV (Szakonyi et al., 2006).

I.2.1.4. Le génome de l'EBV

Le génome d'EBV est constitué d'un ADN bicaténaire de 172 kpb. Il comporte des séquences terminales répétées (TR) d'environ 500 pb en tandem direct à ses deux extrémités, ainsi qu'une importante zone de répétition interne (Internal Repeat 1 ou IR1) séparant le génome en deux régions uniques longue et courte (respectivement, "Long Unique region" ou UL et "Short Unique region" ou US) (**figure 7**). Le nombre des TR varie de 4 à 12. Ces séquences terminales permettent notamment au virus de circulariser son génome pour devenir un épisode. Sous cette forme, l'EBV maintient son génome de façon stable dans les cellules infectées sans avoir à l'intégrer au génome de l'hôte. L'IR1 est quant à elle constituée de 7 à 12 répétitions en tandem de séquences mesurant environ 3 kpb chacune. Les zones US et UL qu'elle délimite mesurent respectivement environ 15 et 150 kpb. Au sein de l'UL, d'autres répétitions en tandem ont été décrites : IR2, 3 et 4. Des répétitions en tandem de modules de 125 pb et 103 pb ont été respectivement observées pour l'IR2 et l'IR4. L'IR3 est une séquence où trois triplets GGG, GCA et GGA sont réitérés sur 700 pb. Ainsi, la région UL comporte 4 zones uniques appelées U2 à U5 (U1 servant à décrire US). Enfin, deux séquences identiques mesurant 1 kb ont été localisées à 2 endroits différents du génome viral, l'une au contact d'IR2 (séquence DL) et l'autre au contact d'IR4 (séquence DR). C'est dans ces séquences que se trouvent les origines de réplication lytique du virus (ori lyt). On retrouve également une origine de réplication latente (Ori p) située au niveau de U1 (**Young et Rickinson, 2004**).

Le génome a plus de 108 phases ouvertes de lecture (POL). Les POL, les gènes, les sites de régulation ou de transcription sont fréquemment référencés par rapport à des fragments du génome obtenus après digestion par l'enzyme de restriction BamHI. Chaque fragment est nommé par une lettre. Le sens de lecture a été arbitrairement fixé ainsi : sur le génome linéaire, de U1 vers U5 représente le sens R (Rightward) et de U5 vers U1, le sens L (Leftward). Ainsi, par exemple, le gène codant la protéine LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) est parfois appelé BNLF-1 parce qu'il se trouve sur le fragment BamHI N, qu'il est transcrit dans le sens L et qu'il s'agit de la première POL (F-1). Il existe entre les différents isolats d'EBV un polymorphisme au niveau du nombre des séquences en tandem dans les TRS. Un polymorphisme s'observe également au niveau des IRS et de plusieurs gènes dont BYRF-1 (codant la protéine EBNA-2), BZLF-1 (codant la protéine Zta) et BNLF-1 (codant la protéine LMP-1, Latent Membrane Protein-1). (**Young et Rickinson, 2004**).

I.2.1.5. Transmission

La transmission de l'EBV se fait essentiellement par contact direct avec la salive (d'où l'appellation « maladie du baiser »).

Les contaminations par transfusion, voies sexuelles, transplantations d'organes ou verticales (Mère/enfant) ont été rapportées (**Rampanou, 2009**).

I.2.1.6. Cellules cibles

Suite à la transmission du virus par la voie oropharyngée, il infecte sa cellule cible, le lymphocyte B naïf. Il peut également infecter les cellules épithéliales oropharyngées comme en témoignent les études *in vitro* et l'induction de certaines pathologies associées à l'EBV: carcinome du nasopharynx ou leucoplasie chevelue de la langue (**Hadinoto et al., 2009 ; Tugizov et al., 2013**).

I.2.1.7. Cycle de multiplication de l'EBV

La connaissance des différentes étapes du cycle biologique de l'EBV aussi que les mécanismes associés sont essentielles pour la compréhension de l'infection aussi que les processus qui induisent la pathologie tumorale (**Figure 8**).

➤ Phases précoces

- Attachement

L'infection du lymphocyte B naïf est initiée par la liaison de la glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale (gp350/220) avec le récepteur cellulaire CD21 exprimé à la surface (**Young et al., 2004 ; Ogembo et al., 2013**).

Un nouveau récepteur pour l'EBV a été récemment découvert. Il s'agit de la molécule CD35, découverte chez un patient génétiquement déficient en CD21. Des modèles de transduction *in vitro* montrent que les cellules pré-B exprimant le CD35 et n'exprimant pas CD21, mises en contact avec de l'EBV deviennent des cellules infectées de manière latente (**Ogembo et al., 2013**).

- Pénétration

L'entrée du virion dans la cellule a lieu après la fusion de l'enveloppe virale et la membrane cellulaire par interaction entre la glycoprotéine de l'enveloppe virale gp42 et la molécule HLAII. (Huraux, 2003).

- Décapsidation

La nucléocapside, libérée dans le cytoplasme, migre en direction des pores nucléaires et se désintègre progressivement pour libérer la molécule d'ADN viral qui va pénétrer dans le noyau. Le génome viral, linéaire dans le virion, se circularise dans le noyau par l'intermédiaire des extrémités TR. Ce phénomène implique une recombinaison au niveau des séquences des extrémités TR [(Huraux, 2003 ; Ballout M, 2005).

La réplication de l'EBV est associée à deux évolutions totalement différentes :

- Soit à un cycle réplcatif lytique, qui se caractérise par la lyse des cellules infectées.
- Soit à une prolifération cellulaire continue où seuls les gènes viraux de latence sont exprimés, c'est la phase de latence.
- Soit une infection latente, caractérisée par une expression partielle des gènes viraux : les gènes de latence. Ce type d'infection est associé à une prolifération cellulaire continue.

- Cycle lytique

Le cycle lytique correspond à la phase du cycle biologique durant de laquelle les virions sont produits.

In vitro, la phase de la reproduction virale ou cycle lytique a lieu spontanément dans certaines cellules, ou bien après activation par des agents inducteurs chimiques (esters de phorbol, butyrate de sodium) ou biologiques (anti-immunoglobulines de surface, TGF (transforming growth factor), hormones stéroïdiennesetc) (Vincent M et al., 2001).

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le cycle répliatif comporte trois phases, très précoce, précoce et tardive, correspondent à l'expression de trois catégories de gènes distinctes. Ces gènes ont pour fonction de conditionner la cellule de façon à assurer un environnement optimal pour la réplication de l'ADN viral, d'assurer la réplication du génome et de produire les protéines constitutives des virions. L'un des gènes de la phase lytique code un homologue viral de l'IL10 cellulaire qui pourrait moduler la réponse cytotoxique et donc faciliter la persistance des cellules en cours de réplication (in vivo).

- **Durant la 1^{ère} phase**, les gènes très précoces sont transcrits, sans synthèse préalable de protéines virales. Les protéines très précoces sont présentes au début du cycle lytique mais elles peuvent être retrouvées tout au long du cycle viral.

L'entrée de la phase lytique est déterminée par l'expression de la protéine transactivatrice ZEBRA. La régulation de l'expression de cette protéine semble être la clé du passage de la phase de la latence à la phase de la production virale.

ZEBRA en coopération avec une deuxième protéine transactivatrice R, sont responsables d'une cascade d'activations aboutissant à la production des virions.

ZEBRA active la transcription de son propre gène, elle induit l'expression des gènes précoces, elle permet la réplication de l'ADN viral à partir des deux origines de réplication lytique Orilyt (DR et DL) et l'expression des gènes tardifs (**Hurax, 2003**).

- **Durant la 2^e phase**, sont transcrits les gènes précoces, à condition que les ARN messagers très précoces aient été traduits. Les protéines synthétisées sont des facteurs de la transcription virale ainsi que les enzymes virales impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques (dihydrofolate réductase, thymidilate synthétase, thymidine kinase, ribonucléotide réductase, dUTPase) ou dans la réplication de l'ADN (dans bindingprotein, ADN polymérase, hélicase-primase...) et au moins une protéine
- homologue 0 la molécule anti-apoptotique Bcl2. Il est probable que cette protéine retarde la mise en place des voies d'apoptose qui visent à limiter la production des particules virales (**Vincent M et al., 2001 ; Hurax, 2003**).

L'essentiel de la réplication de l'ADN viral est réalisé par les enzymes virales produites mais en association avec des facteurs de réplication d'origine cellulaire.

I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

- **Durant la 3^e phase**, sont transcrits les gènes tardifs, à condition que la réplication de l'ADN viral ait eu lieu. Les protéines synthétisées sont celles de la capsid dont la protéine majoritaire étant la protéine VCA (Viral Capsid Antigens) et des glycoprotéines de l'enveloppe. On trouve également la protéase nécessaire à l'assemblage et à la maturation des particules virales (**Huroux, 2003 ; Sueur, 2011**).

La molécule d'ADN génomique est incorporée à l'intérieur d'une capsid presque terminée pour constituer la nucléocapsid. Cet assemblage a lieu dans le noyau cellulaire et nécessite une protéase codée par le virus. Les nucléocapsides rencontrent, au cours de leur migration en direction de la surface de la cellule, les membranes nucléaires et/ou intracytoplasmiques dans lesquelles elles bourgeonnent.

Les glycoprotéines virales de surface et transmembranaires sont incorporées dans les membranes cellulaires et sont assemblées avec les virus au cours de cette migration. Les particules virales sont généralement libérées par bourgeonnement et l'effet cytopathogène accompagnant le cycle aboutit à la destruction de la cellule (lyse passive ou bien apoptose (**Ballout M, 2005**)).

Les virus néosynthétisés libérés se retrouvent au niveau de l'oropharynx et vont à nouveau infecter des lymphocytes B naïfs et de nouvelles cellules épithéliales. Par ce processus, des sujets sains en réactivation excrètent du virus de façon abondante dans leur salive et le transmettent à d'autres personnes (**Cohen, 2000 ; Hadinoto et al., 2009 ; Odumade et al., 2011**).

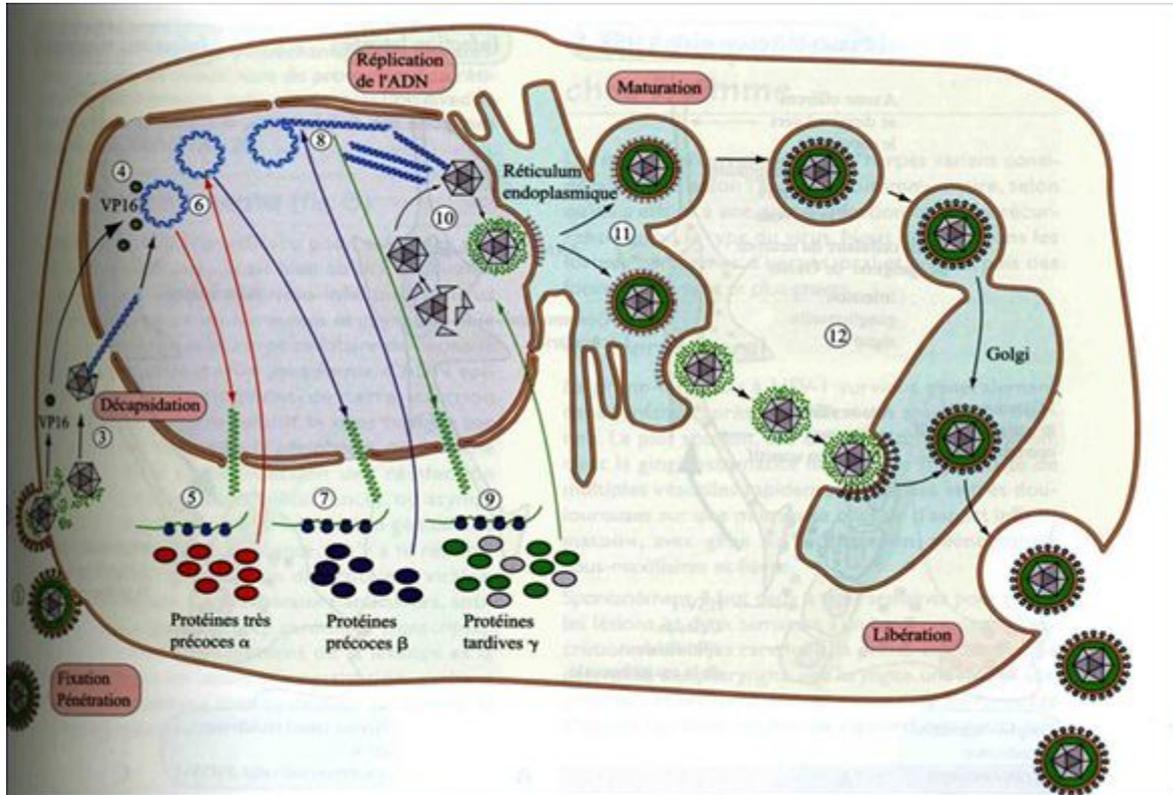


Figure 8 : Cycle de répliation de l'EBV (Huraux, 2003).

➤ Phase de latence

La latence correspond à une phase spécifique de l'interaction virus-hôte au cours de laquelle l'épisome viral persiste à long terme même si la cellule se divise, et il n'y a pas de production de particule infectieuse.

Dix gènes sont transcrits et traduits en dix protéines. Ce sont six EBNA, pour Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA3L), trois LMP, pour latent membran protein (LMP1, LMP2A, LMP2B), et le produit de gène BARFO, pour Bam HI A right frame 0. De plus, deux gènes sont transcrits en deux ARN non poly adénylés et non traduits, appelés EBER1 et EBER2, pour EBV encoded small RNA (**Huraux, 2003**).

Ces protéines commencent à avoir des fonctions bien définies ; ce sont notamment des protéines oncogènes et anti-apoptotiques (**Young et al., 2004 ; Saha et al., 2011**).

L'ADN viral se réplique de façon synchrone au dédoublement du génome cellulaire. C'est le rôle de la protéine EBNA-1 qui se lie à la seconde origine de réplication Ori-P du génome EBV et l'active ; la stabilité du nombre de copies au cours des divisions cellulaires successives est donc assurée. Le génome viral se maintient en général sous forme extrachromosomique circulaire (= episome) en plusieurs copies (**Ballout M, 2005**).

a. Les protéines de latence

- **Les antigènes nucléaires (EBNA, Epstein-Barr virus Nuclear Antigen)**

In vivo, ces protéines sont exprimées essentiellement dans les lymphoproliférations du sujet immunodéprimé.

- EBNA1 est exprimée dans toutes les cellules infectées ; elle permet le maintien et la réplication de l'épisome viral ; elle interagit également avec certains promoteurs viraux. La protéine EBNA1 est reconnue par les lymphocytes T CD4+ mais pas par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) du fait d'une séquence répétitive glycine/alanine qui empêche son apprêtement et donc sa présentation comme antigène par les molécules HLA de classe I à la surface de la cellule infectée. Elle est également anti-apoptotique en particulier dans la maladie de Hodgkin (**Saha et al., 2011**).

- EBNA2 est une protéine transactivatrice de l'oncogène cellulaire myc et du récepteur cellulaire CD23 ainsi que les gènes viraux codant pour les protéines LMP1 et LMP2A.
- EBNA1P interagit avec EBNA2 comme cofacteur de la transactivation.
- EBNA 3A/B/C modulent la transactivation d'EBNA2 en conjonction avec EBNA1P. EBNA3C interagit plus spécifiquement avec des facteurs de modulation de transcription (Amiel, 2013).

❖ Les protéines de latence membranaires (LMP, Latent Membrane Proteins)

- LMP1 est la principale protéine transformante de l'EBV avec un rôle oncogène essentiel ainsi qu'une activité anti-apoptotique par stimulation du facteur anti-apoptotique bcl2 ainsi que d'autres gènes d'immortalisation. De plus, LMP1 mime la molécule cellulaire CD40, ce qui représente un des deux signaux de survie du lymphocyte B dans le centre germinatif. *In vivo*, elle est exprimée dans les cellules lymphoprolifératives des tissus lymphatiques infectés du sujet immunodéprimé dans les carcinomes nasopharyngés et dans la maladie de Hodgkin (Amiel, 2013).
- LMP2A et LMP2B ne jouent pas de rôles essentiels dans la transformation de l'EBV des cellules B *in vitro*. Mais LMP2A mime l'engagement du récepteur B pour l'antigène (BCR ; B cell receptor), autre facteur de survie du lymphocyte B. Elle induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose et la suppression de l'immunité cellulaire. Enfin, LMP2A peut également transformer les cellules épithéliales (Amiel, 2013).

b. Les ARN de latence

❖ Les EBERs (EBV-Encoded small non polyadenylated RNAs)

Les EBERs sont très abondants dans les cellules transformées. Ils se lient à la protéine kinase R (PKR) et inhibent sa fonction apoptotique et son rôle médiateur dans les effets antiviraux des interférons. Dans le lymphome de Burkitt, ils augmentent la tumorigénicité, la survie cellulaire et l'induction d'interleukine 10 (Amiel, 2013).

❖ Les BARTs (BamHI-A right ward transcripts) :

Les transcrits BARTs sont des ARN très abondamment exprimés, qui ont été retrouvés initialement dans le carcinome nasopharyngé mais que l'on retrouve également dans toutes les cellules des lymphoproliférations B et T (Young et al., 2003 ; Hadinoto et al., 2009 ; Saha et al., 2011).

c. Les types de phase de latence : tableau I

❖ La phase de latence de type III

L'infection des lymphocytes **B naïfs** entraîne une activation avec prolifération polyclonale des cellules (prolifération lymphoblastoïde) et expression de marqueurs d'activation. Dans ce cas toutes les protéines du cycle de latence sont exprimés (6 EBNA et 3 LMP), ainsi que les ARN EBER (Cohen, 2000 ; Young et al., 2004).

❖ La phase de latence de type II

Les lymphocytes B naïfs se différencient en cellule **B mémoires** avec mutation somatique des gènes d'immunoglobuline (Ig) et se localisent dans le centre germinatif ; le virus entre alors en latence II (programme de différenciation cellulaire). L'expression virale est limitée aux protéines EBNA1, LMP1, LMP2A, LMP2B et ARN EBER.

❖ La phase de latence de type 0

Chez les patients non immunodéprimés le système immunitaire spécifique du virus qui se met en place va contrôler les événements de réplication virale ; les lymphocytes **B** deviennent des cellules **mémoires CD27+** à longue durée de vie au repos. Le virus entre alors en phase latence 0 ; aucun gène n'est exprimé sauf un peu d'EBNA1.

❖ La phase de latence de type I

Lorsque le lymphocyte B entre en division, le génome virus EBV (sous forme épisomale) entre également en phase de réplication. Il entre alors en phase de latence I avec expression d'EBNA1 et ARN EBER. (Cohen, 2000 ; Huraux, 2003 ; Young et al., 2004 ; Heslop, 2009).

I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ces formes de latence sont retrouvées également dans les pathologies induites par EBV : latence III dans les lymphoproliférations post-greffe (PTLD), latence II dans la maladie de Hodgkin et le carcinome nasopharyngé (CNP), latence I dans le lymphome de Burkitt et le carcinome gastrique (Young et al., 2004 ; Heslop, 2009).

Tableau I : Profil d'expression des protéines virales selon le type de latence (Young et al., 2004)

	Latence type 0	Latence type I	Latence type II	Latence type III
EBNA-1	-	+	+	+
EBNA-2	-	-	-	+
EBNA-3A, B, C	-	-	-	+
EBNA LP	-	-	-	+
LMP-1	-	-	+	+
LMP-2A,B	-	-	+	+
EBERs	-	+	+	+
BART	+	+	+	+
Exemples	Lymphocyte B mémoire	Lymphome de Burkitt	Lymphome Hodgkin Carcinome du Nasopharynx	Lignée cellulaire lymphoblastoïde Lymphomes associés au HIV Lymphoproliférations post- transplantation

I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Le virus EBV est donc soit en phase de latence (0, I, II ou III) ou en phase répliquative (appelée également « cycle lytique » avec expression des transcrits très précoces (IE ; immediate early), précoces (E ; early) ou tardifs (L ; Late). Ces phases correspondent à des étapes physiologiques ou à des états pathologiques bien définis. Néanmoins les progrès des techniques d'étude d'expression des transcrits de l'EBV montrent que ces différentes phases de latence/réplication sont parfois intriquées. C'est le cas en particulier dans le carcinome nasopharyngé qui associe l'expression de protéines de latence II avec de protéines du cycle répliquatif comme la protéine transactivatrice ZEBRA (**Figure 9**) (Amiel, 2013).

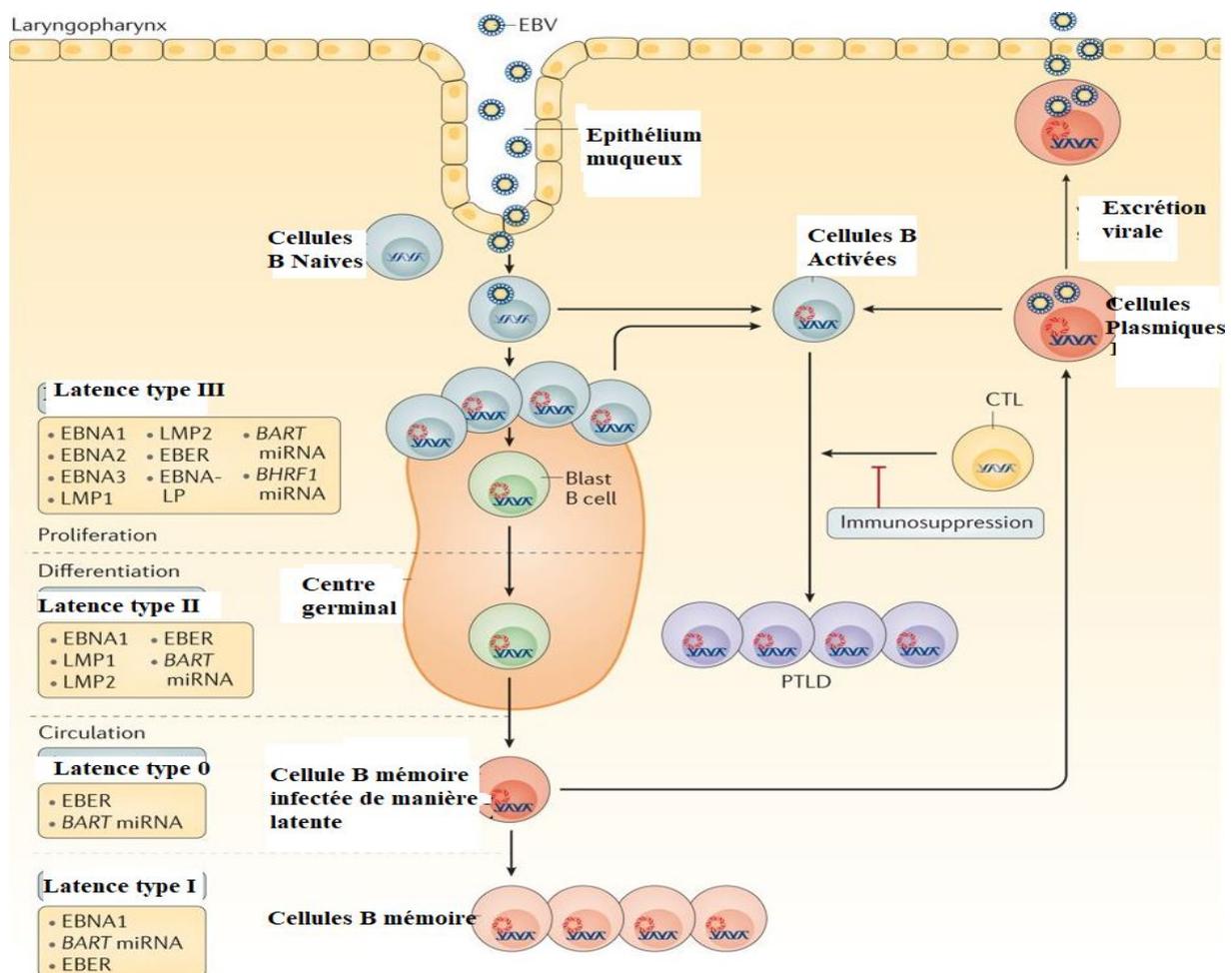


Figure 9 : Cycle biologique de l'infection par l'EBV. (Nature Review)

I.2.1.8. Oncogenèse virale de l'EBV

Le virus Epstein-Barr est le premier virus oncogène découvert chez l'homme. C'est l'un des virus capables de transformer et d'immortaliser des cellules humaines en culture. **(Vincent M, 2013).**

Plusieurs protéines de latence ont une activité oncogène avérée, à la fois dans le contexte des lymphocytes B et des cellules épithéliales.

L'expression persistante des protéines virales dans des tumeurs survenant chez des patients immunocompétents apporte la preuve que le virus Epstein-Barr a mis en place de multiples stratégies d'immuno évaison remarquablement efficaces au cours de son évolution : réduction de l'expression des molécules des CMH-I et II, inhibition du processing des antigènes viraux, production de cytokines de type Th-2 ou viro-induites (IL-6, IL-10) qui altèrent la réponse immunitaire locale de type Th-1, modulation négative des signaux de mort imposés par les cellules immunitaires aux cellules infectées. **(Vincent M, 2013).**

L'analyse de virus porteurs de délétions partielles et l'utilisation de « mini-virus » a permis d'établir qu'au moins 6 protéines virales sont requises pour activer les lymphocytes B quiescents et induire leur prolifération (gp350, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, EBNA3L et LMP1) :

- La glycoprotéine gp350 intervient dès la phase précoce de l'infection virale. L'interaction gp350 CD21 déclenche en effet un signal qui reconditionne le lymphocyte quiescent et le rend compétent pour exprimer les gènes cellulaires nécessaires à la division cellulaire.
- EBNA2 et EBNA3L agissent ensuite en coopération pour activer l'expression du gène codant la cycline D2, une protéine cellulaire qui contrôle l'entrée du lymphocyte quiescent (phase G0) dans la phase G1 du cycle cellulaire.
- EBNA2 intervient également de façon déterminante dans les cellules en division ; elle induit en particulier l'expression de plusieurs gènes cellulaires (CD21, CD23, CD25, c-fgr, etc.) dont les produits activent directement la multiplication des cellules. EBNA2 est par ailleurs un activateur majeur de l'expression des gènes de latence. **(Vincent M, 2013).**

I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

- EBNA1P interagit avec les produits des gènes suppresseurs de tumeur P53 et pRb ; par ce biais, elle contribue probablement à stimuler l'entrée des cellules en phase S tout en limitant l'activité antiproliférative de P53.
- EBNA3C interagit également avec le produit du gène Rb (pRb).

- Bien que plusieurs travaux témoignent de l'importance de la protéine EBNA3A, notamment dans les phases précoces de l'activation des cellules B quiescentes, son rôle exact n'est pas encore totalement élucidé.
- LMP1 est capable d'altérer les voies de différenciation des cellules épithéliales et de conférer des propriétés tumorigènes aux cellules de rongeurs dans lesquelles elle est exprimée de façon constitutive. LMP1 se comporterait en fait comme un récepteur cellulaire membranaire, assez similaire au récepteur CD40, active de façon constitutive. Sa présence à la surface des cellules initie plusieurs voies de transduction du signal qui conduisent à l'activation de médiateurs de signaux poly spécifiques, tels que les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (*activator protéine 1*) ou des kinases. plusieurs gènes anti-apoptotiques comme bcl-2 et A20, des gènes codant des cytokines (IL1, -2, -6, -8, TNF α , etc.), enfin de chaîne de signalisation ou des récepteurs et des marqueurs membranaires d'activation sont activés. **(Vincent M, 2013)**.
- Les fonctions des deux autres protéines de latence membranaires, LMP2A et 2B, sont encore beaucoup discutées. Des résultats d'étude préliminaires anciens suggèrent le rôle de la protéine LMP2A dans le blocage de l'entrée du virus latent dans le cycle lytique.
- Des travaux plus récents suggèrent que LMP2A pourrait produire un signal susceptible de promouvoir la survie des cellules B dans le sang circulant. **(Vincent M, 2013)**.

En conclusion, les modèles d'études de la latence ex vivo permettent de proposer un modèle selon lequel la prolifération continue des lymphocytes B quiescents sous l'action de l'EBV est le résultat de l'action séquentielle et coordonnée (i) de la glycoprotéine gp350 (réveil transcriptionnel du lymphocyte B quiescent), (ii) des protéines EBNA2 et EBNA1P, puis EBNA3A (transition G0 -> G1), (iii) de la protéine EBNA3C (transition G1 -> S).

La protéine LMP1 est sans doute indispensable à la production de signaux mitogènes (ordre de division) et au blocage des voies d'apoptose, alors que LMP2A prolongerait la survie des cellules infectées et bloquerait l'entrée du virus en phase lytique.

Rôle des ARN viraux :

Aux activités des protéines de latence ci-dessus rapportées s'ajoutent également celles d'ARN :

La découverte des mi-RNA (mi-RNA BART ou dérivés de la région BHRF1) viraux a apporté un nouveau degré de complexité dans la compréhension des interactions entre EBV et progression tumorale. Les mi-RNA sont de courtes séquences d'ARN complémentaires de transcrits cellulaires ou viraux. En formant des duplexes avec les transcrits viraux il perturbe leur traduction ou leur stabilité. EBV produit environ 40 miRNA matures qui ciblent les produits des gènes cellulaires et viraux pour induire et réguler plusieurs fonctions (**Jia et al., 2014 ; Piedade et Azevedo- Pereira 2016**).

- L'effet pléiotrope des mi-RNA réside notamment dans leur capacité à reconnaître plusieurs ARNm distincts. En conséquence, ils se trouvent souvent au centre de réseaux complexes de régulation de l'expression des gènes. Les cibles des mi-RNA codés par l'EBV sont impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire, l'induction de l'apoptose ou le contrôle de la prolifération cellulaire (**Vincent M. 2013**).
- Les EBERs augmentent la tumorigénicité, la survie cellulaire et l'induction d'interleukine 10 en inhibant la fonction apoptotique de la protéine kinase R (PKR) ainsi que son rôle médiateur dans les effets antiviraux des interférons (**Amiel, 2013 ; Albanerse et al.,2016**).

Les cancers associés au virus Epstein-Barr apparaissent comme des incidences très rares en regard de la prévalence élevée de ce virus dans les populations humaines. Dans la majorité des cas, la transformation des cellules – liée à l'expression des oncoprotéines virales et probablement à celle des mi-RNA – est parfaitement contrôlée par la réponse immunitaire.

Hors d'un contexte d'immunosuppression majeure, des fragilités de cette réponse (allèles HLA spécifiques ? Exposition répétée à des antigènes microbiens ? Altérations génétiques survenant lors des processus de maturation des lymphocytes ?) Conjuguées éventuellement avec l'action de co-carcinogènes chimiques pourraient autoriser l'émergence de clones de cellules pré-tumorales. **(Vincent M, 2013)**.

La prolifération de ces clones favorise sans doute une instabilité du génome cellulaire qui facilite l'acquisition de mutations secondaires contribuant elles-mêmes à accroître le pouvoir tumoral des cellules infectées. Un tel modèle suggère que la contribution du virus réduit au fur et à mesure que le processus tumoral évolue **(Vincent M, 2013)**.

Actuellement l'EBV est associé à deux types de cancers : les lymphoproliférations qui affecte majoritairement les lymphocytes B mais aussi minoritairement les cellules T et NK ainsi que des cellules épithéliales, c'est le cas essentiellement du carcinome du nasopharynx, certains carcinomes gastriques, voire mammaires ou pulmonaires. En dehors de ces proliférations malignes, d'autres pathologies pourraient être associées à l'EBV même si la relation de cause à effet reste encore très débattue : la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque, la myasthénie, le syndrome de fatigue chronique **(Odumade OA et al., 2011)**.

I.2.1.8.1. Les lymphomes

➤ Lymphome de Burkitt

Il existe trois types de lymphome de Burkitt : endémique, sporadique, et lié à l'infection VIH. Le Burkitt endémique ou « africain » se localise préférentiellement au niveau des os de la face (mâchoire) et touche les enfants de 4 à 7 ans ; il est associé à l'EBV dans 90-95 % des cas. On le retrouve essentiellement dans les zones à forte endémie palustre.

Le Burkitt sporadique concerne les jeunes adultes, il se localise au niveau de l'estomac et de l'abdomen ou du tractus respiratoire et il est associé à l'EBV dans 15 % des cas.

I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le Burkitt associé au SIDA se localise au niveau des ganglions et de la moelle osseuse ; il est associé à l'EBV dans 30 à 40 % des cas.

Il représente 20 % des lymphomes des patients infectés par VIH-1 et le risque de développer un Burkitt chez ce type de patient est généralement 200 à 1 000 fois plus élevé que le reste de population (**Macsween et al., 2003**).

Le facteur principal de la pathogenèse du lymphome de Burkitt est une translocation chromosomique du proto-oncogène c-myc du chromosome 8 vers le locus des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines : translocations 8 /14 (80 %) ; 8/2 ; 8/22. Le gène myc code le facteur de transcription Myc. Cette translocation est le résultat accidentel d'une multiplication prolongée et intense des lymphocytes B sous l'influence de l'EBV et du paludisme endémique, selon l'hypothèse émise par Burkitt.

Plasmodium falciparum diminuerait le contrôle de la prolifération des cellules B par les lymphocytes T et par conséquent favoriserait cette prolifération. La dérégulation et l'expression constitutive de c-myc serait responsable de la prolifération incontrôlée des lymphocytes B.

Une autre hypothèse est que l'exposition répétée des lymphocytes B à certains antigènes paludéens (comme la fraction de la protéine P1 de membrane, CIDR1 alpha) jouerait un rôle d'activateur polyclonal des cellules B, augmentant leur survie, activant le compartiment B mémoire, induisant la prolifération virale, ce qui favoriserait leur transformation par l'EBV (**Moormann et al., 2011**).

Le virus est en phase de latence I dans le lymphome de Burkitt, il exprime uniquement EBNA1 en plus des EBERs. Le défaut de reconnaissance d'EBNA1 par les CTL fait que le traitement par immunothérapie adoptive (transfert de CTL) reste peu efficace (**Merlo et al., 2010**).

➤ **Maladie de Hodgkin**

L'association EBV et maladie de Hodgkin a longtemps été suspectée sur la base d'une élévation des Ac anti-EBV et de l'augmentation de l'incidence des Hodgkin dans les 5 ans qui suivent la mono nucléose infectieuse (MNI). Il y aurait 2 à 5 fois plus de risque de développer une maladie de Hodgkin chez un patient ayant fait une MNI. L'identification d'ADN-EBV dans les cellules de Reed Sternberg (CRS) a confirmé cette hypothèse. Les CRS sont des cellules B issues des centres germinatifs, avec réarrangement fonctionnel des gènes des Ig mais défaut de transcription des Ig.

La survie de ces cellules serait due à la présence de l'EBV (**Macsween et al., 2003**).

Il existe quatre types histologiques : sclérose nodulaire, cellularité mixte, à déplétion lymphocytaire ou à prédominance lymphocytaire. Le lymphome de Hodgkin est associé à l'EBV dans 40 à 65 % des cas et dépend du type histologique du Hodgkin (EBV très souvent retrouvé dans le type cellularité mixte), de l'âge et du pays.

La latence associée est une latence de type II avec expression des protéines EBNA1, LMP1 et LMP2A. On retrouve toujours une activation de NF-kB (facteur de transcription) liée à la présence de LMP1 dans les CRS ou une inactivation des inhibiteurs de NF-KB lorsque les cellules CRS sont EBV-négatives (**Cohen et al., 2000 ; Tsuchiya et al., 2002 ; Young et al., 2004 ; Thorley-Lawson et al., 2004 ; Edwards RH, 2008**).

➤ Lymphomes T

L'EBV a été relié également à différents lymphomes touchant les cellules T, bien que la cible préférentielle d'infection par l'EBV soit les lymphocytes B. Un exemple commun en Asie est un lymphome extranodal qui se présente sous forme d'une lésion érosive dans la cavité nasale. Ce type de lymphome dériverait de cellules cytotoxiques infectées par l'EBV ayant pour origine soit un lymphocyte T, soit une cellule NK (**Young et al., 2004**).

I.2.1.8.2. Les carcinomes

➤ Le carcinome indifférencié du nasopharynx

Le carcinome nasopharyngé (CNP) indifférencié est une tumeur épithéliale, première cause de cancer chez les Chinois de la région de Canton, même émigrés dans un autre pays. Le CNP est responsable d'environ 50 000 décès par an et d'une morbidité très élevée.

Les patients atteints de carcinome du nasopharynx présentent un taux élevé d'anticorps anti-EBV, et la présence d'ADN d'EBV a été observée dans 100% des carcinomes indifférenciés du nasopharynx étudiés.

On soupçonne l'intervention de facteurs génétiques et alimentaires (exposition à des carcinogènes) dans la détermination de cette tumeur, associée à une participation éventuelle du virus.

Un titre élevé d'IgA anti-VCA est un signe prédictif de ce cancer. Le virus est en latence II dans le CNP, avec expression des protéines EBNA1 et des EBERs et moins constamment de LMP1 et 2A (Cohen et al., 2000 ; Tsuchiya et al., 2002 ; Young et al., 2004 ; Thorley-Lawson et al., 2004 ; Edwards et al., 2008).

On retrouve également des microARN BART dans le plasma des patients atteints de CNP. Ces microARN pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse du CNP et servir également potentiellement de marqueur pronostique indépendamment de la charge virale EBV (Gourzones et al., 2013).

➤ Le carcinome gastrique

Les facteurs de risque les plus importants pour ce cancer sont les prédispositions génétiques et les facteurs environnementaux. L'EBV n'est retrouvé que dans 10% des adénocarcinomes gastriques. Il exprime alors une latence similaire à celle des NPC (latence de type II), avec expression des protéines de latence EBERs, EBNA1, LMP2A et BARTs, mais pas d'expression de LMP1 ni des autres EBNA. Les carcinomes gastriques EBV-positifs montrent des caractéristiques phénotypiques et cliniques distinctes par rapport aux tumeurs EBV-négatives, dont une augmentation de la survie des patients. Il existe d'importantes variations géographiques à l'association avec EBV, du peut-être à des différences ethniques ou génétiques.

Le rôle précis de l'EBV dans la pathogenèse du carcinome gastrique reste à déterminer, mais l'absence d'EBV dans les lésions pré-malignes suggère que l'infection virale arrive tardivement dans la carcinogénèse (Young et al., 2004).

➤ Le carcinome mammaire

L'EBV a été détecté dans le lait maternel en 1991 (Junker et al., 1991). Par ailleurs, l'EBV a été mis en évidence par des techniques de PCR conventionnelle dans 20% à 50% des cancers du sein (Labrecque et al., 1995; Luqmani et al., 1995; Bonnet et al., 1999; Fina et al., 2001). La charge virale a été quantifiée par Q-PCR dans des biopsies de cancer du sein et des cellules tumorales isolées par microdissection (Arbach et al., 2006). Les résultats obtenus révèlent un faible nombre de copies, ce qui explique la difficulté à mettre en évidence la présence du virus.

De plus, la distribution du génome viral est très hétérogène au sein de la même tumeur et d'une tumeur à l'autre. D'autres parts, il a été détecté par RT-PCR dans les tumeurs EBV positives, des transcrits de gènes latents : EBNA1 a été retrouvé dans 80% des cas et les transcrits de deux oncogènes viraux LMP1 et BARF1 ont été détectés respectivement dans 20% et 57% des cas. Les résultats obtenus en utilisant les microdissections confirment ainsi la présence de l'EBV dans les cellules tumorales mammaires et la détection des transcrits de gènes latents montre que le génome viral est sous forme latente.

Par ailleurs, la possibilité selon laquelle le virus contribuerait à la progression de cette tumeur a été suggérée (Arbacht al., 2006).

I.3. Les Rétrovirus Endogènes Humains

I.3.1. Les Rétrovirus

Les rétrovirus sont des rétrovirus à ARN dont les particules sont sphériques et enveloppées d'environ 80 à 100 nm de diamètre. Leur génome est composé de deux copies identiques d'ARN simple brin, de polarité positive, d'environ 7 à 11 kb pour chaque brin. La particularité des rétrovirus est l'intégration de leur génome dans celui de la cellule hôte après une étape de rétrotranscription de leur ARN en ADN double brin. Cette étape est réalisée par une enzyme spécifique codée par les rétrovirus : la transcriptase inverse ou RT (Reverse Transcriptase). Sous leur forme intégrée, les rétrovirus sont nommés provirus.

Les rétrovirus persistent dans l'organisme de l'hôte malgré l'existence d'une réponse immunitaire spécifique (Lwoff André 1957).

On distingue deux types de rétrovirus selon la complexité de leur génome : les virus simples, qui ne comportent que les gènes essentiels à leur réplication (*gag*, *pro*, *pol* et *env*) et les virus complexes qui possèdent en plus de ces quatre gènes des gènes dits accessoires et régulation comme *vif*, *vpr*, *nef*, *vpu*, *rev* et *tat* du HIV (Human Immunodeficiency Virus), permettant la régulation de leur cycle réplcatif. Les rétrovirus simples peuvent posséder des oncogènes d'origine cellulaires, acquis lors des précédents évènements réplcatifs. Les rétrovirus sont dits compétents lorsqu'ils se répliquent dans une cellule en l'absence de tout autre rétrovirus. L'absence d'un ou plusieurs gènes essentiels conduit à des rétrovirus défectifs qui ne peuvent se répliquer qu'en présence d'un rétrovirus compétent appelé dans ce cas virus helper. Les virus contenant des oncogènes sont très souvent défectifs, l'es oncogènes récupérés prenant la place d'un des gènes rétroviraux essentiels (Lwoff André 1957).

I.3.2. Les rétrovirus endogènes

L'intégration irréversible confère une caractéristique unique aux rétrovirus qui est leur présence dans le génome des cellules de la lignée germinale de nombreux eucaryotes comme éléments hérités. Ces éléments, nommés rétrovirus endogènes ou ERV (Endogenous RetroVirus) se comportent comme des gènes du soi avec une transmission mendélienne stable verticalement d'une génération suivante. On présume que ces endogènes dérivent d'événements intégratifs de rétrovirus exogènes (transmission horizontale) dans la lignée germinale d'un hôte spécifique.

Durant l'évolution, ces endogènes ont modelé le génome de pratiquement tous les vertébrés. Aujourd'hui il a été estimé qu'environ 8 % du génome humain est composé de séquences endogènes nommées HERV (Human Endogenous RetroVirus) (**Lander et al., 2001**).

Les rétrovirus endogènes proviennent des rétrovirus exogènes ayant intégré leur génome dans celui de la lignée germinale à différentes périodes, on distingue deux types d'ERV : les « anciens » et les « modernes ».

Les ERV anciens partagent le même site d'intégration proximal chez plusieurs espèces indiquant que l'insertion a eu lieu avant la spéciation. L'insertion de certains HERV anciens date de plus de 60 millions d'années. Ils ont accumulé de très nombreuses mutations et/ou des délétions dans leurs régions codantes ou régulatrices.

En effet, on retrouve toujours de très nombreuses différences entre les deux LTR des ERV anciens (**Coffin et al., 1997**). Les ERV modernes ont été introduits dans la lignée germinale plus récemment et montrent ainsi une hétérogénéité génétique considérable dans les sites d'insertion d'une espèce à une autre. Ils n'ont pas été identifiés chez toutes les espèces de vertébrés. En effet, malgré la présence de rétrovirus endogènes modernes chez la souris, le poulet et de nombreux primates, les humains ne les possèdent pas dans leur génome (**Barbulescu et al., 1999**), (**Coffin et al., 1997**). Les rétrovirus endogènes modernes montrent beaucoup moins de mutations et il existe parfois des rétrovirus exogènes circulants qui leur sont génétiquement très proche.

I.3.3. Organisation génomique et classification

Les copies rétrovirales endogènes sont organisées de la même manière que les provirus exogènes. Ils possèdent des gènes de structure et des gènes codant des enzymes encodés par deux LTR. La plupart présentent des mutations ou des délétions, les rendant incompetents pour la répllication ou transcriptionnellement inactifs. Certains sont complets et actifs. Il existe aussi de nombreux LTR solitaires résultant de la recombinaison entre deux séquences endogènes. Les rétrovirus endogènes chez les animaux ont été nommés par rapport à leur homologie avec un rétrovirus exogène, les séquences endogènes proches du virus FeLV sont nommées en FeLV (endogenous FelineLeukemia Virus), il en est de même pour les séquences endogènes proches de JSRV nommées en JSRV (endogenous Jaagsiekte RetroVirus). **(Tristem et al., 2000).**

Les séquences endogènes humaines ont quant à elles été classées tout d'abord selon la lettre de l'acide aminé codant l'ARNt complémentaire du site de liaison utilisé par la transcriptase inverse, le PBS. Par exemple, HERV-K appartient à la famille des HER-V utilisant un ARNt Lysine comme amorce de la rétrotranscription alors que HERV H utilise un ARNt Histidine. **(Tristem et al., 2000).**

Mais ce système de classement s'est révélé assez vite peu approprié pour plusieurs raisons : i) beaucoup de rétrovirus endogènes possèdent le même PBS et donc le même type d'ARNt, ii) de nombreuses familles d'HER-V n'ont été que partiellement caractérisées ainsi la séquence du PBS n'est pas toujours connue. **(Tristem et al., 2000).**

Récemment l'homologie de séquence du gène *pol* entre les HER-V et les différents genres de rétrovirus exogènes a permis de diviser les HER-V en trois classes. Ces classes sont composées de sous-groupes nommés selon la nomenclature basée sur le type d'ARNt utilisé. La classe I incluant les familles HER V-W et HER V-H présente des homologies avec les gammas rétrovirus. La classe II proche des bêta- et delta rétrovirus se compose des nombreux éléments de la famille HERV-K.

La classe III présente une certaine homologie de séquence avec les spumavirus et comprend les familles HERV-L et HERV-S. Actuellement, environ vingt-deux familles d'HERV distinctes ont été identifiées et caractérisées **(Tristem et al., 2000).**

I.3.4. Expression des Rétrovirus Endogènes

Les rétrovirus endogènes sont très souvent défectifs mais certains ayant conservé des cadres de lecture ouverts intacts pour un ou plusieurs gènes et des éléments de régulation transcriptionnelles fonctionnels peuvent être transcrits voire traduits dans certaines cellules. En effet, de nombreuses expressions transcriptionnelles d'endogènes ont été détectées dans différents tissus normaux ou pathologiques et dans des lignées cellulaires normales ou tumorales (**Sugimoto et al., 2001**). Une expression protéique est également observée, mieux encore des études en microscopie électronique ont révélé une expression de particules virales des endogènes humains HERV-K et HERV-W, proches structurellement des rétrovirus exogènes (**Boller et al., 1993**) (**Perron et al., 2005**) (**Urnovitz et al., 1996**).

Les endogènes ont un effet bénéfique pour l'hôte plus que délétère à la vue de leur longue présence au sein des génomes.

I.3.4.1. Le Rétrovirus Endogènes HERV-K et pathologies associées

La famille HERV-K est présente sous forme de trente à cinquante copies par génome chez l'homme. Elle est la seule à posséder des séquences intactes contenant des cadres de lecture ouverts pour toutes les protéines structurales et enzymatiques (**Mayer, 1998**).

Il a été montré que deux types différents de séquences entières HERV-K existaient. Le type 1 présente une délétion de 292 nucléotides en 5' du gène *env* par rapport au type 2 (**Banert, 2004**). Cette délétion n'a pas de conséquence délétère sur la protéine Env.

Ces deux types de séquences de HERV-K possèdent également un gène supplémentaire accessoire, les gènes *rec* pour le type 2 et *np9* pour le type 1 (**Armbrusher, 2002 ; Magin CR, 1999**) La protéine codée par *rec* montre une fonction analogue aux protéines Rev d'HIV et Rex de HTLV-1 dans les signaux d'import et d'export nucléaire.

Il a été suggéré que la dérégulation de l'expression de Rec pourrait jouer un rôle dans le développement du cancer des testicules (**Boes A, 2000**) Le gène *np9* quant à lui, est largement retrouvé sous forme de transcrit dans les carcinomes mammaires (**Armbrusher VM, 2002**) Une prédominance de transcrits de type 1 est observée par rapport au type 2 dans les cancers du sein et les lignées cellulaires issues de ces tumeurs (**Wang,2001 ;2003**)Mais à ce jour aucune évidence d'un potentiel tumorigénique direct de Rec et de Np9 n'a été montrée.

➤ Cancer du sein

Des transcrits de l'enveloppe de HERV-K sont exprimés dans la plupart des cancers du sein humain et pas dans des tissus mammaires contrôles normaux (**Wang, 2003 ; 2001**). Il y a une prédominance de transcrit de type 1 par rapport au type 2 dans les cancers du sein et les lignées cellulaires issues de cancer du sein (**Wang, 2003**). On retrouve cette différence au niveau de l'expression transcriptionnelle des gènes *np9* et *rec*, avec une prédominance de transcrits *np9* par rapport à *rec*. Alors que des transcrits de HERV-K type 1 sont exprimés dans de nombreux tissus sains et tumoraux, aucun transcrit du gène *np9* n'est généré dans les tissus normaux humains (**Armbrusher, 2002**). Cette expression très spécifique de *np9* dans les tissus tumoraux et particulièrement dans les carcinomes mammaires suggère une implication de ce gène dans la tumorigénicité. Mais cet hypothétique potentiel tumorigénique de la protéine Np9 reste encore à montrer. L'expression de HERV-K peut être induite par des glucocorticoïdes chez la lignée cellulaire T47D dérivée d'un carcinome mammaire humain (**Ono, 1987**). Dans cette lignée, il a été également observé une production de particules virales (**Seifarth, 1995**). Ce profil d'expression apparaît comme un nouveau marqueur de la maladie.

Cette étude est réalisée au Laboratoire de Biologie du Développement et de la Différenciation Oran 1 en collaboration avec les différents services de prise en charge des cancers mammaires à ORAN avec consentement éclairé (**Annexe 1**) établi entre les différentes patientes et leurs médecins traitants.

Nous avons mis en œuvre les techniques, d'ELISA, d'Immunohistochimie et d'hybridation *in situ* afin de déterminer le profil sérologique, le statut des onco-proteines (LMP-1, EBNA, HER2) et l'index mitotique Ki67 ainsi que la détection de l'expression du génome viral en phase de latence III.

L'ensemble des résultats pour chaque cas est reporté sur une fiche technique (**Annexe 2**)

II.1. Population d'étude

Nous avons recruté 39 patientes atteintes de carcinome canalaire infiltrant diagnostiqués de Janvier 2012 à Décembre 2014 dans l'ouest algérien.

Les 23 cas de carcinomes canaux infiltrants retenus dans ce travail ont été sélectionnés sur la base d'un regroupement de toutes les données et prélèvements (sanguin et tissulaire) nécessaires pour répondre à la problématique.

Echantillons biologiques

Nous avons utilisé des blocs de paraffine contenant la lésion tumorale pour les explorations phénotypique et génomiques (Immunohistochimie et Hybridation *in situ*).

Pour les sérums : nous avons prélevé 10ml de sang total, dans des tubes secs, ensuite nous avons centrifugé à 1800 rpm puis récupéré les sérums que nous avons conservés à -20°C.

II.2. Méthodes

Pour l'étude des caractéristiques clinicopathologiques, les données concernant :

- L'âge des patientes.
- Le statut hormonal.
- Le statut ganglionnaire.
- Le grade histopronostique de Scraff Bloom et Richardson (SBR).
- Les statuts :
 - Des récepteurs hormonaux (RE, RP).
 - De l'oncoprotéines HER2.
 - Du KI67.
- La classification moléculaire.

Les données ont été recueillies sur fiche technique répondant aux objectifs du travail en consultant les rapports anatomopathologiques, et les dossiers des patientes (**Annexe 2**).

II.2.1. Etude de l'expression virale

Pour l'étude de l'expression virale, nous avons mis en œuvre la technique d'ELISA, d'immunohistochimie et de l'hybridation in situ.

II.2.1.1. Etude sérologique par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunoessay Sorbent)

Nous avons utilisé la technique ELISA pour rechercher la présence des marqueurs sérologiques de la réponse immunitaire contre les différentes protéines virales : les IgG anti-VCA, les IgG anti EBNA-1 (**Annexe 3**).

- **Description de la technique d'ELISA (Kit Dako)**

1. Pipeter 100 µl de chaque Etalon, contrôle et échantillon dilué dans les puits respectifs de la microplaque. Pour une analyse qualitative, n'utiliser que l'étalon B (Etalon Cut-off). La fiabilité du test peut être améliorée en effectuant les dosages en double.

2. Couvrir la plaque avec une feuille adhésive, puis Incuber la plaque 60 min à 37° C.

3. Retirer la feuille adhésive, et jeter la solution d'incubation, puis laver la plaque 3 x avec 300 µl de Tampon de Lavage dilué. Egoutter l'excès de solution en frappant la plaque retournée sur du papier absorbant.

4. Pipeter 100 µl de conjugué enzymatique et l'introduire dans chaque puits.

5. Recouvrir la plaque avec une nouvelle feuille adhésive, puis incuber la plaque 60 min à 37° C.

6. Retirer la feuille adhésive, jeter la solution d'incubation et laver la plaque 3 x avec 300 µl de Tampon de Lavage dilué. Egoutter l'excès de solution en frappant la plaque retournée sur du papier absorbant.

7. Utiliser une micropipette à 8 canaux si possible pour l'ajout de la solution substrat et celle d'arrêt. Pipeter ces solutions à la même cadence. Utiliser un déplacement positif et éviter la formation de bulles d'air. Pipeter 100 µl de solution substrat TMB dans chaque puits et incuber 30 min à 37°C à l'obscurité (sans feuille adhésive).

Arrêter la réaction substrat en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt TMB dans chaque puits.

Mélanger rapidement le contenu en agitant la plaque.

8. Mesurer la densité optique avec un photolorimètre à 450 nm (longueur d'onde de référence: nm) dans les 60 min suivant l'ajout de la Solution d'arrêt.

II.2.1.2. Etude phénotypique

II.2.1.2.1. Immunohistochimie

L'Immunohistochimie est une technique de détection morphologique directe permettant de déceler l'expression des protéines intra-tissulaires utilisant des antisérums spécifiques souvent de lapin ou de souris (anticorps primaires). (**Tableau II**)

Les coupes des tumeurs, montées sur des lames traitées au silane (Superfrost) sont incubées pendant 1 heure à 60°C ; ensuite elles sont déparaffinées dans du xylène, puis réhydratées par une série de 2 de lavages de 5 min dans de l'éthanol à 100%, puis à 80% et enfin à 50%. Un dernier lavage de 5 min est effectué dans du PBSx1. Les coupes sont ensuite, passées 10 min au four micro-ondes dans de l'acide citrique (pH 6). Après un refroidissement de 30 min, les lames sont lavées 3 fois 5 min dans du PBS. Le blocage des sites libres est réalisé par incubation dans du PBS contenant 4% de BSA. Les anticorps primaires dilués dans du PBSx1 / 1% BSA Tween 20 sont ajoutés et laissés incuber pendant une nuit à température ambiante.

Les coupes histologiques sont lavées 3 fois pendant 8 min dans du PBSx1 : Tween avant mise en contact avec l'anticorps secondaire de chèvre, couplé à la biotine (Dako, Danemark) dilué au 1/200ème. Une série de 3 lavages 8 min dans du PBS-Tween 20 permet d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire.

Une incubation de 30 min avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée au 1/200ème dans du PBS est réalisée. L'excès est éliminé par 3 lavages avec du PBSx1 pendant 8 min, suivi d'un rinçage à l'eau pure. La révélation s'effectue avec le DAB (3,30 diaminobenzidine, Vektor) pendant 5 min. Les coupes histologiques sont contre-colorées avec de l'hématoxyline. Un examen histologique de routine (coloration à l'hématoxyline-éosine) est réalisé pour les mêmes échantillons. Après déshydratation complète, les lames sont traités par la solution de montage (Eukitt) puis examinées au microscope optique.

Tableau II : Liste des anticorps utilisés dans l'étude Immunohistochimique.

Anticorps	Clone	Provenance	Dilution	Conditions	Type de Démasquage
Anti-LMP-1	CS1-4	DakoCytomation	1/25	30 min, température Ambiante	Citrate, pH 6.0
Anti-EBNA-1	2B4	DakoCytomation	1/50	30 min, température Ambiante	Citrate, pH 6.0

II.2.1.3. Etude génomique**II.2.1.3.1. L'hybridation *in situ* des EBERs**

Afin de déterminer et de localiser les cellules infectées qui expriment le génome de l'EBV, nous avons appliqué la technique d'hybridation *in situ* utilisant des sondes PNA (Oligonucléotides de synthèse) complémentaires aux deux transcrits primaires nucléaires EBER-1 et 2 de l'EBV, conjuguées à la fluorescéine (DakoCytomation, Y5200). Ces sondes sont très stables car les bases sont portées par des peptides (non dégradables par les RNases), contrairement aux sondes ARN/ADN classiques.

La révélation de l'hybride de la sonde PNA avec l'ARN cible s'effectue par méthode colorimétrique basée sur l'interaction de la phosphatase alcaline couplée à un anticorps anti isothiocyanate de fluorescéine (Anti-FITC/AP) et qui a pour substrat le BCIP/NBT (nitroblue-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3- Indolyphosphate). Le kit utilisé est de type Dako (DakoCytomation, K5201). Sur des coupes de carcinome du nasopharynx, on introduit des sondes de contrôle (témoin positif et témoin négatif).

Les étapes de la technique (Annexe 4)

Cette technique de diagnostic morphologique, qui dure 4 heures, comprend six étapes :

- Préparation des coupes.
- Réhydratation.
- Traitement préliminaire.
- Hybridation.
- Lavage rigoureux.
- Révélation.

➤ Préparation des coupes

Des coupes de 5 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome, à partir de blocs de tissus fixés au formol puis incluses dans de la paraffine. Ces coupes sont étalées avec de l'eau distillée sur des lames silanisées (le Silane empêche le décollement des coupes) et placées sur une plaque chauffante. Enfin, une incubation des lames pendant une nuit à 37°C, permet une meilleure adhésion des coupes tissulaires sur la lame ainsi que la fusion de la paraffine.

➤ Réhydratation des coupes

- Le déparaffinage des coupes est effectué à l'aide de xylène (2 bains de 5 minutes).
- Pour éliminer le xylène résiduel et réhydrater les tissus, les coupes subissent deux passages successifs dans deux bains d'éthanol à 100%, suivis de deux autres bains d'éthanol à 95% et deux lavages à l'eau distillée.

➤ Traitement préliminaire

- Après avoir entouré les coupes tissulaires par le DAKO-PEN (Dako Cytomation, S2002) pour marquer leurs positions, les lames sont placées dans une chambre humide afin d'éviter toute dessiccation des coupes.
- Une digestion protéolytique est assurée par la protéinase K diluée à 1/10 (mg/ml) dans du tampon salin Tris-Borate (TBS) pH 7,5 à température ambiante pendant 30 minutes pour rendre l'ARN accessible à la sonde, elle est suivie d'un lavage dans deux bains d'eau distillée.
- Enfin, les lames sont passées dans un bain d'éthanol à 96% puis séchées à l'air pendant 5 minutes (pour éviter la dilution des sondes dans les alcools).

➤ **Hybridation**

- 1 à 2 gouttes de la solution d'hybridation (contenant la sonde PNA) sont appliquées sur les coupes puis les lames sont recouvertes avec des lamelles et remises dans une chambre humide pour être incubées dans une étuve à 55°C pendant 30 minutes.

➤ **Lavage rigoureux**

- Le lavage consiste en un traitement des coupes tissulaires avec deux types de tampons de lavage. En effet, le premier lavage consiste à faire immerger les lames dans du tampon de lavage de stringence diluée au 1/60 (prêt-à-l'emploi) et préchauffé à 55°C. Ensuite une incubation des lames est effectuée à 55°C pendant 25 minutes. Le deuxième lavage est réalisé par passage des lames dans du tampon TBS.

➤ **Révélation**

- 2 à 3 gouttes d'anticorps anti-isothiocyanate de fluorescéine (Anti-FITC/AP) sont additionnées sur chaque lame suivie d'une incubation à température ambiante dans une chambre humide pendant 30 minutes, l'excès d'anticorps anti isothiocyanate de fluorescéine est éliminé en tapotant avec de la gaze.
- Deux lavages dans du tampon TBS à pH 7,5 pendant 3 minutes chacun sont effectués, suivi par deux rinçage des lames dans de l'eau pure.
- Après avoir ajouté le substrat de la phosphatase alcaline sur les lames et le BCIP/NBT, une incubation dans une chambre humide pendant 30 à 60 minutes est effectuée. Un dernier lavage des lames est réalisé dans l'eau du robinet pendant 5 minutes, suivi d'une contre coloration à l'hématoxyline de Mayer.
- Montage des lames avec le Faramount (DakoCytomation, S3025).
- L'observation au microscope optique, des cas d'EBV positifs par hybridation in situ se manifestent par une coloration noirâtre intranucléaire.

III.1. Population générale

Nous avons analysé les caractéristiques clinicopathologiques de 39 cas de carcinomes canauxiaux infiltrants.

III.1.1. Age des patientes

L'âge moyen enregistré est de $57,40 \pm 3,14$ avec une médiane de 59 ans et une étendue allant de 22 à 88 (66 ans). Le pic est observé dans la tranche d'âge 50-59 ans (**Figure 10**).

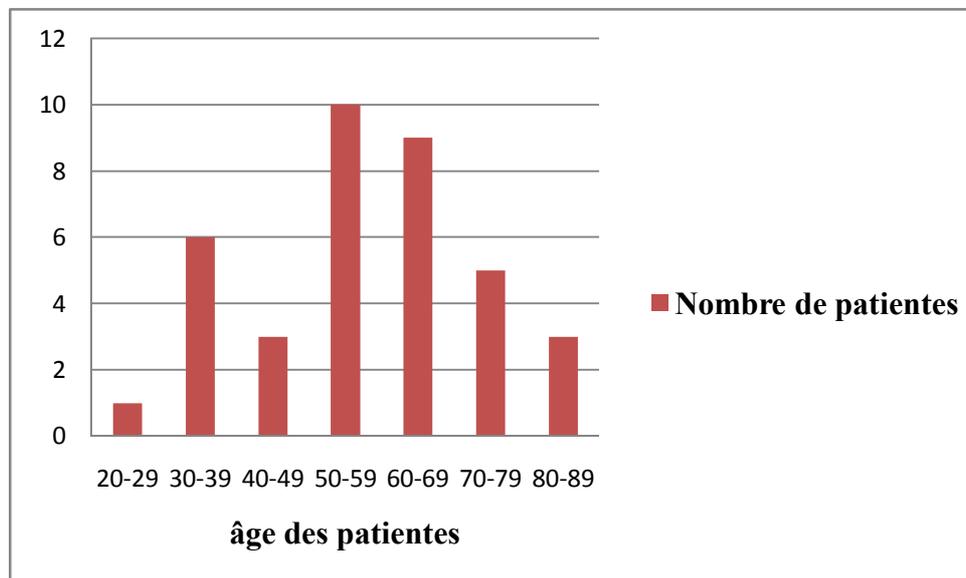


Figure 10 : Répartition de la population selon l'âge des patientes.



III.1.2. Statut hormonal des patientes

Nous avons enregistré une prédominance des patientes ménopausées avec 73% (**Figure 11**).

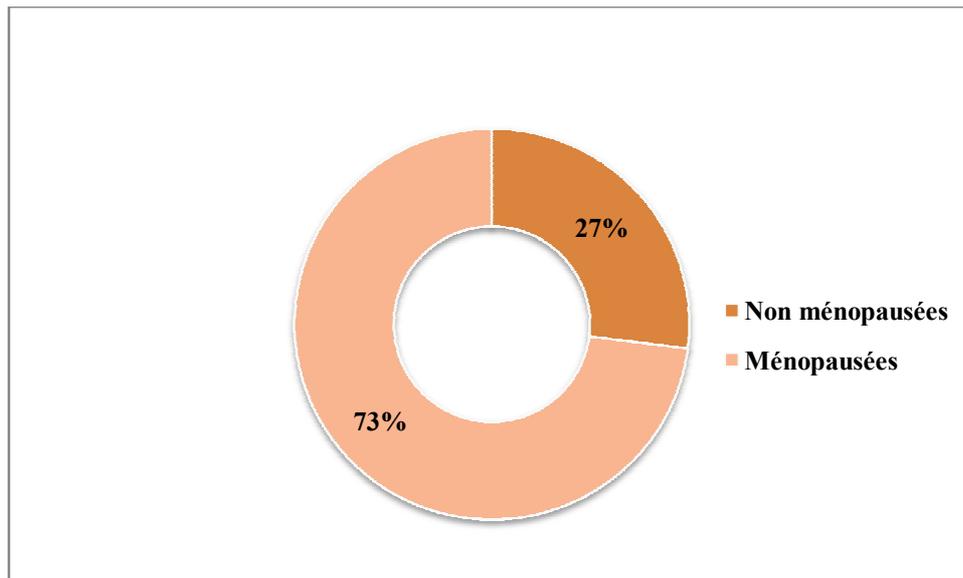


Figure 11 : Répartition de la population selon le statut hormonal des patientes.

III.1.3. Grade SBR

Nous avons noté une prédominance du grade SBR II qui représente 70%, suivi des tumeurs classées SBR III avec 27% et le grade SBR I vient en troisième position avec un taux de 3% (**Figure 12**).

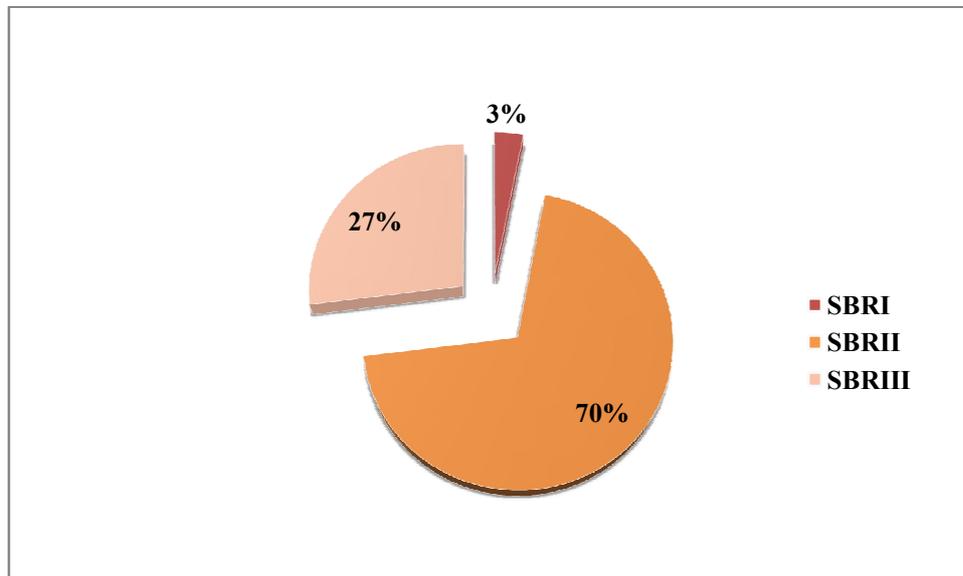


Figure 12: Répartition de la population selon le grade SBR.

III.1.4. Statut ganglionnaire

Les patientes avec envahissement ganglionnaire (pN+) représentent 73% contre 27% sans envahissement ganglionnaire (pN-) (Figure 13).

Selon le nombre de ganglions atteints (gg+), la tranche de 1 à 3 ganglions envahis ($1 \leq gg+ \leq 3$) prédomine avec 55% (Figure 14).

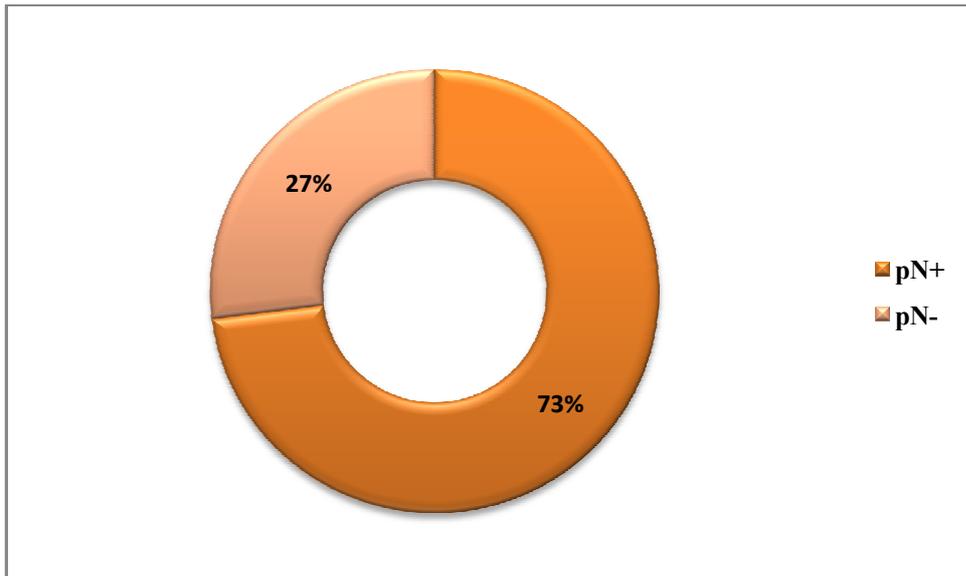


Figure 13 : Répartition de la population selon le statut ganglionnaire.

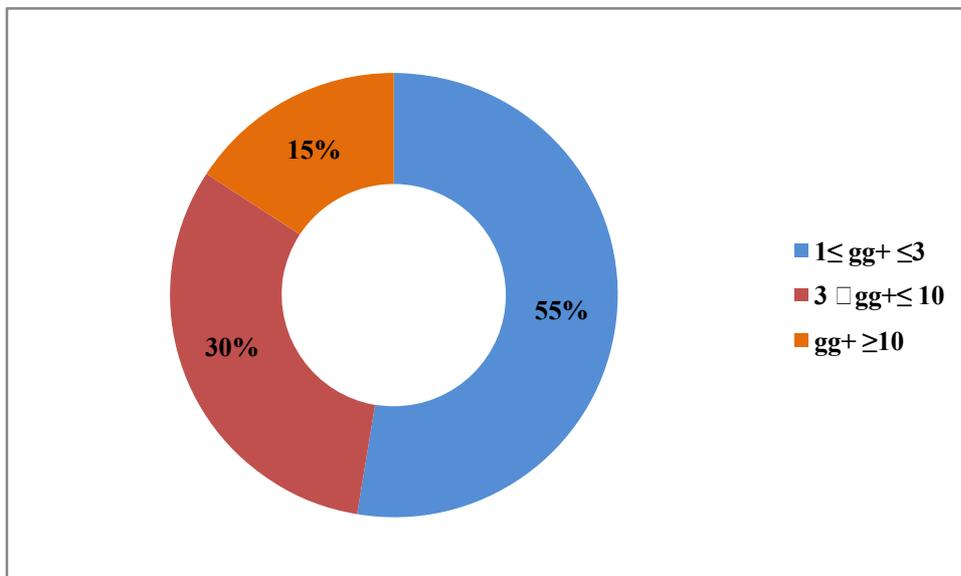


Figure 14 : Répartition de la population selon le nombre des ganglions atteints.

III.1.5. Statut des récepteurs hormonaux

III.1.5.1. Statut des récepteurs ostrogéniques (RE)

Dans la population que nous avons étudiée, les tumeurs qui surexpriment les récepteurs ostrogéniques (RE+) représentent 58% des cas contre 42% des RE- (**Figure 15**).

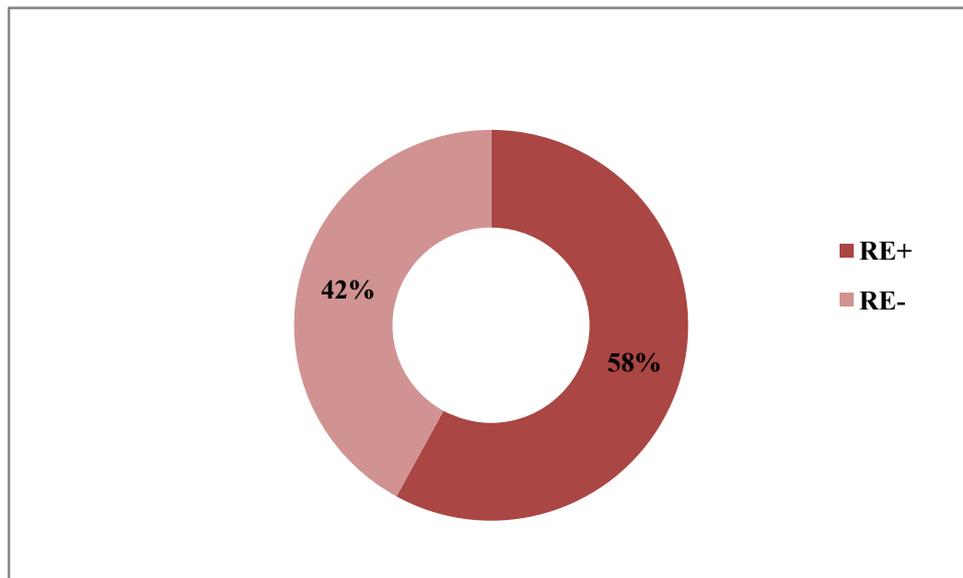


Figure 15 : Répartition de la population selon le statut des récepteurs ostrogéniques.

III.1.5.2. Statut des récepteurs progéstéroniques (RP)

Les tumeurs qui surexpriment les récepteurs progéstéroniques (RP+) représentent 51% des cas (**Figure 16**).

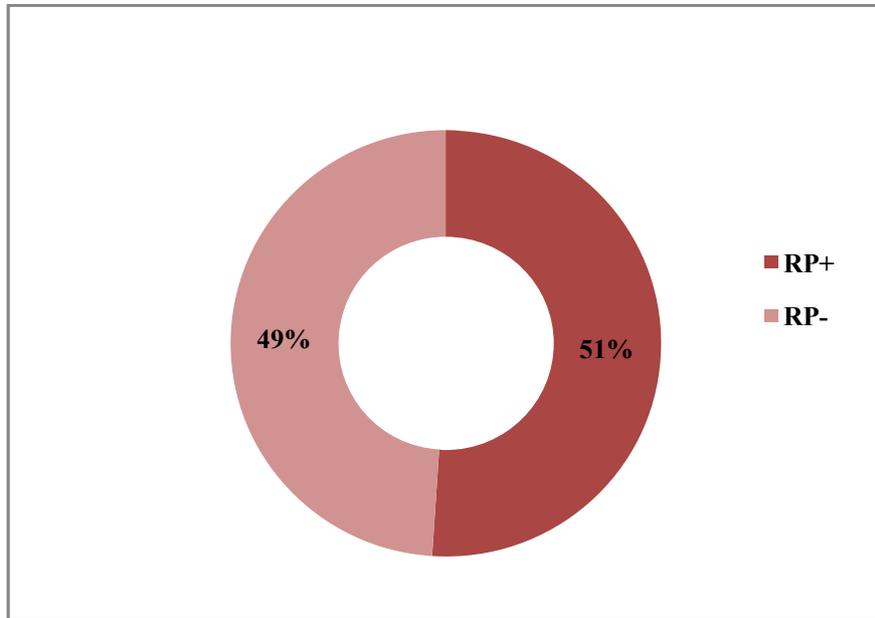


Figure 16 : Répartition de la population selon le statut des récepteurs progéstéroniques.

III.1.6. Statut HER1

Selon notre analyse, seulement 24% des tumeurs surexpriment l'oncoprotéines HER1 contre un taux de 76% des cas présentant un statut HER1 négatif (**Figure 17**).

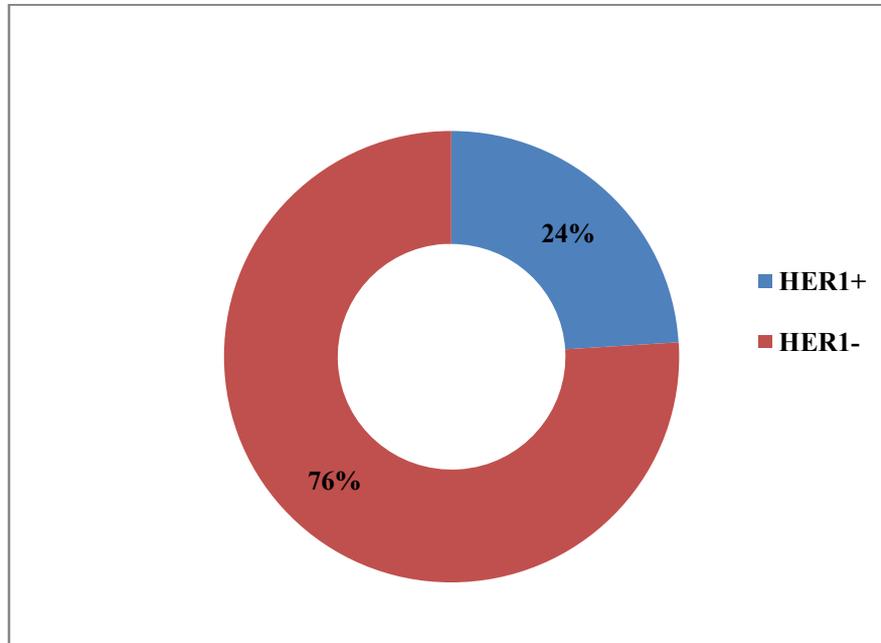


Figure 17 : Répartition de la population selon le statut HER1.

III.1.7. Statut HER2

Pour le statut des HER2, 62% des tumeurs ne surexpriment pas les HER2, contre 38% les expriment (**Figure 18**).

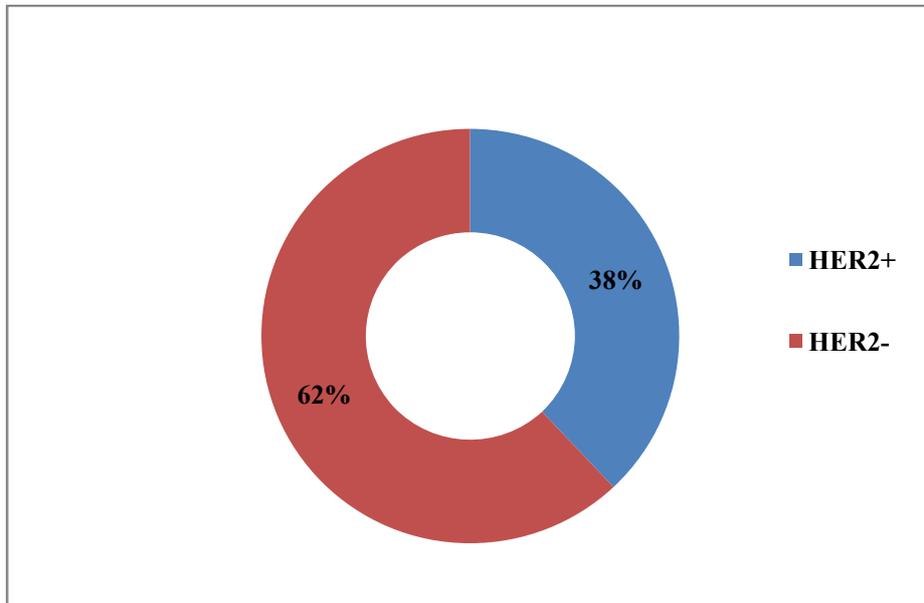


Figure 18 : Répartition de la population selon le statut HER2.

III.1.8. Statut du Ki67

Pour l'index de prolifération Ki67, 81% des carcinomes ont une activité proliférative élevée □14% (positif) contre 19% avec un Ki67<14 (négatif) (**Figure 19**).

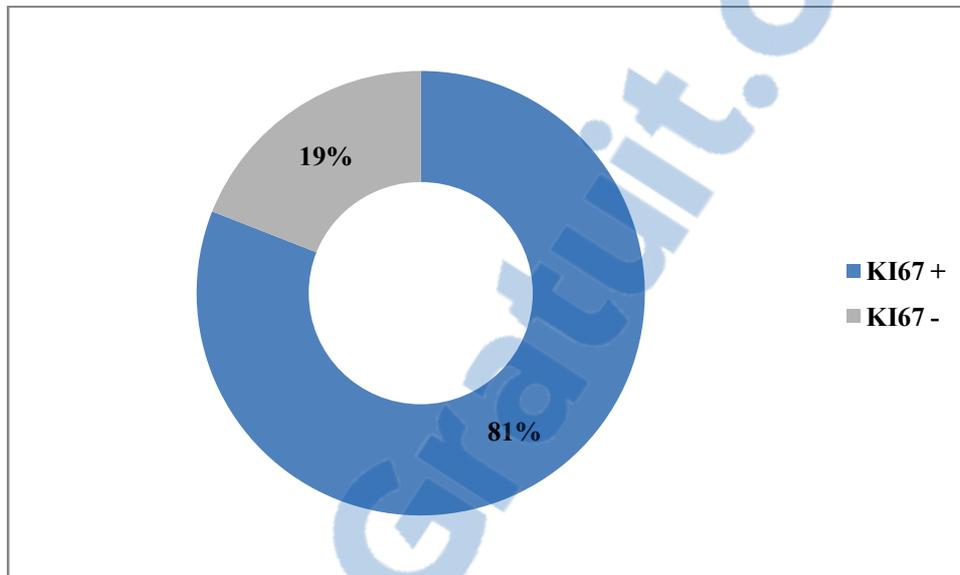


Figure 19 : Répartition de la population selon le statut Ki67.

III.1.9. Sous types moléculaires des tumeurs

Nous avons constaté une dominance du type Luminal A avec pourcentage de 34% (**Figure 20**).

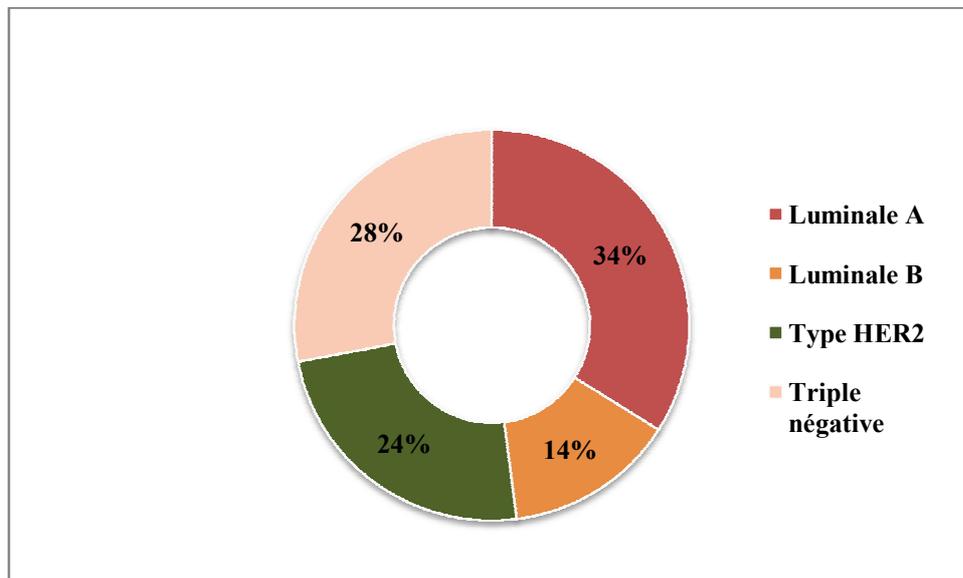


Figure 20 : Répartition de la population selon la classification moléculaire.

III.2. Résultats de l'étude de l'expression virale

Pour l'étude de l'expression virale des 23 cas de CCI, les résultats de la sérologie, l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* sont mentionnés ci-dessous.

III.2.1. Résultats de l'étude sérologique

Pour les marqueurs sérologiques de la réponse immunitaire aux différentes protéines virales, IgG anti VCA et IgG anti EBNA-1, nous avons opté pour une évaluation qualitative en utilisant la valeur seuil.

La valeur seuil ou Cut-off est donnée par la densité optique (DO) de l'Etalon B (Etalon Cut-off). L'index Cut-off (COI) est calculé à partir de la moyenne des densités optiques de l'échantillon et de la valeur Cut-off (Etalon B). Si la densité optique de l'échantillon se situe dans une gamme d'environ 10 % autour de la valeur du Cut-off (zone grise), l'échantillon doit être considéré limite. Les échantillons avec des DOs plus élevées sont positifs, les échantillons avec des DOs plus faibles sont négatifs.

La majorité des sérums explorés, ont affiché des profils sérologiques positifs (**Figure 21**). La comparaison des différents sérums explorés a été faite par rapport aux sérums témoins (carcinome du nasopharynx) (**Figure 22**).

Cut off (Etalon B = 0.6) pour les IgG anti EBNA-1.

Cut off (Etalon B = 0.5) pour les IgG anti VCA.

COI= Do échantillon / Do Etalon.

- **Interprétation des Résultats**

Le Cut-off Index (COI) est positif lorsqu'il est > 1.1 , lorsqu'il est entre 0.9 et 1.1 il est limite est enfin lorsqu'il est < 0.9 négatif.

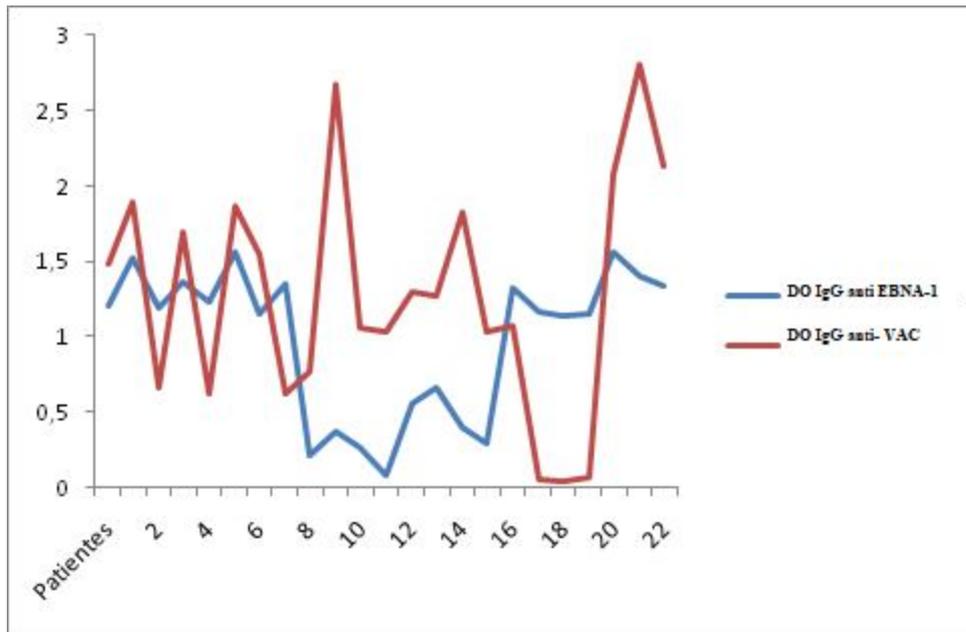


Figure 21 : Représentation graphique des densités optiques des IgG anti- EBNA-1 et IgG anti-VCA des 23 cas étudiés.

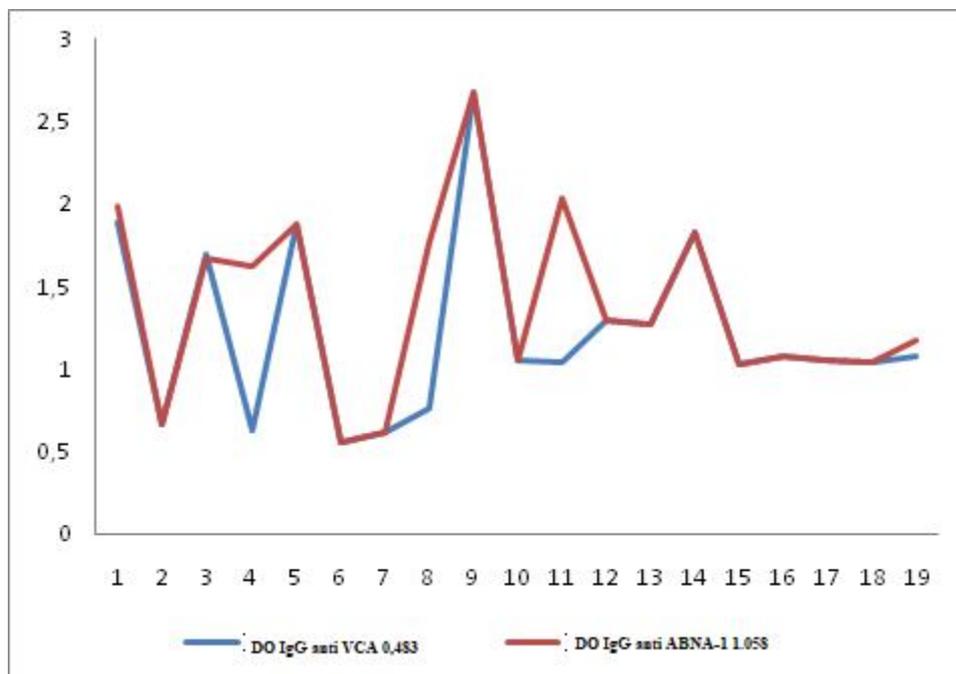


Figure 22 : Représentation graphique des densités optiques des IgG anti-EBNA-1 et IgG anti-VCA chez les patientes atteintes de carcinome nasopharyngé (témoins).

Sur les 23 sérums diagnostiqués, nous avons obtenu les résultats suivants :

Pour les anticorps IgG anti-VCA, 20 / 23 ont présenté un profil sérologique positif soit 87 % de positivité (**Figure 23**).

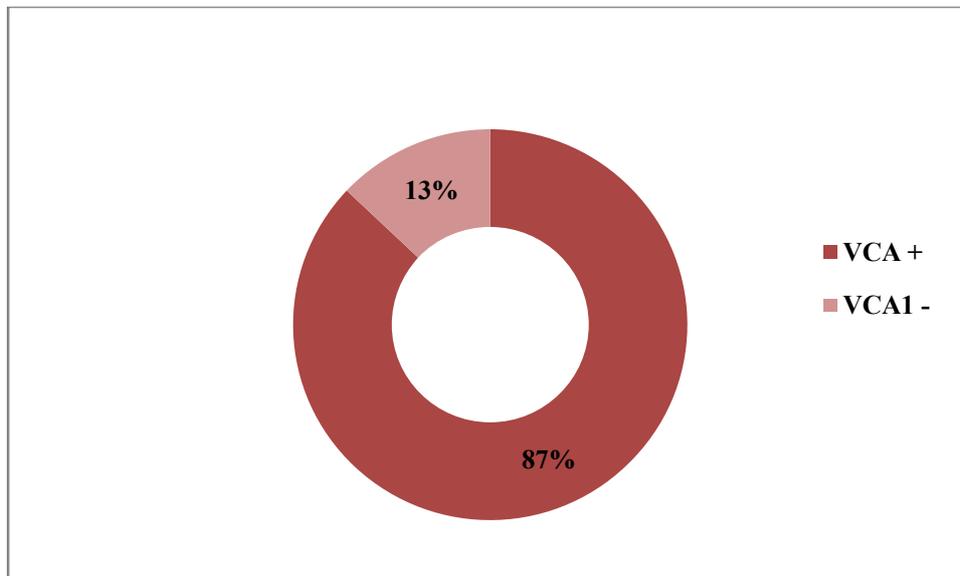


Figure 23 : Répartition des patientes selon le profil sérologique des IgG anti-VCA.

Pour les anticorps IgG anti-EBNA-1, les résultats obtenus montrent que 17 / 23 ont présenté un profil sérologique positif soit 74% (**Figure 24**).

Par contre pour les sérums des patientes atteintes de carcinome nasopharyngé, utilisés comme témoin nous notons que les 20 / 20 ont un profil sérologique IgG anti- VCA et IgG anti-EBNA-1 positif (**Figure 22**).

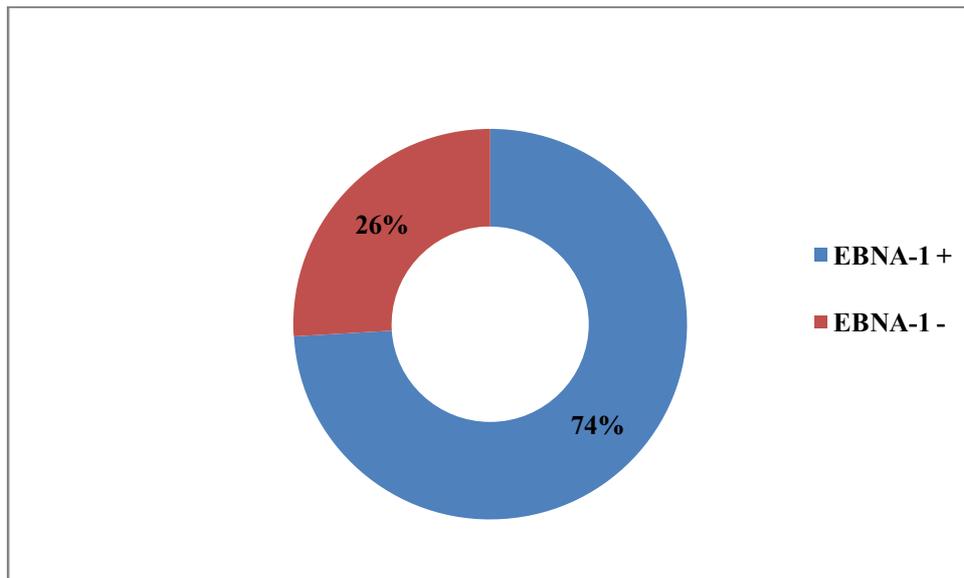


Figure 24 : Répartition des patientes selon le profil sérologique des IgG anti-EBNA-1.

III.2.2. Résultats de l'étude immunohistochimique de la LMP-1 et EBNA-1 :

Le marquage immunohistochimique de la protéine LMP1 a montré une surexpression cytoplasmique dans 5 cas parmi les 23 cas étudiés soit 21,73% (**Figure 25**).

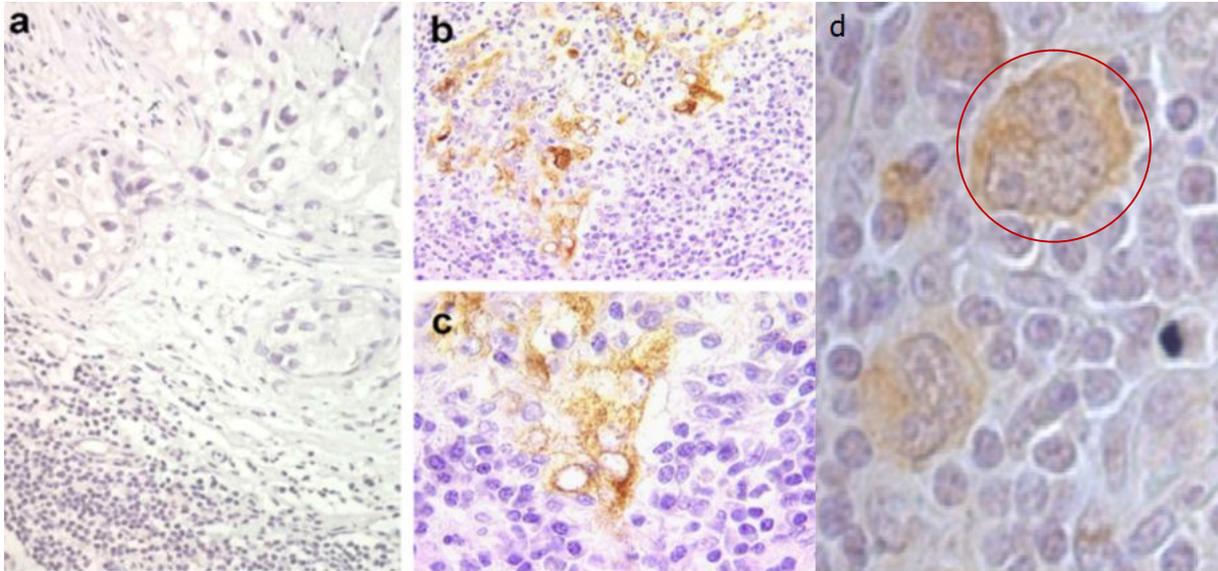


Figure 25 : Micrographies des résultats du marquage immunohistochimique des LMP-1.

a : coupe histologique d'un carcinome mammaire montrant l'absence de signal positif (x40).
b et c : un cas de carcinome nasopharyngé utilisé comme témoin positif (x 40 et x 100) marquage en marron claire.
d : cas de carcinome mammaire montrant une présence de signal positif (marron claire) pour LMP-1 (x400)

Le marquage immunohistochimique de la protéine EBNA-1 a révélé une surexpression nucléaire (marquage positif) dans 3 CCI (13,04 %) contre 20 négatifs parmi les 23 cas étudiés (**Figure 26**).

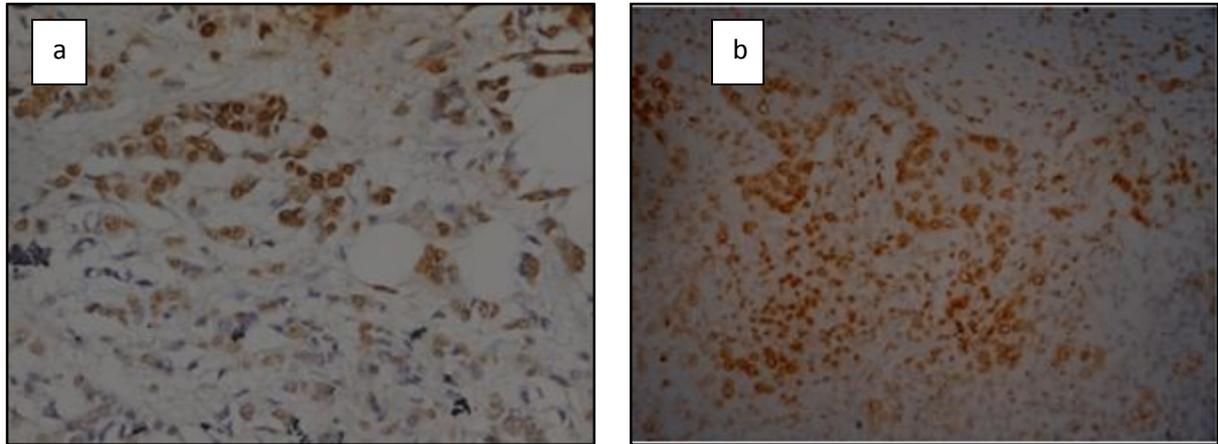


Figure 26 : Micrographies du marquage immunohistochimique de la protéine EBNA-1 dans des CCI (x100)

- a. Cellules tumorales de carcinome canalaire infiltrant présentant une positivité nucléaire granulaire intense pour l'anticorps EBNA-1.
- b. Contrôle positif des cellules tumorales de carcinome nasopharyngé présentant une positivité nucléaire pour EBNA-1.

III.2.3. Résultats de l'hybridation *in situ*

En utilisant la sonde PNA, nous avons observé le statut des EBERs au niveau de la tumeur, en dehors de la tumeur.

Ensuite nous avons recherché la relation entre :

- le statut des EBERs et l'indice de prolifération Ki67.
- le statut des EBERs et le statut de l'oncoprotéine HER2.

III.2.3.1. Statut des EBERs au niveau de la tumeur

Le statut des EBERs au niveau de la tumeur, détecté par hybridation *in situ*, montre que 43% des tumeurs (n=10) sont EBERs positifs (**Figure 27**).

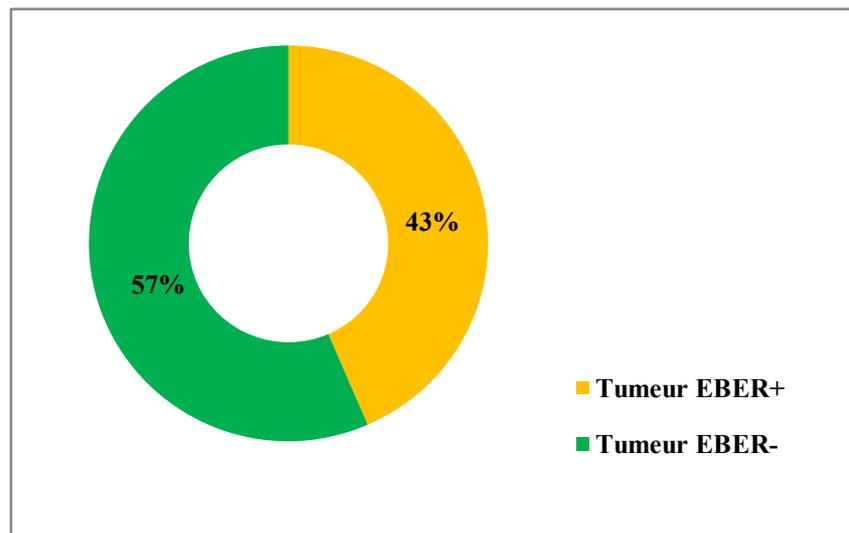


Figure 27 : Répartition des cas selon le statut des EBERs au niveau de la tumeur.

III.2.3.2. Statut des EBERs en dehors de la tumeur

Le statut des EBERs en dehors de la tumeur montre que 70% (n=16) sont EBERs négatifs (Figure 28).

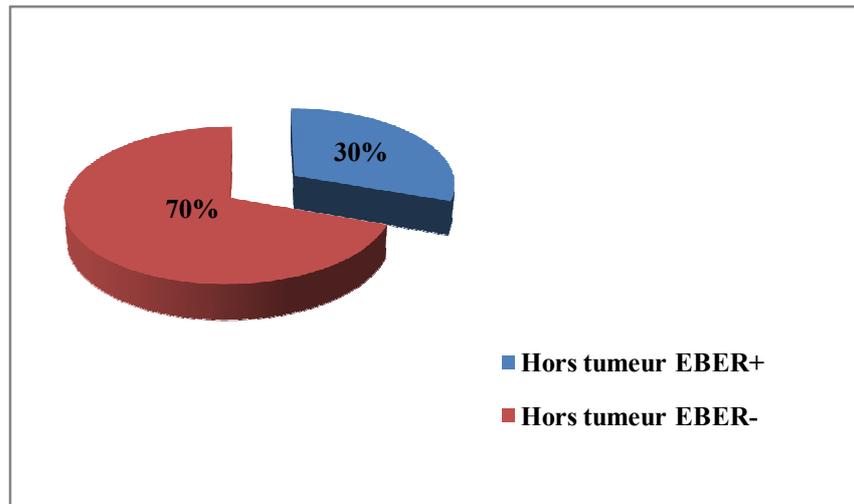


Figure 28: Répartition des cas selon le statut des EBERs en dehors de la tumeur.

III.2.3.3. Statut des EBERs et du Ki67 négatif

Aucun cas de Ki67 négatif n'a été retrouvé quand le statut des EBERs est positif à la fois dans la tumeur et en dehors de la tumeur en même temps (Figure 29).

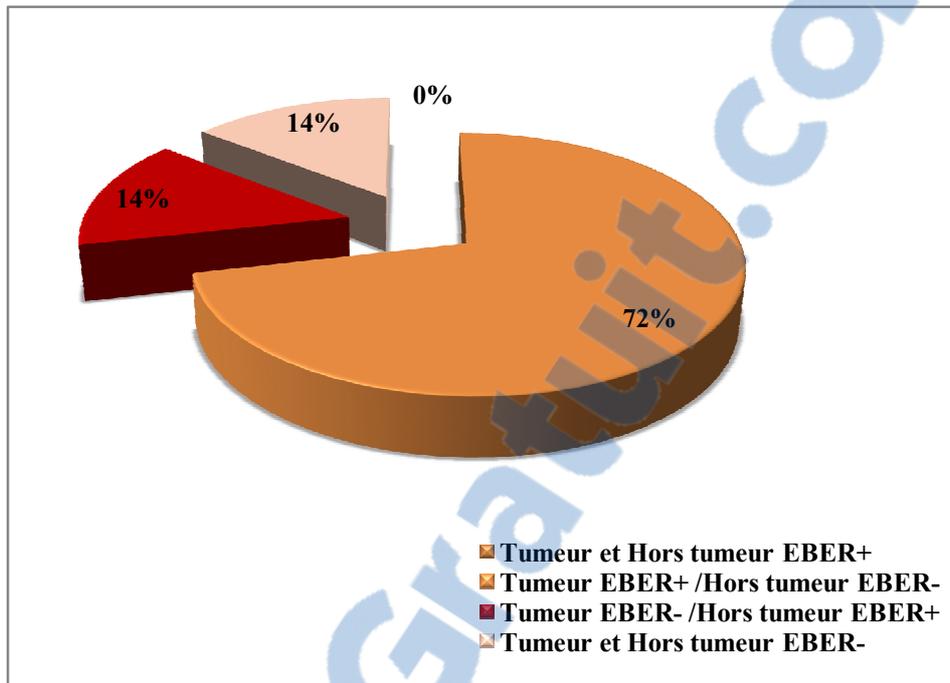


Figure 29 : Répartition des cas selon le statut des EBERs en fonction du Ki67 négatif.

III.2.3.4. Statut des EBERs en fonction de Ki67 positif

Le pourcentage du Ki 67 positif est élevé (50%, n=8) quand le statut EBERs est négatif à la fois dans la tumeur et en dehors la tumeur (**Figure 30**).

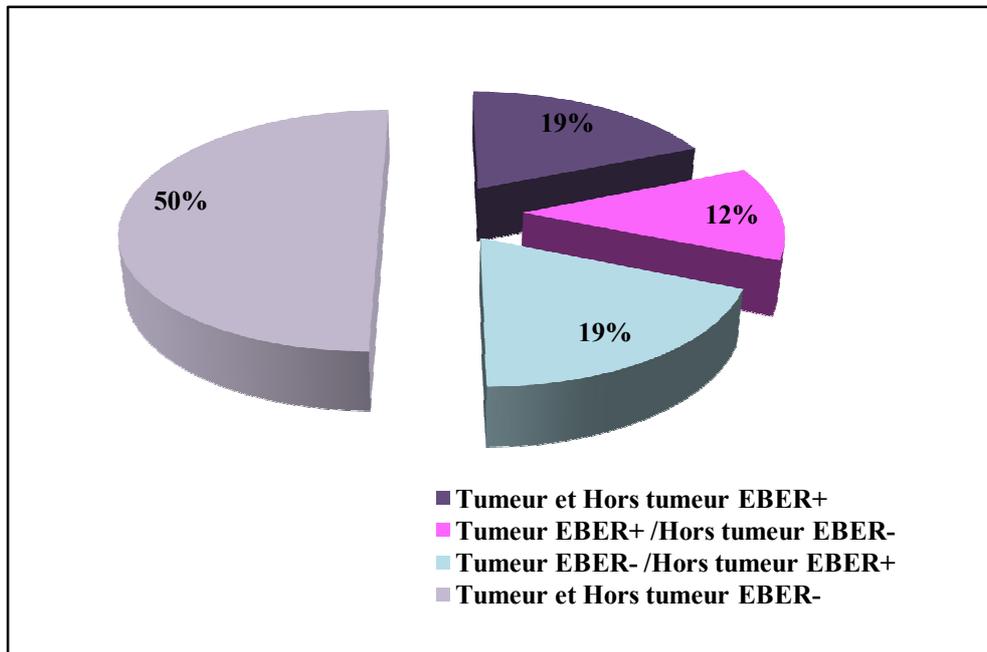


Figure 30 : Répartition des cas selon le statut des EBERs en fonction du Ki67 positif.

III.2.3.5. Statut EBERs en fonction de HER2+

Le pourcentage de la surexpression de HER2+ est élevé et représente 50% (n=5) quand le statut EBERs est négatif à la fois dans la tumeur et en dehors la tumeur (**Figure 31**).

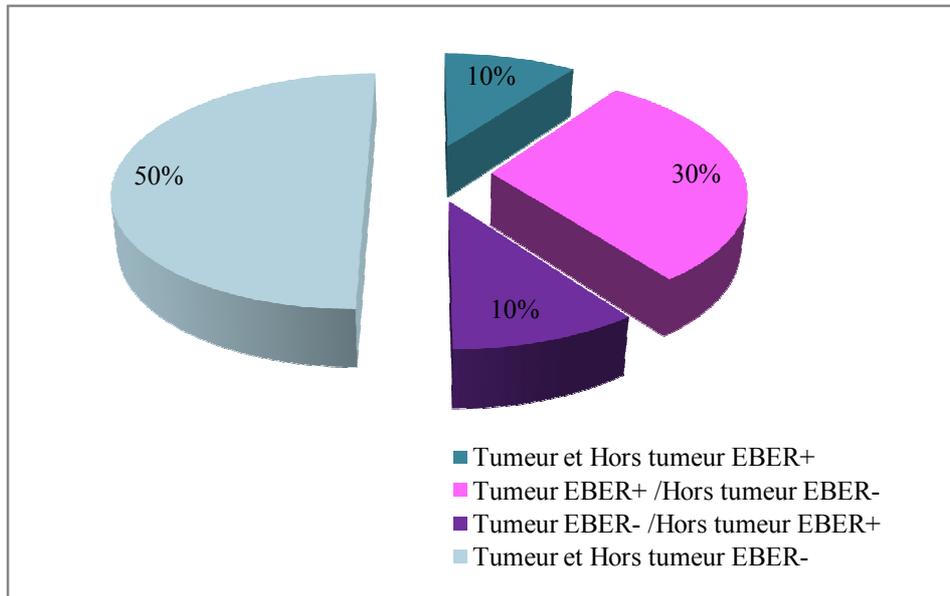


Figure 31 : Répartition des cas selon le statut des EBERs et la surexpression de HER2+.

III.2.3.6. Statut des EBER en fonction HER2-

Lorsque le statut HER2 est négatif, il existe autant de cas avec un statut des EBERs négatifs à la fois dans la tumeur et en dehors de la tumeur que EBERs + dans la tumeur et EBERs négatif en dehors la tumeur (31% de surexpression n=4) (**Figure 32**).



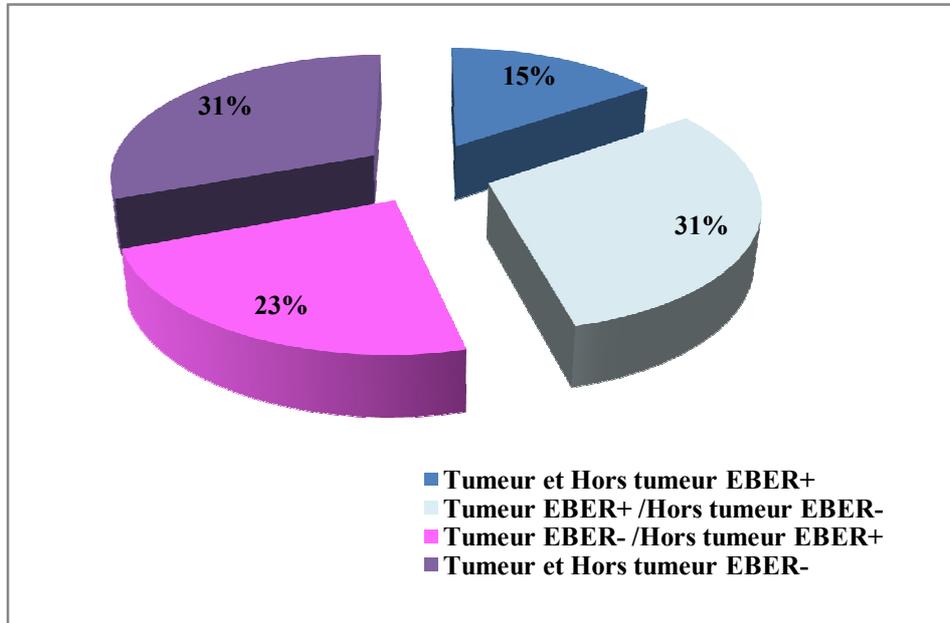


Figure 32 : Répartition des cas selon le statut des EBERS et le HER2 négatif.

Les micrographies suivantes montrent un marquage positif des EBERS.

Figure 33 : marquage à la fluorescéine les cas EBERS positifs sont observés au microscope à fluorescence. (FISH)

Figure 34 : des cas EBERS positifs en utilisant un chromogène, observés au microscope à fond blanc. (CISH)

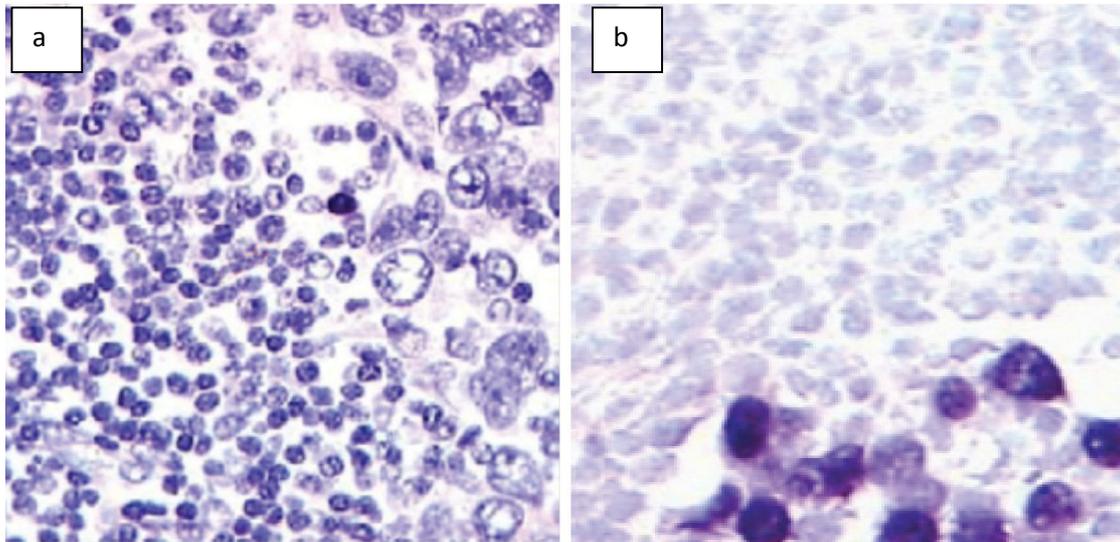


Figure 33 : Micrographies montrant le marquage positif des EBERS (FISH) (x400).

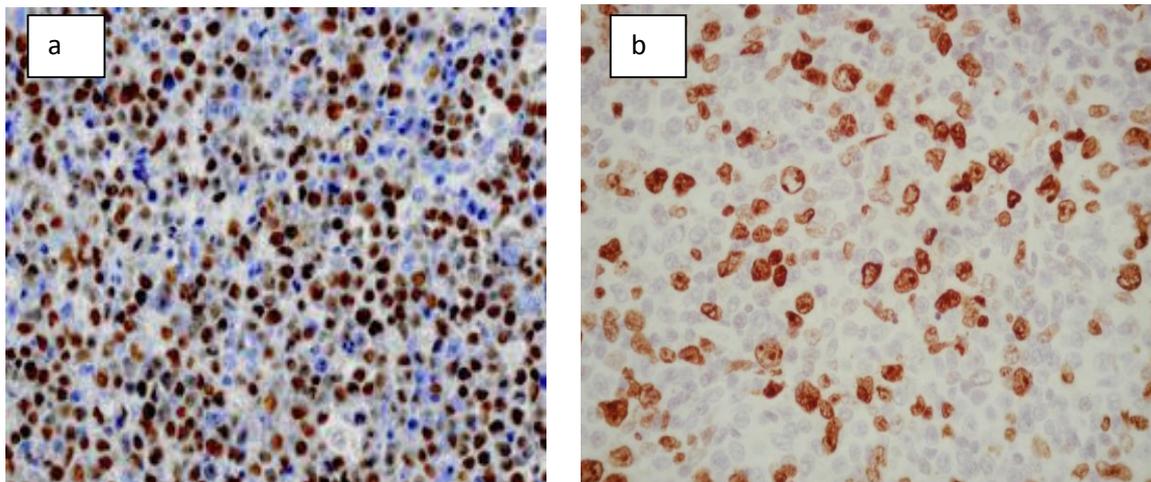


Figure 34 : Micrographies montrant le marquage positif des EBERS (CISH) (x100).

a : EBERS positif au niveau du cancer du nasopharynx.

b : EBERS positif au niveau du carcinome canalaire infiltrant indifférencié.

III.3. Résultats de l'étude statistique

Au cours de cette étude nous avons réalisé une étude statistique afin de rechercher une relation entre les résultats de l'étude sérologique et les résultats de l'étude moléculaire (phénotypique et génomique).

Les résultats obtenus sont démontrés dans les tableaux III, IV, V, VI et VII.

Tableau III : Relation entre le profil sérologique des IgG VCA et les IgG EBNA-1

Variable	Nombre des cas IgG VCA +	Nombre des cas IgG VCA -	Valeur <i>P</i>
IgG EBNA-1 +	15	02	1
IgG EBNA-1 -	05	01	

Il n'existe pas de relation entre les IgG VCA et les IgG EBNA.

Tableau IV : Relation entre l'étude immunohistochimique des LMP-1 et les EBNA-1

Variable	Nombre des cas EBNA-1 1+	Nombre des cas EBNA-1-	Valeur <i>P</i>
LMP1+	03	02	0.0056
LMP1-	00	18	

Le résultat est significatif ($p < 0.05$) selon le test de Fisher avec une valeur de 0,0056. Nous notant qu'il existe une relation significative entre la surexpression d'EBNA-1 et LMP1.

Tableau V: Relation entre IHC des LMP-1 et les profils phénotypiques, le Ki67, le HER2, le profil sérologique des IgG (VCA, EBNA-1), IHC des EBNA-1 et le statut des EBERs

Variable	Nombre des cas LMP-1+	Nombre des cas LMP-1-	<i>P</i>
Luminale A	1	8	0.673
Luminale B	1	2	
HER2	1	2	
TN	2	6	
Ki67 \geq 14	1	17	0.0027
Ki67<14	4	1	
HER2			0.621
Présence	2	5	
Absence	3	13	
Sérologie			0.575
IgG EBNA-1+	3	14	
IgG EBNA-1-	2	4	
IgG VCA+	4	13	
IgG VCA-	1	5	1
IHC			0.0052
EBNA+1+	3	0	
EBNA-1-	2	18	
EBERs			0.002
Au niveau de la tumeur	5	5	
En dehors de la T	0	7	

Pour tous les tests : on a utilisé le test Fisher's exact

Les valeurs de probabilité de $P < 0.05$ ont été considérés comme statistiquement significatif.

Il existe une relation significative entre LMP-1 et Ki67, IHC EBNA, EBERs.

Tableau VI : Relation entre le profil sérologique des IgG VCA et le phénotype moléculaire, Ki67, HER2, IHC LMP-1 et le statut des EBERs

Variable	Nombre des cas IgG VCA+	Nombre des cas IgG VCA-	P
Luminale A	8	1	0.695
Luminale B	2	1	
HER2	3	0	
TN	7	1	
Ki67 \geq 14	16	2	0.539
Ki67<14	4	1	
IHC			0.0027
LMP-1+	4	1	
LMP-1-	1	17	
HER2			1
Présence	6	1	
Absence	14	2	
Sérologie			1
IgG EBNA-1+	15	2	
IgG EBNA-1-	5	1	
EBERs			0.432
Tumeur	9	1	
En dehors de la T	5	2	

Il existe une relation positive entre le profil sérologique des IgG VCA et la surexpression LMP-1 ($P=0.002$). ($P<0.05$)

III : RESULTATS

Tableau VII : Relation entre le profil sérologique des IgG EBNA-1 et le phénotype moléculaire, Ki67, HER2, IHC LMP-1 et le statut des EBERs

Variable	Nombre des cas IgG EBNA-1+	Nombre des cas IgG EBNA-1-	<i>P</i>
Luminale A	4	5	0.0511
Luminale B	2	1	
HER2	3	0	
TN	8	0	
Ki67 \geq 14	12	6	0.272
Ki67<14	5	0	
IHC			0.5
LMP-1+	3	2	
LMP-1-	14	4	
HER2			0.0033
Présence	2	5	
Absence	15	1	
IHC			1
EBNA-1+	2	1	
EBNA-1-	15	5	
EBERs			0.1
Tumeur	9	1	
En dehors de la T	3	4	

Il existe une relation positive entre le profil sérologique des IgG EBNA-1, la surexpression du HER2 ($P=0.003$), et le profil moléculaire ($P=0.051$).

Le virus Epstein-Barr est le premier virus oncogène découvert chez l'homme. C'est un des virus capable de transformer et d'immortaliser des cellules humaines en culture (**Vincent M, 2013**). In vivo l'infection par ce virus provoque une infection latente qui persiste dans l'organisme durant le restant de la vie. Les cellules infectées vont exprimer peu de protéines virales ce qui leurs permettra d'échapper à la surveillance du système immunitaire, cependant cette phase est interrompue lors de la réactivation du virus qui se traduit par la production de nouvelles particules virales, la destruction de la cellule hôte et le développement du cancer. On peut donc considérer que les cancers induits par l'EBV sont le reflet d'un déficit sévère du système immunitaire (**Pagano et al., 2004**). Une association de l'infection par EBV avec le cancer du sein a été rapportée en Inde (Joshi et al., 2009), en Chine (Peng et al., 2014; He et al., 2012) en Afrique du Nord (Fina et al., 2001; Hachana et al., 2011b) et en Europe du Sud (Marrao et al., 2014; Mazouni et al., 2011; Labrecque et al., 1995).

L'âge moyen des patientes retenues dans notre étude est de $57,40 \pm 3.14$ et dont 73% des patientes sont ménopausées. L'étude de «Pan African Médical a porté sur 335 patientes atteintes d'un carcinome mammaire invasif, recrutées au CHU de Fès entre janvier 2007 et septembre 2010. La population de cette région est caractérisée par un âge jeune, avec un âge médian de 45 ans, et des extrêmes allant de 18 à 82 ans (**The Pan African Medical Journal 2012**).

La société Française de Sénologie et Pathologie mammaire a rapporté en 2010 que deux cancers du sein sur 3, soit 66.6 se déclarent après la ménopause. Le cancer du sein se déclare de plus en plus jeune 7% des femmes touchées ont moins de 40 ans, alors que ce chiffre était de 5.6% en 2002. (**S.F.S.P.M., 2010**)

Dans notre étude 70% des tumeurs de grade SBRII, 27% sont de grade SBRIII, et 3% de grade I. Zaoui et al 2010 ont rapporté 88.5% de grade SBRII. Dans la série de Abas et al (2011) la proportion des grade SBRII est élevée. Chahbouni (2012) rapporte que 27.7% des cas étaient de grade III. Les tumeurs de grade II étaient majoritaires et elles représentaient 56.9% des cas. Les tumeurs de grade I représentaient 51.4% des cas.

Dans notre étude 73% de cas sont pN + avec une prédominance du nombre des ganglions envahis de 1 à 3%. Dans l'étude de Zaoui et al (2010) les pN + représentaient 58% de la population. Dans la série étudiée par Chehbouni le curage ganglionnaire a été réalisé chez 46% des cas soit 60/103 patientes, 32.2% des patientes avaient des ganglions non envahis **(Chahbouni, 2012)**.

Dans notre étude, 58% des tumeurs surexpriment les récepteurs oestrogéniques, 51% les récepteurs progestéroniques et 38% surexpriment les HER2. Mc Grogan a trouvé que dans 80% des cas les récepteurs oestrogéniques sont surexprimés dans les cellules tumorales contre 68% pour les récepteurs progestatifs **(Mc Grogan, 2011)**

L'étude immunohistochimique réalisée par Abass et al a révélé que 72% des tumeurs sont positives aux récepteurs hormonaux avec 54.7% positives aux RE, 66% positives au RP et 26% des tumeurs surexpriment la protéine HER2. **(Abass et al., 2011)**

L'étude immunohistochimique permet de classer les tumeurs invasives en 4 sous types moléculaires, Luminale A, Luminale B, HER2, Triple négatif. Dans notre étude nous avons retrouvé de 34% LA, de 14% LB, de 24% HER2 et 28% de triples négatifs. Mathieu (2012) rapporte une classification discordante avec la littérature **(Mathieu, 2012)**.

Pour l'exploration de la présence virale, nous avons retenu 23 patientes. L'étude sérologique des différents anticorps anti-EBV recherchés ne présente pas de différence significative. La quasi-totalité des sérologies sont positives. Nous avons retrouvé des anticorps anti- VCA chez 20 des 23 patientes, anti- EBNA-1 chez 17 cas des 23 patientes. Ces résultats prouvent la présence du virus chez ces patientes et nous conduisent à poser la question : s'agit-il d'une infiltration lymphocytaire bien ce que le cancer diagnostiqué est la conséquence d'une phase de réactivation virale ?

He et al en 2011 en Chine ont étudié les taux sériques d'immunoglobuline A (IgA) et d'IgG contre l'antigène de la capsid virale EBV (VCA) et EBNA-1 chez les femmes atteintes de carcinome du sein ainsi que des témoins dans une zone à incidence élevée du carcinome nasopharyngé. Leurs résultats ont montré une association significative entre les niveaux d'IgA VCA et le risque accru de cancer du sein. Par contre les variables IgG n'étaient pas liées au carcinome du sein.

Les études d'Angeloni et al, (2001), et Richardson et al, (2001) ont cherché des preuves sérologiques de l'infection chez des patientes atteintes de cancer du sein.

L'infection par EBV a été étudiée dans une seule étude en mesurant les taux d'IgG de l'EBV dans 208 échantillons de plasma stockés issus de patientes atteintes de cancer du sein et de 169 personnes non atteintes utilisées comme témoins ont trouvé que l'expression de EBNA-1 est observée dans une proportion significative des échantillons de tissus de cancer du sein provenant des régions rurales de l'Inde et par rapport aux patientes atteintes de maladies mammaires bénignes, ces patientes ont également une réponse immunologique plus élevée contre EBNA-1 (Deepti et al., 2009).

Yahia et al, 2017 ont étudié la sérologie des EBNA-1 P79 et ont trouvé un taux élevé de profil sérologique positif (Radia et al., 2017)

Gina Marao et al en 2014 ont utilisé deux méthodes différentes: (i) des tests d'immunofluorescence indirecte conventionnels (IFA) ont été effectués pour mesurer les IgG anti-VCA et les antigènes anti-précoce (EA), ils ont également étudié la réactivation du cycle lytique par un titrage ELISA des IgG anti-ZEBRA. Les patientes présentant des anticorps anti-ZEBRA à des titres élevés ont connu une survie globale plus faible.

Avec le test de Fisher's exact, nous avons retrouvé une relation positive entre le profil sérologique IgG EBNA-1 le profil moléculaire ($p=0.051$) et la surexpression des HER2 ($p=0.003$), ainsi qu'une relation positive entre le profil sérologique IgG VCA et la surexpression cytoplasmique LMP-1 ($p=0.0027$).

En 2009 une étude menée par JIAN-RONG HE et al, sur la relation EBV et cancer du sein infirme toute relation entre ces deux paramètres. Il en est de même pour l'étude de Angeloni et al, menée sur 71 patientes atteintes de cancer du sein chez lesquelles la protéine BFRF1 (protéine de réplication) n'a été détectée dans tous les sérums testés alors qu'elle a été détectée chez les patients atteints de NPC et de Burkitt, ce qui alimente le questionnement de l'infection par l'EBV dans les carcinomes mammaires et qui requiert de plus amples des travaux sur une cohorte importante.

Ces travaux devaient en premier lieu, mettre en évidence la présence du virus et son rôle comme agent inducteur de cancer mammaire en réalisant un suivi par des techniques fines et fiables, telles que la PCR Quantitative en Temps Réel, mais aussi la technique des micro-array.

La localisation du génome viral au niveau cellulaire est rendue possible par l'application de techniques morphologiques comme l'hybridation in situ ou l'immunohistochimie. Dans cette étude, nous avons recherché l'expression de l'antigène LMP-1 et EBNA-1 d'EBV dans les cellules tumorales à l'aide de la technique IHC. Nous avons mis en évidence l'expression de LMP-1 dans les cellules des carcinomes mammaires dans 21.73 % et 13.04 % pour EBNA-1 des échantillons étudiés. L'association entre EBV et cancer du sein a été signalée dans plusieurs études conduites dans différents pays. Mazouni et al (2001) en France ont révélé la présence d'acide désoxyribonucléique (ADN) EBV dans 33,2% des cas étudiés en utilisant la technique de réaction en chaîne polymérase quantitative (PCR) en temps réel. Joshi et al (2009) ont comparé l'expression d'EBNA-1 par immunohistochimie et la détection du génome par PCR dans des échantillons provenant de carcinome du sein et de la maladie fibrokystique. L'expression d'EBNA-1 a été trouvée dans 25% des échantillons de cancer du sein. Parmi ceux-ci, 80% étaient également positifs pour l'ADN EBNA-1 par PCR. Preciado et al (2005) en Argentine utilisaient à la fois des techniques d'IHC et de PCR et ont trouvé l'expression d'EBNA-1 dans 35% des échantillons de carcinome du sein. Perrigoue et al (2005) aux USA, ont utilisé une PCR quantitative en temps réel et ont signalé un manque d'association entre l'EBV et le carcinome du sein. Dans l'étude de Labrecque et al en 1995 au Royaume uni par technique de PCR, l'ADN de 91 cas de carcinome du sein et des échantillons de sang provenant des mêmes patients ont été amplifiés par PCR sur une région de la séquence de répétition majeure EBV BamHIW suivant un protocole d'amplification en une seule étape. 19 échantillons soit 21% étaient positifs; Le protocole adopté a révélé que 10 échantillons de sang (seulement 3 provenant de patients atteints de tumeurs à EBV-positives) contenaient de l'ADN de l'EBV.

Glenn et al (2012) en Australie ont identifié des séquences d'EBV par PCR dans 68% des échantillons de cancer du sein invasif.

Baltzell et al (2012) aux États-Unis ont utilisé des méthodes moléculaires in situ de détection virale, montrent que l'EBV est susceptible d'avoir un rôle causal dans la plupart des types de carcinome du sein.

Mazouni et al (2014) ont rapporté la présence du virus dans des échantillons de sein à l'aide d'une PCR quantitative (PCRq), la positivité de l'EBV a été observée dans 32,5% des cas.

Gina Marao et al en 2014 ont déterminé l'infection de l'EBV, par PCRq dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et les biopsies tumorales. Ils ont également examiné la forme de réplication de l'EBV par titrage d'anticorps anti-ZEBRA sériques. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la détection d'EBV dans les cellules tumorales ou les PBMC et les caractéristiques tumorales d'une part et l'EBV et autres facteurs pronostiques d'autre part.

Notamment, les patients présentant des anticorps anti-ZEBRA à titres élevés ont connu une survie globale plus faible. Il a été constaté que ceux qui ont pu guérir de leur maladie ils avaient une charge mesurable en ADN viral, ainsi qu'une fréquence élevée de PBMC produisant des IFN- γ et TNF- α , ce qui indique l'existence d'une réponse immunitaire polarisée de type Th1 à la fois dans la tumeur et dans le tissu environnant.

Parallèlement, il est important de souligner qu'il n'y a que peu d'études sur la présence d'EBV au Moyen-Orient les travaux de Kalkan et al en 2005 ont révélé que 58% du cancer du sein sont positifs dans la population turque. Zekri et al (2012) ont constaté que 45% et 28% des cancers du sein chez les femmes égyptiennes et irakiennes respectivement sont positifs pour l'EBV.

Fawzy et al (2008) en l'Egypte a comparé l'expression d'EBNA-1 par immunocoloration et PCR dans des échantillons provenant de carcinome du sein et maladie fibrokystique. L'expression d'EBNA-1 par IHC a été trouvée dans 25% des échantillons de cancer du sein. Parmi ceux-ci, 80% étaient également positifs pour l'ADN EBNA-1 en PCR.

En parallèle, Hachana et al en 2011 ont démontré que 27% des tissus du cancer du sein en Tunisie étaient positifs pour l'EBV.

Une autre étude en Tunisie réalisée par Trabelsi et al en 2011 par IHC et hybridation *in situ*, a permis de détecter le virus dans 16,6% des carcinomes médullaires et 11% des carcinomes canauxiaux invasifs de haut grade avec stroma lymphoïde. Cependant, une étude récente réalisée en Iran a montré que l'EBV n'était pas détectable dans le cancer invasif et les tissus mammaires normaux chez les femmes iraniennes. Par conséquent, les recherches des différents pays de la région du Moyen-Orient, à l'exception d'une étude réalisée en Iran, ont montré que la présence d'EBV dans le cancer du sein et les tissus normaux variaient entre 27 et 58%, ce qui équivaut approximativement 9 fois par rapport à sa présence dans le cancer du sein dans le monde entier. Aboukacim et al (2015) déclarent que l'EBV est présent dans environ 52% du cancer du sein chez les Syriennes.

Fimereli et al en 2015, ont recherché des séquences virales exprimées dans des transcriptomes de 58 carcinomes mammaires. Ils ont identifié un petit nombre de séquences virales appartenant au virus de l'herpès humain 4 et 6 et au polyomavirus de cellules de Merkel. Les niveaux d'expression extrêmement faibles avec deux ordres de grandeur inférieurs à ceux d'une infection typique du virus de l'hépatite B dans le carcinome hépatocellulaire, n'ont pas suggéré d'infections actives. La présence d'éléments viraux a été confirmée dans des séquences d'exome appariées à l'échantillon, mais n'a pu être confirmée par PCR ou IHC.

Almoustapha et al en 2016 ont montré qu'un motif de coloration de points cytoplasmiques, était corrélé avec le phénotype invasif du cancer du sein dans 60,7% des échantillons de cancer du sein par opposition à 20,8% des tissus de cancer *in situ*. Ils présupposent que ces carcinomes mammaires *in situ*, qui sont EBV positifs, finiront par se transformer en carcinomes invasifs sous l'effet de l'EBV, puisqu'ils sont déjà de niveau nucléaire intermédiaire élevé.

D'autre part, ils ont noté que plus de 90% des cellules cancéreuses dans les échantillons expriment LMP1 par rapport aux cellules épithéliales mammaires normales adjacentes, qui n'expriment pas LMP1. Ces données de l'IHC ont été confirmées par la présence de LMP1 et EBNA-1 dans 54 des échantillons en utilisant une analyse par PCR avec tous les contrôles nécessaires, y compris les lignées cellulaires Mec1 et MCF7 ainsi que les cellules épithéliales mammaires normales. Ils ont pu prouver qu'EBV était présent dans la majorité des carcinomes invasifs du sein par rapport aux cancers in situ chez les patientes Syriennes.

Saad Hasan Mohammed Ali et al en 2017 ont analysé le taux d'infection EBV exprimant LMP1 dans les tissus mammaires en association avec des défauts et / ou des mutations dans le gène BRCA-2. Ceci en évaluant les niveaux d'expression endogène de BRCA -1, ainsi que les produits protéiques LMP-1 et leurs relations avec la différenciation des tissus de cancer du sein invasifs primaires. La détection des réactions immunohistochimiques LMP-1 dans les tissus avec BC a été observée chez 11 sur 34 patientes soit 32,4%.

Avec le test de fisher's exact, nous avons retrouvé dans notre étude une relation positive de la surexpression LMP-1 EBNA-1 par immunohistochimie ($p=0.005$) et LMP-1 est le Ki67 ($p= 0.002$) mais aucune relation entre le triple négatif et la surexpression de HER2.

La prévalence variable de l'association EBV avec le cancer du sein dans ces études peut être attribuable à plusieurs facteurs, y compris la taille et la méthodologie de l'échantillonnage. La PCR et les techniques d'hybridation in situ sont certainement plus précises par rapport à la technique IHC.

À notre connaissance, il n'existe pas d'étude à grande échelle sur l'infection virale chez patientes atteintes de cancer du sein corrélée aux triples négatives, mais certaines études explorant l'association avec des sous-types de récepteurs hormonaux ont été menées. Dans une étude bien conduite utilisant 196 tumeurs congelées issues du sud de la France, Mazouni et al en 2014 ont révélé que la positivité d'EBV était significativement plus fréquente chez les ER- que chez les ER + avec 45,4% contre 27,9%. Par contre Silva et al (2004) n'ont pas trouvé de corrélation entre le statut de l'ER ou du PR et l'expression de la protéine EBNA-1.

IV : DISCUSSION

Corbex en 2014 suggèrent une association entre la présence d'ADN viral et les phénotypes agressifs du cancer du sein, et triple-négatif, ils ont montré une positivité du virus plus élevée que les tumeurs non triples négatives 44% contre 14% ($p=0,009$).

Rehab et al en 2016, ont sélectionné 107 cas de carcinome invasif du sein les blocs préparés par microarray ont été examinés par IHC pour les antigènes viraux HCMV, EBV et HPV. L'EBV a été retrouvé dans 10,3 % et il est associé à la taille de la tumeur, au stade et au type histologique ($p = 0,25, 0,005, 0,009$) respectivement. Le HCMV retrouvé dans 43,9% et HPV dans 24,3%.

Dans notre étude le marquage des EBERs a montré que l'expression du génome viral a lieu dans 43,48% des tissus mammaires transformés mais elle est également présente en dehors de la tumeur dans 30,43% des cas. Les tumeurs positives pour le marqueur Ki67 >14% sont considérées comme des tumeurs très prolifératives. La présence du génome de l'EBV au niveau de la tumeur n'accélère pas la division tumorale, par contre son absence corrèle avec une activité du Ki67 élevée et les tumeurs sont nettement prolifératives.

Plusieurs études ont examiné les tissus de carcinome du sein et ont signalé des résultats largement divergents. En utilisant l'hybridation in situ des EBERs, Lezzoni et al (IARC 2008) n'ont pas détecté d'EBV dans 52 cas de cancer du sein infiltrant avec des caractéristiques médullaires (carcinome lymphoépithélome). De même Chu et al ont analysé des échantillons de carcinome mammaire et ont constaté qu'aucun des 60 cas de cancer du sein au Taiwan n'était positif pour l'EBV à l'aide de l'hybridation in situ d'EBER, de l'immunohistochimie EBNA-2 et LMP-1.

Glaser et ses collègues (2004) ont également échoué à démontrer des cas positifs dans 107 tissus de carcinome mammaire aux États-Unis.

Récemment, Brink et ses collègues ont étudié 24 cas de carcinome du sein européen. Les signaux d'hybridation in situ d'EBS-1 et EBER-2 n'étaient détectés dans aucune des cellules de carcinome mammaire, mais un des cas positifs à la PCR avait un petit nombre de lymphocytes EBER-positifs. Ces travaux ont permis de conclure qu'il n'y avait aucune preuve d'association entre le cancer du sein et l'EBV car la transcription des transcrits EBNA-1, EBER-1, EBER-2 dans les échantillons de carcinome du sein n'a pu être détectée.

En revanche, Labrecque et al (1995) ont trouvé que 19 des 91 cas de cancers du sein, soit 21% au Royaume Uni étaient positifs par PCR ADN pour la détection des EBER-1 et EBER-2. Toujours au Royaume Uni, Luqmani et al (1995) ont également trouvé que 15 des 28 soit 42% des cancers du sein britanniques avaient l'ADN viral détecté par de PCR. Cependant, aucun de ces cas PCR-positifs n'a été trouvé positif en utilisant l'hybridation in situ EBER. En utilisant la PCR d'ADN pour détecter EBER-2 et LMP-2, Bonnet et al (1999) ont trouvé 51 des 100 soit 51% EBV+ des cas de carcinome du sein étudié.

Des rapports antérieurs confirment que l'expression des EBERs peut favoriser les effets cancérigènes dans une cellule infectée. L'étude de Malekpour Afshar Reza et al en 2016 ont montré que l'ARN EBER était détecté dans 18% d'échantillons de cancer du sein et dans 55,5% des échantillons de ganglions lymphatiques, ces résultats ont permis de confirmer le rôle de l'ARN des EBER dans la transformation cellulaire.

Bien que les données de nombreux études suggèrent une association possible entre l'EBV et le carcinome du sein, d'autres n'ont pas réussi à confirmer une telle relation. Kadivar et al (2011) en Iran ont étudié la présence d'EBV dans le carcinome du sein et les maladies mammaires bénignes en utilisant des techniques d'IHC et de PCR. Les résultats de cette étude montrent l'absence totale des marqueurs EBV chez l'ensemble des échantillons des cancers du sein et des témoins.

Perrigou et al (2005) aux États-Unis ont utilisé une PCR quantitative en temps réel et signalé un manque d'association entre l'EBV et le cancer du sein. De même les résultats de l'étude de Baltzell et al (2012) aux États-Unis utilisant des méthodes moléculaires de détection virale, aboutissent à la conclusion qu'il est peu probable que l'EBV ait un rôle causal dans la plupart des types de carcinome du sein.

Conclusion

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme dans le monde. Il représente aussi un important problème de santé publique et constitue une des principales causes de mortalité par cancer chez la femme dans le monde. En Algérie il occupe le premier rang avec un taux de mortalité très élevé. A Oran le carcinome canalaire infiltrant représente 80% de l'ensemble des cancers du sein.

Différentes théories font que l'association de l'EBV avec le cancer du sein mérite d'être étudiées.

Dans notre étude, l'objectif principal était d'évaluer la présence du virus Epstein-Barr et l'expression de son génome dans les carcinomes canaux infiltrants. Cette étude a été conduite sur des échantillons issus de 23 cas de femmes de l'ouest Algérien atteintes de cancer du sein.

Les Profils sérologiques des IgG anti- VCA, IgG anti- EBNA-1 sont dans la plupart des cas étudiés positifs avec une relation positive entre le profil sérologique IgG VCA et la surexpression des LMP-1.

Nous avons trouvé une relation positive entre le profil sérologique des IgG EBNA-1 et les sous types moléculaires ainsi que la surexpression de l'oncoprotéine HER2.

De plus l'étude immunohistochimique des LMP-1 et EBNA-1 a montré une minorité de surexpression des LMP-1 et EBNA-1 avec une relation positive entre ces derniers. L'index de prolifération Ki67 est en relation positive avec la surexpression de la protéine LMP-1.

La présence du génome viral a été recherchée par la mise en évidence des EBERs par hybridation *in situ*. Ces derniers montrent une relation positive avec les LMP-1 et HER2 et inversement avec l'index de prolifération Ki67.

L'EBV peut avoir un rôle dans le cancer du sein humain mais son rôle possible comme facteur étiologique reste à déterminer. La sérologie virale est considérée comme un excellent marqueur tumoral qui peut être utilisé comme moyen diagnostique dans les cancers viro induit ce qui pourrait contribuer à la prévention de ces cancers à un stade précoce.

La prévalence variable de l'association EBV avec le cancer du sein dans cette étude peut être attribuable à plusieurs facteurs, y compris la taille de l'échantillon et la méthodologie utilisée. La PCR et les techniques d'hybridation in situ sont certainement plus précises par rapport à la technique d'immunohistochimie.

L'existence d'une relation positive avec un facteur de bon pronostic HER-2 est en même temps avec un facteur de bon pronostic Ki67 bas ce qui nous met dans une situation où on ne peut trancher ni préciser le rôle que joue l'infection virale. Celle-ci joue-t-elle un rôle étiologique ou protecteur.

Perspectives

Malgré toutes les avancées scientifiques concernant la compréhension et la prise en charge du cancer du sein, hélas cette pathologie continue à frapper de plus en plus des femmes à tout âge et de plus en plus des sujets jeunes, représentant ainsi la première cause de mortalité par cancer .

Le cancer du sein reste donc une pathologie énigmatique avec une multitude de facteurs de risque connues tel que : la génétique, l'environnement, les hormones, les rayonnements ultraviolets, les virus, etc.

Tous ces paramètres, représentent un obstacle majeur dans la prise en charge du cancer du sein. Des difficultés plus prononcées sont rencontrées dans l'ouest Algérien, à cause des conditions socio- économiques des patientes qui sont le plus souvent défavorables, ce qui ne les pousse pas à consulter à temps. Ceci conduit inévitablement à la gravité de la maladie et quand ces patientes arrivent au centre de soin; la maladie est déjà à un stade très avancé ne laissant aucune chance de survie.

Le cancer du sein en Algérie est un véritable problème de santé publique d'où la nécessité d'alerter les pouvoirs publics pour cerner cette épidémie.

Il est donc impératif de créer une équipe multidisciplinaire composé de médecins, chirurgiens, chercheurs, biologistes et surtout psychologues pour une prise en charge optimale des patientes.

Prise en charge des registres de cancer, en regroupant toutes les patientes issues de l'ouest algérien, ceci peut être réalisé grâce au concours et aux efforts de toutes les équipes médicales et paramédicales menées par un réseau d'épidémiologistes et statisticiens.

Recommandations

Il est recommandé d'impliquer de plus en plus de virologistes au diagnostic des cancers viro induits, de mettre à la disposition les techniques sérologiques telles que les techniques ELISA et immunoassay, mais également accéder aux nouveaux moyens diagnostiques tel que la PCR Quantitative en Temps Réel qui nous permet de renseigner d'une manière quantitative des sur la présence et la fréquence des gènes viraux mais surtout la quantification la charge virale.

Le plan cancer du sein mis en œuvre n'a pas encore eu d'évaluation il est nécessaire d'augmenter les centres de mammographie. Et enfin il serait nécessaire de faciliter l'accès au diagnostic du cancer du sein en offrant les moyens de dépistage, en créant une unité mobile se déplaçant dans les zones rurale et isolées des centres de soins, afin d'offrir la chance à ces patientes de consulter à temps et d'accéder aux différents moyens d'imagerie tels que la mammographie, l'échographie et à titre gratuit pour les patientes les plus démunies, ceci permettra peut-être de minimiser cette épidémie et surtout permettre d'établir un diagnostic précoce.

Sur le plan recherche, il est nécessaire d'établir les profils moléculaires tels que l'établissement de carte d'identité moléculaire des tumeurs du sein pour déboucher sur une classification plus fine de la maladie.

A

- **Abbass F, Bennis S, Znati K, Akasbi Y, Amrani JK, El Mesbahi O et Amarti A.** Le profil épidémiologique et biologique du cancer du sein à Fès-Boulemane (Maroc). *EMHJ* Vol. 17 No. 12 • 2011
- **Aboukassim T, Amber Y, Nizar A, Batist G, Al Moustafa A.** Incidence of Epstein-Barr virus in Syrian women with breast cancer: a tissue microarray study. *Hum Vaccin Immunother* 2011; 4: 951-5.
- **Albanese M, Tagawa T, Bouvet M, Maliqi L, Lutter D, Hoser J, Hastreiter M, Hayes M, Sugden B, Martin L, Moosmann A, Hammerschmidt W.** 2016. Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: e6467–e6475
- **Al Moustafa A, Al-Antary N, Aboukassim T, Nizar A, Batist G, Amber Y.** Co-prevalence of Epstein-Barr virus and high-risk human papillomaviruses in Syrian women with breast cancer. *Hum Vaccin Immunother* 2016 ; 7 : 1936-9.
- **Amat S, Penault-Llorca F, Cure H, Le Bouedec G, Achard JL, Van Praagh I, Feillel V, Mouret- Reynier MA, Dauplat J, Chollet P.** Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: A pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *Int J Oncol* 2002;20:791-796.
- **Amiel C.** Le virus Epstein-Barr (EBV) : physiopathogénèse et diagnostic, université Pierre et Marie Curie, Paris, 2013, pp 47- 55.
- **Angeloni A, Farina A, Gentile G, et al.** Epstein-Barr virus and breast cancer: search for antibodies to the novel BFRF1 protein in sera of breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:560-Ann Oncol. 12 Suppl 1:S9-13. Review.
- **Arbach H, Viglasky V, Lefeu F, Guinebretiere JM, Ramirez V, et al.** Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol*.2006;80:845–853.
- **Armbruster V, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, Mueller-Lantsch N.** A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res*. 2002 Jun; 8(6):1800-7.

B

- **Ballout M.** Evaluation par PCR de l'activité antivirale des inhibiteurs de l'ADN polymérase du Virus d'Epstein-Barr, faculté de médecine de Grenoble, France, 2005, pp 1-157.
- **Baltzell K, Buehring GC, Krishnamurthy S, Kuerer H, Shen HM, Sison JD.** Epstein-Barr virus is seldom found in mammary epithelium of breast cancer tissue using *in situ* molecular methods. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132:267–74.
- **Bannert N and Kurth R.** Retroelements and the human genome: New perspectives on an old relation. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2004 Oct 5; 101(Suppl 2): 14572–14579
- **Barbulescu M, Turner G, Michael I, Amos S, Kenneth D K, Lenz J.** (1999). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. Volume 9, Issue 16, 26 August 1999, Pages 861-868, S1.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Bikfalvi A** (2003). Tumor angiogenesis. *Bull Cancer*. 90: 449-58.
- **Biomnis**. Biologie médicale spécialisée. précis de biopathologie analyses médicales specialisees, France, 2012, pp 1-4.
- **Bittner JJ**. Some possible effects of nursing on the mammarytumor incidence in mice. *Science*.1936;84:162–9.
- **Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J**. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 1;97(3):1184-9.
- **Boller K, König H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, Löwer R, Löwer J, et al**. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* (1993) 196:349–5310.1006/viro.1993.1487
- **Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, et al**. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1376–1381.
- **Boyle P, Levin B**. World cancer report 2008. International agency for research on Can, Lyon. www.iarc.fr
- **Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ**. Etiology of breast carcinoma: No apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathol Res Pract* 1992;188:384-386.
- **Brink AA, van Den Brule AJ, van Diest P, Meijer CJ**. Re: detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:655–656; author reply 656.
- **Buehring GC, Hua Min Shen, Hanne M. Jensen, Diana L. Jin, Mark Hudes, Gladys Block** (2015). Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. 10.1371/journal.pone.0134304

C

- **Carmeliet P**. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 6:389-95
- **Chahbouni S, 2012**. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté de Médecine et de Pharmacie Fesanné 2009 N° 135 la classification moléculaire du cancer du sein.
- **Chu JS, Chen CC, Chang KJ**. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett*. 1998;124:53–57.
- **Cianfrocca M., and Goldstein L.I** 2004. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 9:606-616.
- **Clarke JB, Griffiths JB**. The effect of bioreactor configuration on production of HIV and cell-virus interaction. *Cytotechnology*. September 1990, Volume 4, Issue 2, pp 145–153.
- **Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE**, éditeurs. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- **Cohen J**. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 481-92.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Corbex M, Bouzbid S, Traverse-Glehen A, et al** (2014). Prevalence of papillomaviruses, polyomaviruses, and herpesviruses in triple-negative and inflammatory breast tumors from Algeria compared with other types of breast cancer tumors. *PLoS One*, 9, 114559.
- **Czerwenka K, Friedrich Heuss, Josef W, Hosmann, Mahmood M, Yongxian Lu, Darko J, Ernst K** (1999). Human papilloma virus DNA: A factor in the pathogenesis of mammary Paget's disease? *Breast Cancer Research and Treatment*, 41 p 51-57

D

- **Danai Fi, David G, Debora F, Roberto S, Françoise R, Denis t, Christos S and Vincent D.** (2015). No significant viral transcription detected in whole breast cancer transcriptomes. *BMC Cancer*.
- **Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML.** Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;21:95-100.
- **Donegan, W.L.** 1997. Tumor-related Prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J. Clin.* 47:28-51.

E

- **Eccles SA.** (2001). The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and
- **Edwards RH¹, Marquitz AR, Raab-Traub N/** Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing. *J Virol.* 2008 Sep;82(18):9094-106. doi: 10.1128/JVI.00785-08. Epub 2008 Jul 9.
- **Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G., and Barr, Y. M.** (1965). Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med* 121, 761-70.

F

- **Fawzy S, Sallam M, Awad NM.** Detection of Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Egyptian women. *Clin Biochem.* 2008;41:486-492
- **Fina F, Romain S, Ouafik L, Palmari J, Ben Ayed F, et al.** Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br J Cancer.* 2001;84:783-790.
- **Ford D, Easton DF, Stratton M, et al.** Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998 ; 62 : 676-89.

G

- **Gaffey MJ, Frierson HF, Jr, Mills SE, Boyd JC, Zarbo RJ, et al.** Medullary carcinoma of the breast. Identification of lymphocyte subpopulations and their significance. *ModPathol*.1993;6:721–728.
- **Glaser SL, Ambinder RF, DiGiuseppe JA, Horn-Ross PL, Hsu JL.** Absence of Epstein-Barr virus EBER-1 transcripts in an epidemiologically diverse group of breast cancers. *Int J Cancer*. 1998;75:555–558.
- **Glaser SL, Hsu JL, Gulley ML.** Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:688–697.
- **Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS.** Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PLoS One*.2012; 7:e48788.
- **Goldberg JI, Borgen PI.** Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*.2006 Aug;6(8):1205-14. Review.
- **Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, Sharma JK, Hedau ST, Mandal AK, Das BC.** Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerasechainreaction. *Breast Cancer ResTreat* 1996;39:197 - 202
- **Gourzones C et al.** Consistent High Concentration of the Viral microRNA BART17 in Plasma Samples From Nasopharyngeal Carcinoma Patients - Evidence of Non-Exosomal Transport *Virol J* 10, 119. 2013 Apr 16
- **Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, et al.** Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res*. 2002; 62:4876–4878.

H

- **Hachana M, Amara K, Ziadi S, Romdhane E, Gacem RB, Trimeche M.** Investigation of Epstein-Barr virus in breast carcinomas in Tunisia. *Pathol Res Pract*.2011; 207:695–700.
- **HadinotoV , Michael Shapiro ,Chia Chi Sun, David A.** Thorley-La : The Dynamics of EBV Shedding Implicate a Central Role for Epithelial Cells in Amplifying Viral Output July 3, 2009 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000496>
- **He JR, Chen LJ, Su Y, Cen YL, Tang LY, Yu DD, et al.** Joint effects of Epstein-Barr virus and polymorphisms in interleukin-10 and interferon- γ on breast cancer risk. *J Infect Dis*. 2012; 205:64–71.
- **Heslop HE¹How** I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*. 2009 Nov 5;114(19):4002-8. doi: 10.1182/blood-2009-07-143545. Epub 2009 Sep 1.
- **Huraujc, Nicolas JC, Aagut H, Peigue-I.** *Virologie médicale*, Estem Ed, Paris, 2003, pp 213- 225, 31-40.

I

- **IARC (2018).** World cancer report 2018. Lyon, International Agency for Research on Cancer.

J

- **Jia S, Zhai H, Zhao M. 2014.** MicroRNAs regulate immune system via multiple targets. *Discov Med*, 18: 237–247.
- **Joshi D, Quadri M, Gangane N, Joshi R, Gangane N.** Association of Epstein Barr virus infection with breast cancer in rural Indian women. *PLoS One*.2009;4:e8180.
- **Junker AK, Thomas EE, Radcliffe A, Forsyth RB, Davidson AG, Rymo L. (1991).** Epstein- Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci*. 302:220-

K

- **Kadivar M, Monabati A, Joulaee A, Hosseini N.** Epstein-Barr virus and breast cancer: Lack of evidence for an association in Iranian women. *PatholOncol Res*. 2011; 17:489–92.
- **Kaklamani VG, Gradishar WJ (2006).** Gene expression in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 7: 123–128
- **Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Yekeler H, Cobanoglu B, et al.** Investigation of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed and paraffin- embedded breast cancer tissues. *Med PrincPract*.2005; 14:268–271.
- **Keen J. C, Davidson N. E.** The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 2003, 97 (3 Suppl): 825-33
- **Kerbel R, Folkman J. (2002).** Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2: 727-39.
- **Krajinovic M, Richer C, Gorska-Flipot I, Gaboury L, Novakovic I, Labuda D, Sinnott D, Genomic, Sartelet H.** Atypical *Epstein-Barr* virus (*EBV*) latent protein expression in *EBV*-associated smooth muscle tumours ... 2001 Jun;10(2):78-88.

L

- **Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE.** Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res*. 1995;55:39–45.
- **Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al.** Initialisation séquentielle et analyse du génome humain. *La nature*.2001;409 : 860-921.Doi: 10.1086 / 172716.
- **Lefeu F.** Caractérisation de la charge et de l'expression du virus d'Epstein-Barr dans les cancers du sein. Modulation de l'expression de gènes cellulaires sous l'effet de

l'infection *in vitro* par l'EBV dans des cellules épithéliales mammaires, faculté de Sciences de la Vie et de la Terre, France, 2005, pp 1- 35.

- **Lespagnard L, Cochaux P, Larsimont D, Degeyter M, Velu T, et al.** Absence of Epstein-Barr virus in medullary carcinoma of the breast as demonstrated by immunophenotyping, in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Am J ClinPathol*.1995; 103:449–452. Logical Aspects. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 15, 224-228.
- **Luqmani YA, Shousha S.** Presence of Epstein-Barr virus in breast carcinoma. *Int J Oncol*.1995; 6:899–903.
- **Lwoff A.** The concept of virus. *J GenMicrobiol* 1957; 17: 239-53.

M

- **Mac grogan G, Soubeyran I, De mascarel I, Wafflart J, Bonichon F, Durand M, Avril A, Mauriac L, Trojani M, Coindre JM.** the immunohistochemical detection of progesterone receptors in breast invasive ductal carcinomas. A correlative study on 942 cases. *Appl immunohistochem* 2004 ; 4 : 219-27.
- **Macsween KF, Crawford DH.** Epstein - Barr virus recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003;3:131-140
- **Magin, C., Lower, R., and Lower, J.** (1999). cORF and R_cRE, the Rev/Rex and RRE/RxRE homologues of the human endogenous retrovirus family HTDV/HERV-K. *J. Virol.* 73, 9496–9507.
- **Malekpour AR, Mollaie H, Lashkarizadeh M, Fazlalipour M, Zeinali Nejad H.** Evaluation frequency of Merkel cell polyoma, Epstein-barr and mouse mammary tumor viruses in patients with breast cancer in Kerman, Southeast of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015 ; 16 : 7351-7.
- **Mant C, Hodgson S, Hobday R, D'Arrigo C, Cason J.** A viral aetiology for breast cancer: time to re-examine the postulate. *Intervirology.* 2004; 47:2–13.
- **Marrao G, Habib M, Paiva A, Bicout D, Falekers C, Fronco S, et al.** Epstein-Barr virus infection and clinical outcome in breast cancer patients correlate with immune cell TNF- α /IFN- γ response. *BMC Cancer* 2014 ; 14 : 1471-2407.
- **Mathieu MC, 2012.** Anatomie Pathologique des Cancers du sein
- **Mayer J et al** 'Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World primates.' *J Virol.* Mar. 1998;72(3):1870-5
- **Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Brandone JM, et al.** Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer.* 2011; 104:332–7.
- **Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Brandone JM, et al.** Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer.* 2011;104:332–7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **McCall SA, Lichy JH, Bijwaard KE, Aguilera NS, Chu WS, et al.** Epstein-Barr virus detection in ductal carcinoma of the breast. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93:148–150.
- **Medina D, 1996.** The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* .January 1996, Volume 1, Issue 1, pp 5–19
- **Medina D. 1976.** Preneoplastic Lesions in Murine Mammary Cancer.
- **Merlo, L. M., N. A. Shah, X. Li, P. L. Blount, T. L. Vaughan, B. J. Reid, and C. C. Maley.** 2010. A comprehensive survey of clonal diversity N measures in Barrett's esophagus as biomarkers of progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer prevention research* 3:1388 – 1397. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0108.metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 6:393-406. Review.
- **Moormann AM¹, Snider CJ, Chelimo K.** The company malaria keeps: how co-infection with Epstein-Barr virus leads to endemic Burkitt lymphoma. *Curr Opin Infect Dis.* 2011 Oct;24(5):435-41. doi: 10.1097/QCO.0b013e328349ac4f.

N

- **Naderimaghani S, Alipour S, Djalalinia S, et al** (2014). National and sub-national burden of breast cancer in Iran; 1990-2013. *Arch Iran Med*, 17, 794-9.
- **Netter, Franck.** Atlas d'anatomie. 4e edition. Issy-les-Moulineaux: Mason 2007. 548 p. ISBN 978-2-294-08042-5.
- **Neve RM, Lane HA, Hynes NE. (2001).** The role of overexpressed HER2 in transformation.

O

- **Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr.** Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jan; 24(1):193-209. doi: 10.1128/CMR.00044-10.
- **Ogembo J.G., Kannan L., Ghiran I., Nicholson-Weller A., Finberg R.W., Tsokos G.C., Fingerhuth J.D.** Human complement receptor type 1/CD35 is an Epstein - Barr virus receptor. *Cell Rep.* 2013;3:371–385
- **Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P. (2007).** Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol.* 63:125-49. Review.
- **Ono M, Kawakami M, Ushikubo H.** Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol.* 1987 Jun; 61(6):2059-62.

P

- **Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B** (2004) Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol*14: 453–471.
- **Piedade, D., and Azevedo-Pereira, J. M. (2016)** MicroRNAs, HIV and HCV: a complex relation towards pathology. *Rev. Med. Virol.*, doi: 10.1002/rmv.188.
- **Peng J, Wang T, Zhu H, Guo J, Li K, Yao Q, Lv Y, Zhang J, He C, Chen J, et al.** Multiplex PCR/mass spectrometry screening of biologicalcarcinogenic agents in humanmammarytumors. *J Clin Virol* 2014; 61:255-9; PMID: 25088618; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.010>
- **Perkins RS, Sahm K, Marando C, Dickson-Witmer D, Pahnke GR, et al.** Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast cancer primary biopsy specimens by real time PCR. *Breast Cancer Research*.2006; 8:R70.
- **Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752
- **Perreard L, Fan C, Quackenbush JF.** Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 8, 2006: R23.
- **Perrigoue JG, den Boon JA, Friedl A, Newton MA, Ahlquist P, Sugden B.** Lack of association between EBV and breast carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:809–14.
- **Perron, H., Lazarini, F., Ruprecht, K, Pechoux-Longin, c., Seilhean, D.,Sazdovitch, V., Creange, A., Battail-Poirot, N., Sibai, G., Santoro, L. et al.** (2005). Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiplesclerosislesions. *J Neurovirol*11, 23-33.
- **Polyak K.** *BiochimBiophysActa.* (2001). On the birth of breast cancer. 1552:1-13. Review.
- **Preciado MV, Chabay PA, De Matteo EN, Gonzalez P, Grinstein S, et al.** Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Argentina. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129:377–381.
- **Pugh CW, Ratcliffe PJ.** (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF

R

- **Rehab A, Shaimaa M.** Immunohistochemical detection of human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and human papillomavirus in invasive breast carcinoma in Egyptian women: a tissue microarray study. *J Solid Tumor* 2016 ; 2 : 1925-4076.
- **Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S.** Does the correlation between EBNA-1 and p63 expression in breast carcinomas provide a clue to tumorigenesis in Epstein-Barr virus-related breast malignancies? *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:89–95.
- **Richardson AK, Cox B, McCredie MR, Dite GS, Chang JH, et al.** Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and risk of breast cancer before age 40 years: a case-control study. *Br J Cancer.*2004; 90:2149–2152.
- **Rickinson A, Kieff E.** Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, Fifth. Vol. 2. 2 vols. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. pp. 2655–2700.
- **Rampanau Aurore.** contribution du virus d'epstein-barr au developpement de carcinomes mammaires, faculté de Sciences de la Vie et de la Terre, France, 2009, pp 1- 25.
- **Russo J, Mailo D, Hu YF, Balogh G, Sheriff F, Russo IH.** (2005). Breast differentiation and its implication in cancer prevention. *Clin Cancer Res* 11: 931s-6s.

S

- **SaadHasan MA, Dalya Salah MAS, Jwan AA, Shakir H. Mohammed A, Ahmed Abbas Abid-zwaid.**(2017). Nuclear Co-Localization of Expressional Products of BRCA-2 and Epstein Barr Virus-Latent Membrane Protein-1 Genes: An Immunohistochemical Study of Breast Cancers Tissues from a Group of Iraqi Female Patients. Vol.10 No.2, pp720-733.
- **Saglier, EC, Antoine** .Edition, 3.Publisher, Masson, 1996.ISBN, 2225853967, 9782225853968.Length, 125 pages. Export Citation.
- **Saha A and Erle S. Robertson** Epstein-Barr virus Associated B-cell lymphomas: Pathogenesis and Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res.* 2011 May 15; 17(10): 3056–3063.
- **Seifarth W et al.** 'Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles.'*J Virol.* Oct. 1998;72(10):8384-91
- **Serraino, D., Piselli, P. and Scognamiglio, P.** (2001) *Viral Infections and Cancer: Epidemio-*.
- **SESPM.** 32es Journées de la *SFSPM*, Strasbourg, novembre 2010. 32. *Épidémiologie du cancer du sein de la femme jeun.*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al** (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implication. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 :10869-10874
- **Sorlie T, Wang Y, Xiao et al** (2006). Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer : gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* 7 :127
- **Sueur Charlotte**. Identification et caractérisation des partenaires Cellulaires de zebra, facteur de transcription du virus epstein-BARR. Mise en évidence d'un complexe tripartite entre la protéine virale ZEBRA et les protéines cellulaires Ubinucléine et 14-3-3ε, faculté de pharmacie de Grenoble, France, 2011, pp 1- 29.
- **Sugimoto J, Matsuura N, Kinjo Y, Takasu N, Oda T, Jinno Y** 2001. Transcriptionally active HERV-K genes: Identification, isolation, and chromosomal mapping. *Genomics* 72: 137–144 system.. *Nat Med.* 9:677-84. Review.
- **Szakonyi G¹, Klein MG, Hannan JP, Young KA, Ma RZ, Asokan R, Holers VM, Chen XS**. Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Nov;13(11):996-1001. Epub 2006 Oct 29.

T

- **Tavassoéli F.A, Devilee P**. WHO. Pathology and genetics. Tumor of the breast and female genital organs. 2003
- **Thorley-Lawson DA¹, Gross A** : Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med.* 2004 Mar 25;350(13):1328-37.
- **Trabelsi A, Rammeh S, Stita W, Mokni M, Mourou A, et al**. [Detection of Epstein-Barr virus in breast cancers with lymphoid stroma]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2008;66:59–62.
- **Tristem M**. Identification et caractérisation de nouvelles familles de rétrovirus endogènes humains par dépistage phylogénétique de la base de données de projet de cartographie du génome humain. *J Virol.* 2000;74 : 3715-3730
- **Tsuchiya S**, Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases, *Critical Review in Oncology Hematology* (vol.44), 2002, pp.227-238
- **Tubiana M, Koscielny S**. [natural history of human cancer and prognostic factors. The example of breast cancer]. *Bull Cancer* 1987; 74:43-57.
- **Tubiana M, Koscielny S**. The natural history of breast cancer: Implications for a screening strategy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19:1117-1120.
- **Tugizov SM¹, Herrera R, Palefsky JM**, Epstein-Barr virus transcytosis through polarized oral epithelial cells. *J Virol.* 2013 Jul; 87(14):8179-94. doi: 10.1128/JVI.00443-13. Epub 2013 May 22.

V

- **Veisy A, Lotfinejad S, Salehi K, et al (2015).** Risk of breast cancer in relation to reproductive factors in North-West of Iran, 2013-2014. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 451-5.
- **Vincent M et Frederique Q.** Virus et cancers humains : des virus modèles aux nouvelles étiologies, université Pierre et Marie Curie, Paris, 2013, pp 73- 46.
- **Vincent M et Tristan P.** le virus epstein-barr : structure et cycle, biologique, Hopital Rothschild Service de virologie, 2011, pp 25-31.
- **Vrnovitz, H. B. and Murphy, W. H (1996).** Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin Microbiol Rev* 9, 72-99.

W

- **Wang D, Liebowitz D, Kieff E.** La forme tronquée de la protéine de la membrane d'infection latente du virus Epstein-Barr exprimée dans la replication du virus ne transforme pas les fibroblastes de rongeurs. *J Virol* 1988;62 : 2337 -46.
- **Wang D, Liebowitz D, Kieff E.** Une protéine de membrane EBV exprimée dans des lymphocytes immortalisés transforme des cellules de rongeurs établies. *Cell* 1985;43 : 831 -40.
- **Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Azerou R, Lu DW, Chen D-T, et al.** Detecting the expression of human endogenous retrovirus E envelope transcripts in human prostate adenocarcinoma. *Cancer* (2003) 98:187–9710.1002/cncr.11451
- **Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, Khazaeli MB, LoBuglio AF, Shaw DR, et al.** Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* (2001) 7:1553–60
- **Witt A, Hartmann B, Marton E, et al (2003).** The mouse mammary tumor virus-like env gene sequence is not detectable in breast cancer tissue of Austrian patients. *OncolRep*, 10 , 1025-9 .
- **Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, VousdenKH .** Absence of hpv 16 and 18 DNA in breast cancer. *BrJ Cancer* 1992;65:891 - 894. (www.santeallaitementmaternel.com).

Y

- **Yahia R, Zaoui C, Melouli H, Taibi F, Sahraoui T, Elkebir FZ.** (2017). Search for proteinebn-1 p79 anti ebv in serum of patients reachesany of breast cancer and from western algeria.P33-39
- **JM, Kim HM, Kim HS 2001.**Molecular cloning and phylogenetic analysis of the human endogenous retrovirus HERV-K long terminal repeat elements in various cancer cells. Mol Cells12: 137–141
- **Young LS¹, Rickinson AB :** Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer. 2004 Oct;4(10):757-68.
- **Young, L. S., and P. G. Murray.** 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene22:5108-5121
- **Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K,Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K.** HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in chinese and japanese populations. Anti cancer Res 1999;19:5057-5061.

Z

- **Zekri AR, Bahnassy AA, Mohamed WS, El-Kassem FA, El-Khalidi SJ, Hafez MM,** et al. Epstein-Barr virus and breast cancer: Epidemiological and molecular study on Egyptian and Iraqi women. J Egypt NatlCanc Inst. 2012; 24:123–31.
- **Zaoui C, Bekkouche Z, BrahmiSeddiki K, Yahia R, Terki K, Merad B, El Kebir FZ.** 2010 Cancer du sein de grade SBR III à Oran: quel pronostic? SFSPM

Annexe 1

Consentement éclairé

Je soussigné (e)certifie

Avoir reçu des informations complètes sur les objectifs et les modalités de l'étude coopérative auxquels le Docteur.....me propose de participer

J'ai eu la possibilité de poser les questions me semblant nécessaires sur le traitement diététique.

Je suis informé(e) que ma participation à cette étude volontaire et que je peux refuser ou cesser d'y participer à quelque moment que ce soit, sans que cela n'entraîne de conséquences vis-à-vis de la part du médecin.

J'ai été assuré que les données recueillies me concernant directement resteront strictement confidentielles et protégées et que mon nom ne sera pas mentionné dans les données informatisées.

En conséquence, j'accepte de participer à ce projet.

Date : Signature du participant

Je soussigné(e), certifie avoir

Présenté les objectifs et les modalités du présent essai en un langage approprié et terme compréhensible.

Date :

Annexe 2

Fiche technique

Dossier N° équipe : médecin traitant :

Initiales : Age : G : P :

Antécédents personnelles :

Antécédents familiaux :

I.Examen Clinique et Radiologique:Coté : Sein droit sein gauche Localisation : QSE QIE QSI QII UQS UQE UQINT UQINF Mamelon Central Prolongement axillaire Sillon sous-mammaire précisé Taille clinique : mmLésion infraclinique : masse calcifications autre Ecoulement lésion cutanée autre Taille radiologique : mm non précisée nbre de foyer : uni bi multiACR : 1 2 3 4 5 non précisé Adénopathie axillaire : oui non Métastase : oui Classification TNM : TN M

V. Examen microscopique (histologique) :Foyer : unique multiples non évaluable Taille (pT) : mm limite d'exérèse mmType : Carcinome Canalaire Lobulaire in situ infiltrant Autre

Différenciation glandulaire :	1	2	3	} SBR I II III
Atypie nucléaire:	1	2	3	
Mitoses (activité mitotique) :	1	2	3	

Ganglion sentinelle : Nbr envahis Nbr indemne Curage axillaire complémentaire : Nbre de ganglions repérés de ganglions positifs Rupture capsulaire : non observée observée Nbre **Classification pTNM :** pT pN pM **VI. Examen immunohistochimique :****Oncoprotéine HER 2 :** positif négatif **Indice de prolifération Ki 67:** ≤14% >14%

Etude sérologique :

EBNA-1 + EBNA-1 -- LMP-1 + LMP-1 -----

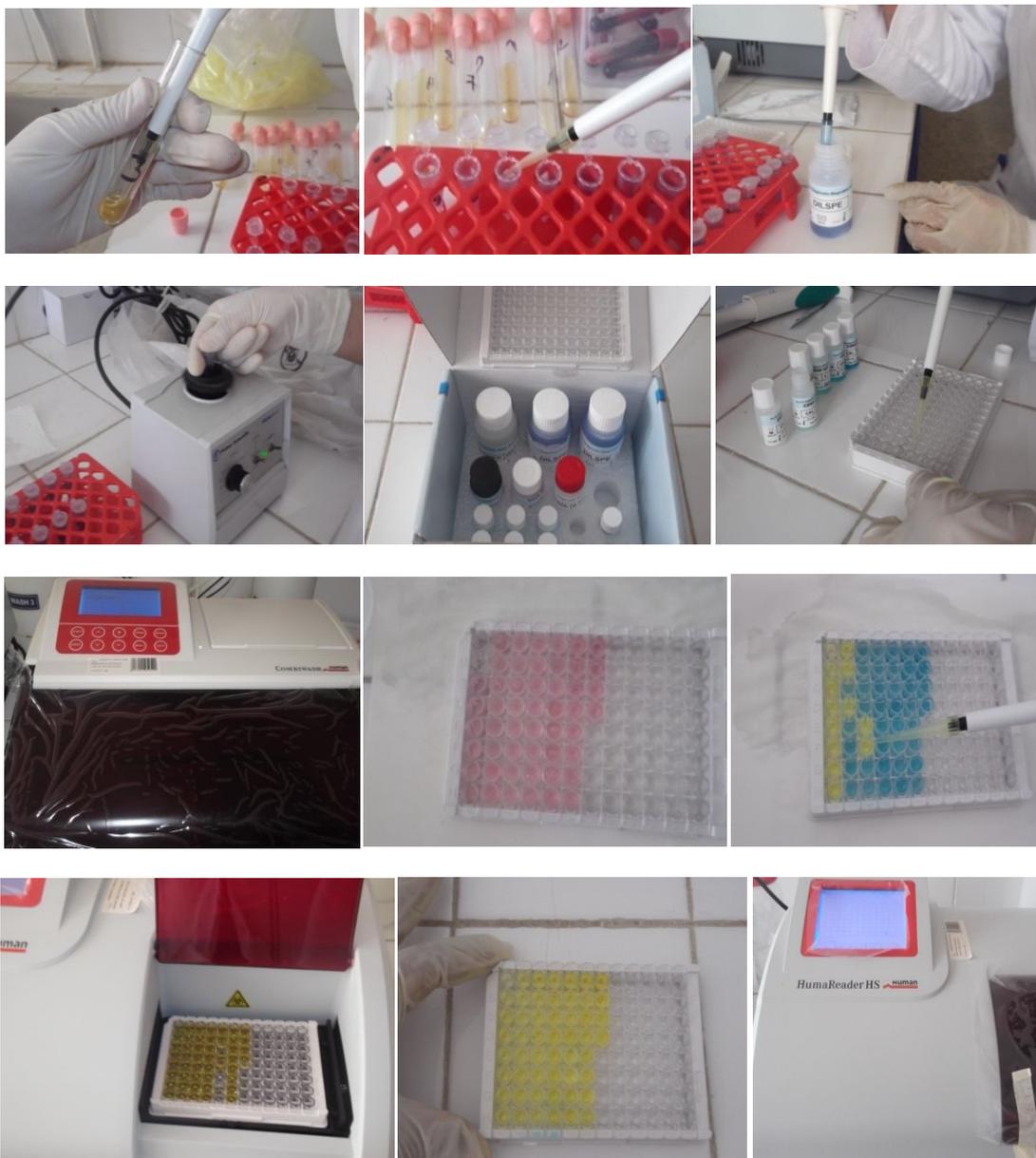
L'étude immunohistochimique :

EBNA-1 + EBNA-1 ---- LMP-1 + LMP-1-----

Prélèvement sanguin effectué:	Oui <input type="checkbox"/>	Non <input type="checkbox"/>
Coupe au niveau de la tumeur:	EBER+ <input type="checkbox"/>	EBER- <input type="checkbox"/>
Coupe en dehors de la tumeur:	EBER+ <input type="checkbox"/>	EBER- <input type="checkbox"/>

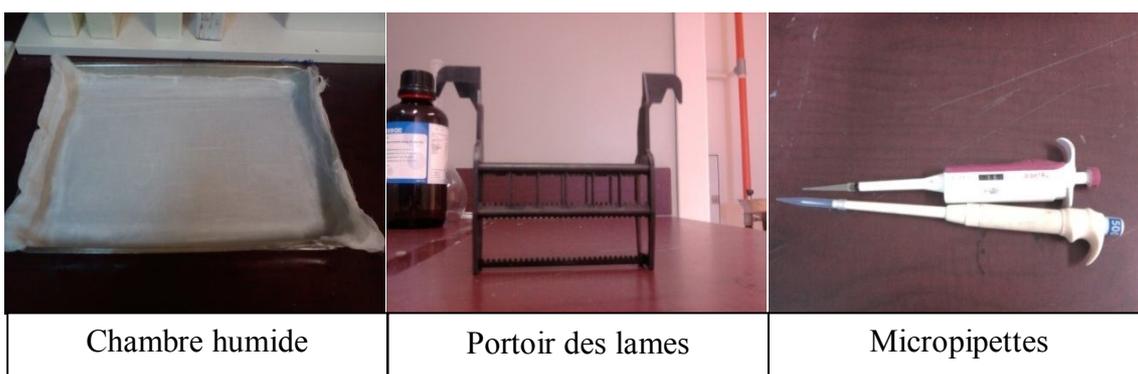
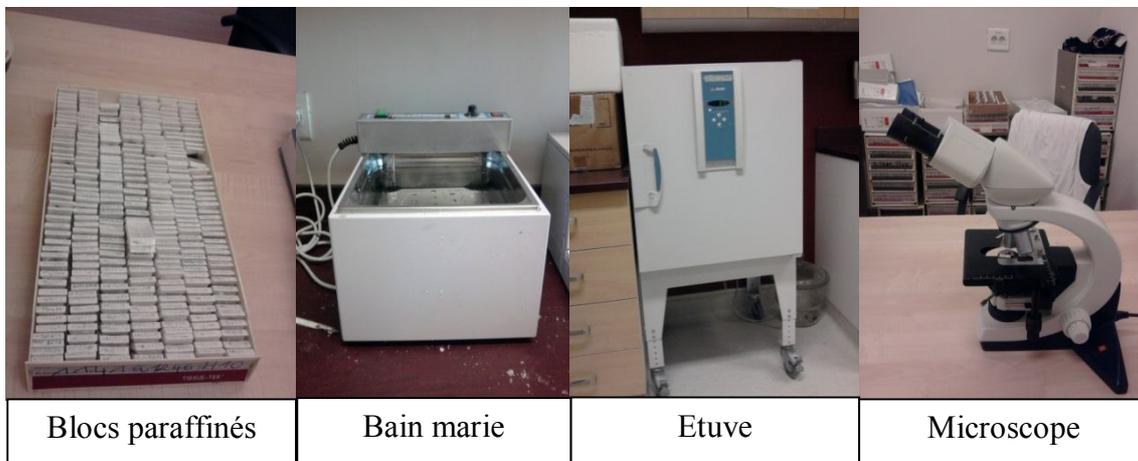
Annexe 3

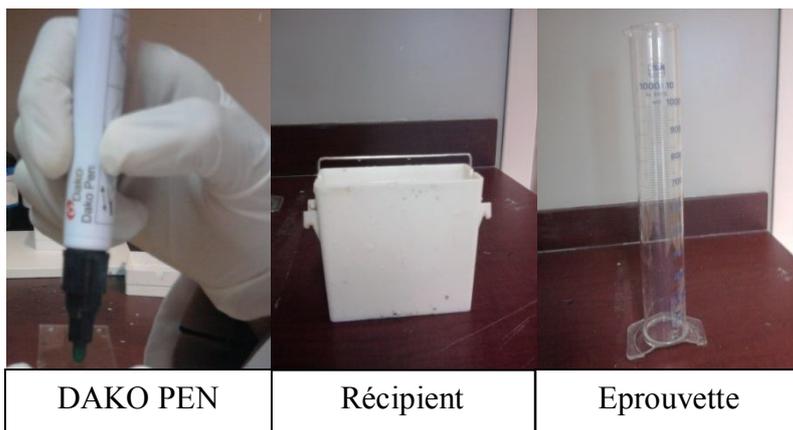
- la technique Elisa



Annexes 4

Matériel utilisé pour l'hybridation in situ





Les Produits :



Coffret de réactifs (K5201)
1 : PROTEINASE K (×10)
2: NEGATIVE CONTROL PNA
PROBE/FITC
3: POSITIVE CONTROL PNA
PROBE/FITC
4: STRINGENT WASH SOLUTION



EPSTEIN-BARR Virus (EBER) PNA
Probe/Fluorescein (Y5200)



Xylène (M= 106.17)
Ethanol (M= 46,07)



TBS (Tris Buffer Saline)

Annexe 5

Les étapes de la technique d'hybridation in situ :

1. Des coupes de 5 μm sont réalisées à l'aide d'un microtome.



2. Etalement des coupes avec de l'eau distillée sur les lames



3. Réhydratation des coupes.



4. Limitation des coupes avec le DAKO-PEN



5. Dépôt du Protéinase K sur chaque lame placée dans la chambre humide.



6. Dépôt de la sonde PNA sur chaque lame



7. Lavage rigoureux des lames



8. Incubation des lames dans un bain marie à 55°C pendant 25 mn



9. Elimination de l'anticorps en tapotant.



10. Contre coloration des lames à l'hématoxyline.

