

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Laboratoire de Biotechnologie végétale et Ethnobotanique

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée par
BOUCHEMAL Amina
Thème

**INVESTIGATION SUR LE RÔLE DU CYTOMÉGALOVIRUS
DANS LA PATHOLOGIE CANCÉREUSE**

Soutenue le : 13/01/2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mme. Ait-Ali Djida	MCA	Univ. De Bejaia	Président
Mme. Bedjou Fatiha	Professeur	Univ. De Bejaia	Rapporteur
Mr. Ghidouche Abderrezak	MCA	Univ. De Bejaia	Co-Rapporteur
Mr. Delmi Abdelhak	Professeur	Univ. De Constantine3	Examineur
Mme. Ouhida Soraya	Professeur	Univ. De Sétif 1	Examineur

Année Universitaire : 2023/2024

*« On ne va jamais aussi loin
que lorsqu'on ne sait pas où l'on
va. »*

CHRISTOPHE COLOMB

DÉDICACES

Car la famille c'est là où la vie commence et où l'amour ne finit jamais.

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents, ma sœur chérie et mes frères adorés, ma belle-sœur et mon beau-frère, mes adorables neveux et nièces. Pour leur amour, leur soutien inébranlable et leur encouragement constant tout au long de ce voyage. Vous êtes ma source d'inspiration et de force.

À toute ma famille et ma belle-famille. Pour leurs prières et leurs encouragements.

À mes précieux amis et collègues qui ont partagé cette aventure avec moi et m'ont apporté des moments de détente et de rire lorsque j'en avais le plus besoin.

À tous ceux qui ont perdu la vie en se battant contre ce fléau et aux guerriers qui se battent chaque jour contre une maladie chronique.

À toi mon Shams, ce joyau de Rumi t'es dédié : « Sans l'Amour le monde serait inanimé. Chaque atome est épris de cette perfection et se hâte vers elle. À chaque instant retentit de tous côtés l'appel de l'Amour ».

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup de gratitude que je remercie ma directrice de thèse, **Professeur Bedjou Fatiha**. Pour son engagement inlassable, son expertise inestimable, et sa direction éclairée tout au long de ce projet de recherche. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour votre accueil, votre disponibilité et votre soutien indéfectible dès mon arrivée au sein de l'Université de Bejaia. Merci pour tout.

Je remercie également mon co-directeur de thèse **Dr Ghidouche A**, vos contributions ont été essentielles à la réussite de ce travail.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury :

Dr Ait-Ali Djida, maître de conférences à l'Université Abderrahmane Mira Bejaia, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Merci également pour toutes vos orientations et vos précieux conseils durant mon parcours doctoral. Votre bienveillance et votre sympathie ont ponctuées ces années de thèse.

Pr Delmi A, professeur à l'Université de Constantine 3 Salah Boubnider et médecin chef du service de chirurgie générale B au CHU de Constantine,

Pr Ouhida S, professeur à l'Université de Sétif 1 Farhat Abbas et médecin chef du service d'anatomie pathologique au CHU de Sétif.

Merci pour avoir accepté de consacrer leur précieux temps et leur expertise à l'évaluation de ce travail de recherche. Vos commentaires constructifs et vos précieuses suggestions ont grandement enrichi cette thèse.

Mes vifs remerciements vont au **Pr Maes P** et toute son équipe de l'institut Rega, mon stage au sein de leur laboratoire était un privilège. Un immense merci à vous Piet et à Joan. Cette expérience m'a transcendé tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Merci à celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

L'évolution récente de la recherche en oncologie a été marquée par un intérêt grandissant pour les éventuelles associations entre les infections virales et le développement des cancers. Parmi les virus étudiés dans ce contexte, on retrouve le Cytomégalovirus Humain (HCMV), un herpesvirus très répandu dans la population mondiale. Principalement connu pour les graves complications qu'il induit chez les patients immunodéprimés et les femmes enceintes, il suscite actuellement un vif intérêt pour sa potentielle association avec le développement de malignités ainsi que son éventuelle utilisation dans le cadre de la thérapie ciblée. Durant cette recherche, nous nous sommes fixés pour objectif d'explorer en profondeur la présence du HCMV au sein de biopsies tumorales provenant d'une cohorte de patients atteints de tumeurs cérébrales ou colorectales dont les caractéristiques cliniques et moléculaires ont été définies et analysées.

Cette étude s'est appuyée sur une approche moléculaire basée sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR), visant à détecter le génome viral et à évaluer son potentiel rôle dans le développement tumoral. En dépit de la sensibilité des techniques que nous avons utilisées, la totalité des échantillons que nous avons testés étaient négatifs pour l'infection à HCMV. Bien que nos résultats ne plaident pas en faveur d'un rôle majeur pour ce virus dans la pathogenèse des cancers étudiés, ils soulignent l'importance d'une méthodologie rigoureuse et consensuelle dans l'exploration des relations complexes qui sous-tendent l'infection par le HCMV et le développement de pathologies cancéreuses.

Mots clés

Cytomégalovirus, tumeurs cérébrales, tumeurs colorectales, oncogenèse, Herpesvirus, biologie moléculaire, biopsies tumorales, infection.

Abstract

Recent developments in oncology research have been marked by a growing interest in the possible association between viral infections and the development of cancers. Among the viruses studied in this context, we find Human Cytomegalovirus (HCMV) a widespread herpesvirus that is mainly known for the serious complications it induces in immunocompromised patients and pregnant women. It is currently arousing a huge interest for its potential association with the development of malignancies as well as its possible use in the context of targeted therapy. During this research we set the objective of exploring in depth the presence of HCMV in tumor biopsies from a cohort of patients with brain or colorectal tumors whose clinical and molecular characteristics have been defined and analyzed. This study relied on a molecular approach based on the polymerase chain reaction (PCR), aimed at detecting the viral genome and evaluating its potential role in tumor development. Despite the sensitivity of the techniques we used, the totality of the samples we tested were negative for HCMV infection.

Our results do not argue in favor of a major role for this virus in the pathogenesis of the cancers studied. However, our findings highlight the importance of a rigorous and consensual methodology in the exploration of the complex relationships underlying the infection by HCMV and the development of malignancies.

Keywords

Cytomegalovirus, brain tumors, colorectal tumors, oncogenesis, Herpesvirus, molecular biology, tumor biopsies, infection.

ملخص

اتسمت التطورات الأخيرة في أبحاث الأورام بالاهتمام المتزايد بالارتباطات المحتملة بين الالتهابات الفيروسية وتطور السرطان. ومن بين الفيروسات التي تمت دراستها في هذا السياق، نجد الفيروس المضخم للخلايا البشرية، فيروس واسع الانتشار بين سكان العالم، ينتمي إلى عائلة الهربس. هو معروف بشكل رئيسي بالمضاعفات الخطيرة التي يسببها لدى المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة والنساء الحوامل، لكنه يثير حالياً اهتماماً كبيراً لارتباطه المحتمل بتطور الأورام الخبيثة، إضافة إلى إمكانية استخدامه في سياق العلاج الموجه.

خلال هذا البحث، وضعنا كهدف الاستكشاف المتعمق لوجود الفيروس في خزعات الورم لمجموعة من المرضى الذين يعانون من أورام المخ أو القولون والمستقيم الذين تم تحديد وتحليل خصائصهم السريرية والجزيئية. اعتمدت هذه الدراسة على المنهج الجزيئي المعتمد على تفاعل البوليميراز المتسلسل، بهدف الكشف عن الجينوم الفيروسي وتقييم دوره المحتمل في تطور الورم. وعلى الرغم من حساسية التقنيات التي استخدمناها، فإن جل العينات التي اختبارناها كانت سلبية بالنسبة لعدوى الفيروس المدروس. على الرغم من أن نتائجنا لا تؤيد وجود دور رئيسي لهذا الفيروس في ظهور السرطانات التي تمت دراستها، إلا أنها تسلط الضوء على أهمية اتباع منهجية صارمة ومتفق عليها في استكشاف العلاقات المعقدة الكامنة وراء العدوى بالفيروس وتطور الأمراض السرطانية.

الكلمات المفتاحية

الفيروس المضخم للخلايا، أورام الدماغ، أورام القولون والمستقيم تكوين الأورام، فيروس الهربس، البيولوجيا الجزيئية، خزعات الورم، العدوى.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie des virions herpétiques.	4
Figure 2 : Structure de la particule virale du HCMV.	7
Figure 3 : Structure du génome.	9
Figure 4 : Cycle répliatif du HCMV.	12
Figure 5 : Carte de la prévalence mondiale du HCMV chez les adultes.	14
Figure 6 : Maladies à HCMV les plus fréquentes.	17
Figure 7 : Modèle simplifié illustrant l'interaction entre les CPA et le HCMV	20
Figure 8 : HCMV et les caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses.	25
Figure 9 : Mécanisme de l'oncomodulation par le HCMV	28
Figure 10 : Mécanismes oncolytique par le HCMV.	30
Figure 11 : Incidence et mortalité dans l'Algérie vs le monde	33
Figure 12 : Mode d'action des agents initiateurs et promoteur des tumeurs	37
Figure 13 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses.	39
Figure 14 : Origine génétique de la transformation maligne.	42
Figure 15 : Mécanismes de la progression tumorale par les oncovirus	44
Figure 16 : Interactions tumeurs et système immunitaire	45
Figure 17 : Infection virale APOBEC et cancer	48
Figure 18 : Carte de l'incidence mondiale des cancers colorectaux (GLOBOCAN 2020).	50

Figure 19 : Stades histologiques du développement du cancer colorectal.....	52
Figure 20 : Cancers colorectaux héréditaires.	53
Figure 21 : Voies de signalisations altérées dans le cancer colorectal.....	54
Figure 22 : Sous types moléculaires des glioblastomes.....	60
Figure 23 : Caractérisation de l'infiltrat immunitaire dans un gliome	62
Figure 24 : Les principales stratégies de l'immunothérapie dans le traitement des gliomes	63
Figure 25 : kit d'extraction d'acides nucléiques.	69
Figure 26 : Processus général d'extraction d'ADN via des colonnes.....	71
Figure 27 : Photographie du nanophotomètre (Implen N 60).....	71
Figure 28 : Mesure de l'absorbance de l'ADN.....	72
Figure 29 : Électrophorèse sur gel d'agarose (agarose à 1%) de la PCR	73
Figure 30 : Principe de la PCR Nichée Panherpesvirus	74
Figure 31 : Sexe ratio de la population d'étude.....	77
Figure 32 : Répartition des deux sexes selon la tranche d'âge.	78
Figure 33 : Moyennes d'âge selon la localisation chez les deux sexes.	78
Figure 34 : Localisation des tumeurs coliques selon la tranche d'âge.	79
Figure 35 : Les différents sous-types histologiques du cancer colorectal.....	79
Figure 36 : Répartition des grades des CCR selon les tranches d'âge.....	80
Figure 37 : Test de sensibilité de la PCR nichée.	81
Figure 38 : PCR nichée pour détecter les herpesvirus dans nos échantillons.	82
Figure 39 : PCRs pour détecter le cytomégalo virus humain (HCMV).	82
Figure 40 : Micrographies de Tumeurs cérébrales.....	96
Figure 41 : Activités de la protéine virale IE1.....	97
Figure 42 : Membres de la famille APOBEC.	99
Figure 43 : Expression de l'enzyme A3A dans différents cancers humains.	99
Figure 44 : Etapes de la PCR en temps réel.....	101
Figure 45 : Cinétique de la PCR en temps réel.	101

Figure 46 : PCRs spécifiques pour la détection du HCMV.....	104
Figure 47 : PCR nichée pour détecter les herpesvirus dans nos échantillons.....	105
Figure 48 : Expression relative de L'A3A dans les TC et les contrôles.....	105
Figure 49 : Courbe de l'expression de L'A3A dans les différents échantillons testés.....	106
Figure 50 : Comparaison de l'expression relative de L'A3A dans les gliomes et les méningiomes.....	107
Figure 51 : Comparaison de l'expression relative de A3A entre les TC et les CCR.....	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les herpesvirus humains.....	5
Tableau 2 : Pathologies associées aux infections par les herpesvirus	6
Tableau 3 : Principales protéines virales aux propriétés oncogéniques	22
Tableau 4 : Statistiques du cancer en Algérie.	34
Tableau 5 : Classification des facteurs de risque selon la cancérogénicité.	36
Tableau 6 : Les virus oncogènes et les principaux cancers associés.	43
Tableau 7 : Incidence mortalité et prévalence des tumeurs cérébrales en Algérie.....	58
Tableau 8 : Métadonnées cliniques des patients inclus dans l'étude moléculaire	68
Tableau 9 : Liste des amorces dégénérées et leurs caractéristiques.....	75
Tableau 10 : Amorces utilisés pour l'amplification du HCMV	76
Tableau 11 : Méta-analyse sur les études impliquant les HHV et le développement du CCR. ...	93
Tableau 12 : Description des conditions de la PCR nichée	98
Tableau 13 : Programme de la RT-PCR.....	102
Tableau 14 : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide desoxy ribonucléique

AKT: alpha serine/threonine-protein kinase

APOBEC: Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like

ARN : acide ribonucléique

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

CCR : cancer colorectal

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

GCV: ganciclovir

GLOBOCAN: global observatory cancer

HCMV: Human Cytomegalovirus

HHV: Human Herpesvirus

HSV1, HSV2: herpes simplex 1

ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1

IE: immediate early

IRL: long internal repeat

IRS: short internal repeat).

JAK : Janus kinases

MCP : Protéine majeure de la Capside

mCP : Protéine mineure de la Capside

MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase

NF- κ B: nuclear factor-Kappa B

NK : Natural killer

PCR : réaction en chaine par polymérisation

PDGFRA : récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

pp65: phosphoprotein 65

SCP : Smallest Protéine de la Capside

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

TGF- β : facteur de croissance transformant-beta

TLR2: Toll-like receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TRL: terminal short repeat

TRL: terminal long repeat

UL : Unique Long

US : Unique Short

VGCV : valganciclovir

VZV : Varicella-Zoster Virus

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACES	II
REMERCIEMENTS.....	III
Résumé	IV
Abstract.....	V
ملخص	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
TABLE DES MATIÈRES	XI
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Cytomégalovirus humain (HCMV).....	3
1. Généralités sur le HCMV	4
1.1 La famille des Herpesviridae.....	4
Structure générale et propriétés biologiques	4
Taxonomie virale.....	5
1.2 Découverte du HCMV	6
1.3 Structure de la particule virale.....	7
1.3.1. Génome	8
1.3.2. Capside	8
1.3.3. Tégument.....	8
1.3.4. Enveloppe.....	9
1.4 Cycle virale répliatif et latence.....	10
1.4.1 Cycle répliatif du HCMV.....	10
1.4.2 Latence et réactivation	12
1.5 Épidémiologie et transmission.....	13
1.5.1. Prévalence.....	13
1.5.2. Modes de transmissions du cytomégalovirus	13
1.6 Diagnostic et traitement.....	14
1.6.1. Moyens de détection	14
1.6.2. Traitement et prévention.....	15
2. Physio-pathologies de l'infection à HCMV	15
2.1 Manifestations cliniques de l'infection	16

2.2 Immunobiologie du HCMV et mécanismes d'échappement	17
2.2.1 Système immunitaire anti HCMV chez l'IC	17
2.2.2 Mécanismes d'échappement du HCMV	19
3. HCMV ET CANCERS	20
3.1 Rôle du HCMV dans l'initiation et/ou la progression tumorale.....	21
3.1.1 Détection du HCMV dans les pathologies malignes.....	21
3.1.2 Bases moléculaires de la transformation et la progression tumorale par le HCMV.....	22
3.1.3 HCMV ET HALLMARKS	24
Maintien des signaux prolifératifs et immortalisation.....	24
Inhibition de l'apoptose et action pro-survie cellulaire.....	25
Instabilité génomique et modifications épigénétique	26
Néo-angiogenèse.....	26
Invasion et métastases	26
Inflammation	27
Dérégulation du métabolisme cellulaire.....	27
3.1.4 Rôle oncomodulateur.....	28
3.2 Rôle oncolytique	29
Chapitre 2 : Le Cancer.....	31
1. Généralités sur le cancer	32
1.1. Définition	32
1.2.1. Incidence.....	32
1.2.2. Mortalité.....	33
1.2.3. Facteurs de risque.....	34
Classification selon le type.....	35
Classification selon la cancérogénicité :	36
Classification selon l'action	36
1.3. Aspects moléculaires du développement tumoral	37
1.3.1. Processus générale de la cancérisation.....	37
1.3.2. Caractéristiques des cellules cancéreuses « Hallmarks ».....	38
Indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs.....	38
Insensibilité aux inhibiteurs de la croissance cellulaire.....	38
Résistance à la mort cellulaire	38
Pouvoir répliatif illimité	39
Induction de l'angiogenèse.....	39
Invasion et métastases	39

Dérégulation du métabolisme cellulaire.....	40
Echappement au système immunitaire.....	40
Instabilité génomique	40
Inflammation	41
1.3.3. Bases moléculaires et génétiques de la cancérogenèse.....	41
Les oncogènes	41
Gènes suppresseurs de tumeur (GST).....	41
Gènes de réparation de l'ADN.....	42
1.3.4. Cancérogenèse viro-induite	42
1.4. Immunobiologie du cancer	45
1.4.1. Inflammation et progression tumoral.....	46
1.4.2. APOBEC et hétérogénéité tumorale	47
2. Cancers Colorectaux (CCR)	49
2.1. Définition	49
2.2. Epidémiologie	49
2.2.1. Incidence et mortalité.....	50
2.2.2. Facteurs de risque et formes héréditaires	51
Facteurs de risque	51
Formes héréditaires :.....	51
2.3. Carcinogenèse des CCR.....	51
2.3.1. Histologie Moléculaire des CCR	52
2.3.2. Voies de signalisations altérées	54
2.4. Traitement.....	55
3. Tumeurs cérébrales	55
3.1. Définition	55
3.2. Epidémiologie	56
3.2.1. Incidence et mortalité.....	56
3.2.2. Facteurs de risque.....	56
3.3 Classification histo-moléculaire des TC	58
3.4 Aspects moléculaires de la neuro-oncogenèse	59
3.4.1 Altérations génétiques et épigénétique	60
3.4.2 Marqueurs pronostiques et prédictifs	61
3.5 Traitement	62

Chapitre 3 : HCMV ET CCR.....	64
1. Objectif de l'étude.....	65
1.1. Étude épidémiologique descriptive	66
1.1.1. Objectif	66
1.1.2. Méthodologie	66
1.1.3. Description de la population d'étude.....	66
1.2. Étude moléculaire.....	66
1.2.1. Échantillons cliniques	66
1.2.2. Méthodes	67
Extraction des acides nucléiques.....	69
1.2.3. Matériels et solutions utilisés :.....	69
Amplification des gènes d'intérêt.....	73
2. Résultats.....	77
2.1. Étude épidémiologique.....	77
2.1.1. Répartition selon l'âge et le sexe	77
2.1.2. Répartition selon la localisation	77
2.1.3. Répartition selon le type histologique et le stade	78
2.1.4. Comorbidités.....	80
2.2. Analyse moléculaire.....	80
3. Discussion.....	83
3.1. Évaluation des caractéristiques épidémiologiques :.....	83
3.2. Investigation sur l'implication des herpesvirus dans le développement des CCR :.....	86
Chapitre 4 : HCMV et TC.....	94
1. Objectif de l'étude.....	95
1.1. Étude de la prévalence du HCMV dans les Tumeurs cérébrales	96
1.1.1. Échantillons cliniques :	96
1.1.2. Méthodes	97
Évaluation quantitative et qualitative des Acides nucléiques :.....	97
PCR Nichée :	97
1.2. Évaluation du profil d'expression de l'APOBEC.....	98
1.2.1. Choix de la cible enzymatique.....	98
1.2.2. Échantillons testés	99
1.2.3. Méthodes :	100
Isolation des ARNs totaux :	100
Réalisation de la RT-PCR :	100

Principe :.....	100
Description générale du protocole :.....	102
Traitement et analyse des données :.....	103
2. Résultats.....	103
2.1. Prévalence du HCMV dans les TC.....	103
2.2. Profil de l'expression de L'A3A :.....	105
3. Discussion.....	108
3.1. HCMV et tumeurs cérébrales :.....	108
3.2. Évaluation du rôle du HCMV dans la pathologie cancéreuse :.....	111
3.3. Expression des APOBEC dans la pathologie cancéreuse :.....	112
CONCLUSION	115
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
ANNEXES	134

INTRODUCTION

Introduction

Le cancer représente l'une des pathologies les plus complexes affectant la santé humaine. En forte progression dans le monde, il représente l'une des principales causes de mortalité à l'échelle mondiale. En effet, l'organisation mondiale de la santé OMS a enregistré plus de 19 millions de cas et près de 10 millions de décès liés au cancer en 2020. Ces alarmantes statistiques inscrivent ainsi les pathologies cancéreuses au cœur des priorités de la recherche médicale contemporaine (GLOBOCAN2020).

La recherche fondamentale en oncologie se concentre principalement sur l'élucidation des mécanismes complexes régissant l'interaction entre la prédisposition génétique, les facteurs environnementaux et leurs processus cellulaires sous-jacents. Ces connaissances plus approfondies permettront d'identifier les dysfonctionnements qui sont à l'origine de la transformation néoplasique et de mettre au point des thérapies ciblées plus efficaces et moins invasives que les thérapies conventionnelles actuelles [1].

Parmi les différents facteurs étudiés pour leurs rôles dans le développement et la progression du cancer, les virus apparaissent comme des contributeurs importants, responsables d'approximativement 18% des cancers humains. Les infections avec ces virus oncogènes favorisent l'apparition des tumeurs selon des mécanismes divers faisant intervenir des facteurs endogènes et exogènes qui font l'objet de nombreuses études à l'intersection entre la virologie et l'oncologie [2]. L'un des virus qui suscite actuellement une attention considérable en raison de son potentiel rôle dans l'oncogenèse est le Cytomégalo virus humain ou HCMV [3]. Ce membre de la famille des Herpesviridae, est un agent pathogène répandu, pouvant établir des infections chroniques chez l'hôte infecté. En outre, il serait doté de propriétés virales lui permettant non seulement d'échapper à la surveillance immunitaire mais aussi d'altérer plusieurs voies cellulaires impliquées dans l'initiation et ou la progression tumorale. Toutefois, le HCMV n'est pas considéré comme un virus oncogène et sa probable association avec le développement tumoral fait toujours débat au sein de la communauté scientifique [4–6].

Une compréhension plus fine des intrications complexes entre les infections virales, notamment l'infection par le HCMV, et la progression des tumeurs malignes pourrait éventuellement conduire à l'élaboration de vaccins thérapeutiques visant à améliorer le pronostic des patients. De plus, elle pourrait faciliter la mise au point de vaccins préventifs pour contrer le développement de ces cancers viro-induits [7]. Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse vise à explorer de manière approfondie la potentielle association entre

l'infection à cytomégalovirus et la pathogenèse du cancer à travers l'étude de deux pathologies malignes ; à savoir, le cancer colorectal et les tumeurs cérébrales.

Ce manuscrit de thèse est structuré en deux principales parties. La première est consacrée à une revue approfondie de la littérature, elle comporte deux chapitres ; dans le premier nous détaillerons les connaissances actuelles sur le HCMV et sa physiopathologie, dans le second nous définirons la pathologie cancéreuse puis nous retracerons l'histoire naturelle des cancers étudiés et leurs principales caractéristiques.

Dans la deuxième partie scindée en deux chapitres, nous décrirons la méthodologie que nous avons adoptée, puis nous présenterons les résultats de nos investigations que nous analyserons à la lumière des connaissances actuelles. Enfin nous conclurons ce travail en présentant les différentes perspectives de recherche liée à cette thématique.

CHAPITRE 1 : CYTOMÉGALOVIRUS HUMAIN (*HCMV*)

1. Généralités sur le HCMV

Le Cytomégalo*virus* (CMV) est un herpes*virus* appartenant à la sous-famille des bêta-herpesvirinae. Il est retrouvé chez de nombreuses espèces incluant l'homme, les primates non-humains et les rongeurs. Les virus infectant ces différents organismes ont des gènes en commun mais comportent aussi des gènes qui sont spécifiques de l'hôte infecté [8]. Nous nous intéresserons dans ce travail uniquement à l'infection par le cytomégalo*virus* humain (HCMV) ou Human Herpes*virus* 5 (HHV-5).

1.1 La famille des Herpesviridae

Les Herpes*virus* sont une large famille de virus à ADN (acide désoxyribonucléique) doubles brins. Plus de 150 virus individuels ont été décrits. Très répandues, ils ont été identifiés à partir d'un large spectre d'espèces hôtes de vertébrés et d'invertébrés. Cette large distribution des herpes*virus*, associée à un taux d'infection élevé mais généralement asymptomatique chez l'hôte naturel ainsi que leur capacité à induire des infections latentes suggèrent une coévolution et une adaptation pendant plusieurs millions d'années avec leurs hôtes [9].

Structure générale et propriétés biologiques

Le virion des herpes*virus* mesure entre 150 et 200 nm de diamètre, il contient un ADN linéaire double brins empaqueté dans une capsidie de structure icosaédrique allant de 115 à 130 nm de diamètre. La capsidie est entourée par une couche protéique appelée le Tégument. Ce dernier est enveloppé par une bicouche lipidique provenant des organismes hôtes et comprenant des glycoprotéines virales. Cette dernière est mise en cause dans leur vulnérabilité vis-à-vis des pH acides, la dessiccation, les détergents et les solvants [9] (figure 1).

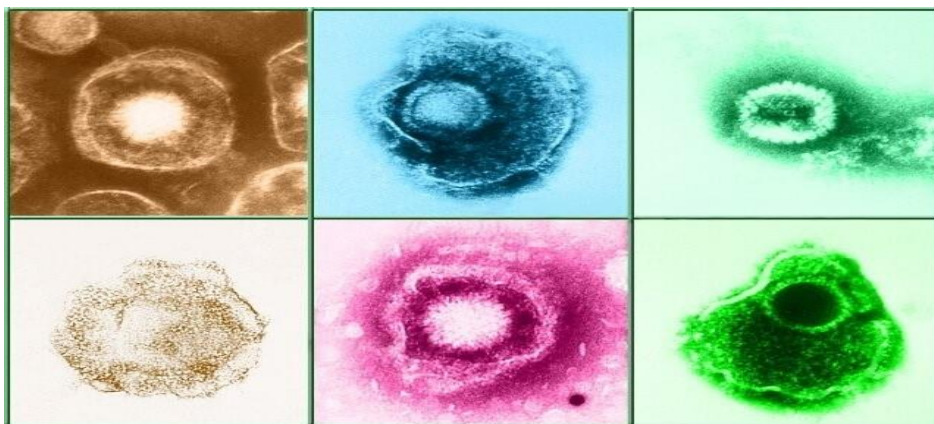


Figure 1 : Morphologie des virions herpétiques[8].

Les photographies par microscope montrent plusieurs virions de différents virus de l'herpès, illustrant l'aspect "œuf au plat" de la capsidie icosaédrique entourée par l'enveloppe.

La caractéristique principale des tous les Herpesviridae est leur capacité à établir une infection latente à l'intérieur de tissus spécifiques conduisant à une infection persistante. Ceci est notamment dû aux différents mécanismes d'évasion au système immunitaire de l'hôte.

Taxonomie virale

La famille *Herpesviridae*, appartenant à l'ordre Herpesvirale et comprenant les virus infectant les humains est subdivisée selon des critères biologiques et génétiques en 3 sous-familles : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*.

Il existe neuf virus pouvant infecter l'homme : Herpès Simplex virus types 1 et 2 (HSV-1 et 2), Varicelle-Zona virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), Cytomégalo*virus* (CMV), Herpesvirus 6 humain (HHV-6, variants A et B), Herpesvirus 7 humain (HHV-7) et le virus herpétique humain associé au sarcome de Kaposi (KSHV) [10] (tableau 1).

Tableau 1 : Les herpesvirus humains. Le tableau indique les différents herpesvirus pouvant infecter l'Homme ainsi que leurs principales caractéristiques [10].

<i>Sous famille</i>	<i>Espèce</i>	<i>Terminologie officielle</i>	<i>Site(s) de l'infection</i>	<i>Site de latence</i>	<i>Taille du génome (KB)</i>
<i>Alphaherpesvirinae</i>	HSV1	HHV1	Cellules épithéliales	Ganglion trigéminal	152
	HSV2	HHV2	Cellules épithéliales	Ganglions des racines nerveuses sacrées (S2–S5)	154
	VZV	HHV3	Cellules épithéliales	Ganglions de la racine dorsale	125
<i>Betaherpesvirinae</i>	HCMV	HHV5	Monocytes, cellules endothéliales et épithéliales	Monocytes, progéniteurs CD34+	230
	/	HHV6 (A / B)	Lymphocytes, monocytes, neurones	Cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse	156 /162
	/	HHV7	Lymphocytes	Lymphocytes	153
<i>Gammaherpesvirinae</i>	EBV	HHV4	Cellules B et cellules épithéliales	Cellules B mémoires	172
	KSHV	HHV8	Cellules B et cellules endothéliales	Cellules B mémoires	138

- Impact clinique des virus herpétiques humains

Les infections causées par les différents herpesvirus humains sont généralement asymptomatiques ou bénignes chez les individus pourvus d'une bonne santé. Toutefois, elles peuvent avoir des conséquences importantes en termes de morbidité et de mortalité chez les patients présentant un système immunitaire déficient qu'il soit génétique ou acquis. Par ailleurs, plusieurs herpesvirus provoquent des infections congénitales (présentes à la naissance) ou des infections périnatales (acquises au moment de la naissance) du nouveau-né, en particulier lorsque la mère est infectée ou a une infection active pendant la grossesse (tableau 2). Bien que certains virus de l'herpès répondent bien à la chimiothérapie antivirale, la plupart d'entre eux présentent encore des défis non résolus pour le développement de vaccins [11].

Tableau 2 : Pathologies associés aux infections par les herpesvirus [11].

Herpesvirus	Pathologies associées
HSV1 ET HSV2	Herpès labial, herpès génital, kératites ou des encéphalites.
VZV	Varicelle chez l'enfant et du zona lors d'une réactivation d'un virus latent chez l'adulte.
EBV *	Syndromes de mononucléose, carcinomes nasopharyngés ou des lymphomes (lymphome de Burkitt).
HCMV*	Syndromes de mononucléose, rétinites, colites etc.
HHV6 A et B	Roséole infantile, de rares cas d'infections sévères telles que des méningoencéphalites, hépatites aiguës, myocardites.
HHV7	Roséole infantile.
KHSV *	Sarcome de Kaposi, le lymphome primitif des séreuses ainsi que de la maladie de Castleman multicentrique.

* *L'EBV et le KSHV sont considérés comme virus oncogènes par L'OMS, le potentiel oncogénique du HCMV est en cours d'évaluation.*

1.2 Découverte du HCMV

Dès 1881, de premières descriptions faites par trois scientifiques allemands, Ribbert, Jesionek et Kiolenenoglou montraient de grandes cellules à inclusions nucléaires en œil de hibou dans divers organes tels que les poumons, le foie et les glandes salivaires. Néanmoins, ils ont attribué ces anomalies histologiques à des infections protozoaires. La première indication que ces cellules caractérisant la « maladie des inclusions cytomégaliqes » pouvaient être reliées à une

infection virale par les herpesvirus est venue après l'observation des mêmes effets cytopathologiques chez un homme infecté par le VZV et le HSV [12].

Des décennies plus tard, la microscopie est venue étayer ces suppositions avec la visualisation d'une particule virale au sein de ces cellules à inclusions. En 1960, suite au développement des techniques de culture cellulaire et la collaboration de trois équipes scientifiques. Weller et ses collaborateurs isolent le virus et le désignent par le nom « cytomégalo*virus* » en raison de la morphologie des cellules infectées [12]. Durant les années 70, la relation entre les lésions cérébrales congénitales et d'autres complications neurologiques sensorielles liées aux infections *in utero* par le HCMV ont été établies. Suite à cela, l'émergence du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) et l'essor des interventions de transplantations et de greffes ont mis l'accent sur ce virus et ont dévoilé son caractère d'agent opportuniste associé à l'immunosuppression [13]. L'avènement de nouvelles technologies de biologie moléculaire telles que le clonage et le séquençage d'ADN marquera le commencement d'une nouvelle aire de recherche pour le HCMV. Permettant à la fois une fine connaissance de la particule virale, de la physiopathologie liée à l'infection mais aussi l'utilisation de son génome comme vecteur dans le génie génétique [13].

1.3 Structure de la particule virale

Le HCMV peut atteindre les 200 nm, il est considéré comme le plus grand et le plus complexe des herpesvirus étudiés jusqu'à présent. Il est constitué d'un : génome, une capside, un tégument et une enveloppe (figure 2).

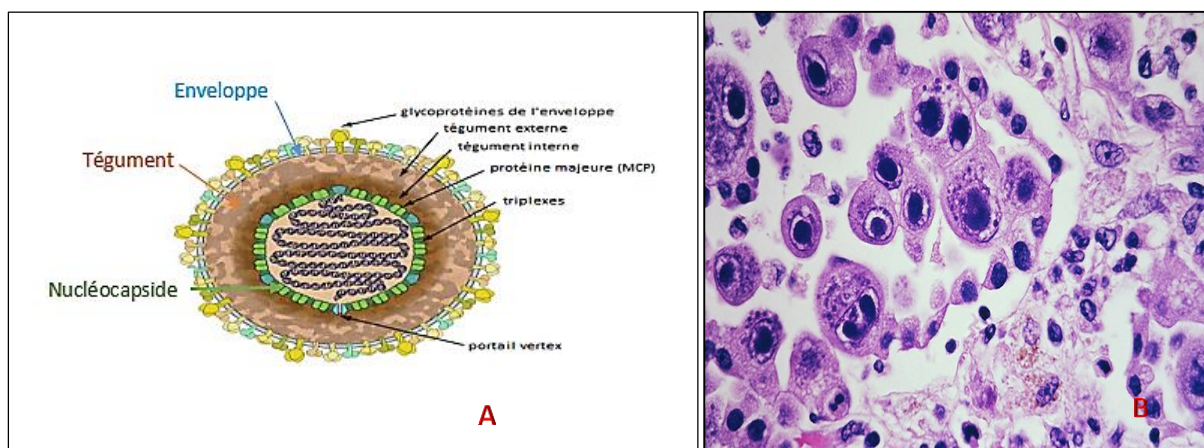


Figure 2 : Structure de la particule virale du HCMV. (Photo de Danny L. Wiedbrauk). A/schéma représentant la composition structurale du HCMV. B photographie par microscope optique illustrant l'aspect caractéristique en œil de hibou constitué de virions néoformés et de lysosomes dans une cellule infectée par le HCMV.

1.3.1. Génome

Son génome est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire, comptant environ 235 kb. Il se circularise dans le noyau de la cellule infectée lorsqu'il est libéré de la capsid. Il est organisé en deux segments uniques : d'une part un segment unique long UL (Unique Long), correspondant à 85 % du génome et d'autre part, un segment unique court US (Unique Short). Le génome peut se circulariser grâce à des séquences répétées inversées terminales les TRL (terminal long repeat) et les TRS (terminal short repeat). A l'intersection de ces deux segments se trouvent deux séquences internes, les IRL (long internal repeat) et les IRS (short internal repeat) [14 -16] (figure 3).

Selon le consensus actuel, le génome du HCMV peut coder un minimum de 170 protéines, plus 4 gènes codant pour de longs ARNs non-codants, deux origines de réplifications ARN (ori Lyt) ainsi que 23 miARNs. La comparaison de génomes de différentes souches d'environ 230kb, a révélé que seulement le tiers de ces protéines dont les gènes sont localisés principalement dans le domaine UL étaient communes avec les autres herpesvirus et sont indispensables à la répllication virale. La grande majorité des protéines restantes seraient probablement impliquées dans la pathogénèse virale par divers processus comme le tropisme, la latence et la modulation de la réponse immunitaire etc. La nomenclature des gènes et des protéines associe la désignation de la région codante (UL, US, TRL/IRL, TRS/IRS) et le cadre ouvert de lecture de façon séquentielle. La protéine porte l'indication de sa nature : pp pour phosphoprotéine, gp pour glycoprotéine [15].

1.3.2. Capsid

La capsid est composée de 162 capsomères (150 hexons et 12 pentons) et 320 triplexes, elle présente une structure icosaédrique et mesure environ 100 nanomètres de diamètre. Les principales protéines qui la constituent sont : la Protéine majeure de la Capsid (MCP) formant les capsomères. La Protéine mineure de la Capsid (mCP), permettant l'ancrage de l'ADN à la capsid. La Smallest Protéine de la Capsid (SCP) indispensable à la répllication et la protéine AP (UL 80) impliquée dans l'encapsidation de l'ADN viral [14].

1.3.3. Tégument

Le tégument ou la matrice, est une structure amorphe qui entoure la capsid et joue un rôle à la fois structural et immunomodulateur. Elle est constituée d'au moins 39 protéines dont la fonction de la plupart demeure inconnue [14]. Les plus importantes sont pp65 (UL83), pp150

(UL32), pp28 (UL99), pp71 (UL82), pUL47 et pUL48. En général, elles sont phosphorylées et fortement immunogènes. Ces protéines présentent différentes activités allant du conditionnement de la cellule hôte et de l'évasion immunitaire au début de l'infection jusqu'à l'orchestration des derniers stages de l'assemblage du virion. Il est à noter que l'analyse par spectrométrie de masse a permis l'identification de plus de 70 protéines humaines localisées dans le tégument, ces protéines de la machinerie cellulaire incluraient entre autres des protéines structurales du cytosquelette (β -actine), des protéines impliquées dans la traduction, des enzymes et des protéines facilitant le trafic et la progression cellulaire du virion ainsi que sa réplication en présence d'inhibiteurs. En plus des protéines, on a retrouvé également des ARNs viraux et cellulaires qui permettent dès l'entrée du virus une expression des gènes viraux [15].

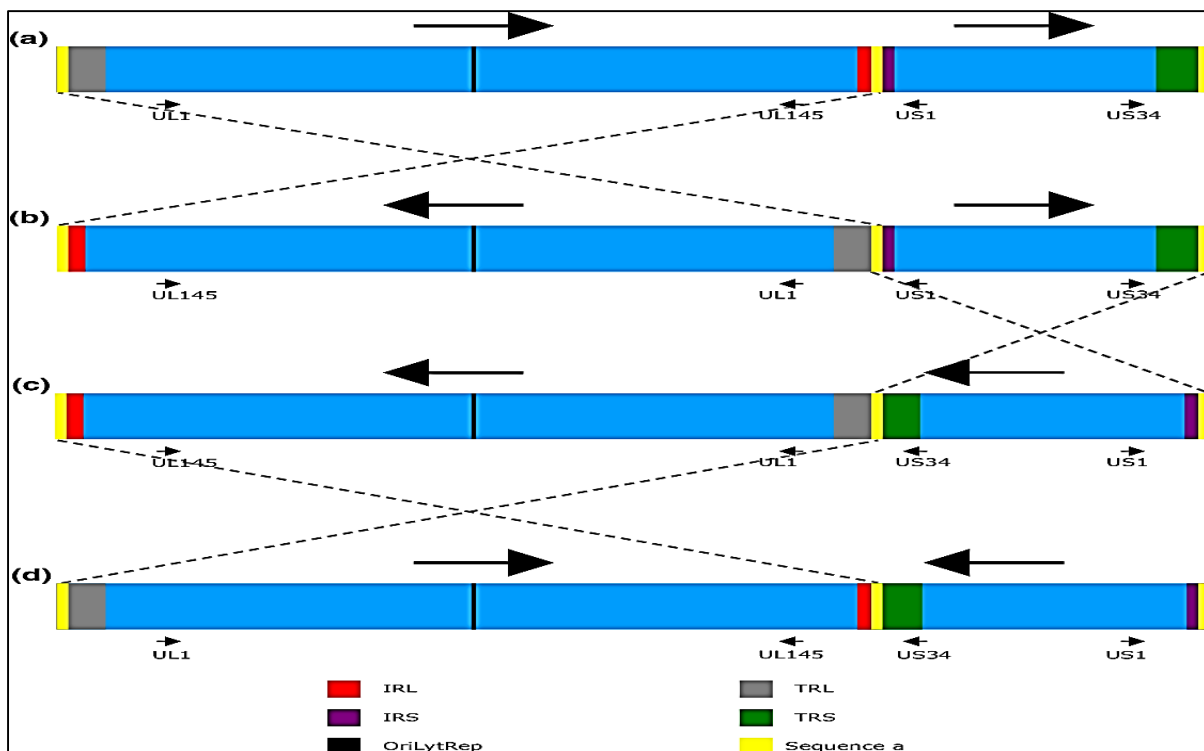


Figure 3 : Structure du génome [16]. Quatre isoformes équimolaires différentes du génome viral peuvent apparaître au cours de la réplication virale (a,b,c,d) selon l'orientation des segments UL et US. UL unique long, US unique short, IRL inverted repeated long, IRS inverted repeated short, TRL Terminal Repeated Longue, TRS terminal repeated short.

1.3.4. Enveloppe

L'enveloppe dérive des membranes internes cytoplasmiques et nucléaires. Elle est constituée de polyamines, de lipides et de diverses glycoprotéines, dont les plus étudiées sont les glycoprotéines gB, gH, gM/N, gL et gp48. Certaines contribuent à l'attachement et l'entrée du virus, tandis que d'autres sont impliquées dans la maturation du virion et la modulation de la réponse de la cellule hôte. Ces glycoprotéines constituent les principaux antigènes contre

lesquels l'hôte constitue une réponse immunitaire. Récemment on a suggéré que le tropisme cellulaire dépend de la constitution de complexes glycoprotéiques trimérique ou pentamérique. Par exemple, le complexe pentamérique gH : gL : pUL128 : pUL130 : pUL131A facilite l'attachement et l'entrée dans les cellules épithéliales et endothéliales. Tandis que le trimère protéique gH : gL : gO facilitent l'infection des fibroblastes [17].

Nb. Dans la cellule infectée, de nombreuses protéines codées par le génome viral mais non assemblées dans la particule, sont présentes. Parmi celles-ci, se trouvent diverses enzymes impliquées dans la réplication virale et des protéines participant à l'échappement immunitaire.

1.4 Cycle virale répliatif et latence

Le HCMV a un tropisme particulièrement large lui permettant d'infecter des types cellulaires très variés comme les pneumocytes, les hépatocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les stromales de la moelle osseuse, les monocytes/macrophages ou encore les cellules dendritiques. Cependant, la réplication virale y est généralement bloquée et le cycle productif ne s'effectue que dans les cellules différenciées et matures ; les cellules immatures telles que les monocytes et les cellules dendritiques immatures contribuent à la dissémination du virus dans l'organisme par voie hématogène.

La primo infection débute par une réplication dans l'épithélium muqueux. Par la suite, le virus libère concomitamment aux particules virales des facteurs chimiotactiques aboutissant au recrutement des cellules monocytaires de la lignée myéloïde, où il établit une infection latente, et qui vont participer à la dissémination du virus vers d'autres organes. L'expression des gènes viraux dans ces cellules infectées de manière latente est restreinte et nettement différente de l'infection lytique [18].

1.4.1 Cycle répliatif du HCMV

Dans les cellules permissives, le cycle répliatif du HCMV se déroule en plusieurs étapes classiques pour les virus herpétiques (figure 4).

❖ Attachement et pénétration du virus dans la cellule hôte :

Le mécanisme exact de l'entrée du HCMV n'est pas encore complètement élucidé. Néanmoins, on sait que le contact initial avec la cellule s'établit via les protéoglycanes de type héparane sulfate présents ubiquitairement dans les membranes plasmiques. Suite à cela, la fusion et l'entrée virale se font via des interactions spécifiques entre les glycoprotéines majeures de l'enveloppe, principalement les gB et gH et des récepteurs cellulaires tels que le récepteur alpha du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRA) et le récepteur du facteur de

croissance épidermique (EGFR). Délivrant ainsi la nucléocapside et les protéines du tégument dans le cytoplasme. Le transport de la nucléocapside vers le noyau est facilité par le réarrangement du cytosquelette cellulaire notamment les microtubules. L'aboutissement de cette dernière au noyau concomitamment avec la modulation des voies de signalisations cellulaires et l'organisation de la transcription génique par les protéines du tégument initient le cycle lytique [18].

Transcription et Réplication

Les différents gènes du virus sont exprimés de façon séquentielle et contrôlée tout au long du cycle ré­plicatif qui se déroule en 48 à 72 heures. Ils sont répartis en trois groupes présentant des cinétiques d'expression et des fonctions différentes. Selon le moment de leur apparition après l'infection on retrouve les transcrits : précoces-immédiats (IE pour immediate early), précoces (E pour early) et tardifs (L pour late).

- Les produits des gènes IE régulent la synthèse d'un nouveau lot de protéines virales et activent l'expression des gènes E.
- Les gènes E codent pour des protéines enzymatiques qui sont impliquées dans la ré­plication du génome. Certaines protéines précoces ont le potentiel de stimuler et de déréguler le cycle cellulaire ainsi que de moduler le système immunitaire. Rappelant ainsi les oncogènes codés par les oncovirus à ADN.
- Les produits des gènes L vont principalement former la structure du virion et contrôler sa maturation. Certains polypeptides fabriqués tardivement sont glycosylés et insérés dans les membranes de la cellule- hôte [18].

Quant à la ré­plication virale, elle peut être divisée en trois étapes :

1. Circularisation du génome par fusion des terminaisons linéaires simple brins.
2. Ré­plication de l'ADN en utilisant l'ADN circulaire comme modèle formant de larges concatémères.
3. Maturation des concatémères en génomes de la même longueur empaquetés dans la capsid.

❖ Assemblage, maturation et bourgeonnement de la particule virale

Suite à la ré­plication et l'accumulation du génome viral au sein du noyau de la cellule, les nucléocapsides se forment selon le mécanisme « *Head full* », puis migrent vers le cytosol par

le bourgeonnement initié dans la membrane nucléaire interne puis remplacée par la fusion avec la membrane externe, permettant la translocation de la nucléocapside dans le cytosol. Enfin, au sein du cytoplasme, le compartiment d'assemblage, constitué d'organelles modifiées de l'hôte, va permettre l'acquisition du tégument et de l'enveloppe virale finale issue des vésicules de golgi. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique libérant ainsi les nouvelles particules virales. Toutefois, la production de copies virales dépend du type cellulaire infecté [19].

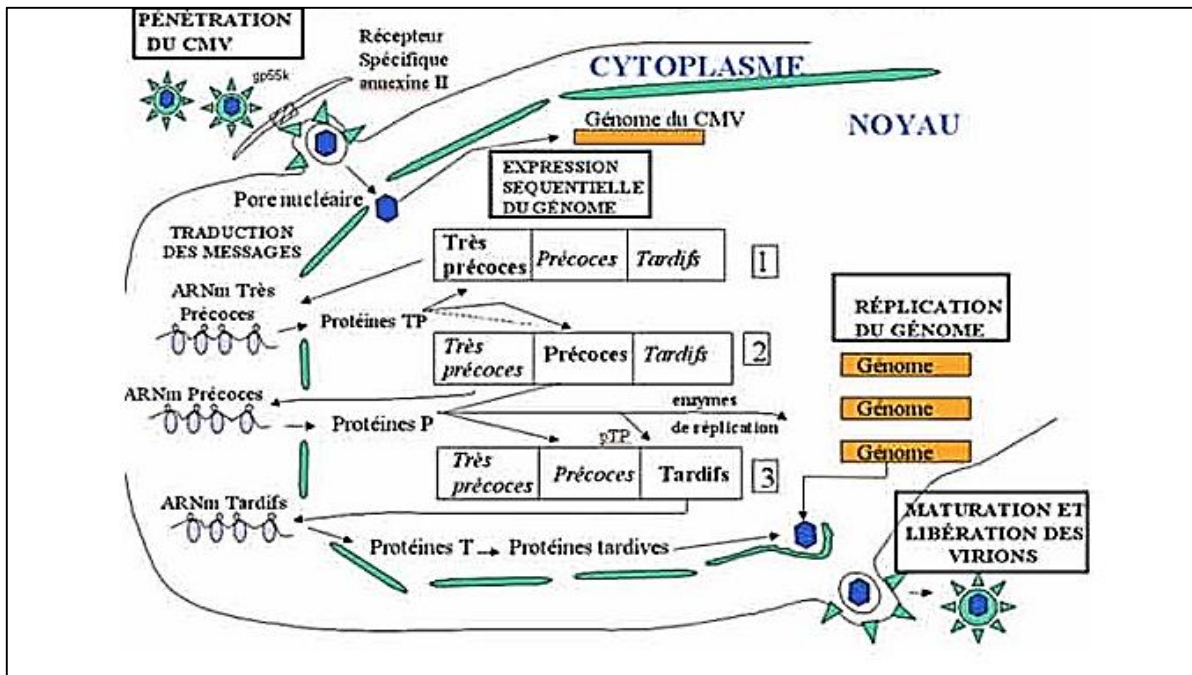


Figure 4 : Cycle réplcatif du HCMV. Schéma illustrant les étapes du cycle réplcatif du virus ainsi que l'expression séquentielle de son génome dans une cellule permissive[19].

1.4.2 Latence et réactivation

L'une des caractéristiques essentielles des virus herpétiques, et donc du HCMV, est leur capacité à entrer en latence au sein de l'organisme suite à une primo-infection. Les cellules myéloïdes CD34+ dans la moelle osseuse et les progéniteurs hématopoïétiques constituent les principaux réservoirs du HCMV latent. La latence n'est pas un état de dormance, où l'expression du génome viral est totalement supprimée, elle serait plutôt une phase dynamique caractérisée par l'expression de gènes impliqués dans la perturbation des fonctions cellulaires comme la survie et l'évasion immunitaire. En parallèle s'effectue la répression de la transcription de gènes associés au cycle lytique soit par des facteurs de répression ou par mécanisme épigénétique, aboutissant à la répression des phases E et L et *in fine* à l'absence de

production de nouvelles particules virales. Cette latence est maintenue grâce à un équilibre entre la pression exercée par le système immunitaire et les systèmes d'évasion du virus.

Quant à la réactivation, elle dépendrait d'une combinaison de facteurs viraux et cellulaires travaillant en synergie pour franchir le seuil de réactivation du virus dans ces cellules. Par exemple elle peut résulter d'une inflammation dans le microenvironnement ou de l'activation ou la répression de certains gènes cellulaires liés à la différenciation cellulaire [20].

1.5 Épidémiologie et transmission

Le HCMV est universellement répandu dans la population mondiale. L'infection évolue sur un mode endémique. L'homme est le seul réservoir du virus et aucun animal de laboratoire n'est sensible à ce virus. La transmission est ainsi uniquement interhumaine, elle s'effectue par contact étroit avec des malades ou des personnes séropositives asymptomatiques excrétaⁿt du virus dans les différents fluides corporels. Après une primo infection, l'excrétion virale dans les urines est plus ou moins prolongée et peut s'étendre sur des mois voire des années. Ce fait ajouté au mode asymptomatique de l'infection expliquerait pourquoi la propagation virale dans la population mondiale est aussi importante [21].

1.5.1. Prévalence

La prévalence du virus est plus importante chez la femme que chez l'homme. Celle-ci augmente avec l'âge mais est inversement corrélée au statut socio-économique de la population. En effet, si en Europe et en Amérique du Nord, la séroprévalence chez la population adulte varie entre 40% et 60 %, elle peut atteindre quasiment 100% dans les pays en voie de développement tels que les pays d'Afrique et d'Asie du Sud-Est. De plus, l'âge de la primo-infection est sensiblement plus bas dans les pays en voie de développement comparativement aux pays développés (figure 5).

Malencontreusement, la séroprévalence en Algérie reste indéterminée car les études épidémiologiques manquent. Cependant, un article-revue portant sur l'infection au Moyen-Orient et l'Afrique du nord estime que la séroprévalence pourrait atteindre les 99.2 % [21].

1.5.2. Modes de transmissions du cytomégalo*virus*

Les données de surveillance sérologique démontrent que la séroprévalence suit une distribution bimodale ; un pic de contamination au cours des premières années de vie (infection materno-foetale et crèches et cela concerne 10 à 25% des enfants) et le deuxième au début de la vie

sexuelle active. Ainsi, il en découle deux principales voies de transmission du cytomégalo*virus*, soit la transmission verticale ou horizontale [22].

- La transmission verticale, représente la transmission du virus de la femme enceinte à son fœtus ou au nouveau-né par la transmission intra-utérine, lors de l'accouchement ou par l'allaitement.
- La transmission horizontale, est l'infection d'un individu naïf par un individu infecté. Elle peut se faire soit par contact direct (Ex : lors des rapports sexuels) ou avec des objets récemment contaminés, la transmission du HCMV peut également survenir par voie iatrogène lors de la transplantation d'un organe dans lequel le virus est présent et représente la virose opportuniste la plus fréquente après transplantation.

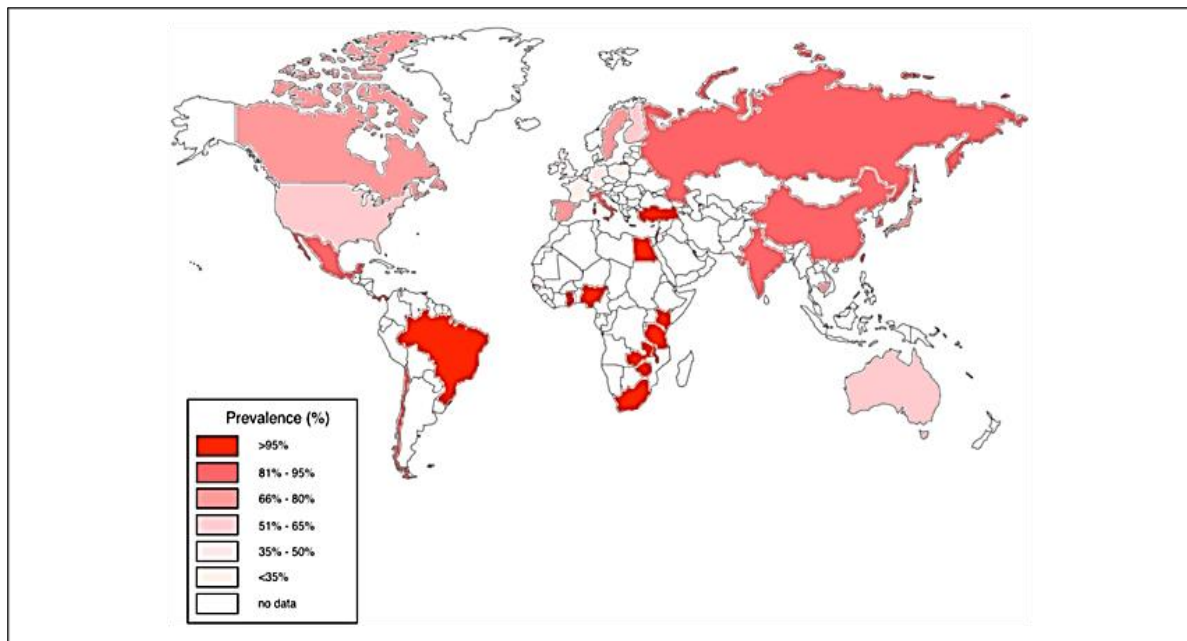


Figure 5 : Carte de la prévalence mondiale du HCMV chez les adultes [22].

1.6 Diagnostic et traitement

Les symptômes d'une infection à HCMV sont peu spécifiques (fièvre, malaise, leucopénie, hépatite, pneumonie) et de nombreux autres agents infectieux peuvent en être responsables. Ainsi, les différentes méthodes de détection au laboratoire sont indispensables pour l'établissement et /ou la confirmation du diagnostic. Ces techniques permettent aussi le suivi et l'évaluation de la réponse aux thérapies antivirales adoptées [23].

1.6.1. Moyens de détection

En général on distingue deux types de méthodes de détection, celles recherchant le virus ou un de ses constituants (ADN, ARN, Protéine) de celles ciblant les agents immunitaires spécifiques

au HCMV [23]. Le choix de la méthode utilisée dépend du contexte et du but derrière la pratique. Les méthodes les plus utilisées sont :

- ✓ Le test d'antigénémie pp65 qui est un test semi-quantitatif basé sur la détection par immunofluorescence de l'antigène viral pp65 à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique dans le sang circulant.
- ✓ La sérologie à HCMV qui vise à détecter les anticorps IgM et IgG anti-HCMV permettant de distinguer une primo-infection d'une infection secondaire.
- ✓ La réaction en chaîne par polymérisation (PCR) qualitative ou quantitative qui par sa précision, mesurabilité et rapidité est la méthode de choix pour la détection du HCMV.
- ✓ D'autres approches sont également disponibles, telles que la microscopie électronique, ou l'immunohistochimie.

1.6.2. Traitement et prévention

Le traitement des maladies à HCMV repose sur l'utilisation d'agents antiviraux tels que le ganciclovir (GCV) et le valganciclovir (VGCV). Ils sont principalement utilisés chez les patients immunosupprimés vu que l'infection chez les sujets immunocompétents se résorbe spontanément dans la plupart des cas. Le mode d'action de la majorité de ces agents est le blocage de la réplication du génome viral en ciblant l'ADN polymérase virale. Toutefois, l'utilisation de ces derniers est limitée dans le temps de par leur toxicité.

Le meilleur moyen préventif contre la transmission du virus serait le développement d'un vaccin. Il pourrait d'une part permettre de prévenir les transmissions virales congénitales et d'autre part, il préviendrait le développement des maladies à HCMV chez les patients transplantés limitant donc l'utilisation d'antiviraux toxiques. De nombreuses stratégies sont en cours d'évaluation comme l'utilisation des vaccins vivants atténués, vaccins sous-unitaires, vaccins à ADN ou avec un vecteur viral [24].

2. Physio-pathologies de l'infection à HCMV

Le HCMV est connu depuis longtemps, on a longuement associé le virus à l'immunosuppression ou au contexte congénital. Cependant, le développement de nouvelles techniques plus sensibles et la meilleure compréhension du cycle virale notamment sa latence a permis de donner un regard nouveau sur la potentielle implication du HCMV dans d'autres pathologies allant des plus bénignes jusqu'aux cancers [25]. De ce fait, l'idée que l'infection par HCMV soit considérée comme bénigne est obsolète et doit être révisée.

2.1 Manifestations cliniques de l'infection

Les manifestations cliniques de l'infection à HCMV varient selon l'état immunitaire du patient infecté (immunocompétent : IC ; immuno- incompétent : II ou infection congénitale). Les récentes données s'appuyant sur le séquençage de différentes souches ont également mis en lumière le rôle de la souche virale dans la pathogénèse où le potentiel pathogénique du HCMV était corrélé à la composition génétique de chaque souche [25].

- **Chez l'II :** On distingue plusieurs populations à risque : les patients transplantés (greffes de la Moelle Osseuse ou d'organes solides), les patients dont l'immunité est déficiente comme les sidéens et les cancéreux recevant une chimiothérapie immunosuppressive. Les affections les plus rencontrées sont les : rétinites, pneumopathies, les atteintes du système nerveux central et des colites à HCMV caractérisées par des lésions (figure 6). Le risque de développer ces pathologies chez ces patients est proportionnel à la charge virale dans la circulation sanguine ainsi qu'au niveau d'immunosuppression du patient.
- **Infection Congénitale :** Elle est la principale cause d'embryo-foeto-pathie infectieuse, responsable de plusieurs désordres symptomatiques significatifs. Elle représente la première cause de malformations congénitales non génétiques et de retards de développement chez le nouveau-né et la première cause de surdité congénitale non génétique. Notons que le statut sérologique de la mère ainsi que le stade de grossesse au moment de l'infection impactent directement sur les conséquences et la gravité de celle-ci.
- **Chez l'IC :** Les infections symptomatiques se caractérisent par des symptômes peu spécifiques tels que la fièvre, une myalgie, des malaises, des maux de tête ou un syndrome mononucléosique. D'autres symptômes moins communs sont rapportés comme la pharyngite, des adénopathies et une splénomégalie. De manière plus rare, des infections à HCMV sont associées à des complications plus sévères telles que celles observées chez des sujets immunosupprimés mais ces complications disparaissent rapidement et sont généralement sans séquelles [25].

Toutefois, de nombreuses études actuelles suggèrent que même chez l'IC, l'infection par le HCMV serait associée à un risque de maladies graves. En effet, plusieurs preuves tendent à démontrer que le HCMV est un agent étiologique ou co-étiologique dans le développement et / ou la gravité et la persistance de l'inflammation. Il pourrait ainsi induire diverses maladies inflammatoires chroniques chez les immunocompétents tels

que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la sénescence immunitaire, les maladies cardiovasculaires et peut être associé au développement de certains types de tumeurs. Des recherches intensives sont actuellement menées pour mieux comprendre les mécanismes de sa pathogenèse virale [26].

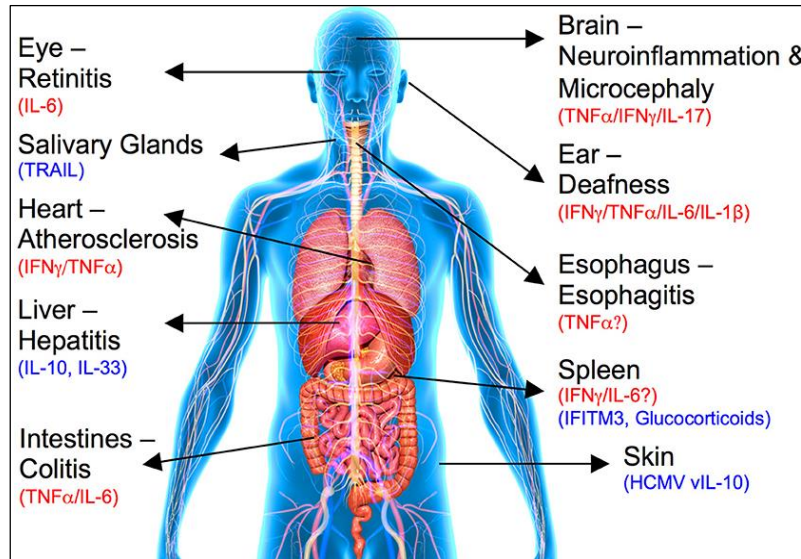


Figure 6 : Maladies à HCMV les plus fréquentes. La figure illustre les affections les plus fréquemment retrouvées lors d'une infection à HCMV principalement chez l'immuno- incompétent avec les différentes cytokines inflammatoires impliquées dans l'induction de ces pathologies [27].

2.2 Immunobiologie du HCMV et mécanismes d'échappement

Le corps humain a élaboré une variété complexe de mécanismes de défense immunitaire qui préviennent les infections virales et éliminent les cellules infectées par le virus. À leur tour, les virus se sont adaptés en développant différentes stratégies pour échapper aux réponses immunitaires. Nous évoquerons ci-dessous la coévolution entre le système immunitaire et les différents mécanismes d'échappement du HCMV.

2.2.1 Système immunitaire anti HCMV chez l'IC

L'aspect le plus frappant de l'immunobiologie du HCMV est l'ampleur de la réponse défensive développée par l'hôte contre le virus engageant pleinement l'immunité humorale et cellulaire. L'organisme élabore une défense immunitaire dynamique principalement à médiation cellulaire, ciblant plusieurs gènes d'évasion immunitaire codé par ce virus. Néanmoins, ce dernier est incapable d'endiguer l'infection à HCMV et sa latence [5].

Lors de la primo-infection la première barrière est l'immunité non spécifique, les cellules reconnaissent via le récepteur TLR2 (Toll-like receptor) les glycoprotéines de surface du

HCMV gB et gH et activent plusieurs voies dont l'activation de la transduction du signal dépendante de NF- κ B (nuclear factor-Kappa B) aboutissant à la production des cytokines inflammatoires, des interférons de type I (IFN) et des molécules co-stimulatrices qui sont cruciales pour ralentir le pathogène et ensuite amorcer une réponse immunitaire adaptative de haute qualité. Parallèlement, plusieurs études attestent de l'importance des cellules NK (Natural killer) dans l'élimination et la protection contre le HCMV et la pléthore de mécanismes d'évasion immunitaire codés par le HCMV pour empêcher l'activation des cellules NK indiquent leur importance dans la réponse innée[5].

Intervient ensuite la réponse humorale spécifique ; les immunoglobulines M (IgM) spécifiques du HCMV peuvent être détectés dès 4 à 7 semaines après l'infection et ces anticorps persistent ensuite pendant 16 à 20 semaines. Cette réponse humorale est principalement dirigée contre les protéines virales les plus immunogènes comme la pUL83 (pp65) et la protéine UL44 protéine accessoire de l'ADN polymérase, qui est la cible principale des IgM synthétisées précocement par l'hôte infecté. Le rôle de la réponse humorale dans la protection contre l'infection à HCMV est secondaire, permettant principalement de limiter la dissémination virale et contribuant probablement à minimiser les manifestations cliniques de la maladie. De ce fait, la présence d'anticorps neutralisants à titre élevé n'empêche pas les réinfections ou les réactivations[28].

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est quant à elle considérée comme le facteur principal dans le contrôle de l'infection à HCMV rendant les patients déficients plus exposés aux complications liées à cette infection. En effet, les taux des lymphocytes T spécifiques au HCMV chez les sujets sains sont beaucoup plus élevés que ceux observés pour les autres virus. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ jouent un rôle important dans la protection immune après une primo infection ou une réactivation après latence. Généralement, Les CD4⁺ commencent à circuler le 7j suivant le pic de la réplication virale. Ces derniers reconnaissent diverses protéines virales dont les glycoprotéines d'enveloppe gB et gH, puis une fois le CD4⁺ activé, il produit des cytokines (EXP IFN- γ , TNF- α) qui activent la réponse cytotoxique CD8⁺ ou induit la réponse anticorps par activation des lymphocytes B. Quant aux CD8⁺, ils expriment la perforine et la granzyme B pouvant ainsi lyser les cellules infectées par le virus. Par ailleurs, des réponses des lymphocytes T aux protéines associées à la latence ont été montrées, ce qui indique que les cellules infectées de manière latente pourraient également être contrôlé par les lymphocytes T [28].

2.2.2 Mécanismes d'échappement du HCMV

La relation entre le système immunitaire et le HCMV est très complexe et la coexistence millénaire du virus avec l'humain lui a permis de s'adapter. Le HCMV arrive non seulement à échapper à l'immuno-surveillance par divers mécanismes mais il peut de surcroît détourner le système immunitaire en s'appuyant sur les cellules immunitaires pour se propager et disséminer [5].

Le HCMV a élaboré des stratégies d'échappement à la réponse immunitaire en se dissimulant ou en exerçant une action antagoniste. Ainsi, il modifie le microenvironnement de la cellule infectée pour générer un environnement tolérogène, notamment par la production de cytokines anti-inflammatoires, de microARN ciblant des composants du système immunitaire et par diverses protéines virales telles que : pUS28, pUL111 qui lui permettent *in fine* d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules NK et d'échapper aux protéines du complément [5].

Pour échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires, l'expression des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité est inhibée par le virus suite à l'intervention en cascade de plusieurs produits géniques localisés dans les régions US2-US11 conduisant à la rétention puis à la dégradation de ces molécules. De ce fait, la fonction immunologique des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ; l'activité phagocytaire et la présentation des antigènes viraux est subvertie au profit de la dissémination (figure 7). La diffusion du virus dans l'organisme se fait essentiellement de cellule à cellule, ce qui permet au virus d'échapper à l'action des anticorps neutralisants. La fixation de la β 2-microglobuline à la surface des virions, en masquant les sites antigéniques, pourrait aussi jouer un rôle dans l'échappement à la réponse humorale [29].

D'autre part, L'infection à HCMV induit une diminution de la prolifération lymphocytaire, une inversion du rapport des lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ du fait d'une augmentation du nombre de lymphocytes CD8⁺. Le virus a également développé des moyens de défense contre l'activation des voies apoptotiques extrinsèques et intrinsèques initiées par les lymphocytes T cytotoxiques. Enfin, la complexité et le caractère crucial de la relation entre le HCMV et le système immunitaire apparaît essentiellement avec l'interaction du virus avec la production de cytokines (en particulier IL1 β et TNF α), de chimiokines et des molécules d'adhésion ICAM-1 et E-selectine plaidant ainsi pour un rôle du virus dans l'athérosclérose primaire, les manifestations de rejet aigu et chronique, diverses maladies inflammatoires et même certains cancers [27].

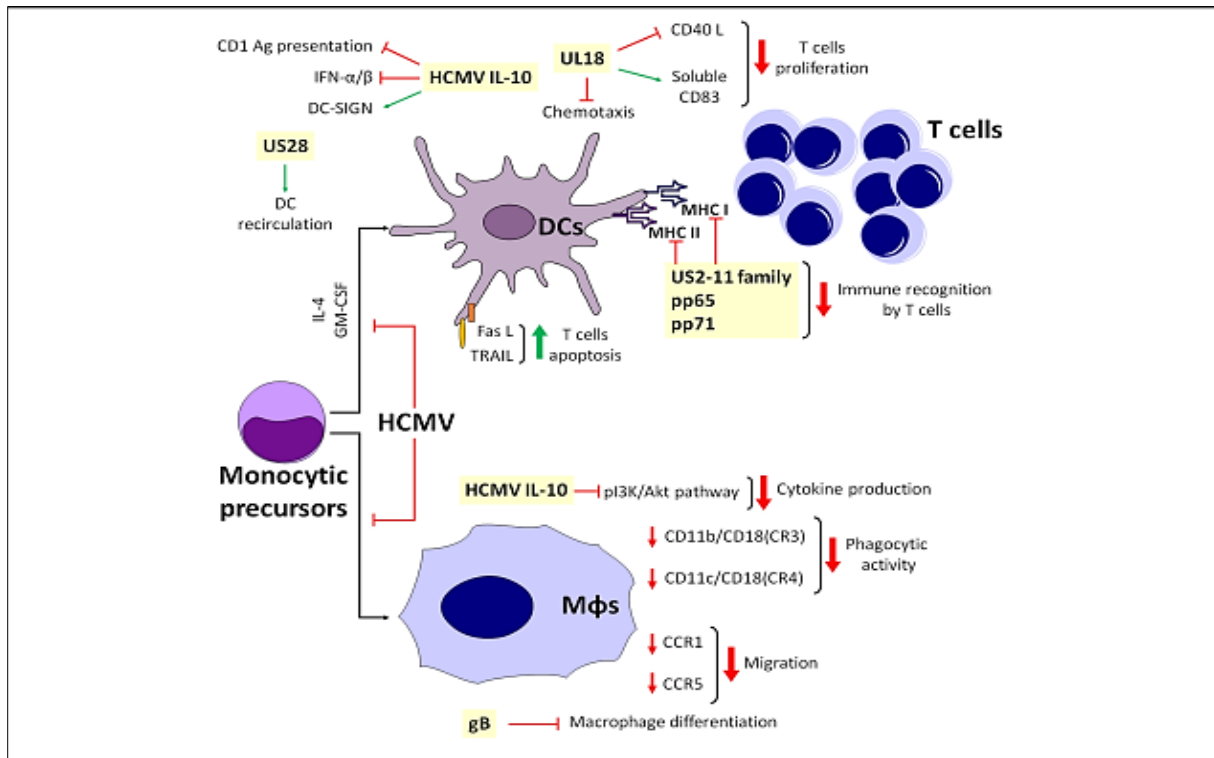


Figure 7 : Modèle simplifié illustrant l'interaction entre les CPA et le HCMV [5]. Le virus code pour une panoplie de protéines comme la famille US2-11, la pp65 et la vIL10 qui exercent plusieurs fonctions aboutissant à l'échappement immunitaire soit par dissimulation ou par action antagoniste.

3. HCMV ET CANCERS

La potentielle relation entre l'infection à HCMV et le cancer est débattue depuis des décennies. Il est difficile de déterminer si le HCMV peut être considéré comme un agent causal de cancers, car le mécanisme précis par lequel il pourrait contribuer à l'oncogenèse est incertain et sujet à controverse. Celle-ci, remonte à l'année 1970, quand *Fred Rapp et al* a déclaré que le HCMV pouvait transformer les cellules embryonnaires humaines normales *in vitro*. Bien que les lignées cellulaires transformées aient présenté une tumorigénicité accrue chez les souris nude, l'expression d'antigènes spécifiques au HCMV dans les cellules transformées et les lignées dérivées de tumeurs diminuaient avec l'augmentation des passages. Ultérieurement, d'autres équipes ont démontré la capacité du virus à induire des mutations dans les gènes critiques pour la transformation maligne *in vitro*. Cependant, l'ADN viral n'a pas été détecté dans la plupart des cellules transformées. Ces découvertes ont conduit à l'hypothèse que le HCMV pouvait contribuer à l'oncogenèse par un mécanisme de « hit-and-run » [30].

Actuellement, les données sont toujours controversées et conflictuelles. D'une façon générale, elles stipulent que selon le type de cancer et/ou le modèle étudié, ce virus semble avoir soit des propriétés oncogéniques lui faisant jouer un rôle de facteur initiateur du cancer, des propriétés

oncomodulatrices permettant la progression tumorale ou, à l'opposé, des propriétés antitumorales [30]. Ci-dessous nous exposerons une synthèse des connaissances actuelles portant sur le lien entre le HCMV et le développement tumoral.

3.1 Rôle du HCMV dans l'initiation et/ou la progression tumorale

De nombreuses études actuelles basées sur des technologies sensibles ont mis en lumière de nombreux indicateurs reliant le HCMV aux cancers. Parmi les arguments présentés, on retrouve la présence du HCMV dans de nombreux cancers, l'expression de nombreux éléments viraux (protéines et ARNs) pouvant potentiellement transformer diverses cellules *in vitro*, en agissant comme facteur oncogénique et /ou oncomodulateur (tableau 3) [30].

3.1.1 Détection du HCMV dans les pathologies malignes

Il a été avancé que le HCMV serait associé à une variété de malignités. Des études séro-épidémiologiques, moléculaires et histologiques basées sur la détection d'acides nucléiques viraux et/ou d'antigènes dans les fluides et les tissus malins, menées par plusieurs groupes de recherche indépendants, suggèrent un rôle étiologique du HCMV dans le développement de divers types de cancers [31].

De nombreux groupes de recherche, en utilisant des méthodes optimisées et sensibles telles que l'hybridation *in-situ*, la PCR, la microscopie électronique, le séquençage d'ADN et d'ARN, l'immuno- marquage d'échantillons tissulaires, les analyses de cytométrie en flux de cellules tumorales issues de résections chirurgicales, ont démontré une prévalence élevée de HCMV dans divers cancers dont le cancer du côlon, le sein, la prostate, le rhabdomyosarcome, le cancer hépatocellulaire, tumeurs des glandes salivaires, les neuroblastomes et les tumeurs cérébrales. La prévalence virale pouvait atteindre plus de 90 % dans ces tumeurs positives pour les protéines du HCMV et/ou les acides nucléiques. En outre, des études ont rapporté la présence du virus dans des cellules néoplasiques infiltrant les ganglions lymphatiques ainsi que dans des cellules métastatiques [6]. Cette infection virale serait limitée aux cellules tumorales et à certaines cellules inflammatoires et ne se propage pas aux cellules normales adjacentes et pouvait être corrélé selon la charge virale à un pronostic plus sombre [6]. Cependant, plusieurs autres équipes n'ont pas réussi à détecter le HCMV dans leurs cohortes d'étude [31] [32]. Pour justifier ces résultats discordants, les défenseurs d'un rôle pro-tumoral pour le HCMV ont suggéré que la détection du HCMV puisse varier avec le temps en raison de la vulnérabilité croissante de l'ADN viral à la dégradation pendant le stockage de l'échantillon ou peut être due à la sensibilité de la technique [4].

Tableau 3 : Principales protéines virales aux propriétés oncogéniques

Eléments viraux	Effets biologiques	Propriétés oncogéniques
pUL123 (IE1), pUL122 (IE2) pUL97, pUL76, pUL82 (pp71)	-Entrée en phase S -Liaison et suppression de l'activité de p53 et de Rb - Dérégulation de l'expression de la cycline E et Inhibition de l'apoptose -Induction d'aberrations et de cassures chromosomiques - Induction de l'expression du gène E2F et du TGF- β - Activation de la télomérase et de la voie PI3K/Akt	-Prolifération cellulaire et insensibilité aux signaux antiprolifératifs - Immortalité - Inflammation - Amélioration de la survie cellulaire - Instabilité et mutation du génome - Echappement à l'immunité
pUS28	-Induction de l'expression du VEGF -Activation de plusieurs voies : IL-6/JAK/STAT3, NF- κ B, -mobilité dépendante de RhoA	-Prolifération et croissance Tumorale -Amélioration de la survie -Induction de la néo-angiogenèse
pUL111A (vIL10)	-Activation de STAT3 -Production de cytokines immunosuppressives	-Prolifération, migration et métastases -Activation de la télomérase -Augmentation de la suppression immunitaire
pUS2, pUL16, pUL83 (pp65)	-Inhibition de l'expression du CMH de classe I, -Rétention intracellulaire de NKG2D -Antagonise le récepteur activateur NKp30 -Augmentation de la fréquence des mutations	-Échappement à l'immunité -Mutation génomique
pUL36 (vICA), pUL37x1 (vMIA)	-Inhibe l'activation et l'apoptose de la caspase-8 - Inhibe l'apoptose médiée par les mitochondries	-Amélioration de la survie

3.1.2 Bases moléculaires de la transformation et la progression tumorale par le HCMV

Les dernières recherches estiment que le HCMV code pour plus de 750 protéines, ces dernières pourraient interférer avec plusieurs fonctions physiologiques dans les cellules infectées. Beaucoup de ces produits géniques, en particulier ceux exprimés au début du cycle de vie du HCMV, régulent les processus caractérisant le cancer ou « hallmarks of cancer ». Des

expériences inédites ont démontré la capacité d'une souche virale clinique, le HCMV-DB à transformer des cellules épithéliales *in vitro* et qui est capable d'induire la formation d'une tumeur *in vivo*. En ce sens, on rapporte également l'apparition de colonies sur un gel d'agaroseensemencé avec des hépatocytes primaires humains infectés par le HCMV, ces dernières disparaissent suite à un traitement aux UV et au ganciclovir, prouvant ainsi une caractéristique fondamentale de la carcinogenèse qui est la prolifération indépendante de l'ancrage et confirmant ainsi le potentiel oncogénique du virus. Il est intéressant de noter que similairement à tous les oncovirus humains identifiés à ce jour, le HCMV peut induire la formation de cellules cancéreuses géantes polyploïdes (PGCC). Ces dernières sont responsables de la formation de métastases, de la résistance aux thérapies adjuvantes et de la récurrence [33]. On rapporte aussi que de façon semblable aux oncovirus, certaines souches de HCMV pourraient induire une expansion des cellules souches cancéreuses (CSC) en provoquant simultanément une dédifférenciation des cellules épithéliales et une transformation cellulaire [34].

Parmi les produits viraux qui ont un potentiel de transformation on retrouve notamment la IE1 et la pUS28. Cette dernière a la capacité suite à une expression stable, de transformer les cellules 3T3 *in vitro* ces cellules une fois injectée chez des souris induisent une croissance tumorale.

L'activation de l'axe IL6–JAK–STAT3 par la pUS28 pourrait être l'un des mécanismes impliqués dans le développement tumoral. Ce mécanisme de transformation est activé dans les cellules de GBM et favoriserait la transformation des hépatocytes *in vitro*. En parallèle, le hcmvIL-10 codé par le gène UL111A, active également le STAT3 comme cela a été décrit dans les cancers avec un sombre pronostic [3].

Quant à IE1 il favorise l'induction de facteurs de transcription qui sont cruciaux pour la persistance des cellules souches cancéreuses et le développement tumoral [35].

Il est intéressant de noter que ces protéines virales (tableau 3) vont non seulement inhiber l'action des produits de gènes suppresseurs de tumeurs tel que la p53 et Rb mais également ciblent et activent de nombreux oncogènes qui sont retrouvés activés uniquement dans les cellules infectées [35].

En outre, de récents travaux s'intéressant aux microARN codés par le HCMV, suggèrent qu'ils sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire. Le microARN non codant β 2.7 se lie aux composants du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et le stabilise pour empêcher l'apoptose des cellules infectées. Un autre ARN, le miR-UL112 entrave l'expression de l'ARNm de la chaîne B liée au CMH de classe I (MICB) et inhibe ainsi l'activation des cellules NK et des lymphocyte T, permettant l'évasion immunitaire des cellules infectées [36]

[37]. L'ensemble de ces données sont en faveur d'un rôle direct du HCMV dans l'oncogenèse. Cependant, il est important de souligner que la fonction de ces éléments viraux peut dépendre du contexte interne des cellules tumorales et des propriétés du virus. A titre d'exemple le statut de la p53 sauvage ou muté détermine l'action des protéines virales sur l'arrêt ou la progression du cycle respectivement. De ce fait, le virus joue un rôle paradoxal où il bloque la croissance dans les cellules non transformées et la favorise dans les cellules tumorales [30].

Similairement certains variants caractérisés par une variabilité génotypique et phénotypique sont considérés comme des souches oncogéniques de haut risque. Ces derniers, par opposition à d'autres souches associées à un risque moindre, seraient responsables des diverses actions oncogéniques imputables au HCMV [34].

3.1.3 HCMV ET HALLMARKS

La concordance et la juxtaposition entre les potentiels actions des éléments (protéines/ ARNs) du HCMV et les altérations cellulaires aboutissant au cancer représente un argument appuyant son rôle dans le développement tumoral. En effet, il est désormais établi que le cancer est un processus multi étapes pendant lesquelles les cellules vont acquérir un certain nombre de caractéristiques connu sous le terme de « Hallmarks » (figure 8). Nous décrivons ci-dessous l'effet de l'infection par HCMV sur ces caractéristiques [38].

Maintien des signaux prolifératifs et immortalisation

Dans les cellules cancéreuses, la dérégulation des voies de signalisation se traduit par la capacité des cellules cancéreuses à proliférer à l'infini. Des études ont démontré que le HCMV a développé de multiples mécanismes pour assurer l'activation de MAPK dans les cellules infectées. De plus, plusieurs protéines du HCMV notamment la protéine du tégment pp71, IE-72, IE-86, et pUL97 sont impliquées dans la désactivation de la famille de protéines Rb et en corolaire l'entrée des cellules en phase S avec la collaboration de la pUL123 et la pUL122. En parallèle, IE-72 et IE-86 peuvent également interagir avec la p53 et déréguler des points de contrôle du cycle cellulaire, rappelant ainsi le mécanisme d'action de certains oncovirus. D'autres données ont montré que le HCMV stimule la transcription de hTERT et augmente l'activité de la télomérase par UL123 maintenant de ce fait la division cellulaire [30].

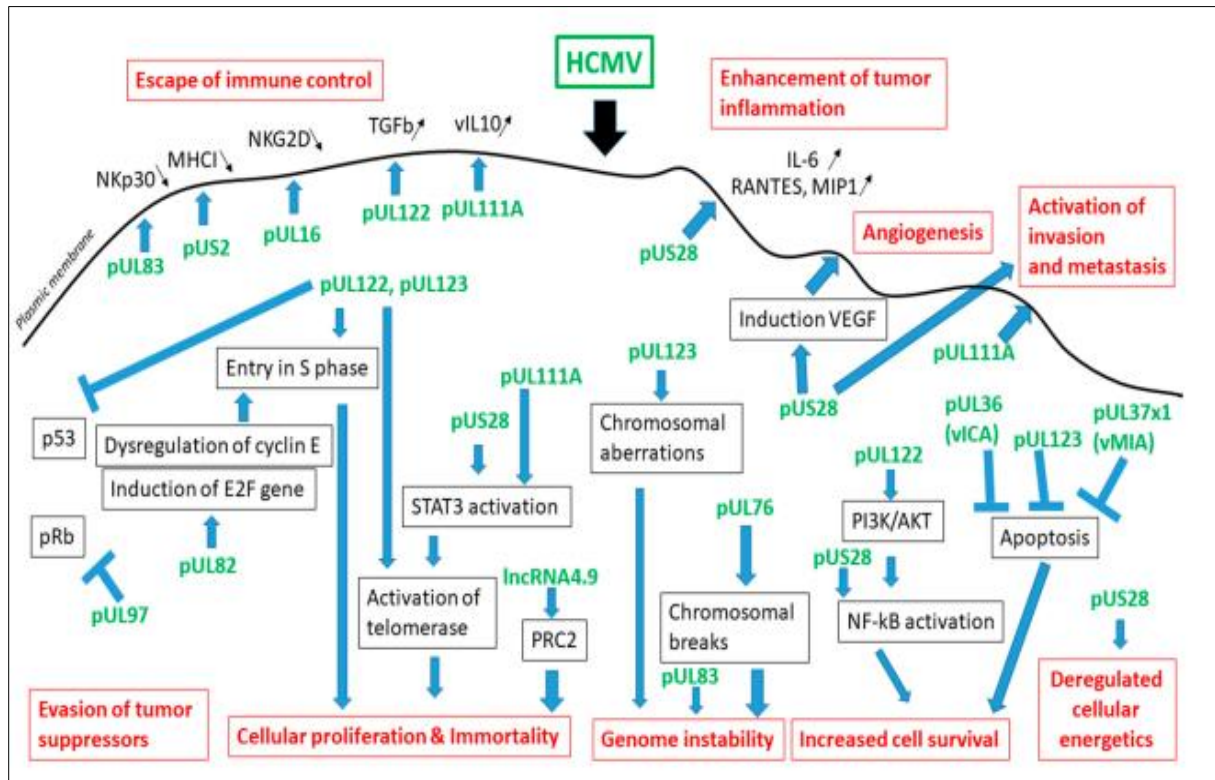


Figure 8 : HCMV et les caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses [30]. Cette figure illustre l'action des protéines HCMV (en vert) sur les différents effecteurs cellulaires (en noir) aboutissant aux caractéristiques du cancer *Hallmarks* (en rouge). Les petites flèches noires décrivent la régulation positives et négatives des cytokines et des protéines cellulaires.

Inhibition de l'apoptose et action pro-survie cellulaire

L'apoptose est un mécanisme essentiel pour le maintien de l'hémostase tissulaire. Le HCMV, inhibe l'apoptose par de multiples stratégies. Elles peuvent être directes ou indirectes [38].

Stratégies directes :

- Via Les protéines IE-72 et IE-86 impliquées dans le blocage de l'apoptose médiée par le TNF- α .
- IE-86 se lie à p53 et inhibe l'apoptose médiée par p53
- Par l'inhibition de l'activation des caspases médiée par FAS.
- Par blocage de l'activité des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak

Stratégies Indirectes :

- Par l'activation de voies de survie, par exemple Wnt/ β -caténine et PI3K/AKT.
- Suite à l'induction de cytokines favorisant la tumeur Ex. l'activation de l'axe IL6–JAK–STAT3 par la pUS28.
- Il peut induire l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 conférant ainsi une résistance aux drogues cytotoxiques.

En outre, de récentes études ont démontré que les cellules infectées par le HCMV acquièrent une résistance face à l'autophagocytose, un mécanisme physiologique, intracellulaire, de protection et de recyclage d'éléments cellulaires. Le virus parvient à l'inhiber via la protéine virale TRS1 et l'induction de l'expression de BCL-2 [39].

Instabilité génomique et modifications épigénétiques

Ce phénomène est considéré comme l'une des exigences les plus importantes pour la transformation cellulaire et l'oncogenèse. Le HCMV peut induire des dommages génétiques et cause une accumulation d'aberrations chromosomiques, principalement dans le chromosome 1, où on retrouve des points de cassures du brin d'ADN dans les positions 1q42, 1q21 et 1q23.3. Certaines de ces aberrations sont retrouvées dans les GBM. De plus, il est proposé que certains gènes suppresseurs de tumeurs soient localisés à ces positions. Ces cassures chromosomiques sont induites par le gène UL76 [38].

Néo-angiogenèse

C'est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés, il est contrôlé par un équilibre entre les facteurs anti-angiogéniques et les facteurs pro-angiogéniques. Le HCMV est capable de moduler plusieurs voies pour favoriser l'angiogenèse et favoriser un environnement pro-angiogénique. Le virus peut enclencher l'angiogenèse soit en induisant la production d'IL-8 par l'UL76, soit en supprimant l'expression de TSP-1. De plus, l'activation de COX-2 médiée par la pUS28, favorise l'angiogenèse et la migration cellulaire car elle régule iNOS, PDGF, bFGF, TGF- α et VEGF dans les cellules tumorales [30].

Invasion et métastases

Le HCMV, principalement par la US28, peut faciliter l'invasion par diverses actions. Il favorise l'activation des intégrines (par exemple, $\alpha 5 \beta 1$) sur la surface de la cellule tumorale et augmente l'adhérence des cellules tumorales à l'endothélium voisin par l'activation de kinases liées à l'intégrine (par exemple, la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale FAK^{Tyr397}). En parallèle, La régulation négative des récepteurs des molécules d'adhésion par le HCMV notamment la molécule d'adhésion des cellules neurales CD56 facilite la transmigration des cellules tumorales. Ces actions sur les molécules d'adhésion expliquent la diminution de la liaison des cellules cancéreuses entre elles et l'augmentation de la liaison à l'endothélium. Ce processus est un événement précoce et fondamental dans la formation de métastases [38].

Inflammation

L'inflammation chronique est désormais considérée non seulement comme un déclencheur majeur de la transformation maligne, mais aussi comme un moteur du cancer dans tous les stades de son développement. Il existe une interaction entre inflammation et HCMV. D'une part, les médiateurs inflammatoires tels que l'IL6 vont activer le HCMV et en corollaire l'ensemble des produits géniques essentiels pour le développement tumoral. Cette inflammation peut être due au contexte tumoral (cellules tumorales elle-même ou agents carcinogènes externes) ou consécutive aux traitements conventionnels (chimio/radiothérapie). D'autre part, plusieurs études suggèrent que l'infection par le HCMV pourrait conduire à un environnement d'inflammation chronique, qui à son tour pourrait favoriser l'oncogenèse d'une manière similaire au virus de l'hépatite. Via la pUS28, le virus peut exacerber l'inflammation par la sécrétion des cytokines and chimiokines tels que l'IL-6, le TNF-alpha, la protéine inflammatoire des macrophages-1 et les métalloprotéinases (MMP). De même ; les protéines IE-1 et IE-2 activent la voie NFκB, ce qui augmente la libération de cytokines inflammatoires dans la tumeur. Ceci pourrait conduire à des cancers plus agressifs au pronostic plus sombres [40].

Dérégulation du métabolisme cellulaire

L'infection par HCMV induit la dérégulation de l'énergie cellulaire, change l'utilisation du glucose et du glutamique et induit l'effet Warburg. Plusieurs études démontrent que le HCMV induit une activation de la transcription des enzymes impliquées dans la glycolyse et le cycle de l'acide citrique, modifiant ainsi le métabolisme cellulaire vers un environnement favorable à la progression de l'infection. Par ailleurs, L'inhibition pharmacologique de la biosynthèse lipidique inhibe la réplication virale, soulignant ainsi l'importance de cette orientation métabolique pour le HCMV. Via sa protéine IE1, le HCMV altère également les mécanismes de transport du glucose dans les fibroblastes infectés en inhibant l'expression membranaire normale du transporteur GLUT-1 au profit d'une augmentation de l'expression de GLUT-4, un transporteur plus efficace du glucose, et favorise ainsi l'entrée du glucose dans la cellule. Les effets du HCMV sur le métabolisme du glucose sont donc en partie superposables à ceux observés dans les cellules cancéreuses. La cellule cancéreuse infectée par le HCMV pourrait ainsi bénéficier de l'action du virus sur l'entrée du glucose dans la cellule et de la surexpression des enzymes impliquées dans l'utilisation métabolique du glucose et de la glutamine [41].

- ✓ Échappement au système immunitaire et action sur le microenvironnement

Le HCMV grâce à ses différentes protéines, dispose d'une multitude de mécanismes lui permettant d'échapper au système immunitaire. En outre, il peut agir sur la composition du

microenvironnement. Ainsi, par le biais de la cytokine anti-inflammatoire virale *vil10*, il peut moduler les Macrophages associés aux tumeurs (TAMs) qui exprimeraient un phénotype M2 produisant des cytokines tel que l'IL-10 et TGF-beta et permettant l'évasion immunitaire. Ce phénotype favorise également l'établissement d'une réponse auxiliaire Th2, qui favorise l'angiogenèse, le remodelage et la réparation tissulaire. Une densité élevée de TAM est une caractéristique de mauvais pronostic dans le cancer du sein, le cancer colorectal et le glioblastome. Il favorise également le recrutement des LT régulateurs aux dépens des LTc. De ce fait, l'infection des cellules cancéreuses par le HCMV leur confère une protection contre la reconnaissance et l'action du système immunitaire [41].

3.1.4 Rôle oncomodulateur

Les premières recherches portant sur le lien entre le HCMV et la néoplasie humaine ont postulé pour un rôle majeur du HCMV dans le développement tumoral. Cependant, bon nombre de ces études n'étaient pas reproductibles et manquaient de corrélations histopathologiques *in-situ* avec les maladies proposées. En outre, plusieurs études n'ont pas pu démontrer une initiation de l'oncogenèse par les protéines du virus ou n'arrivaient plus à le détecter après plusieurs passages en culture cellulaire [6]. De ce fait, pour concilier ces données avec les résultats divergents obtenus ultérieurement, un nouveau paradigme décrit par l'oncomodulation a été proposé. L'oncomodulation est définie comme une augmentation de la malignité suite à une infection virale [38]. Ce paradigme pourrait décrire l'effet du HCMV sur les cellules tumorales, vu que le consensus actuel suggère que le HCMV n'initie pas la transformation mais agirait plutôt comme cofacteur favorisant la carcinogenèse sans être un virus oncogène en soi (figure 9) [35].

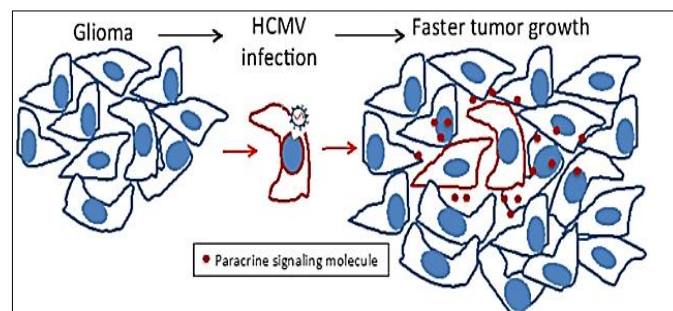


Figure 9 : Mécanisme de l'oncomodulation par le HCMV[2]. Par ce mécanisme indirect, le HCMV ne participe pas à la transformation de cellules tumorales (ici d'origines gliales) ; il présenterait plutôt un tropisme accru pour les cellules tumorales (le gliome). Le virus n'infecte qu'une fraction des cellules tumorales et active les voies de signalisation qui favorisent la croissance tumorale.

Les cellules tumorales fournissent un environnement génétique, caractérisé par des perturbations des voies de signalisation intracellulaires, des facteurs de transcription et des protéines suppresseurs de tumeurs, qui permettent au HCMV d'exercer son potentiel oncomodulateur, expliquant ainsi pourquoi ce potentiel ne se manifeste pas dans les cellules normales adjacentes [38].

Rappelons que la plupart des mécanismes cellulaires activés/inhibés par le virus sont régulés de manière comparable par les cellules tumorales et pourraient donc être renforcés par l'infection de ces cellules [26]. De ce fait, l'oncomodulation peut résulter de l'activité des protéines régulatrices du virus et de l'ARN non codant, qui influencent les propriétés des cellules tumorales, notamment la prolifération cellulaire, survie, invasion, l'angiogenèse et l'immunogénicité. Ces différents effets corroborent l'hypothèse que l'infection des cellules cancéreuses par le HCMV leur confère un avantage de survie pour la tumeur. Par conséquent, l'infection par le HCMV peut conduire à un phénotype malin et plus agressif des cellules tumorales et peut contribuer à la progression tumorale [38].

3.2 Rôle oncolytique

En dépit de la littérature croissante décrivant un effet pro-tumoral de l'infection à HCMV. Ce dernier peut également avoir un rôle oncolytique en inhibant le développement de certains types de tumeur. Ceci indique que le paradigme de l'oncomodulation ne peut pas toujours s'appliquer à l'infection par le HCMV. L'effet cytotoxique du HCMV sur la croissance et/ou l'expansion tumorale a été établis en premier lieu chez les patients atteints de leucémie et ayant reçu une greffe de moelle osseuse, en absence d'infection à HCMV les patients ont montré une probabilité de rechute plus importante, contrairement aux individus infectés et ayant une réplication virale précoce qui ont affiché un risque de rechute moindre. Il semblerait qu'il existe une synergie entre l'effet antitumoral exercé par le HCMV et de la réaction chronique du greffon contre l'hôte ou graft-versus-host disease (GVHD) déclenchée suite à la réplication du virus [42]. D'autres études *in vitro* sur des modèles de lignées cellulaires de cancer mammaires et du foie ont confirmé ces observations [43].

L'inhibition de la croissance tumorale serait liée à plusieurs mécanismes (figure 10). Le HCMV peut activer des voies apoptotiques intrinsèque et réduire l'activation de STAT3 comme il peut activer les NK et des LT cytotoxiques [6]. Par ailleurs, il induit une transition mésenchymato-épithéliale (MET) avec inhibition de la capacité migratoire de ces cellules [30].

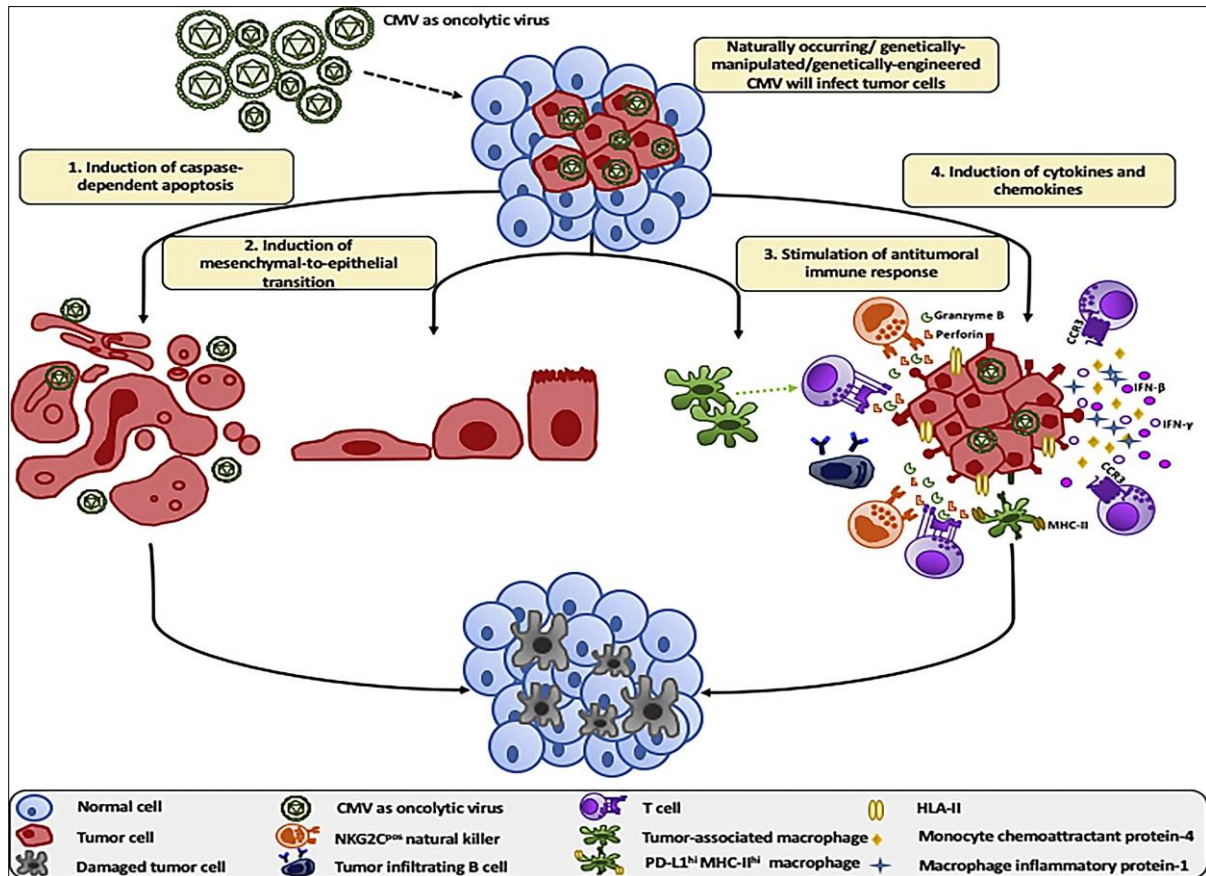


Figure 10 : Mécanismes oncolytique par le HCMV [43]. L'infection virale abouti à l'inhibition de la croissance tumorale directement en déclenchant l'apoptose ou indirectement en stimulant le système immunitaire qui pourra reconnaître et éliminer les cellules tumorales infectées.

Par conséquent, plusieurs études actuelles étudient la potentielle utilisation du HCMV comme vaccin thérapeutique dans plusieurs pathologies cancéreuses comme le glioblastome. Cependant, la technique n'a pas encore abouti aux résultats escomptés principalement à cause de l'immunobiologie complexe et encore méconnue de l'infection par HCMV [7]. Cette virothérapie oncolytique représente une réelle prouesse technique et pourrait être envisagée comme thérapie dans plusieurs autres cancers comme le cancer colorectal, le cancer de la prostate et le cancer du sein où l'on retrouve une présence significative du virus dans les biopsies étudiées.

CHAPITRE 2 : LE CANCER

1. Généralités sur le cancer

Le terme général de « cancer » s'applique à un grand ensemble de maladies pouvant toucher n'importe quel tissu de l'organisme. C'est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. Ci-dessous nous allons exposer les caractéristiques générales de la pathologie, en mettant l'accent sur les mécanismes moléculaires qui sous-tendent son développement.

1.1. Définition

Une tumeur : latin : *tumor* ; *tumerer* : « enfler » est un gonflement pathologique résultant de la multiplication excessive des cellules. Elle résulte d'un déséquilibre entre la mort des cellules et leur renouvellement. Elle échappe aux systèmes de régulation contrôlant la division des cellules. Elle peut être maligne ou bénigne. La tumeur bénigne est sans gravité, d'évolution favorable contrairement aux tumeurs malignes qui sont graves, entraînant des symptômes anormaux allant jusqu'au décès de l'individu atteint.

Le cancer : latin et grec : « crabe » est causé par une tumeur maligne formée par la multiplication rapide de cellules anormales à la croissance inhabituelle, qui peuvent envahir des tissus voisins puis migrer vers d'autres organes. On parle alors de métastases, lesquelles constituent la principale cause de décès par cancer [44].

1.2. Epidémiologie et facteurs de risque

La connaissance de la répartition du cancer dans une population, ses facteurs de risque, ses tendances temporelles ainsi que la possibilité d'une comparaison internationale, représentent un point de départ important pour les programmes de lutte contre le cancer. Notamment en vue des répercussions économiques considérables du cancer. Les taux de mortalité et de morbidité sont exprimés en taux brut (qui est le taux pour 100 000 habitants) et en taux standardisé qui tient compte de la répartition des âges afin de permettre des comparaisons car la fréquence des cancers varie avec l'âge et les répartitions selon les âges varient selon les pays et les régions (figure11).

1.2.1. Incidence

Selon les dernières estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) datant de 2020, il y a eu environ 19,3 millions de nouveaux cas de cancer dans le monde. Les cancers les plus fréquents (en termes de nombre de cas recensés) étaient : le cancer du sein (2,26 millions de cas), le cancer du poumon (2,21 millions de cas) et le cancer colorectal (1,93 million de cas) chez les deux sexes.

Il existe plusieurs facteurs influençant l'incidence du cancer. Le recours accru aux méthodes de dépistage actuelles a grandement contribué à l'augmentation de sa fréquence. L'incidence du cancer augmente également considérablement avec l'âge, probablement en raison de l'accumulation progressive de facteurs de risque spécifiques et de la diminution de l'efficacité des mécanismes de régénération cellulaire au fil du temps. La distribution géographique et le statut économique des pays ont également un impact sur l'incidence et la prise en charge des patients atteints de cancer. En outre, les infections à l'origine de cancers, telles que l'hépatite et le papillomavirus humain (HPV), représentent environ 30 % des cas de cancer dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (OMS 2020).

1.2.2. Mortalité

Le cancer représente la deuxième cause de décès dans le monde. On enregistre environ 10 millions de morts par an dont 70 % surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Selon l'OMS, les cancers à l'origine du plus grand nombre de décès en 2020, étaient : le cancer du poumon (1,80 million de décès), le cancer colorectal (935 000 décès) et le cancer du foie (830 000 décès).

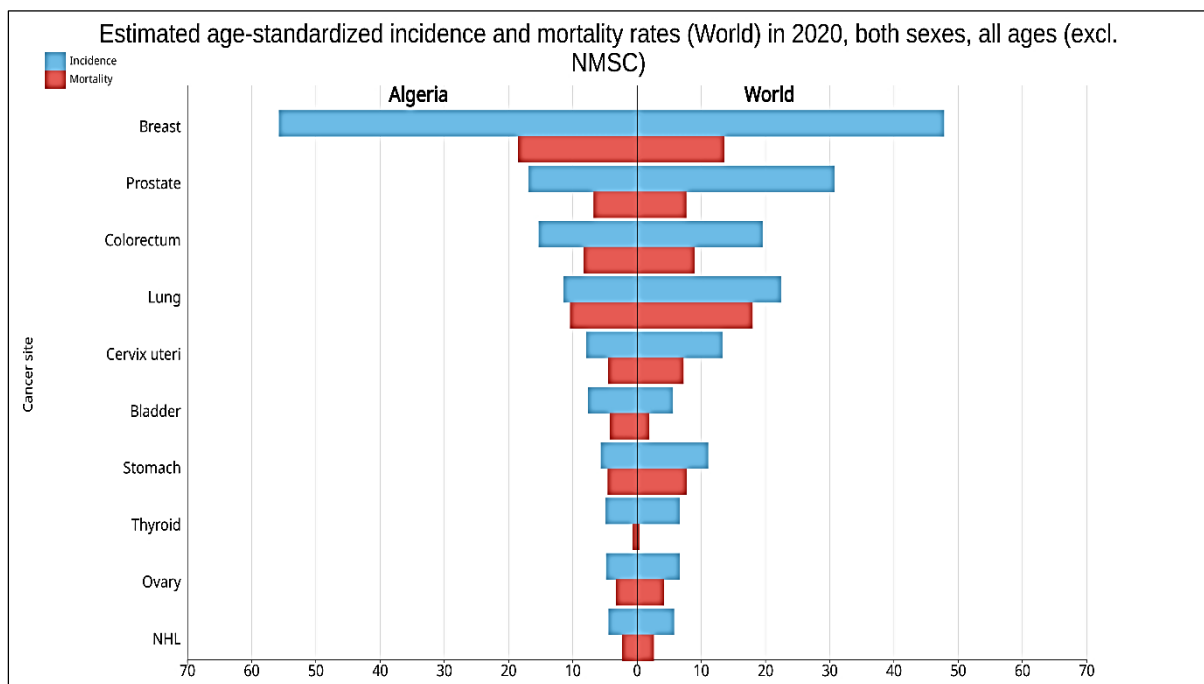


Figure 11 : Incidence et mortalité dans l'Algérie vs le monde [45]. La figure représente un comparatif entre l'incidence du cancer et la mortalité entre l'Algérie et le monde chez les deux sexes. (Les cancers de la peau ont été exclus).

En Algérie, le cancer s'inscrit aujourd'hui parmi les nouveaux besoins prioritaires en santé publique. Sur les ~ 44 millions d'habitants, on enregistre selon l'OMS pas moins de 58418 nouveaux cas et 32802 décès en 2020 (Tableau 4). Ces données proviennent des registres nationaux du cancer où les wilayas sont réparties dans les trois réseaux régionaux Est et Sud-Est, Centre et Sud Centre, et Ouest et Sud-Ouest, coordonnés par le réseau National des Registres de Cancer. D'après ces mêmes sources le cancer serait en nette recrudescence avec des pourcentages annuels (APC) fluctuant entre 2 et 8 % pour les principales localisations. Les principales atteintes pour les deux sexes confondus sont le sein 12 536, le colorectum 6 526 et les poumons 4 774. Quant à la mortalité, le nombre de décès le plus élevé était due au cancer du poumon (4333 décès) suivi de près par le cancer du sein (4116 décès) puis le cancer colon (2174 décès).

Tableau 4 : Statistiques du cancer en Algérie. le tableau résume le nombre de nouveaux cas de cancer et de décès chez les deux sexes ainsi que les cinq cancers les plus fréquents [45].

Summary statistic 2020			
	Males	Females	Both sexes
Population	22 153 808	21 697 235	43 851 043
Number of new cancer cases	27 328	31 090	58 418
Age-standardized incidence rate (World)	129.7	141.7	135.3
Risk of developing cancer before the age of 75 years (%)	13.7	14.1	13.9
Number of cancer deaths	17 902	14 900	32 802
Age-standardized mortality rate (World)	84.2	68.5	76.1
Risk of dying from cancer before the age of 75 years (%)	8.6	7.3	7.9
5-year prevalent cases	64 379	86 011	150 390
Top 5 most frequent cancers excluding non-melanoma skin cancer (ranked by cases)	Lung Prostate Colorectum Bladder Stomach	Breast Colorectum Thyroid Cervix uteri Ovary	Breast Colorectum Lung Prostate Bladder

1.2.3. Facteurs de risque

L'Epidémiologie analytique via ses enquêtes rétrospectives et prospectives a permis de révéler que la pathologie cancéreuse pouvait être influencée par de nombreux facteurs. Ces facteurs favorisant le développement tumoral peuvent être classés selon différentes méthodologies s'appuyant principalement sur leur type, cancérogénicité ou action.

Classification selon le type

Les facteurs de risques peuvent être de types endogènes ou exogènes[45].

- Les facteurs endogènes ou intrinsèques sont propres à l'individu. Ils peuvent inclure :
 - L'âge : Le risque de cancer augmente avec l'âge.
 - Les syndromes de prédispositions familiaux : Certaines formes de cancer peuvent être héréditaires suite à des mutations ou des polymorphismes génétiques comme le Syndrome de Li-Fraumeni, le syndrome de Lynch et la neurofibromatose etc.
 - Les troubles hormonaux : Certains types de cancer peuvent être hormono-dépendants comme le cancer du sein.
 - Certaines pathologies : des affections inflammatoire chroniques peuvent constituer un risque accru de développement d'un cancer comme la maladie de Crohn, l'hépatite chronique etc.
- Les facteurs exogènes ou extrinsèques sont liés à l'environnement et au mode de vie. Ils sont généralement répartis selon leurs origines en facteurs physiques, chimiques ou biologiques.
 - Physiques : l'exposition aux rayonnements comme les radiations ionisantes (rayons X, rayons gamma) ou les rayons ultraviolets peut augmenter le risque de cancer.
 - Chimiques : certains agents chimiques présents dans l'atmosphère, l'eau, les sols ou l'alimentation présentent une toxicité et sont cancérigènes comme l'amiante, les composants de la fumée du tabac et le formol etc.
 - Biologiques : Certaines infections chroniques qui touchent particulièrement les pays à revenu faible ou intermédiaire constituent elles aussi des facteurs de risque de cancer. Environ 13 % des cancers diagnostiqués dans le monde en 2018 étaient imputables à des infections cancérigènes, notamment *Helicobacter pylori*, le HPV, le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C et le virus d'Epstein Barr [45].

Certains facteurs comportementaux comme une mauvaise hygiène de vie marquée par certaines habitudes comportementales comme le tabagisme constituent également des facteurs de risque de cancer. En effet, le tiers des décès par cancer est dû au tabagisme ce qui constitue le facteur de risque le plus important [46]. En outre, une mauvaise alimentation marquée par une faible consommation de fruits et légumes, un manque d'activité physique, un indice élevé de masse corporelle et la consommation d'alcool sont à l'origine d'environ un quart des décès par cancer[46].

Classification selon la cancérogénicité :

Par le biais de son institution spécialisée, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), l'OMS entretient la classification des agents cancérogènes. Elle dispose d'un répertoire comprenant environ 1000 agents et circonstances d'exposition classés en fonction de leur potentiel cancérigène pour l'Homme. Cette classification est en perpétuelle évolution et reflète le niveau de certitude du danger cancérogène de l'agent. Ainsi, selon la force probante des indications de cancérogénicité apportées par les données chez l'Homme, l'animal et sur le mécanisme de cancérogénèse, les agents sont classés en 4 groupes : Groupe 1, Groupe 2A, Groupe 2B et Groupe 3 décrits ci-dessous (tableau 5).

Tableau 5 : Classification des facteurs de risque selon la cancérogénicité.[47]

Groupes	Évaluation	Nombre d'agents évalués (au 29 mars 2021)
Groupe 1	Cancérogène pour l'Homme	121
Groupe 2A	Probablement Cancérogène pour l'Homme	89
Groupe 2B	Peut-être cancérogène pour l'Homme	319
Groupe 3	Inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme	500

Classification selon l'action :

Les agents impliqués dans le processus de cancérisation sont scindés selon leur action en deux [48] :

- Agents initiateurs : ces agents initient l'oncogénèse et la font également progresser en induisant une lésion définitive de l'ADN (ex : mutation, cassure). Exemples : agents alkylants, radiations ou virus (hépatite B, d'Epstein-Barr, etc.) qui confèrent de nouvelles capacités aux cellules tumorales.
- Agents promoteurs : ils n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression de cette dernière, préalablement induite par un agent initiateur. Souvent, les promoteurs tumoraux sont des stimulateurs de la prolifération cellulaire. L'action d'un promoteur tumoral seul sur des cellules saines est totalement nulle sur l'initiation de l'oncogénèse. Son effet de promotion tumorale n'a lieu que sur des cellules ayant

initié l'oncogenèse. Par ailleurs, le temps écoulé entre l'initiation et la progression tumorale est réduit en présence d'agents promoteurs. Exemples : œstrogènes (cancer du sein) alcool (tumeurs ORL), le HCMV (plusieurs malignités). Ces deux modes d'action sont illustrés ci-dessous (figure 12).

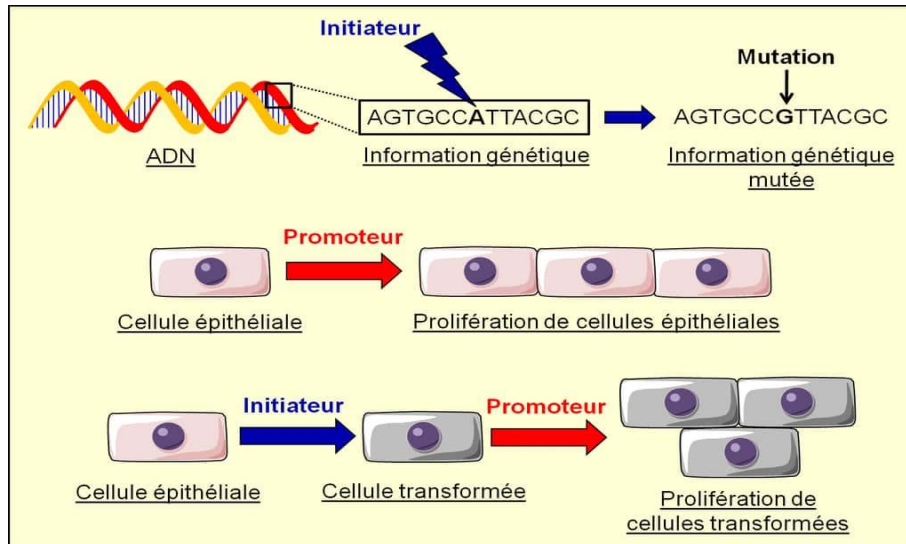


Figure 12 : Mode d'action des agents initiateurs et promoteur des tumeurs [48]. Le schéma illustre la conséquence de l'action d'un agent initiateur et un agent promoteur sur une cellule épithéliale, un promoteur de tumeur ne transforme pas une cellule, il stimule seulement sa progression.

1.3. Aspects moléculaires du développement tumoral

Il est généralement admis que la pathogenèse tumorale met en jeu plusieurs altérations géniques successives qui sont la conséquence d'interactions entre des facteurs génétiques propres au sujet et des agents extérieurs décrits précédemment. Par ailleurs, les modifications de l'expression de ces gènes ou de l'activité de leurs produits peuvent résulter de modifications génétiques ou épigénétiques. Ces dernières aboutissent à la sélection progressive de cellules qui acquièrent un phénotype tumoral [49].

1.3.1. Processus générale de la cancérisation

Les tumeurs se développent à partir de cellules normales par l'entremise d'un processus complexe comportant de multiples étapes aboutissant à des cellules tumorales. Elles ont généralement pour point de départ une lésion précancéreuse, laquelle devient ensuite une tumeur maligne [49]. Ce processus de carcinogénèse peut être résumé en trois principales étapes :

1. Étape **d'initiation** consiste en une dysrégulation génomique (multiples évènements mineurs) aboutissant à une dysrégulation majeure. Il en résulte une transformation cellulaire.
2. Étape de **promotion** résultant d'un faisceau d'interactions entre cytokines (facteurs de croissance) et leurs récepteurs. Elle engendre une perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformés.
3. Étape **d'invasion locale** à l'origine du phénomène de dissémination métastatique, elle résulte d'interactions entre le stroma et l'épithélium.

1.3.2. Caractéristiques des cellules cancéreuses « Hallmarks »

Lors de la cancérogenèse, les cellules évoluent progressivement vers un état néoplasique et vont progressivement selon un processus multi étapes, acquérir des caractéristiques phénotypiques et moléculaires ou « hallmarks » de cellules tumorales [50]. Ces dernières leur confèrent une multitude d'avantages sélectifs. Selon le principe révisé en 2011 par *Douglas Hanahan* et *Robert A. Weinberg* ils sont en nombre de 10 [51] [52] (figure 13). Toutefois, les cellules tumorales présentes dans les tumeurs peuvent être très hétérogènes selon la ou les cellules initiatrices et pourraient donc ne pas présenter les mêmes caractéristiques.

Indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs

Le trait le plus fondamental des cellules cancéreuses réside dans leur capacité à maintenir une prolifération chronique. Ceci est permis via plusieurs alternatives comme par la stimulation autocrine, l'augmentation du nombre et l'activation constitutionnelle des récepteurs de facteurs de croissance etc [51].

Insensibilité aux inhibiteurs de la croissance cellulaire

Elle met en jeu plusieurs mécanismes tels que l'inactivation des mécanismes de contrôle physiologique du cycle cellulaire (PTEN, Rb, p53), Perturbations des mécanismes de rétro-control négatif atténuant la signalisation proliférative (activité GTPasique de Ras) [51].

Résistance à la mort cellulaire

Il existe une multiplicité de mécanismes permettant aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose. Sommairement, on retrouve, l'inactivation de la P53, l'inactivation des facteurs pro-apoptotiques et l'hyper-expression d'inhibiteurs de l'apoptose tels que bcl-2 [51].

Pouvoir réplcatif illimité

La réplication illimitée des cellules tumorales est majoritairement permise par la dé-répression du gène de la télomérase, ou par recombinaison télomérique aboutissant à la maintenance de leur longueur permettant en conséquence l'échappement à la mort par senescence ou par apoptose[51].

Induction de l'angiogenèse

La néovascularisation est essentielle au soutien de la croissance tumorale. Les cellules tumorales entreprennent l'angiogenèse suite à la modification de l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. Elle requière également la contribution de plusieurs éléments comme les cellules de l'immunité innée [51].

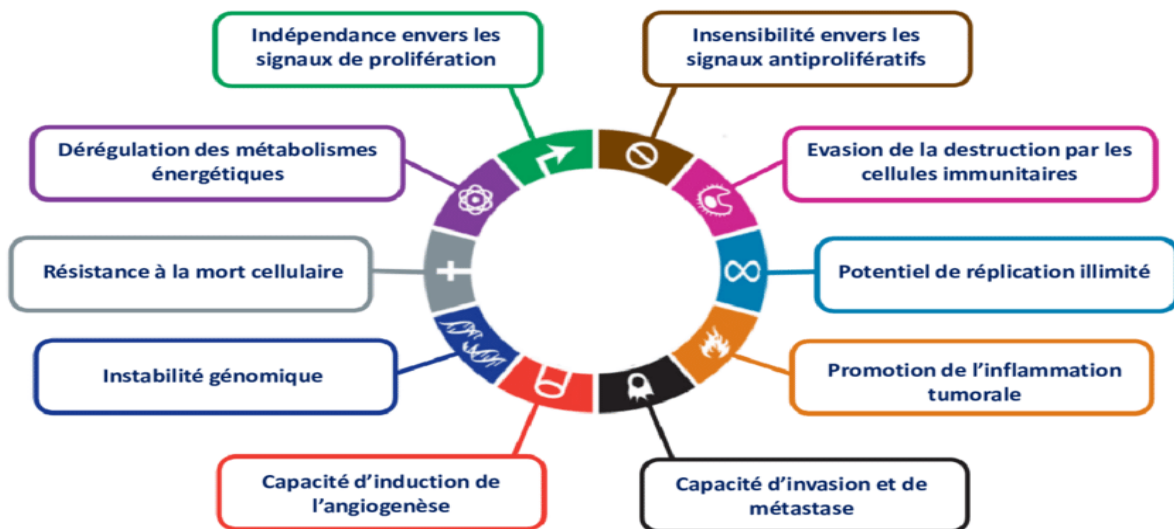


Figure 13 : Caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses. *Adapté à partir de Hanahan et al [52].* Les six capacités distinctives des cancers sont l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la résistance à la mort cellulaire, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogenèse et la capacité à former des métastases. Deux capacités distinctives émergentes ont été rajoutées ; la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et l'évasion de la destruction par le système immunitaire. L'inflammation et l'instabilité génomique sont des caractéristiques favorisant le développement tumoral.

Invasion et métastases

L'invasion de tissus voisins et la formation de métastases sont considérées comme des caractéristiques clés du cancer. Le processus complexe aboutissant à ces deux caractéristiques est représenté comme une cascade lors de laquelle plusieurs acteurs sont impliqués comme les protéines d'adhérence cellulaire, les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et les protéines de signalisation intracellulaire [51].

Dérégulation du métabolisme cellulaire

Pour sustenter la croissance et la division des cellules tumorales. Celles-ci opèrent une reprogrammation du métabolisme énergétique et biosynthétique cellulaire connu sous le terme d'effet Warburg, Ce dernier leur garantie l'énergie ainsi que la biomasse nécessaire à leur division accrue essentiellement à partir du glucose, à travers la glycolyse. De ce fait, La captation cellulaire de glucose et sa dégradation sont accrues, causant notamment l'acidification du milieu environnant suite à la libération du lactate. En parallèle, les cellules cancéreuses peuvent également induire une réorganisation du métabolisme des acides aminés pour soutenir la prolifération cellulaire [52].

Echappement au système immunitaire

L'instabilité génomique des tumeurs, associée à une pression de sélection de l'élimination immunitaire, conduit à l'émergence de cellules tumorales pourvues de mécanismes leur permettant d'échapper au contrôle du système immunitaire, ces dernières ne sont plus reconnues ni éliminées. Cet échappement est permis via divers moyens dont la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs tels que le TGF- β diminuant l'infiltration des lymphocytes cytotoxiques et des cellules NK, la perte de présentation de l'antigène (CMH de classe I) et la dérégulation des cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques ou encore par le recrutement de cellules inflammatoires immunosuppressives, y compris les cellules T régulatrices (Tregs) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) [52].

Instabilité génomique

L'acquisition de ces multiples traits dépend en grande partie de la succession d'altérations génomiques des cellules néoplasiques. Cette instabilité comprend des instabilités chromosomiques, des Instabilités micro-satellitaires, perte d'hétérozygotie etc. Elle est permise d'une part suite à la désactivation de la p53 et d'autre part par l'inactivation ou la répression des gènes de réparation et de préservation de l'intégrité de l'ADN [52].

Inflammation

La majorité des lésions néoplasiques contiennent des cellules immunitaires présentes à des densités allant d'infiltrations minimales à des inflammations macroscopiques. Toutefois, cette inflammation exerce un effet paradoxal permettant la progression tumorale [52].

Outre ces 10 hallmarks, les tumeurs comprennent également divers types de cellules non-tumorales indispensables à la progression tumorale appelées stroma ou microenvironnement tumoral. Il comprend le tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extracellulaire. Outre sa fonction de support, il est impliqué dans l'acquisition de certaines hallmarks : Par exemple les cellules endothéliales sont nécessaires à la vascularisation des tumeurs solides ou encore l'inflammation qui tient un rôle important dans la mise en place d'un microenvironnement tumoral décisif pour la progression de l'oncogenèse [52].

1.3.3. Bases moléculaires et génétiques de la cancérogenèse

Dans une cellule cancéreuse, les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation, dans l'adhésion et la migration, dans la survie et la mort, sont sujettes à diverses altérations géniques pouvant résulter en un avantage prolifératif qui sera sélectionné puis transmis à sa descendance. Ces altérations sont d'un intérêt capital actuellement en vue de leur utilité dans la thérapie ciblée. Elles sont localisées au niveau de trois principales familles de gènes qui ont un rôle crucial dans la transformation maligne : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN [53] (figure14).

Les oncogènes

Tout gène cellulaire, appelé proto-oncogène (c-onc), susceptible de devenir, suite à une modification qualitative ou quantitative, un gène transformant c.à.d. pouvant induire l'apparition et/ou le développement d'une tumeur. Les oncogènes comprennent plusieurs classes en fonction des oncoprotéines pour lesquels ils codent : les facteurs de croissance et leurs récepteurs, les tyrosines protéine-kinases etc. Il existe divers mécanismes d'activation tels que la Mutation ponctuelle, Réarrangement chromosomique, Amplification génique et modification épigénétique [53].

Gènes suppresseurs de tumeur (GST)

Ces gènes sont des inhibiteurs de la croissance cellulaire. Ils régulent négativement le cycle cellulaire et induisent l'apoptose. Les altérations moléculaires aboutissant à la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs sont multiples. On retrouve des mutations ponctuelles, des

délétions ou des inactivations par insertion d'un génome virale, Notons que la voie cellulaire la plus fréquemment altérée dans les cancers est celle contrôlant la transition G1/S et impliquant p53, p16 et RB, or les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides [53].

Gènes de réparation de l'ADN

Ils interviennent indirectement dans ce processus et sont répartis selon l'origine de la mutation en Système de réparation des mésappariements MMR et Système de réparation NER (Nucleotide Excision Repair). Leur inactivation conduit à une accumulation d'altérations géniques favorisant ainsi l'instabilité génétique caractéristique des cellules cancéreuses [53].

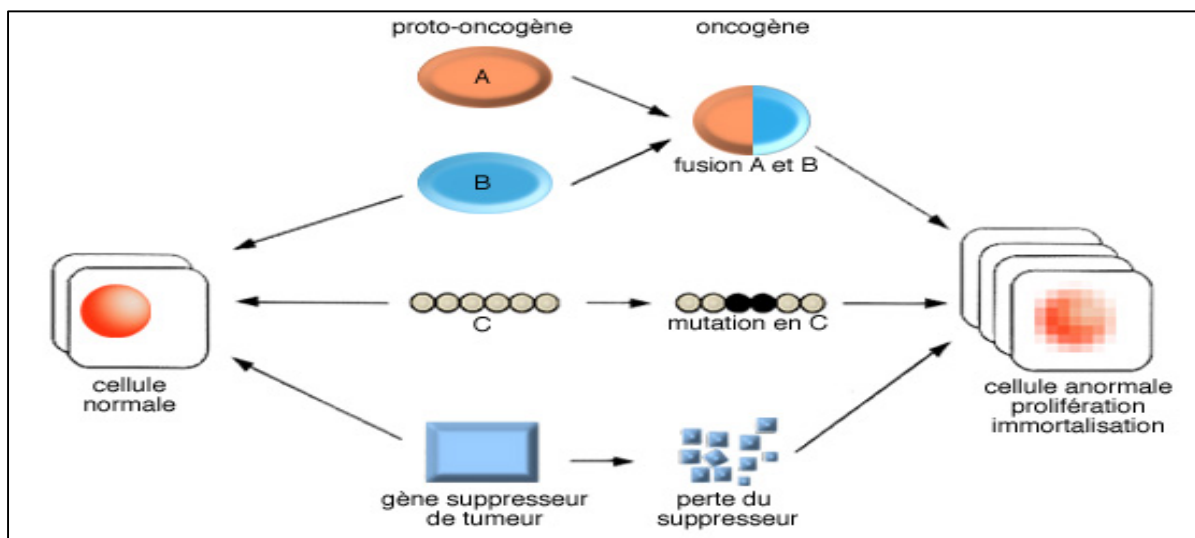


Figure 14 : Origine génétique de la transformation maligne. Ce schéma représente les deux familles de gènes impliqués dans la cancérogenèse à savoir les Proto-oncogènes qui une fois activés par mutation ponctuelle ou translocation génique deviennent des oncogènes favorisant la transformation maligne. Et les gènes suppresseurs de tumeurs qui perdent leurs activités de suppression tumorale suite à diverses altérations.

1.3.4. Cancérogenèse viro-induite

Les virus oncogéniques sont de types très divers, appartenant à des familles différentes tout comme la nature des cancers induits (Tableau 6). Le premier oncovirus à avoir été identifié est l'EBV en 1964 chez des patients atteints du lymphome de Burkitt [2]. Les virus clairement établis à l'heure actuelle comme étant des virus oncogéniques chez l'homme sont en nombre de sept : Human T-cell Leukemia virus-1 *HTLV1* ; virus de l'hépatite B HBV et C *HCV* ; Kaposi's sarcoma associated herpesvirus *KHSV* ; Epstein-barr virus *EBV* ; human

papillomavirus *HPV* et Merkel cell polyomavirus *MCL*. Les cancers viro-induits partagent trois caractéristiques principales [2] :

- Les oncovirus jouent un rôle essentiel, mais ils ne sont pas suffisants pour initier le développement de ces cancers, il existe également un effet synergique entre certains virus et des cofacteurs le plus souvent environnementaux. Ces facteurs peuvent inclure des expositions à des substances cancérigènes, des altérations du système immunitaire ou des prédispositions génétiques.
- Le cancer se développe seulement plusieurs années après une infection aiguë et uniquement lorsque l'infection persiste et échappe au système immunitaire de l'organisme hôte.
- Le système immunitaire peut jouer un rôle paradoxal selon le type de cancer. Certains cancers se développent dans un environnement d'immunosuppression, tandis que d'autres surviennent dans un contexte d'inflammation chronique où cette inflammation contribue fortement à la promotion de la croissance des tumeurs.

Tableau 6 : Les virus oncogènes et les principaux cancers associés.

Oncovirus	Cancers associés
HBV	Carcinome hépatocellulaire
HCV	Carcinome hépatocellulaire
HTLV1	Leucémie à cellules T/ Lymphomes
MCV	Carcinome à cellule de Merkel
HPV	Cancers du col de l'utérus, de la vulve et du vagin, du pénis ; cancers des voies aérodigestives supérieures
KHSV	Sarcome de Kaposi, lymphome primaire diffus
EBV	Lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin, lymphomes à cellules T et NK ; carcinomes du nasopharynx et de l'estomac

L'étude des mécanismes moléculaires utilisés par les oncoprotéines virales est actuellement un domaine de recherche très actif. Le développement des cancers viro-induits semblablement aux autres cancers résulte d'un processus complexe et multi-étapes. Les virus oncogéniques, codent des éléments tels que des protéines virales ou micro-ARNs qui interagissent avec des protéines cellulaires. Cela leur permet de moduler plusieurs voies de signalisation et de mener leur cycle de réplication à terme, favorisant ainsi le développement tumoral [54]. En fonction du virus, ces oncoprotéines peuvent exercer leurs effets selon des mécanismes directs ou indirectes, à différents stades de la formation de la tumeur [55]. Elles peuvent influencer un stade précoce de l'oncogenèse en provoquant des altérations génétiques qui initient la tumeur. Alternativement, elles peuvent agir à des stades plus avancés en modulant les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de l'immortalité répliquative, etc. conduisant à la promotion de la tumeur (Figure 15).

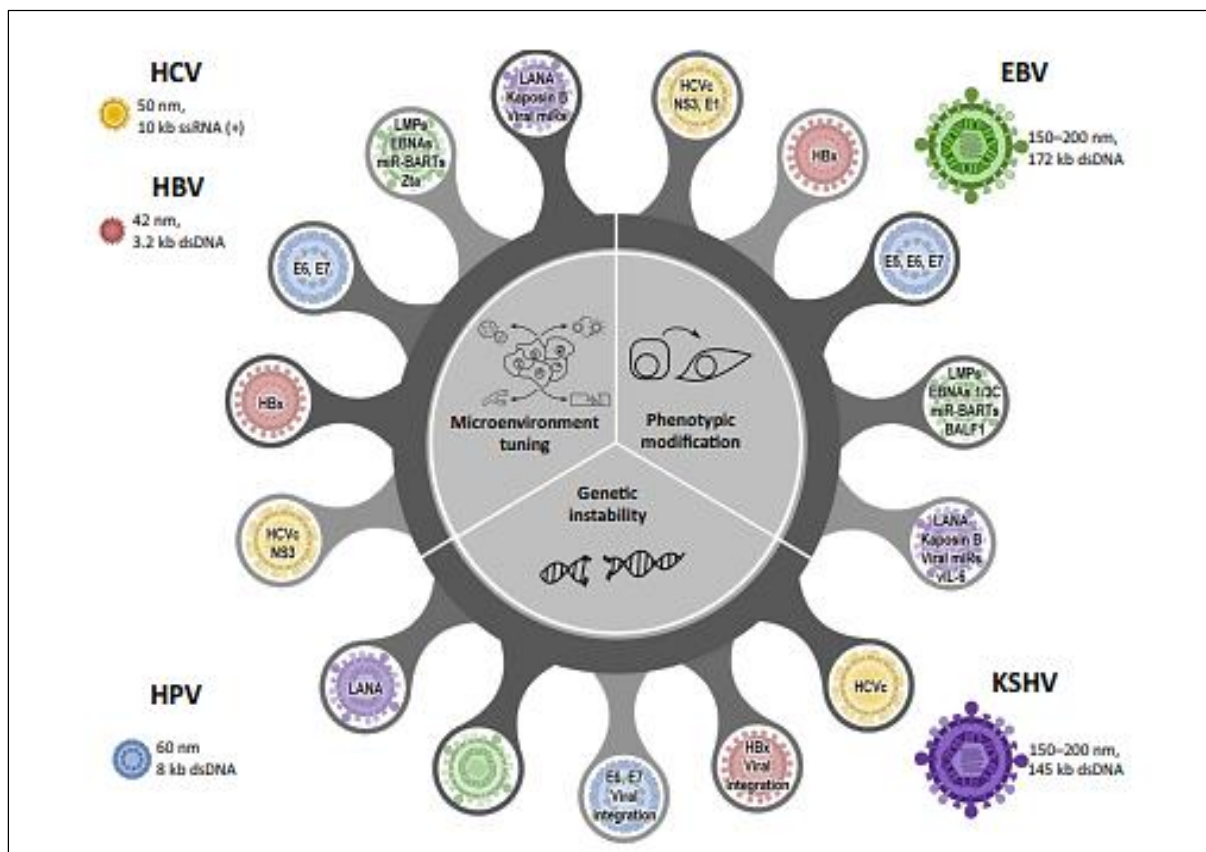


Figure 15 : Mécanismes de la progression tumorale par les oncovirus HBV HCV HPV EBV KSHV [56]. Ces virus oncogènes peuvent notamment grâce à leurs produits viraux jouer un rôle dans la progression tumorale et ce par le biais de divers mécanismes comprenant l'induction d'instabilité génétique, les modifications phénotypiques et la modulation du microenvironnement tumoral.

1.4. Immunobiologie du cancer

Le rôle essentiel de la réponse immunitaire dans la protection de l'organisme contre les tumeurs est bien établi. Cette réponse implique la collaboration entre l'immunité innée et l'immunité acquise et serait responsable du contrôle de la majorité des tumeurs formées en particulier pendant la phase initiale de leur apparition. Cette phase précoce est désignée par phase d'élimination dans le processus d'immuno-surveillance ou d'immuno-édition (figure 16) [57]. Cependant, comme précédemment mentionné, certaines cellules tumorales parviennent à inhiber la réponse immunitaire via des interrupteurs, servant à moduler la réponse de l'organisme, appelés des "points de contrôle immunitaire" ou checkpoint et à détourner la réponse immunitaire à son avantage. Ce qui conduit aux phases d'équilibre puis d'échappement caractérisée par un microenvironnement hautement immunosuppresseur qui favorise la progression tumorale, notamment par la sécrétion de cytokines. Ainsi, le système immunitaire joue d'une part un rôle prépondérant dans l'élimination des tumeurs mais en contrepartie il peut favoriser leur progression et leur hétérogénéité [58]. Cette dualité d'action sera illustrée ci-dessous par deux mécanismes établis par le système immunitaire, l'inflammation et les agents de restriction immunitaire APOBECs. Impliqués principalement dans la défense anti pathogènes mais qui dans un contexte tumoral permettent le développement et la progression vers un phénotype plus agressif.

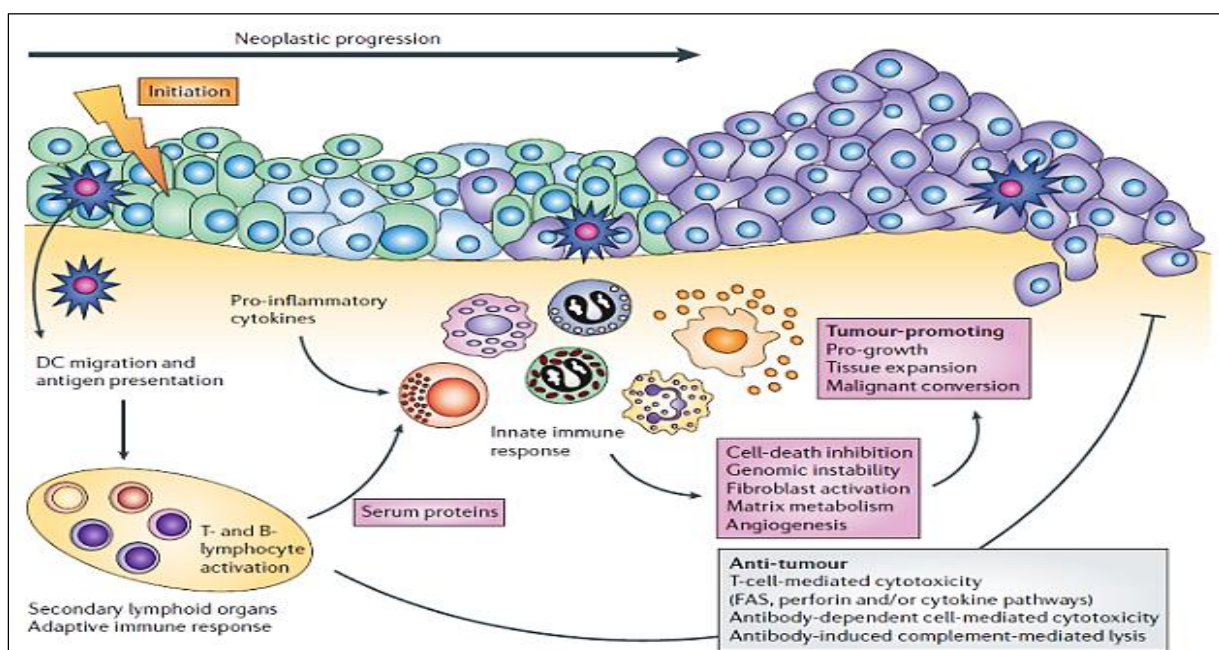


Figure 16 : Interactions tumeurs et système immunitaire [57]. Les tumeurs interagissent continuellement avec le système immunitaire. Si divers composants du système immunitaire sont impliqués dans l'immunité antitumorale, d'autres sont au contraire impliqués dans la progression tumorale.

1.4.1. Inflammation et progression tumorale

La réponse inflammatoire est la réaction des tissus vivants et vascularisés face à une agression. Elle est déclenchée par les cellules présentes dans la zone lésée, ce qui entraîne la mobilisation coordonnée de cellules inflammatoires vers le site endommagé. Ces cellules participent à la réparation et à la reconstruction des tissus, et une fois ces processus achevés la réaction inflammatoire est résorbée. Dans un contexte tumoral, l'inflammation est l'une des caractéristiques fondamentales ou « *Hallmark* » des cellules cancéreuses. Elle est persistante et agit comme un puissant promoteur de la progression de l'oncogenèse. Les cellules tumorales exploitent le processus inflammatoire à leur avantage en sécrétant des facteurs inflammatoires, tels que le PDGF qui recrute des macrophages au sein de la tumeur, entraînant notamment le remodelage de la matrice extracellulaire via les métalloprotéases. Par ailleurs, l'inflammation stimule la prolifération et la survie des cellules cancéreuses, favorise l'angiogenèse et l'invasion tumorale [59]. Au sein du microenvironnement tumoral, on observe paradoxalement et simultanément une augmentation des médiateurs de l'inflammation versus une diminution de la réponse immunitaire antitumorale. Ces médiateurs sont essentiels à l'initiation, la progression, la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et aux métastases du cancer, et sont impliqués dans des voies de signalisation cellulaire bien caractérisées comme NF- κ B, MAPK, JAK-STAT et PI3K-AKT [60].

Le déclenchement et la persistance de ce processus inflammatoire peuvent être causés par plusieurs causes :

- L'inflammation résulte des tumeurs elles-mêmes. Dans ce cas elle joue le rôle de promoteur du développement tumoral [60].
- Une dysrégulation du système immunitaire aboutissant au déclenchement de pathologies inflammatoires chroniques qui selon plusieurs études favoriseraient l'apparition de tumeurs comme chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [61].
- Une inflammation chronique pourrait également faire suite à une infection persistante par un agent infectieux, celle-ci initierait la tumorigenèse ou favoriserait sa progression. C'est le cas notamment pour certains oncovirus tels que le virus de l'hépatite B (HBV), le virus de l'hépatite C (HCV) et serait l'un des mécanismes d'oncomodulation médiée par le cytomegalovirus humain (HCMV) [62] [63].

Toutefois, rappelons que l'inflammation permet le recrutement de cellules immunitaires dont certaines sont capables d'éliminer les cellules cancéreuses. Actuellement la majorité des traitements par immunothérapie permettraient au système immunitaire de réapprendre à identifier et à détruire les cellules cancéreuses notamment en ciblant les checkpoints. Par conséquent la mobilisation de ce type de cellules immunitaires permettrait à l'inflammation d'exercer un rôle antitumoral [64].

1.4.2. APOBEC et hétérogénéité tumorale

Il est communément établi que l'acquisition des différents « hallmarks » des cellules tumorales se fait par des mutations soit spontanées inhérentes à la réplication, soit induites par agent mutagène interne ou externe. De façon intéressante, les données de séquençage à haut débit ont révélé qu'il existe une diversité inter et intra tumorale au niveau génomique, conférant à chaque type une signature mutationnelle propre [65]. En outre, ces mutations ne sont pas toujours dispersées au hasard, et peuvent se produire en même temps regroupées dans des régions spatiales proches et coordonnées sur un même brin, créant des motifs caractéristiques appelées « kataegis » ou mutation en grappe [66]. Les membres de la famille des APOBECs (enzyme d'édition d'ARNm de l'apolipoprotéine B, qui se comporte comme un polypeptide catalytique) ou (Apolipoproteins B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) sont des enzymes à activité cytidine désaminase et qui font partie de ces agents mutagènes internes qui répondent parfaitement à ces critères.

Ces enzymes à la structure uniforme mais aux fonctions divergentes, sont principalement connues en tant qu'acteurs clés de l'immunité naturelle et adaptative. En effet, ils tiennent une importance capitale dans la restriction virale ainsi que la diversité et la commutation de classe des immunoglobulines, pilier de l'immunité adaptative [67]. La découverte de leur mode d'action a permis de clarifier le processus moléculaire conduisant à l'accumulation de mutations qui favorisent la survie, prolifération et l'invasion tumorale. En effet, la présence récurrente de mutations C \geq U (transition de la base cytidine en uridine) dans différentes pathologies cancéreuses a mis en évidence leur rôle dans le développement et l'évolution clonale du cancer [68]. Leur activité de désaminase de l'ADN et de l'ARN conduit à l'apparition de dommages génomiques représentés par les SNP ou « Single nucleotide polymorphism », l'altération génétique la plus fréquemment retrouvée dans le génome humain. De ce fait, ces agents de l'immunité peuvent créer une importante hétérogénéité au sein des tumeurs ; leur conférant un atout pour leur développement et un levier pour l'amplification de leur agressivité.

Dans des conditions physiologiques, leur activité est induite par des cytokines produites lors de la réponse inflammatoire dirigée contre les infections. Bien que les raisons de leur activation dans un contexte tumoral soient encore mal connues, des études plaident en faveur de la contribution d'une inflammation chronique ou d'une infection virale persistante (figure17) [69]. Parallèlement à son activité de mutagenèse au sein des cellules tumorales, l'activation des APOBECs par certaines cellules immunitaires comme les macrophages via les interférons, peut interférer en faveur d'une polarisation type M1 des macrophages, caractérisée par une activité pro-inflammatoire et potentiellement antitumorale [70]. Par ailleurs, les APOBEC pourraient potentiellement provoquer des niveaux de mutation cellulaires au-dessus du seuil de tolérance cellulaire, entraînant une cascade apoptotique et une destruction directe des cellules tumorales [71]. Ceci illustre parfaitement le rôle complexe et paradoxal de ces enzymes au sein des tumeurs, toutefois, ils offrent une opportunité significative pour les thérapies cytotoxiques et immunitaires.

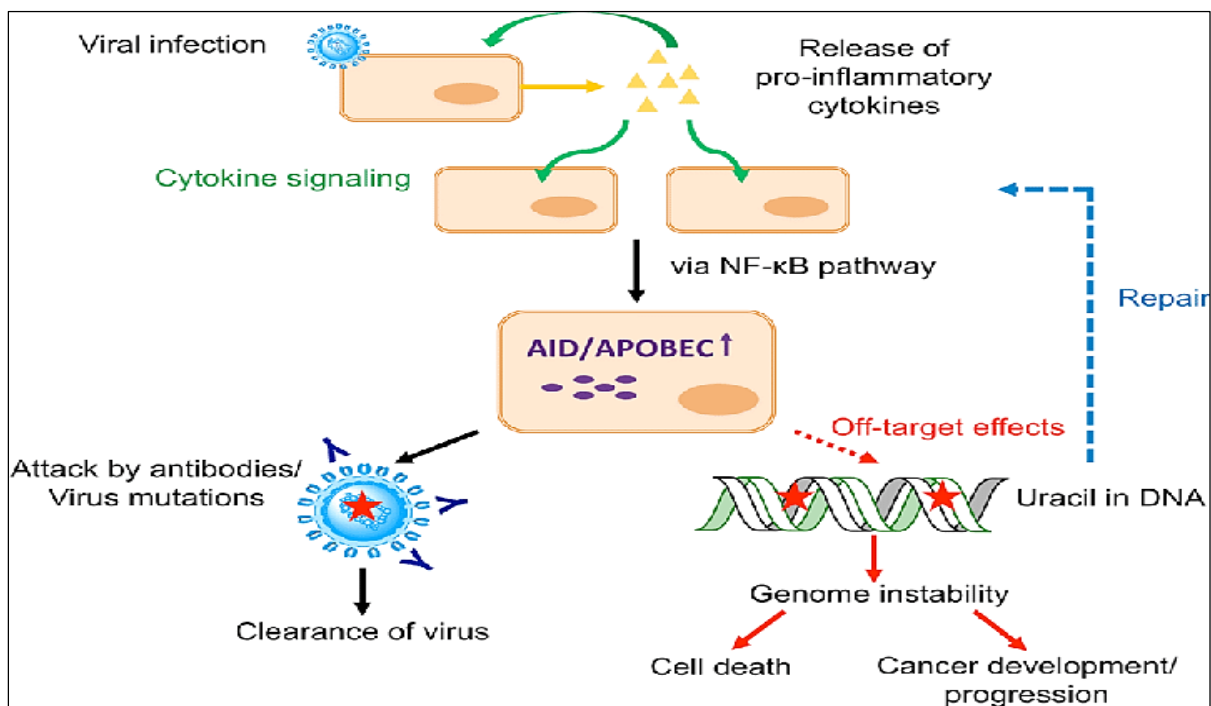


Figure 17 : Infection virale APOBEC et cancer [69]. Durant une infection virale, les membres de la famille APOBEC sont activés suite à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Ces derniers, induisent des altérations au niveau du génome virale et induisent le processus d'hypermutation somatique qui est à la base de la diversité et de la maturation de l'affinité des anticorps permettant alors d'endiguer l'infection virale. Les altérations hors cible entraînent des mutations et des cassures de brins d'ADN générant une instabilité du génome qui peut aboutir à la mort cellulaire ou à une transformation maligne.

2. Cancers Colorectaux (CCR)

Le cancer colorectal (CCR) constitue par sa fréquence et par sa gravité, un problème de santé publique majeur. Ci-dessous, nous présenterons le cancer colorectal en général puis nous décrirons les plus importantes caractéristiques moléculaires de cette pathologie.

2.1. Définition

Le cancer colorectal représente une tumeur maligne se développant à partir de la muqueuse du côlon ou du rectum, il peut toucher tous les segments anatomiques du gros intestin comme le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum. Dans la majorité des cas, ils se développent à partir d'une lésion précancéreuse appelée adénome, une tumeur épithéliale bénigne comportant des degrés variables de dysplasie [72].

Les symptômes de la maladie dépendent de l'emplacement de la tumeur et de son stade. Initialement, le cancer est asymptomatique. Les symptômes typiques du cancer colorectal sont un saignement, une anémie ferriprive, l'alternance entre diarrhée et constipation, ainsi qu'une perte de poids.

2.2. Epidémiologie

D'après une récente étude menée par les chercheurs de la IARC sur 185 pays, ils estiment qu'en 2020 plus de 1,9 million de nouveaux cas de cancer colorectal et plus de 930 000 décès dus au cancer colorectal sont survenus dans le monde. De grandes variations géographiques des taux d'incidence et de mortalité ont été observées. Les taux d'incidence étaient les plus élevés en Europe, en Australie et en Nouvelle-Zélande, et les taux de mortalité étaient les plus élevés en Europe de l'Est (figure 18). Les auteurs prédisent que d'ici 2040, le cancer colorectal passera à 3,2 millions de nouveaux cas par an (une augmentation de 63 %) et 1,6 million de décès par an (une augmentation de 73 %). Malgré la mise en place de stratégies et de programmes de dépistage efficaces dans les pays à revenu élevé, le cancer colorectal demeure une maladie couramment diagnostiquée ; des taux d'incidence croissants sont observés chez les jeunes adultes et dans les pays en transition économique [73].

En Algérie, les efforts de dépistage et de sensibilisation sont encore en cours de développement, mais des initiatives sont en place pour améliorer l'accès aux tests de dépistage et pour encourager les personnes à être plus conscientes de leur santé colorectale.

2.2.1. Incidence et mortalité

À l'échelle mondiale, le cancer colorectal (CCR) est le deuxième et le troisième cancer le plus fréquent chez les femmes et les hommes, respectivement. Avec un sexe-ratio hommes/femmes de 1 pour le cancer du côlon et de 2 pour le cancer du rectum. Il représente la 3ème cause de mortalité par cancer dans le monde. Le CCR survient majoritairement après 50 ans (5 % de cas de cancers colorectaux avant cet âge), avec un âge moyen au diagnostic de 70 ans. Le taux de survie global (sur 5 ans) est de l'ordre de 60% après le diagnostic et est fortement lié au stade de la maladie, il passe de plus de 90% pour les cancers de stade I à 10% pour les cancers stade IV (GLOBOCAN2020). Toutefois, une majorité de ces cancers est diagnostiquée à un stade avancé, d'où l'intérêt d'un dépistage pour précoce, améliorant ainsi son pronostic quand le traitement peut être mis en place au début de la maladie.

En Algérie, c'est le deuxième cancer le plus fréquent pour les deux sexes avec une incidence atteignant le 13.5 (exprimée en ASR). Selon les tendances épidémiologiques actuelles, ces incidences alarmantes sont susceptibles d'augmenter encore à l'avenir [74].

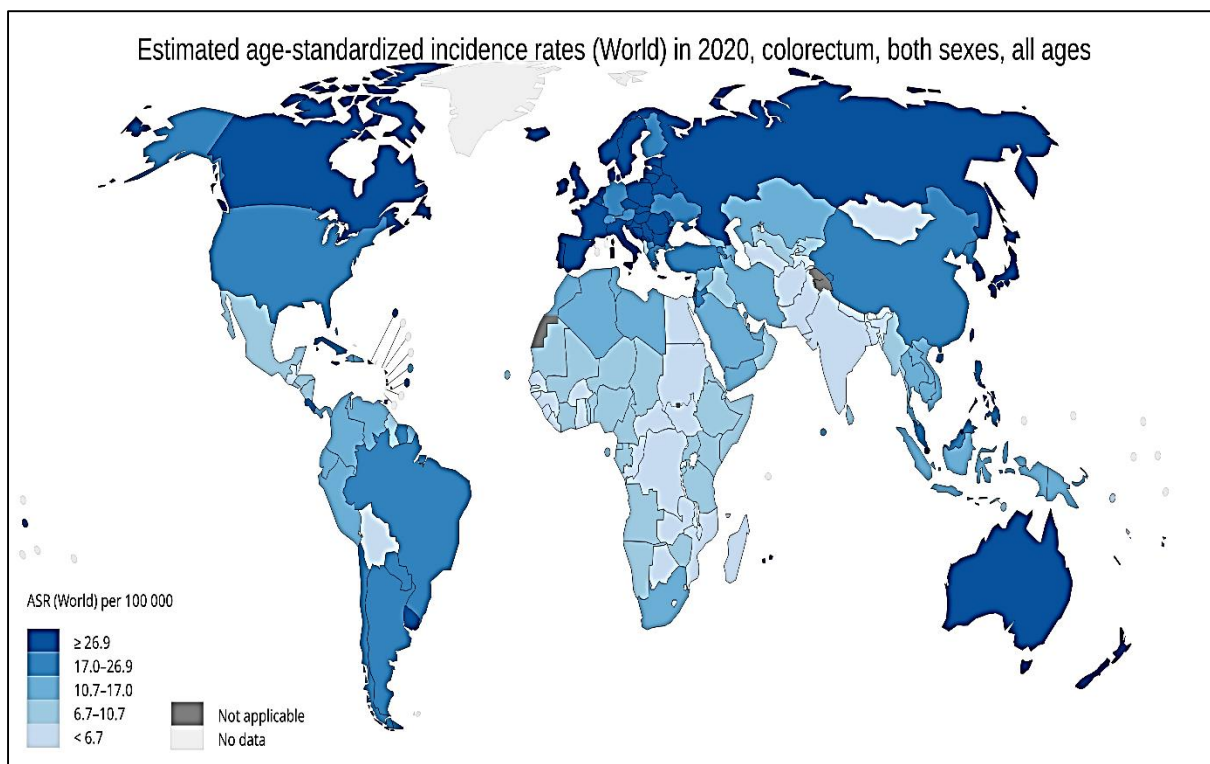


Figure 18 : Carte de l'incidence mondiale des cancers colorectaux (GLOBOCAN 2020). L'incidence du cancer colorectal varie d'un pays à l'autre du fait des différences dans le mode de vie des populations, le type d'alimentation et la prédisposition héréditaire.

2.2.2. Facteurs de risque et formes héréditaires

Plusieurs études suggèrent que le cancer colorectal résulte d'une série de facteurs, qui sont non seulement hérités, mais aussi acquis au cours de la vie de l'individu comme l'environnement et le mode de vie de plus en plus occidental [74].

Facteurs de risque

Les facteurs de risques du cancer colorectal sont multiples, on retrouve parmi ces facteurs : L'âge >50 ans, le surpoids, une alimentation riche en graisse animale, l'alcool, le tabac, l'inactivité physique et la consommation importante de viande rouge ou de viandes transformées (>500g par semaine).

Par ailleurs, les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif telles que la rectocolite hémorragique RCH ou la maladie de Crohn, principalement les pancolites évoluant depuis plus de 10 ans, présentent un risque accru de transformation cancéreuse.

Actuellement, plusieurs études tendent à démontrer l'implication de certains agents infectieux dans le développement des CCR. Comme l'HBV, HPV et plusieurs herpesvirus [75].

Formes héréditaires :

Certains caractères à transmission héréditaire autosomique sont responsables d'un risque accru de CCR. Ces formes familiales représentent moins de 10 % des cancers du côlon et du rectum, et touchent souvent des individus plus jeunes que les formes sporadiques. Parmi les différents syndromes génétiques impliqués dans la genèse du cancer colorectal, on retrouve le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC ou syndrome de Lynch) et la polypose adénomateuse familiale (PAF) qui constituent la majorité des syndromes héréditaires du cancer colorectal, mais aussi la polypose associée au gène MYH (PAM), les syndromes de polypose hamartomateuse (Peutz-Jeghers) et la polypose juvénile et la maladie de Cowden [75].

2.3. Carcinogénèse des CCR

Les tumeurs colorectales comme la plupart des tumeurs, se développent via un processus en plusieurs étapes impliquant des séries de changements histologiques, morphologiques et génétiques qui s'accumulent au cours du temps. Le développement de cette tumeur, à travers les différentes couches de la paroi du côlon ou rectum, est un point clé pour orienter la meilleure stratégie thérapeutique à mettre en place [50].

2.3.1. Histologie Moléculaire des CCR

Selon *Vogelstein et al* [50], des événements génétiques spécifiques pourraient être à l'origine des changements morphologiques des tissus. L'épithélium intestinal ayant un grand taux de multiplication cellulaire, est par conséquent vulnérable aux transformations malignes (figure 19). L'adénocarcinome représente la forme histologique la plus commune. Il existe également d'autres tumeurs non épithéliales moins fréquentes telles que les tumeurs stromales et les lymphomes. L'examen anatomo-pathologique permet de définir le niveau d'invasion de la tumeur dans la paroi, l'extension ganglionnaire et le caractère complet ou non de l'exérèse chirurgicale. Ces paramètres ont un Intérêt capital dans la stratégie thérapeutique.

Les CCR surviennent sporadiquement dans la majorité des cas, seulement 5 à 10 % sont dus à des mutations héréditaires au niveau de gènes bien caractérisés et liés au cancer (figure20). Cependant, jusqu'à 25 % des patients ont des antécédents familiaux de CCR, ce qui suggère une contribution spécifique de gènes qui n'ont pas encore été identifiés [76]. La cancérogenèse colorectale sporadique est liée au mode de vie et les facteurs environnementaux qui peuvent générer une accumulation de mutations somatiques séquentielles conduisant à une instabilité génomique. La perte de l'intégrité génomique facilite l'accumulation de mutations multiples lors du développement des CCR. Au niveau moléculaire, cela se traduit par un groupe très hétérogène de maladies.

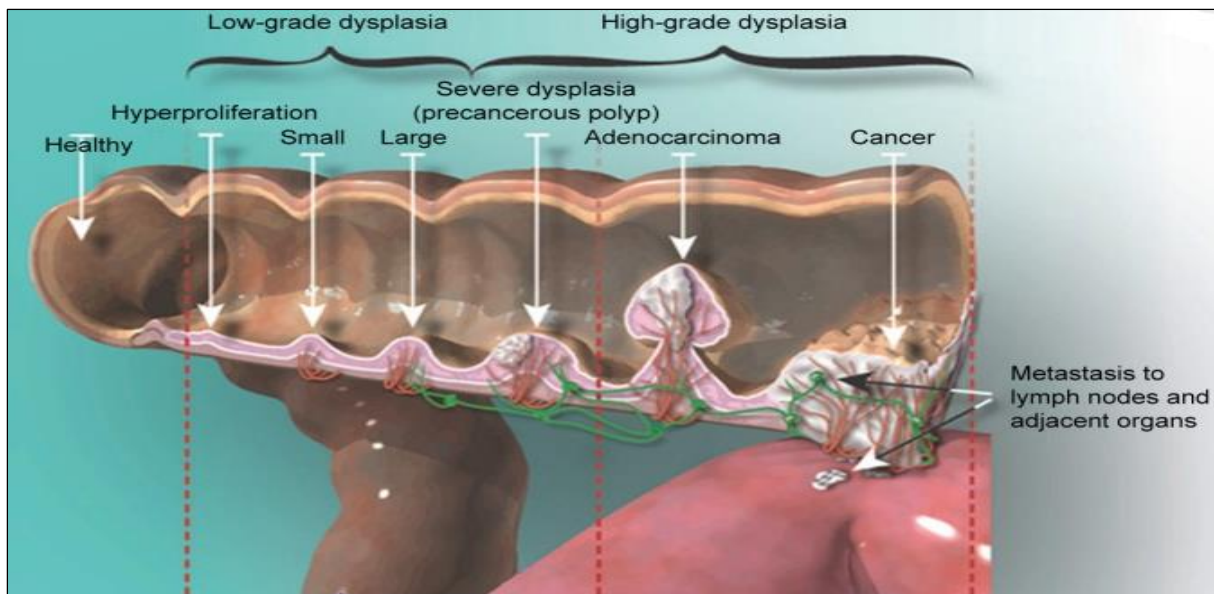


Figure 19 : Stades histologiques du développement du cancer colorectal [72]. Cette figure illustre les différents changements histologiques qui surviennent au niveau de la muqueuse du colon/rectum au cours du développement d'une pathologie cancéreuse.

Les CCR sporadiques peuvent découler d'un ou de la combinaison de trois mécanismes moléculaires différents [77] :

- L'instabilité chromosomique ou CIN (Cancer chromosome instability) : responsable d'une perte importante du nombre de copies de gènes ou d'un fragment de chromosome lors des phénomènes de mitoses. Ils représentent environ 65 à 70% des CCR sporadiques. Ils sont caractérisés par une aneuploïdie, des pertes alléliques fréquentes, ainsi que de nombreuses mutations activatrices d'oncogènes ou inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs. La voie CIN classique débute par l'inactivation germinale ou de novo du gène APC suivie par la mutation secondaire de l'oncogène KRAS qui favorisera la progression tumorale puis, de l'inactivation du gène suppresseur tumoral TP53.
- Le phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP) : anomalie plus récemment identifiée. Elle concerne 20 à 30 % des tumeurs sporadiques. Ce phénotype entraîne l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation de leurs promoteurs.
- L'instabilité micro-satellitaire secondaire à une instabilité génétique ou MSI (microsatellite instability) : due à l'altération des gènes de réparation de l'ADN, précisément la défaillance du système de détection et de réparation de mésappariement des bases de l'ADN : système MMR. Ces MSI entraîneraient la réplication de séquences d'ADN répétitives dans des régions courtes non codantes (microsatellites) desquelles peut découler des mutations génétiques ultérieures. Les quatre gènes clés de ce système sont : mut L homologue 1 (MLH1), mut S homologue 2 (MSH2), mut S homologue 6 (MSH6) et postmeiotic segregation increased 2 (PMS2).

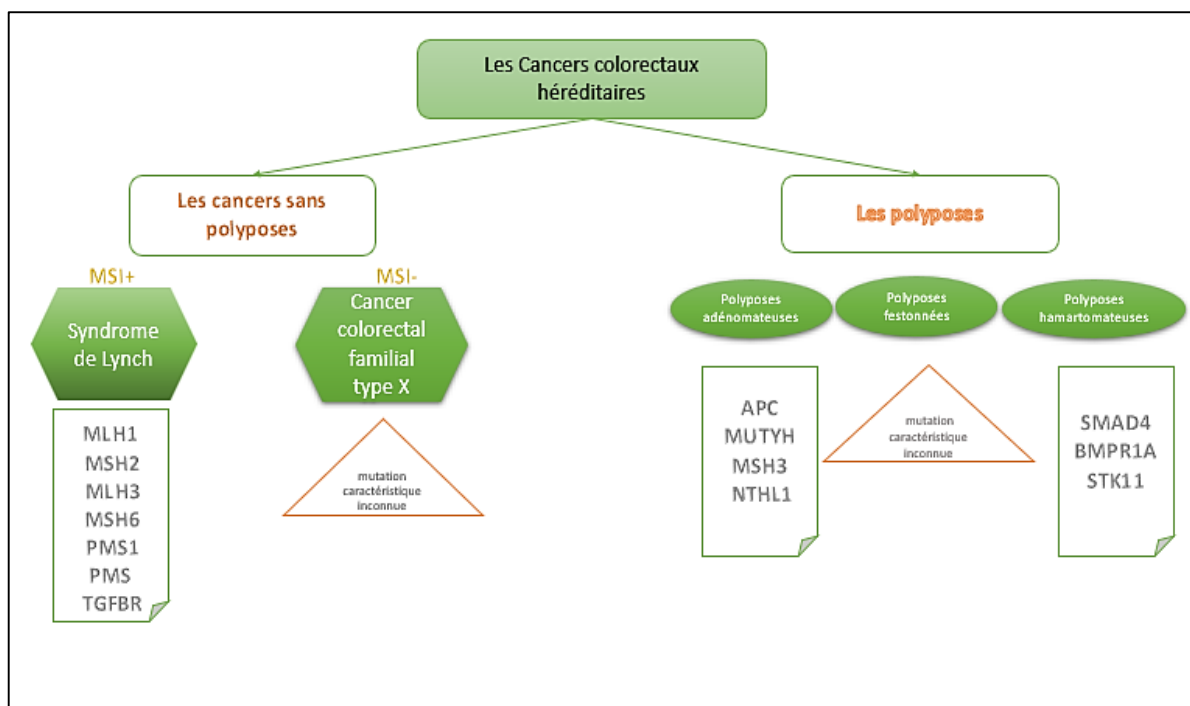


Figure 20 : Cancers colorectaux héréditaires. Cette figure représente les principaux types de cancers à composante héréditaire avec les principaux gènes mutés reliés au développement de la pathologie [76].

2.3.2. Voies de signalisations altérées

Certaines des altérations génétiques impliquées dans le développement de cancer colorectaux se produisent au niveau de gènes qui sont impliqués dans des voies de signalisation importantes. Ainsi, on observe la stimulation des voies qui activent la prolifération cellulaire comme la voie Wnt aboutissant à l'accumulation de la β -caténine [78], et la voie RTK [récepteurs à activité tyrosine kinase] activée par la surexpression du récepteur EGFR mais aussi par des mutations des proto-oncogènes KRAS et BRAF. A l'inverse, les voies permettant la réparation de l'ADN à travers différents systèmes comme le (DNA Mis-Match Repair : MMR), et de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose notamment via l'altération des voies TGF β et de p53 sont inactivées [77]. Ci-dessous (la figure 21) décrit les voies de signalisations les plus fréquemment altérées dans le CCR.

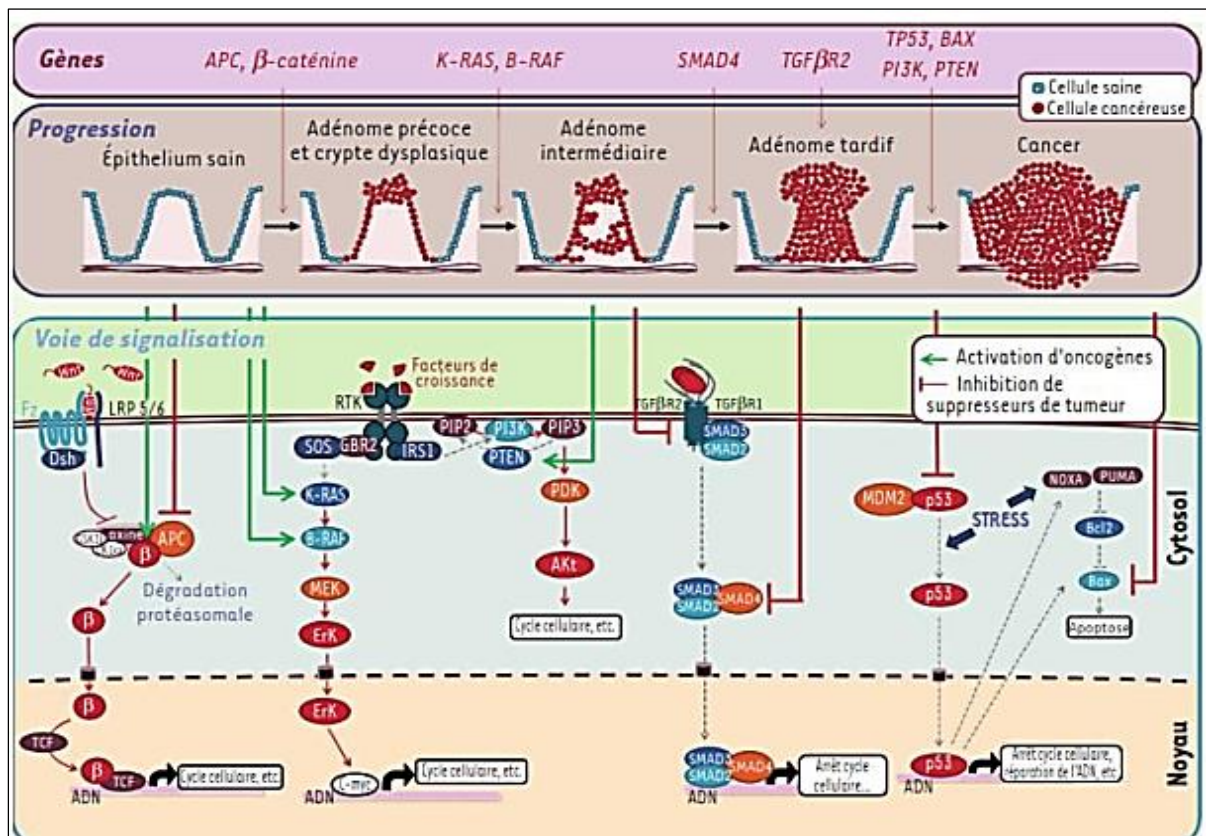


Figure 21 : Voies de signalisations altérées dans le cancer colorectal [79]. Plusieurs voies de signalisation moléculaires altérées sont impliquées dans l'apparition des CRC, tels que Wnt / APC / β -caténine, phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / AKT / glycogène synthase kinase-3 (GSK-3 β), facteur de croissance transformant- β (TGF) - β / Smad, NF- κ B ou gènes de réparation de mésappariement (MMR). Ces altérations confèrent une susceptibilité individuelle au cancer et sont responsables de la réactivité ou de la résistance aux agents antitumoraux.

2.4. Traitement

Il existe plusieurs approches pour traiter le cancer colorectal, notamment la chirurgie, la radiothérapie (pour les cancers du rectum) et la chimiothérapie. Cependant, ces tumeurs présentent une grande hétérogénéité ce qui rend difficile et inefficace l'utilisation de traitements uniformes. C'est pourquoi il est crucial d'adopter une approche de prise en charge personnalisée et de développer des thérapies ciblées. Actuellement, ces thérapies reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui peuvent cibler l'angiogenèse en inhibant le VEGF (facteur de croissance endothéliale vasculaire) ou bloquer la division cellulaire en se liant à l'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique). En pratique, ces thérapies ciblées sont souvent utilisées en combinaison avec la chimiothérapie pour traiter les cancers colorectaux avancés. D'autres thérapies s'appuyant sur l'immunothérapie comme le développement d'inhibiteurs des points de contrôles de l'immunité « immune checkpoints » sont en cours d'évaluation mais présentent d'ores et déjà des résultats très prometteurs dans le traitement des cancers colorectaux [80].

3. Tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales, constituent un groupe génotypiquement et phénotypiquement hétérogène. Elles représentent, malgré leur rareté relative, un problème de santé publique à cause de la mortalité et de la morbidité qui les accompagnent. Ci-dessous nous présenterons succinctement les particularités cliniques ainsi que les aspects moléculaires qui sous-tendent le développement de ces tumeurs.

3.1. Définition

Une tumeur cérébrale (TC), communément appelées tumeurs du système nerveux central, est le résultat d'une succession de divisions incontrôlées des cellules spécialisées qui constituent les tissus du SNC ou des méninges. On distingue les tumeurs cérébrales primaires qui se développent au dépend du parenchyme cérébral des tumeurs cérébrales métastatiques ou secondaires qui proviennent d'un autre organe, tel que les poumons, les seins, les reins ou la peau. Les tumeurs cérébrales peuvent être bénignes ou malignes. Néanmoins, en raison de la rigidité du crâne, elles peuvent engendrer des complications graves dans les deux cas et éventuellement engager le pronostic vital du patient atteint. Les types les plus fréquents de tumeurs cérébrales sont les gliomes, les méningiomes, et les médulloblastomes [81].

Les manifestations cliniques d'une tumeur cérébrale sont variables. Elles dépendent essentiellement de sa localisation, de son volume ou de la présence d'un œdème. Ainsi, une

tumeur localisée dans le lobe frontal entraîne des troubles du comportement, tandis que dans l'hypothalamus elle cause des déficits endocriniens, etc. Outre ces paramètres, l'accessibilité au traitement chirurgical et le degré de son agressivité conditionneront le pronostic [82].

3.2.Epidémiologie

Les études épidémiologiques portant sur les tumeurs cérébrales primitives qu'elles soient descriptives, causales ou cliniques, doivent être faites par types et sous-types histologiques, car leurs causes, leurs facteurs pronostiques et leurs traitements sont spécifiques, rendant la collection de données extrêmement ardue, et justifiant l'insuffisance des études portant sur les TC.

3.2.1. Incidence et mortalité

Les tumeurs cérébrales touchent les adultes à tout âge ainsi que les enfants, bien que les sous-types prédominants et la fréquence des localisations diffèrent. Chez les adultes, Les TC représentent 2 à 3% de l'ensemble des cancers, elles surviennent le plus souvent entre l'âge de 50-70 ans et les hommes sont plus sujets que les femmes à développer la plupart des tumeurs cérébrales excepté pour les méningiomes [83]. Chez les enfants, elles représentent les tumeurs solides les plus fréquentes et la première cause de mortalité [84]. Selon GLOBOCAN 2020, on a enregistré 308 102 nouveaux cas de TC avec 251 329 décès dans le monde.

Les données épidémiologiques récentes ont tendance à démontrer une augmentation de l'incidence globale des tumeurs du système nerveux central, particulièrement les gliomes du sujet âgé et les lymphomes cérébraux. L'incidence peut varier selon les études et le type histologique étudié, elle est également corrélée à la localisation géographique et l'ethnie ; si elle est plus élevée dans les pays industrialisés et les pays de l'Europe de l'ouest où les conditions socio-économiques sont élevées, elle est plus faible au Japon.

En Algérie, les études sur les tumeurs cérébrales sont très rares, les données provenant de GLOBOCAN 2020 montrent que les TC représentent 3 % de l'ensemble des cancers, atteignant 1 777 nouveaux cas et 1 478 décès, ce qui les place au 10^{ème} rang (vs 19 rang dans le monde) en termes d'incidence et au 7^{ème} en termes (vs 12 dans le monde) en termes de mortalité (tableau7).

3.2.2. Facteurs de risque

La diversité des types histologiques suggère une multiplicité de facteurs de risque dont très peu sont clairement démontrés, on distingue parmi les facteurs augmentent potentiellement le risque

de développer une tumeur cérébrale, des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques [83,85]. Parmi les facteurs intrinsèques on compte :

- L'Age et le sexe : Chez les adultes, bien qu'elles puissent survenir à tout âge, le risque de développer une TC augmente en vieillissant, de même il existe une dépendance entre l'apparition de certains sous types et le sexe du patient.
- La génétique : Il est estimé que 5% des tumeurs cérébrales sont liés à des facteurs héréditaires, certaines se développent en relation avec des syndromes héréditaires tels que la neurofibromatose, la maladie de Von Hippel Lindau, la sclérose tubéreuse de Bourneville, les syndromes de Turcot et de Li-Fraumeni. De plus, les études pangénomiques révèlent que certains polymorphismes, intéressant au moins 7 gènes comme CDKN2B et RTEL1 constituent un facteur significatif du risque de survenue de gliomes.
- Les troubles de développement embryonnaire peuvent engendrer des tumeurs cérébrales congénitales histologiquement bénignes ou malignes.

Concernant les facteurs extrinsèques, ils sont liés à l'environnement et peuvent être de nature physique, chimique ou biologique. Actuellement, les radiations ionisantes sont le seul facteur de risque indiscutable pour l'apparition d'une tumeur cérébrale. Plusieurs autres facteurs de risque environnementaux sont étudiés et débattus on cite :

- Les expositions aux radiations non ionisantes telles que les radiofréquences liées à l'utilisation du téléphone sans fil.
- L'exposition aux composés nitrés, les métaux lourds et les pesticides.
- Les Infections : certains virus comme le simian virus- SV40 (retrouvé dans des TC), le VIH ou encore le HCMV augmenteraient le risque de survenue de TC [35,86].

D'autres facteurs de risque ont été incriminés, sans preuve avérées comme les traumatismes crâniens, l'épilepsie, la proximité de lignes électriques à haute tension, des facteurs nutritionnels ou hormonaux, le tabac, l'alcool.

De façon intéressante ; des études suggèrent comme facteurs protecteurs contre le développement de TC, la présence d'un terrain atopique ou une maladie inflammatoire réduisant jusqu'à 30 % le risque de survenue d'un gliome [87].

Tableau 7 : Incidence mortalité et prévalence des tumeurs cérébrales en Algérie (GLOBOCAN2020)

Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site										
Cancer	New cases				Deaths				5-year prevalence (all ages)	
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop. (per 100 000)
Breast	12 536	1	21.5	5.62	4 116	2	12.5	1.96	38 886	179.22
Lung	4 774	2	8.2	1.41	4 333	1	13.2	1.29	5 006	11.42
Colon	3 811	3	6.5	1.05	2 174	3	6.6	0.55	9 263	21.12
Prostate	3 597	4	6.2	1.89	1 635	6	5.0	0.19	12 533	56.57
Bladder	3 201	5	5.5	0.93	1 861	5	5.7	0.45	8 823	20.12
Rectum	2 575	6	4.4	0.71	1 380	8	4.2	0.34	6 804	15.52
Stomach	2 396	7	4.1	0.68	1 947	4	5.9	0.54	3 482	7.94
Thyroid	2 170	8	3.7	0.51	310	20	0.95	0.07	7 145	16.29
Non-Hodgkin lymphoma	1 924	9	3.3	0.47	1 018	10	3.1	0.25	5 484	12.51
Brain, central nervous system	1 777	10	3.0	0.41	1 478	7	4.5	0.37	4 948	11.28
Leukaemia	1 683	11	2.9	0.35	1 115	9	3.4	0.25	4 925	11.23
Cervix uteri	1 663	12	2.8	0.93	930	12	2.8	0.57	4 499	20.74

3.3 Classification histo-moléculaire des TC

Les tumeurs cérébrales sont des pathologies à la grande variété histologique, pronostic et d'évolution variables. Elles sont habituellement classées en fonction de leur aspect histologique, de leur topographie et selon des paramètres moléculaires récemment ajoutés. La classification de référence est celle de l'OMS de 2021 qui se base sur les paramètres histologiques et moléculaires qui ont été introduits pour définir et caractériser les différents phénotypes [88].

On distingue selon leur origine :

- Les tumeurs d'origine neuro-épithéliale, elles prennent pour origine les neurones ou les cellules entourant les neurones (les cellules gliales). Dans ce cas, elles font partie de la famille des gliomes. Certaines tumeurs sont aussi mixtes, c'est-à-dire qu'elles sont composées d'un mélange de neurones et de cellules gliales. Les gliomes représentent la majorité de ces tumeurs.

- Les tumeurs des nerfs périphériques, proviennent des gaines des nerfs périphériques, Elles se développent aux dépens des nerfs crâniens et la majorité sont des schwanomes.
- Les tumeurs méningées primitives : le plus souvent se sont des méningiomes.
- Les tumeurs germinales et les tumeurs de la région sellaire ainsi que les lymphomes primitifs du Système nerveux central (SNC).

De par leur fréquence, leur gravité et les difficultés de traitement qu'ils posent. La majorité des études se concentrent sur les gliomes. Ils représentent 70% des tumeurs du SNC chez l'adulte et 30% des cancers pédiatriques. Ces tumeurs récidivent très fréquemment et sont pour la plupart, de mauvais pronostic avec une survie moyenne de douze mois pour la majorité des patients. La classification des gliomes est basée sur le type cellulaire prédominant (astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte) et selon leur degré de malignité croissant. On distingue les gliomes de bas grade (grade I et II) et les gliomes de haut grade comprenant l'anaplasique au grade III et les glioblastomes correspondants au grade IV.

Quatre sous-types moléculaires de glioblastomes (GBM) ont été identifiés. Le sous-type proneural, le sous-type neural, le sous-type mésenchymateux et le sous-type classique. Cette individualisation est basée sur les mutations et les biomarqueurs caractéristiques de chaque type et met en exergue la grande hétérogénéité au sein des glioblastomes (figure 22). Par ailleurs, on retrouve deux entités différentes au niveau de la pathogénie moléculaire, les GBM de novo et Les GBM secondaires qui se développent à partir de gliomes de bas grades.

3.4 Aspects moléculaires de la neuro-oncogénèse

L'oncogénèse des tumeurs cérébrales semble adhérer à la modélisation théorique de la transformation néoplasique. En conséquence, Il est généralement admis qu'une tumeur cérébrale est la conséquence d'une ou plusieurs mutations génétiques. Ces mutations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes aboutissent vraisemblablement au développement des TC [89]. Par ailleurs, de nouvelles études ont mis en évidence l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) grâce à des marqueurs spécifiques, pouvant donner naissance à des gliomes et joueraient un rôle clé dans la résistance de ces tumeurs aux thérapies conventionnelles [90].

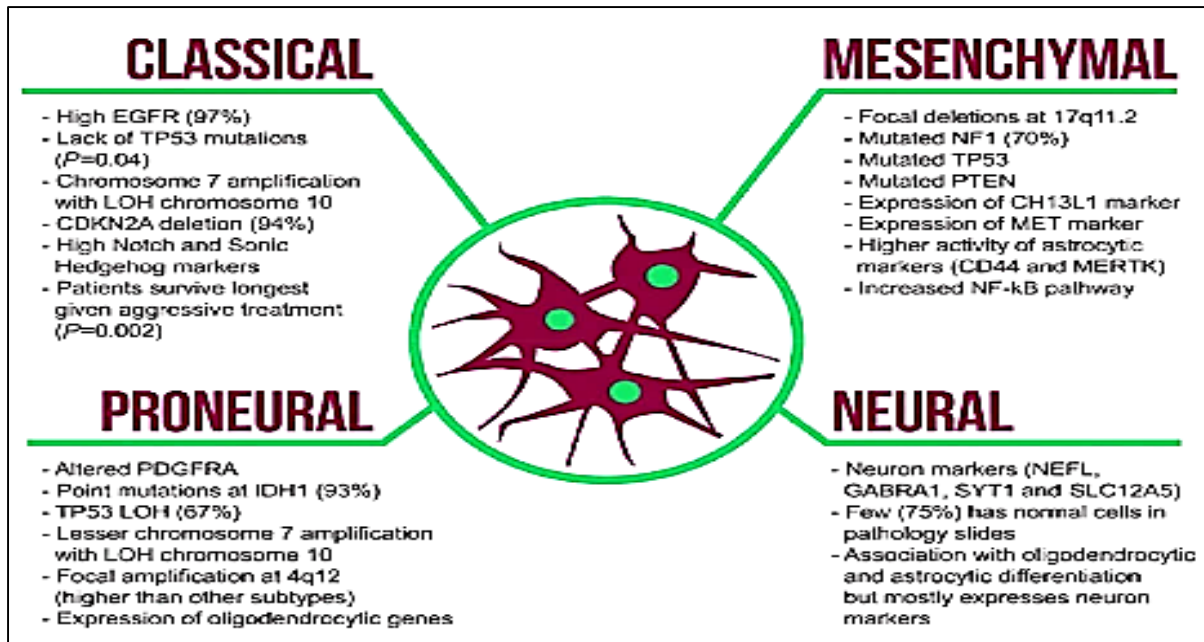


Figure 22 : Sous types moléculaires des glioblastomes [91]. Chaque sous type est représenté avec les principaux biomarqueurs moléculaires qui le distingue.

3.4.1 Altérations génétiques et épigénétique

Les explorations approfondies dans le domaine de la biologie moléculaire et de la génétique visant une meilleure compréhension des mécanismes de développement des tumeurs cérébrales ont dévoilé la présence de plusieurs altérations au niveau moléculaire.

Les gliomes par exemple, sont associés à l'altération de plusieurs voies de signalisation impliquant différentes protéines et aberrations chromosomiques distinctes en pathologie pédiatrique ou adulte. La gliomagenèse des tumeurs de l'adulte est liée à la présence de mutations des gènes IDH1/2 (isocitrate déshydrogénases), du gène TP53, ATRX (alpha-thalassémie/retard mental lié à l'X) et de la Co-délétion 1p19q, en plus de la récurrente méthylation de l'enzyme MGMT (O6-méthylguanine-méthyltransférase) qui participe à la réparation de l'ADN dans les gliomes de bas grade [92]. Parallèlement, les tumeurs de l'enfant et de l'adulte jeune sont secondaires aux mutations des gènes codant pour les histones H3.1 et H3.3 et BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) [93]. Par ailleurs, la présence de ces altérations diffère selon le grade que présente la tumeur gliale [94]. Ainsi :

- Les astrocytomes de grade II (diffus) présentent dans 50% des cas une trisomie 7 ou un gain de 7q et les trois mutations les plus fréquentes touchent TP53, IDH1 et PDGFRA (récepteur A du facteur de croissance dérivé des plaquettes)

- Les astrocytomes de grade III anaplasiques présentent des mutations semblables aux grades II en plus des mutations du gène RB1 (rétinoblastome) et une perte allélique sur le chromosome 19.
- Dans les glioblastomes, les GBM de novo sont caractérisés par les mutations de PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) et RB et la surexpression de EGFR et les glioblastomes secondaires qui en plus des aberrations déjà présentes dans les astrocytomes de grades II et III, ont une perte sur le chromosome 10q.

Concernant les autres TC, si la Co-délétion 1p 19q peut être considérée comme un marqueur d'oligodendrogliomes, les méningiomes sont caractérisés par la perte du chromosome 22q entraînant l'inactivation du gène NF2 (Neurofibromatose 2) situé sur ce même chromosome. De façon similaire, l'altération de PTCH (Homologue 1 de la protéine patched) est à l'origine d'une activation aberrante de la voie SHH (Sonic Hedgehog) qui favorise la progression des lésions précancéreuses en médulloblastomes [89].

3.4.2 Marqueurs pronostiques et prédictifs

De nombreuses altérations moléculaires ont été étudiées pour établir leur éventuel rôle pronostique ou prédictif. Dans ce contexte, plusieurs marqueurs possédant une valeur pronostique et ou prédictive de la réponse à des thérapies ont été identifiés. Nous citerons l'hyperméthylation du promoteur du gène MGMT, la présence des mutations des gènes IDH1/2 et de la Co-délétion 1p19q. La présence d'hyperméthylation du gène MGMT ainsi que la Co-délétion montrent une réponse favorable à la chimiothérapie quant au statut IDH muté il est globalement considéré comme un facteur de bon pronostic. Inversement, la présence des mutations du promoteur TERT, des altérations de l'EGFR ou une combinaison du gain du chromosome 7 et de la perte du chromosome 10 classent l'astrocytome IDH de type sauvage en glioblastome [95].

En outre, des études récentes explorant l'impact d'un infiltrat immunitaire sur le développement de GBM ont démontré une association positive entre la survie et une infiltration lymphocytaire, attestant de la pertinence de l'étude de l'infiltration immunitaire comme facteur permettant non seulement la classification (grading) des tumeurs mais aussi, sa potentielle utilisation comme facteur déterminant de l'application de la thérapie immunitaire dans les gliomes (figure 23) [96].

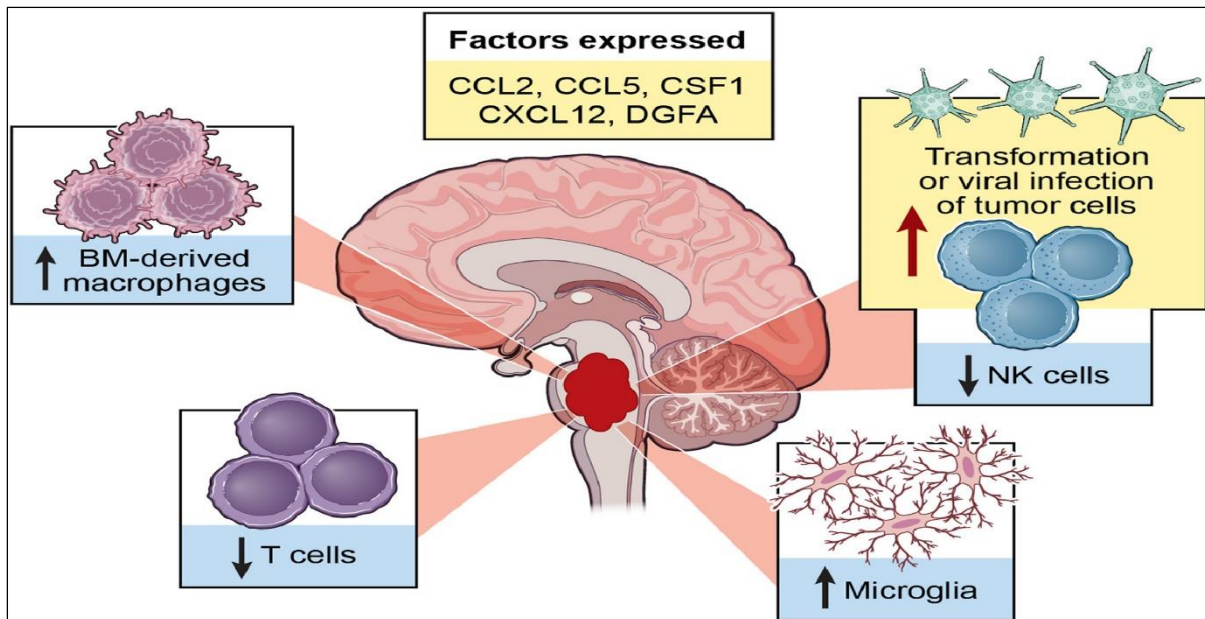


Figure 23 : Caractérisation de l'infiltrat immunitaire dans un gliome [97]. La figure montre la composition du microenvironnement tumoral caractérisé par une infiltration limitée de la tumeur par les cellules NK et les Lymphocytes T et à l'inverse une forte présence des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BM derived macrophages) et des microglies qui représentent les cellules immunitaires résidentes dans le système nerveux. Ces dernières sont responsables de la libération de plusieurs cytokines comme le CCL2 etc.

3.5 Traitement

Les approches thérapeutiques s'appuient essentiellement sur le traitement chirurgical, la radiothérapie et/ou la chimiothérapie. Certains médicaments sont régulièrement associés, les plus communs sont les corticostéroïdes et les anticonvulsivants. Néanmoins, en dépit de ces traitements, le pronostic vital reste sombre par rapport aux autres tumeurs n'excédant pas les 12 mois en cas de GBM. Cette agressivité des tumeurs cérébrales résulte en grande partie de leur localisation et leur caractère diffus qui rend la chirurgie ou la radiothérapie complexe. De plus, l'utilisation de la chimiothérapie est compliquée par la nécessité pour le médicament de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Bien que les immunothérapies développées depuis quelques années commencent à montrer des signes encourageants d'efficacité (figure 24) [98]. D'importants travaux de recherche doivent être menés pour envisager une exploitation optimale de cette approche.

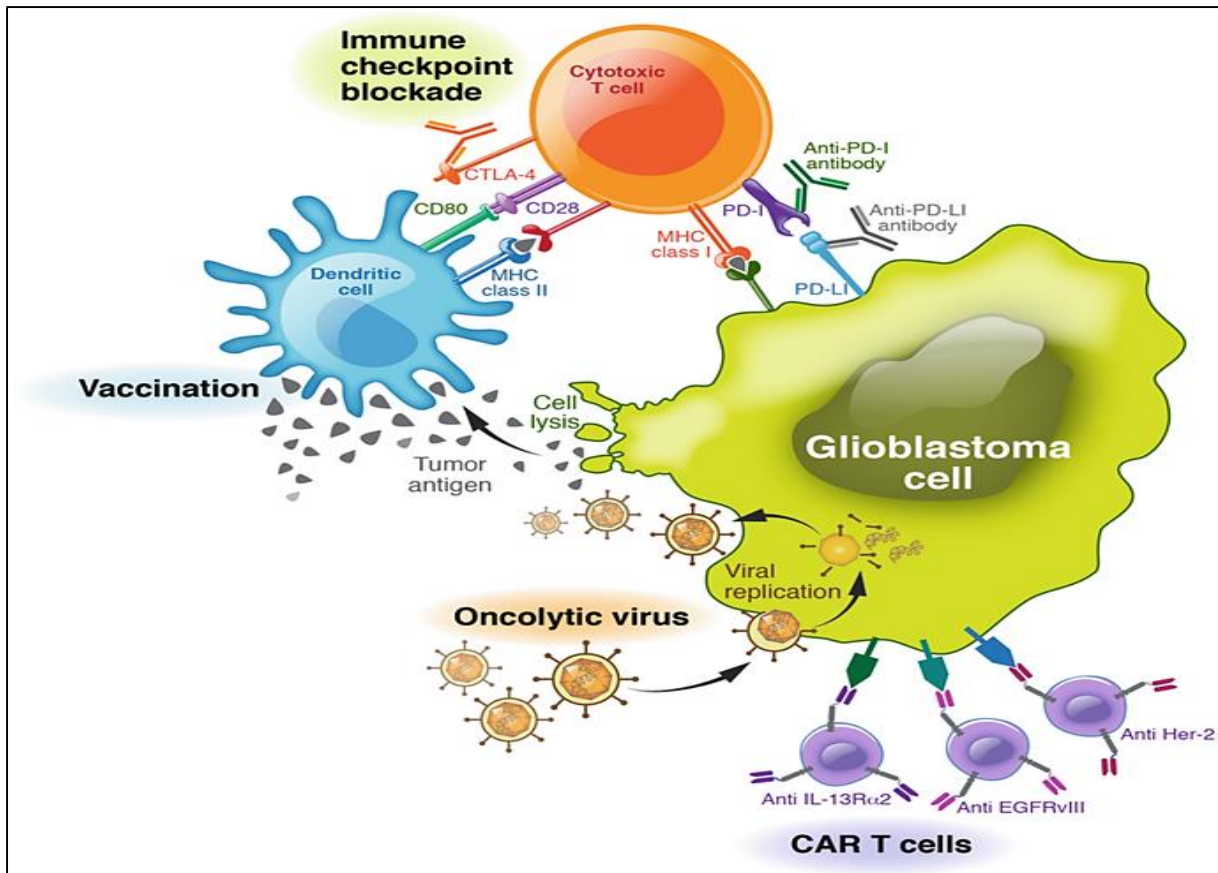


Figure 24 : Les principales stratégies de l'immunothérapie dans le traitement des gliomes [98]. La figure illustre différentes méthodes basées sur l'immunothérapie pour lutter contre les gliomes à savoir : les virus oncolytique, la vaccination par les cellules dendritiques, l'inhibition des points de contrôles des cellules immunitaires comme PD1/ PDL1 et l'utilisation des cellules CAR T qui sont modifiées génétiquement pour reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses.

CHAPITRE 3 : HCMV ET CCR

1. Objectif de l'étude

Comme nous l'avons exposé précédemment, les cancers colorectaux (CCR) sont des pathologies malignes fréquentes à la physiopathologie complexe qui impactent la santé publique mondiale. En Algérie, bien que les études concernant les CCR soient relativement rares, les taux révélés par l'OMS et les registres nationaux sont alarmants et témoignent de la nécessité d'une meilleure compréhension de l'étiologie des CCR afin d'aboutir à des traitements plus efficaces (GLOBOCAN 2020).

Le consensus actuel stipule que les cancers colorectaux résultent de l'interaction complexe de plusieurs facteurs, notamment des facteurs individuels, génétiques et environnementaux. En outre, de nombreuses études suggèrent que certaines infections par des agents pathogènes d'origines bactériennes comme l'infection avec *Schistosoma japonicum* [99] ou virales comme les familles des papillomavirus [100], des hépatites virales [101] ou encore les herpesvirus [102] seraient potentiellement impliquées dans le développement de CCR. Parmi les herpesvirus, l'EBV et le KHSV connus déjà pour leur propriétés oncovirales ainsi que le HCMV dont le potentiel carcinogène est toujours discuté sont particulièrement étudiés pour leur potentielle association avec les CCR [103–105].

Malencontreusement les résultats obtenus sont discordants, si certaines études n'attribuent aucun rôle aux herpesvirus en général et au HCMV spécifiquement dans le développement des CCR ou minimisent leurs effets, d'autres équipes suggèrent fortement leur implication dans l'initiation et ou la progression des CCR. Ces disparités soulèvent l'impact inhérent des conditions expérimentales comme les méthodes de détection, le choix de cohorte et le type d'échantillons sur les résultats, et témoignent du besoin de recherches plus approfondies pour statuer sur cette controverse [105].

Dans cette optique, nous nous proposons d'étudier la potentielle association entre le HCMV et le développement des CCR notamment en vue de l'insuffisance des études similaires dans la région.

Notre étude comporte deux principaux volets : une étude épidémiologique descriptive effectuée au niveau du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHUC) suivie par une étude moléculaire portant sur la mise en évidence des herpesvirus humains dont le HCMV dans nos biopsies tissulaires de CCR.

1.1. Étude épidémiologique descriptive

1.1.1. Objectif

Le but de notre étude est d'évaluer le profil épidémiologique et anatomopathologique du cancer colorectal dans notre population.

1.1.2. Méthodologie

Nous avons mené une étude épidémiologique descriptive rétrospective sur des patients atteints de cancer colorectal sur une période de 3 ans allant de 2017 à 2019. Toutes les informations recueillies ont été récoltés à partir des dossiers médicaux des patients hospitalisés au niveau du service de chirurgie Générale du CHUC (service de chirurgie B) et du service d'anatomie pathologique. Nous avons inclus dans l'étude tous les patients diagnostiqués pour cancer colique ou rectal, ce diagnostic a été fondé sur l'examen clinique et paraclinique puis confirmé par l'étude histologique effectuée dans les laboratoires d'anatomo-pathologie (publics ou privés). Pour chaque patient nous avons colligé les paramètres suivants : L'identifiant, le sexe, l'âge, les antécédents médicaux ou chirurgicaux, le statut sérologique, le siège et la localisation tumorale exacte, les résultats anatomopathologiques et le stade TNM.

1.1.3. Description de la population d'étude

Notre cohorte comporte 198 patients atteints de CRC. Les carcinomes sporadiques sont nettement prédominants, toutefois nous avons enregistré deux cas de syndromes héréditaires qui sont le syndrome Peutz-jeghers et la polypose adénomateuse familiale.

1.2. Étude moléculaire

Pour réaliser notre étude, nous avons effectué une amplification par polymérase en chaîne (PCR) qualitative afin de déterminer le statut viral de nos biopsies quant à la présence du HCMV. Parallèlement, nous avons mené un criblage (un screening) de nos échantillons pour l'ensemble des herpesvirus humains HHVs *via* une PCR nichée (Nested panherpesviruses PCR) dans le but d'évaluer la présence d'un membre de la famille HHVs dans nos échantillons.

1.2.1. Échantillons cliniques

Les patients inclus dans cette étude ont été recrutés au niveau du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHUC) suite à une consultation pour la résection d'une tumeur colorectale entre novembre 2018 et septembre 2019. Comme critères d'inclusion nous avons considéré tous les carcinomes colorectaux primaires éligibles pour notre étude. En parallèle,

nous avons exclu les biopsies de petites tailles ou anciennes (biopsies antérieures à novembre 2018), afin d'éviter les échantillons présentant une faible qualité ou un faible rendement d'ADN. Les patients atteints de lymphomes ou porteurs du VIH ont également été exclus de notre étude. Les métadonnées cliniques jugées pertinentes ont été recueillies et sont résumées dans le tableau 8. L'étude a été menée sur la base de l'approbation du comité de recherche local. Cette approbation éthique pour mener l'investigation sur des échantillons humains a été délivrée par le comité d'éthique du CHU Dr BENBADIS Constantine selon les principes éthiques applicables à la recherche médicale sur des sujets humains mentionnés dans la déclaration d'Helsinki (1964) et conformément aux recommandations du conseil national algérien d'éthique en sciences de la santé (Annexe 1).

Notre analyse moléculaire a été effectuée sur 69 échantillons de tissus inclus en paraffine (FFPE) incluant 61 biopsies de tumeurs colorectales provenant de patients âgés entre 34 et 90 ans [moyenne d'âge \pm écart-type : 66 ± 9 ans], et présentant différents grades, localisations et sous-types histologiques (Tableau 8). En outre, nous avons inclus, cinq biopsies provenant de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), deux échantillons représentant le stroma tumoral et une muqueuse colique normale que nous avons considérés comme échantillons contrôles.

Les biopsies des prélèvements ont été fixées au formol puis incluses en paraffine après résection par les techniciens du service d'anatomie pathologique du CHUC selon la procédure standard [106], puis ont fait l'objet d'un examen anatomopathologique par deux médecins anatomopathologistes pour confirmer le diagnostic.

1.2.2. Méthodes

Afin de réaliser notre analyse moléculaire nous avons d'abord procédé à l'extraction des acides nucléiques (ADN/ARN) à partir des biopsies tissulaires de notre cohorte et nous avons déterminé leurs concentrations et leurs puretés, ensuite nous avons évalué la potentielle présence de l'ADN virale des herpesvirus et du HCMV via des PCRs qualitatives. Ci-dessous nous détaillerons les différents protocoles que nous avons suivis.

Tableau 8 : Métadonnées cliniques des patients inclus dans l'étude moléculaire

Caractéristiques	Rectum (28)	Colon (31)
Groupes d'âge		
≥50	13	9
] 50-80 [12	19
80 ≤	3	3
Sexe		
Males	15	23
Femelles	13	8
Localisation tumorale		
	Haut rectum 2	Caecum 1
	Moyen rectum 1	Gauche 4
	Bas rectum 15	Droit 7
	Non mentionnés 9	Transverse 1
		Jonction Rectosigmoïdienne 14
		Non mentionnés 4
Sous types histologiques et grades		
	27 Adénocarcinomes	29 Adénocarcinomes
	1 dysplasie bas grade	2 dysplasie haut grade
Comorbidités		
Diabètes	6	7
Hypertension	7	7
Autres	1	5
Radio-Chimio thérapie avant résection		
	Radio-Chimiothérapie et /ou radiothérapie	Chimiothérapie pour le cancer du côlon métastatique uniquement
Syndromes héréditaires		
	/	2 Syndrome Peutz jehers Polypose adénomateuse familiale

Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques ont été extraits à partir des échantillons inclus en paraffine à l'aide du kit d'extraction RNA FFPE tissus (Promega, ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System, Wisconsin, USA) (figure 25). Nous avons suivi le protocole d'extraction fourni par le fabricant (Annexe2).Cependant nous avons apporté quelques modifications mentionnées ci-dessous. NB.Toutes les centrifugations ont été effectuées à température ambiante.



Figure 25 : kit d'extraction d'acides nucléiques. Le kit (Promega, ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System, Wisconsin, USA) comprend une huile ménérale, un tampon de lyse, un colorant bleu, la proteinase K , une solution de lavage, un tampon BL, l'eau sans nucléases, tubes collecteurs etc. [107]

1.2.3. Matériels et solutions utilisés :

- Éthanol à 95-100 %
- Isopropanol à 100 %
- Bloc chauffant 80 °C
- Bloc chauffant 56 °C
- Colonnes d'extraction et de purification d'acides nucléiques.
- Coupes de biopsies tissulaires ($\leq 100\mu\text{m}$).

Préparation des solutions :

Avant de commencer la procédure, les solutions sont d'abord préparées comme suit : on ajoute 30 µl du colorant bleu au tampon de lyse et 120 µl d'éthanol à 95-100 % à la solution de lavage 1X.

Déparaffinage à l'aide d'huile minérale :

Pour déparaffiner nos échantillons, l'huile minérale est rajoutée selon la taille des coupes réalisées (environ 50 microns), soit entre 300µl -500µl puis le mélange est incubé à 80°C pendant 1 minute.

Lyse cellulaire :

Afin de procéder à la lyse cellulaire, 300 µl de tampon de lyse ainsi que 60 µl de protéinase K sont ajoutés à l'échantillon. Ce dernier est incubé d'abord à 56°C pendant toute une nuit puis à 80°C pendant 1 heure. Les tubes sont d'abord refroidis à température ambiante pendant 15 minutes puis centrifugés pendant 2 min à la vitesse maximale.

NB. Le traitement à la DNase I n'est pas effectué pour collecter à la fois l'ADN et l'ARN.

Liaison d'acide nucléique :

Brièvement et selon les instructions du fabricant : 325 µl de tampon BL et 200µl d'isopropanol (100%) sont rajoutés à l'échantillon lysé puis le mélange est centrifugé à 10 000 × g pendant 30 secondes. La liaison des acides nucléiques est réalisée *via* l'utilisation de colonnes (Spin columns) (figure 26).

Lavage et élution de la colonne

Nos échantillons sont d'abord lavés avec 500 µl de solution de lavage 1X. ce lavage est répété deux fois puis centrifugés à 16 000 × g pendant 3 minutes pour sécher la colonne. (Il est important de sécher la colonne pour éviter le transfert d'éthanol dans l'éluat). Nous avons utilisé des tubes à faible adsorption d'ADN pour minimiser les pertes. Enfin, nous procédons à l'élution des acides nucléiques en rajoutant 30 à 50 µl d'eau sans nucléases à la colonne qui est centrifugée à 16 000 × g pendant 1 minute. Les acides nucléiques sont stockés à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

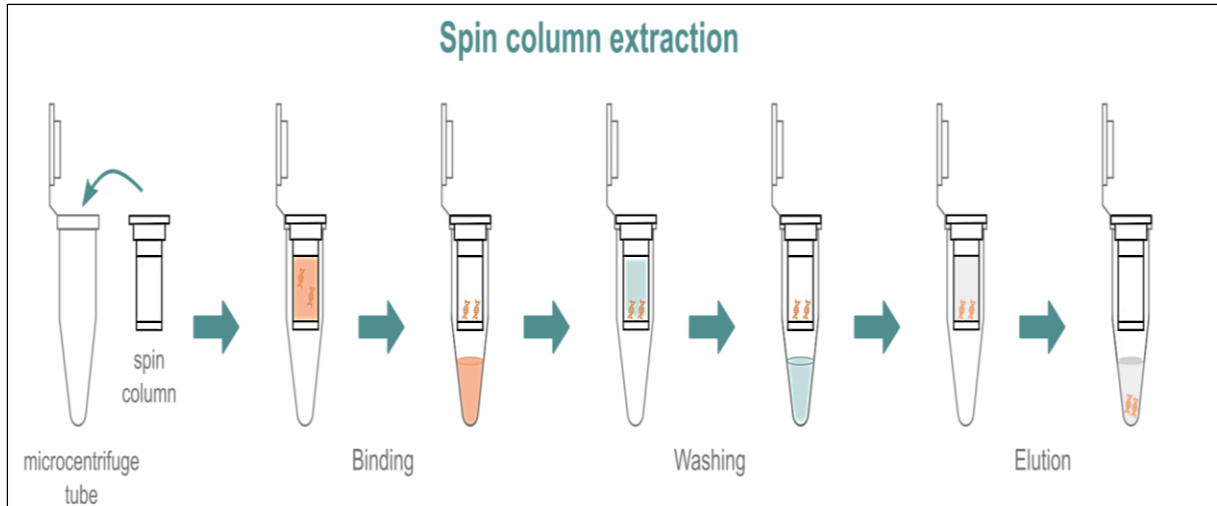


Figure 26 : Processus général d'extraction d'ADN via des colonnes.[108]

Évaluation quantitative et qualitative de l'ADN

La quantité et la qualité de l'ADN ont été évaluées par spectrophotométrie (Implen N60 Nanophotometer) (figure 27).

La concentration des ADNs obtenues était comprise entre [18ng/μl et 1μg/l]. Il est à noter que cette concentration varie selon la taille initiale de l'échantillon. Quant à la pureté elle a été évaluée selon le ratio d'absorbance obtenu à différentes longueurs d'onde. Nous nous sommes focalisés sur les ratios 260/280 et 260/230 (Figure 28).



Figure 27 : Photographie du nanophotomètre (Implen N 60).

PCR de contrôle

Nous avons également effectué une PCR contrôle en utilisant la bêta-actine (housekeeping gene) qui est exprimé de manière constante dans différents types de cellules et conditions expérimentales comme contrôle interne. Cette technique est d'une importance cruciale permettant à la fois l'évaluation de l'intégrité de l'échantillon d'ADN, la vérification de l'efficacité de l'amplification, la compensation des variations expérimentales et la normalisation des différences de quantités d'ADN entre les différents échantillons, ce qui contribue à l'obtention de résultats fiables et significatifs (figure 29).

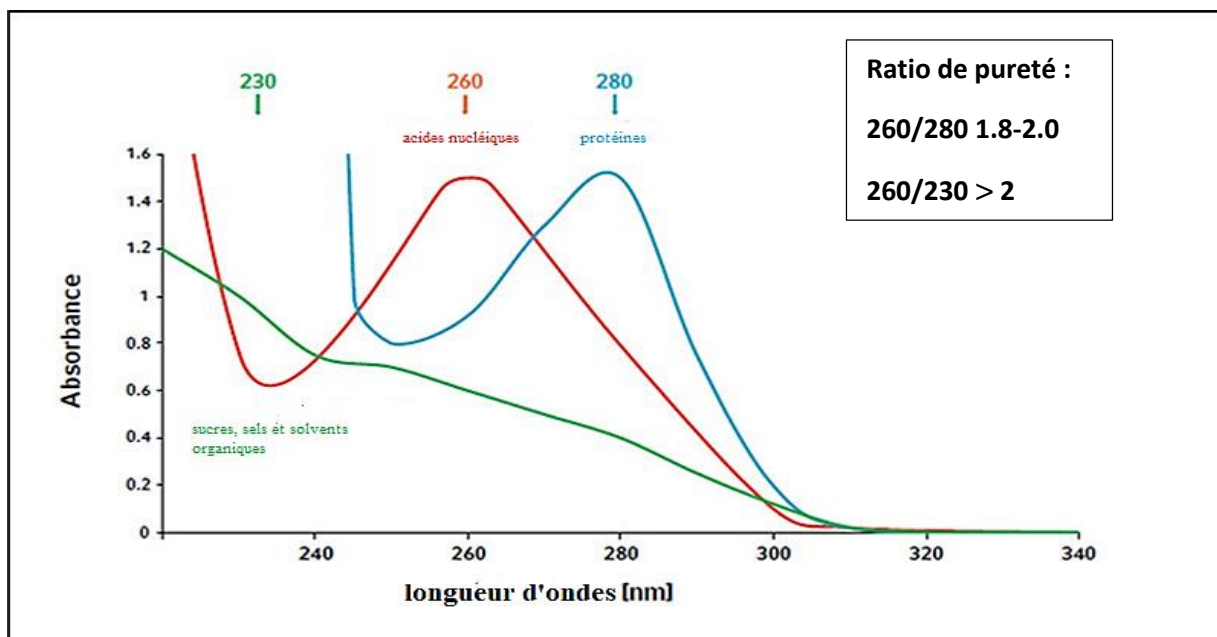


Figure 28 : Mesure de l'absorbance de l'ADN [109]. Le ratio 260/280 est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN en termes de contamination par des protéines, des contaminants organiques ou inorganiques. Une valeur idéale pour ce ratio est généralement comprise entre 1,8 et 2,0 pour l'ADN. Quant au ratio 260/230 il permet d'évaluer la pureté de l'ADN en termes de contamination par des solvants organiques ou des sels. Un ratio idéal pour ce paramètre est supérieur à 2.

Séquences géniques des amorces utilisées pour l'amplification de la Béta actine :

Amorce sens : 5'ATTGCCGACAGGATGCAGAA (Tm 58.4)

Amorce antisens : 5'GCTGATCCACATCTGCTGGAA (Tm 61.2)

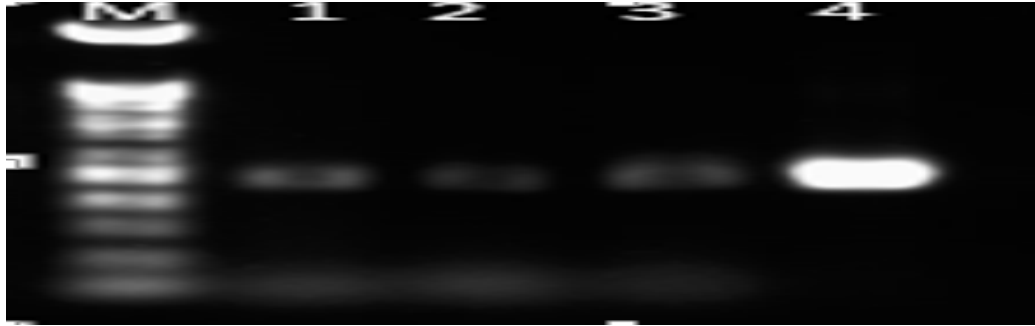


Figure 29 : Électrophorèse sur gel d'agarose (agarose à 1%) de la PCR Contrôle pour l'amplicon bêta-actine (Taille 260 pb). Des signaux intenses dans les échantillons testés révèlent la qualité de l'ADN extrait. M : 1 kb marqueur de taille ADN (Nippon Genetics (Duren, Germany). 1.2.3.4 : échantillons testés.

Les échantillons de faible qualité ou concentrations en ADN, présentant des ratios d'absorbance non optimaux ou affichant une absence d'amplification du gène de contrôle interne ont été jugés inappropriés pour l'analyse et ont été exclus de l'étude.

Amplification des gènes d'intérêt

La mise en évidence de la présence virale au sein de nos échantillons a été effectuée via une PCR nichée pour la détection des HHVs et via des PCRs qualitatives spécifiques au HCMV.

PCR nichée

La présence des herpesvirus humains a été testée par une PCR nichée permettant de détecter tous les HHVs à la fois sur l'ensemble de nos échantillons (69 biopsies). L'amplification cible une région conservée dans le gène codant pour l'ADN polymérase chez les HHVs et se fait grâce à l'utilisation d'amorces dioxy-inosines dégénérées d'Ehlers et al. [110] (Figure 30). Nous avons utilisé le vecteur TB40/E HCMV BAC (*aimablement fourni par le professeur Christian Sinzger du Centre médical universitaire d'Ulm, Allemagne*) comme contrôle positif.

Amorces

La particularité de cette méthode réside dans les amorces consensuelles que nous avons utilisées. Elles sont dégénérées et contiennent de la désoxyinosine à des positions de dégénérescence complète pour maintenir une température de fusion basse, et assurer la sensibilité de la méthode (tableau 9). Ces amorces ciblent le gène de l'ADN polymérase des

herpesvirus situé dans le cadre de lecture numéro 9, qui est hautement conservé parmi les trois sous-familles alpha-beta- et gamma-herpesvirus (figure31). Cette approche permet la détection simultanée de tous les herpesvirus humains dans un échantillon donné [111].

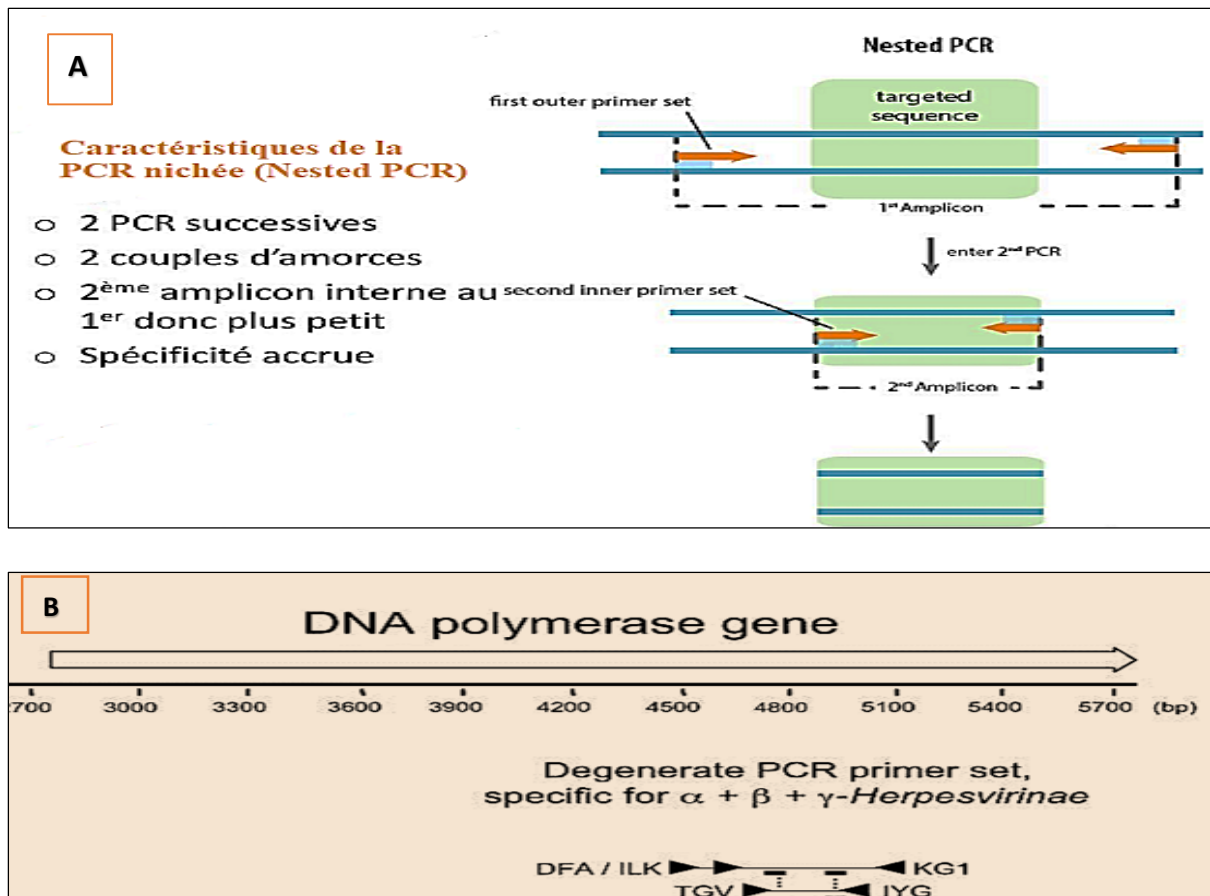


Figure 30 : Principe de la PCR Nichée *Panherpesvirus*. [112] A : représente le principe général de la PCR nichée. B : schéma représentant le gène cible (ADN polymérase) communs pour les alpha, beta et gamma Herpesvirinae dans la PCR nichée et le set d'amorces dégénérées internes et externes utilisées dans la technique.

Description du protocole

Nous avons effectué la PCR nichée avec le kit TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermofisher, Massachusetts, USA) en suivant les étapes décrites ci-dessous :

Premier tour

Les ADNs matrices ont été amplifiées dans 25 μ l de réaction qui contenait 5 μ l de tampon one mix, 1M de chaque amorce DFA/ILK/KG1, 4 μ l de H₂O, 2 U de Taq Polymerase, 200 M de désoxynucléotide triphosphate (dNTP) et 5 μ l d'ADN matrice.

Les cycles de températures variaient selon les températures suivantes : un premier cycle à 95°C (15 min.), suivis de 40 cycles : 95°C (20 sec.), 46°C (30 sec.), 72°C (30 sec.), et un dernier allongement de 72°C (10 min.).

Deuxième tour

Le mélange réactionnel pour le deuxième cycle de PCR contenait : 5 µl de tampon one mix, 1 M d'amorce TGV et IYG, 8 µL d'H₂O, 2 U de Taq Polymérase, 200 M de dNTP, 5 µl du produit PCR du premier tour dilué au 1/5.

La souche TB40/E du HCMV et l'eau sans nucléases ont été utilisées comme contrôle positif et négatif respectivement.

L'amplification a été détectée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec 1X TAE.

Tableau 9 : Liste des amorces dégénérées et leurs caractéristiques.

Amorces	Séquences nucléotidiques	Tours	Tm	Taille de l'amplicon
Amorces sens				
DFA	5'GAYTTYGC(N/I)AGYYT(N/I) TAY CC	Tour 1	38	
ILK	5'TCCTGGACAAGCAGCAR(N/I)YSG C(N/I)M T(N/I)AA	Tour 1	54	
Amorce antisens		Tour 1	57	
KG1	5'GTC TTG CTC ACC AG(N/I) TC(N/I) AC(N/I) CCY TT			215±235 pb
Amorce sens				
TGV	5' TGT AAC TCG GTG TAY GG(N/I) TTY AC(N/I) GG(N/I) TTY AC(N/I) GG(N/I) GT	Tour 2	63	
		Tour 2	52	
Amorce antisens				
IYG	5'CAC AGA GTC CGT RTC (N/I)CC RTA DAT			

Test de sensibilité

Avant de tester nos échantillons avec la PCR nichée, nous avons voulu déterminer le seuil de détection de cette approche. Pour ce faire, nous avons effectué une série de dilution d'un contrôle positif. Ces concentrations initiales décroissantes de notre contrôle ont été utilisées comme ADNs substrats pour la PCR nichée. Puis, nous avons procédé à l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec 1X TAE. Le TB40/E BAC a été utilisé comme contrôle positif.

PCR HCMV

Pour la détection du génome du HCMV, nous avons utilisé des amorces spécifiques au HCMV (tableau 10) dans un sous-ensemble randomisé de notre cohorte (30 échantillons). Nous avons ciblé dans notre étude les deux gènes les plus étudiés et les plus conservés du HCMV qui sont l'UL55 codant pour la protéine gB et l'UL54 codant pour l'ADN polymérase virale [112].

Description du protocole

Le mélange réactionnel contenait 5 µl de tampon one mix, 0,5 µl de mélange dNTP, des amorces gauche/droite (concentration finale de 0,6 µM), 2 U de taq polymérase, 11 µl d'eau sans nucléases et 5 µl d'ADN matrice.

Ensuite, nous procédons à une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pour la détection.

Tableau 10 : Amorces utilisés pour l'amplification du HCMV

Amorces	Séquences nucléotidiques	Tm	Taille de l'amplicon
gB (UL55)			
Amorce sens	5'GACGGTCAAGGATCAATGGC	58	205 pb
Amorce antisens	5'GTCGGCGTTTTCTCCAAAGT	58	
DNA Pol (UL 54)			
Amorce sens	5'CATGGCCAAGACTAACTCGC	58	180 pb
Amorce antisens	5'AACAGATCGCGCACCAATAC	59	

2. Résultats

2.1. Étude épidémiologique

2.1.1. Répartition selon l'âge et le sexe

Sur les 198 cas, nous avons enregistré 111 hommes pour 87 femmes soit un sexe ratio de 1.28 (Figure 31). La tranche d'âge variait de [23 - 90] ans avec une moyenne d'âge de 58 ans. Toutefois, il semblerait qu'il existe une précocité d'apparition des CCR selon le sexe, chez les femmes le pic de survenue apparaît dans la tranche [50-60] ans avec une moyenne d'âge de 56 ans vs un pic entre [60- 70] ans chez les hommes avec un âge moyen de 59 ans (Figure 32).

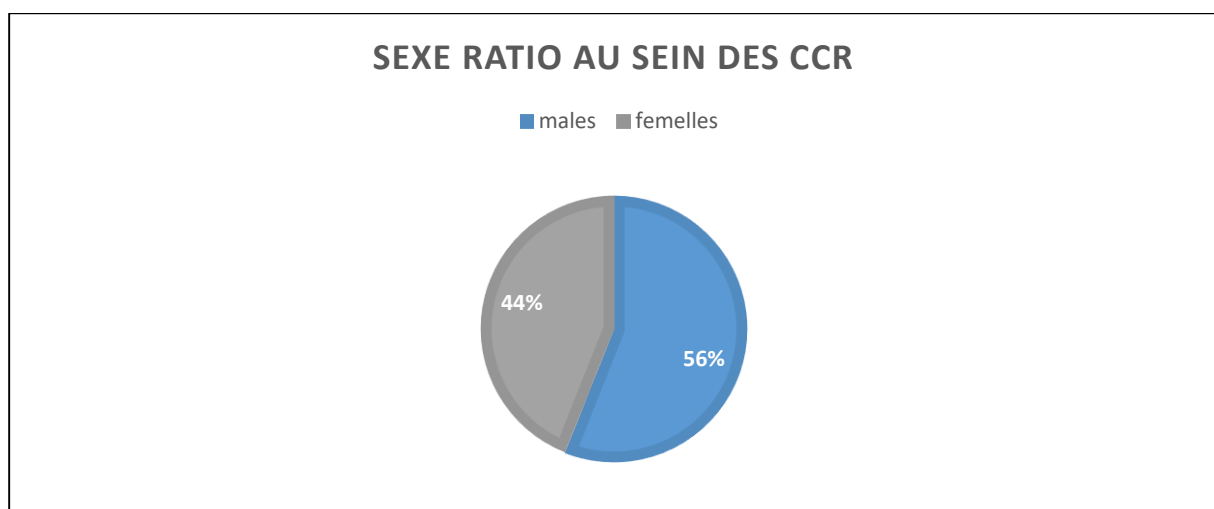


Figure 31 : Sexe ratio de la population d'étude.

2.1.2. Répartition selon la localisation

Dans notre série de cas, l'atteinte au niveau du colon était plus fréquente avec 116 cas vs 82 cas de tumeurs rectales. Où on observe une précocité d'apparition chez les femmes par rapport aux hommes avec une moyenne d'âge de 56 ans vs 59 ans pour les hommes pour les CCR (figure 33). La localisation recto-sigmoïdienne était la plus commune et cela indépendamment du sexe. On observe également que l'atteinte du sigmoïde est prépondérante et ce quelle que soit la tranche d'âge étudiée (Figure 34).

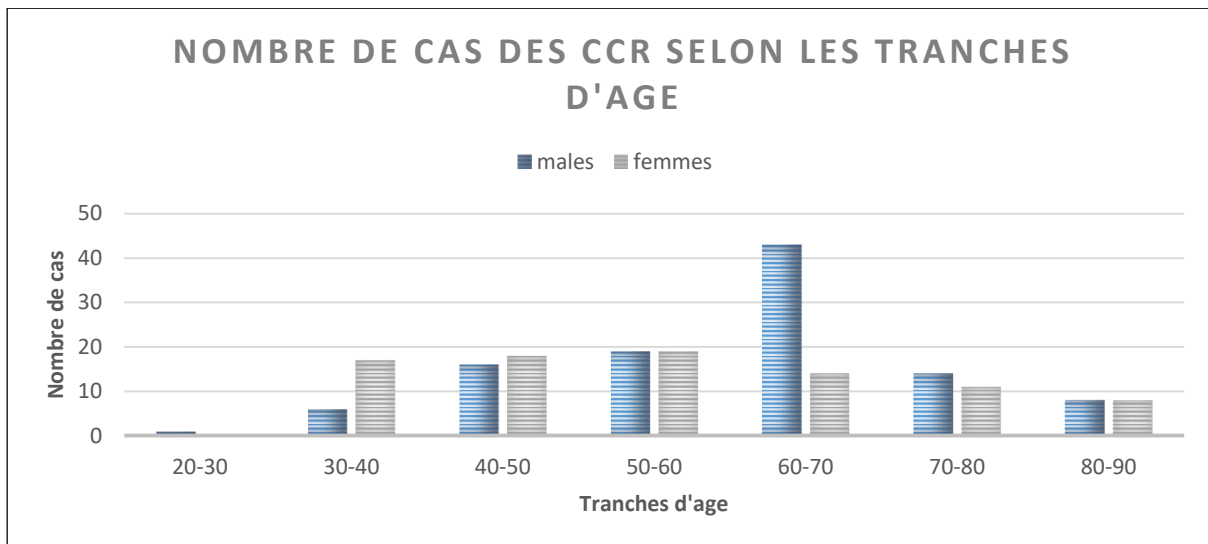


Figure 32 : Répartition des deux sexes selon la tranche d'âge.

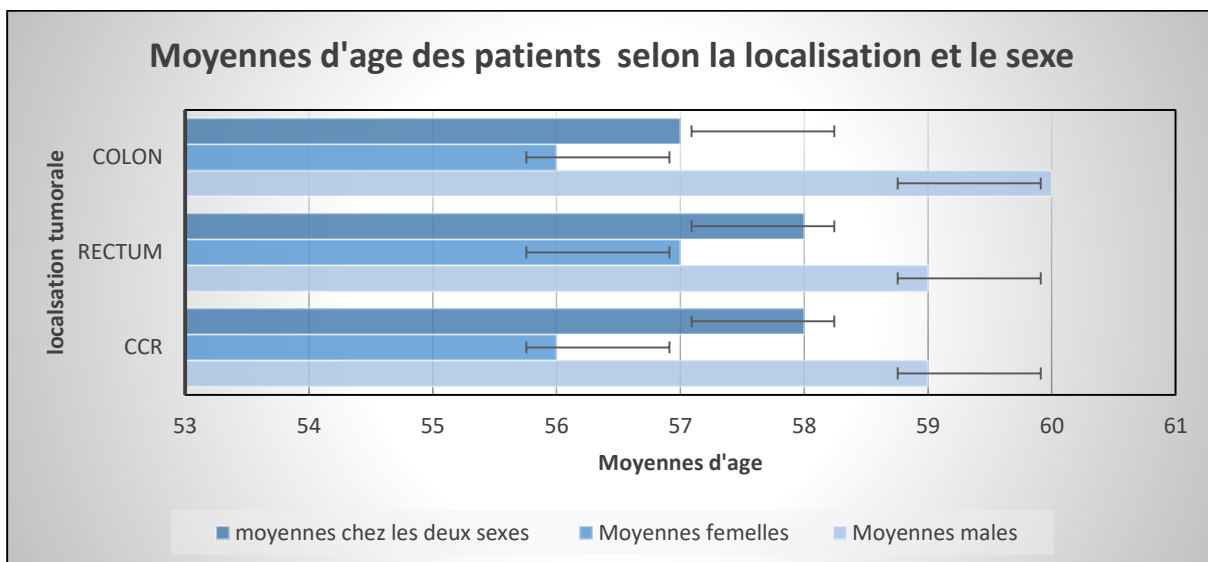


Figure 33 : Moyennes d'âge selon la localisation chez les deux sexes.

2.1.3. Répartition selon le type histologique et le stade

Sur l'ensemble de nos échantillons, 99 % des cancers étaient sporadiques vs 1% de cas avec une composante héréditaire liée au syndrome Peutz jehgers et le syndrome de polypose familiale. 99,5% des CCR étaient des adénocarcinomes vs 0,5% de tumeurs mésoenchymateuses. À l'échelle microscopique, l'adénocarcinome lieberkhünien représentait 73% des cas suivi par l'adénocarcinome colloïde 23%, puis par l'adénocarcinome en bague à chaton 4% (Figure 35). La majorité de ces adénocarcinomes étaient bien différenciés avec 69,4% des cas, 24,3% étaient

moyennement différenciés et seulement 6,3% peu différenciés et cela indépendamment de la tranche d'âge étudiée (figure 36).

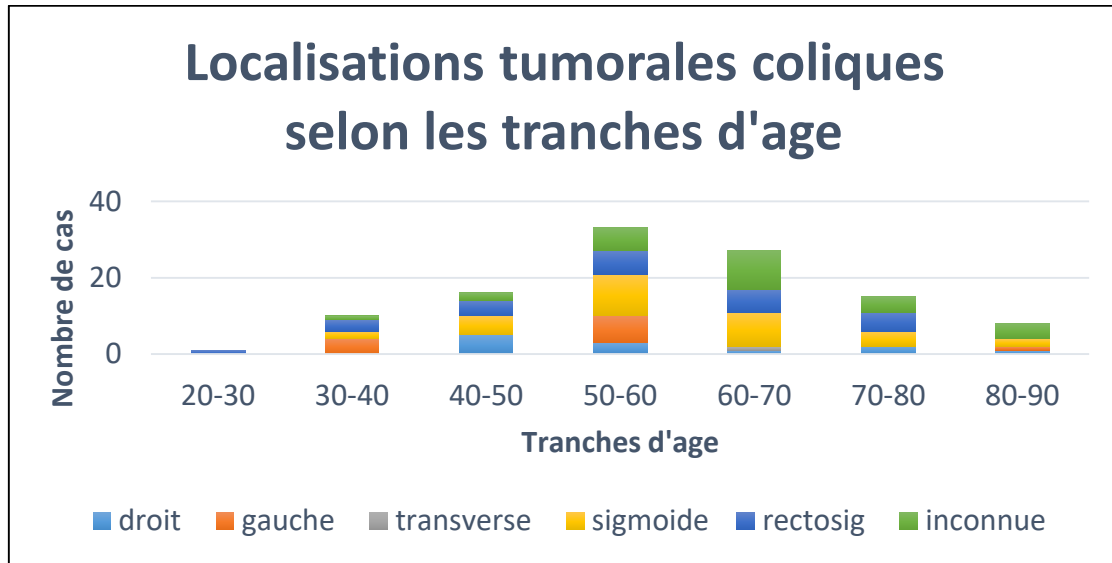


Figure 34 : Localisation des tumeurs coliques selon la tranche d'âge.
(rectosig : charnière recto sigmoïdienne).

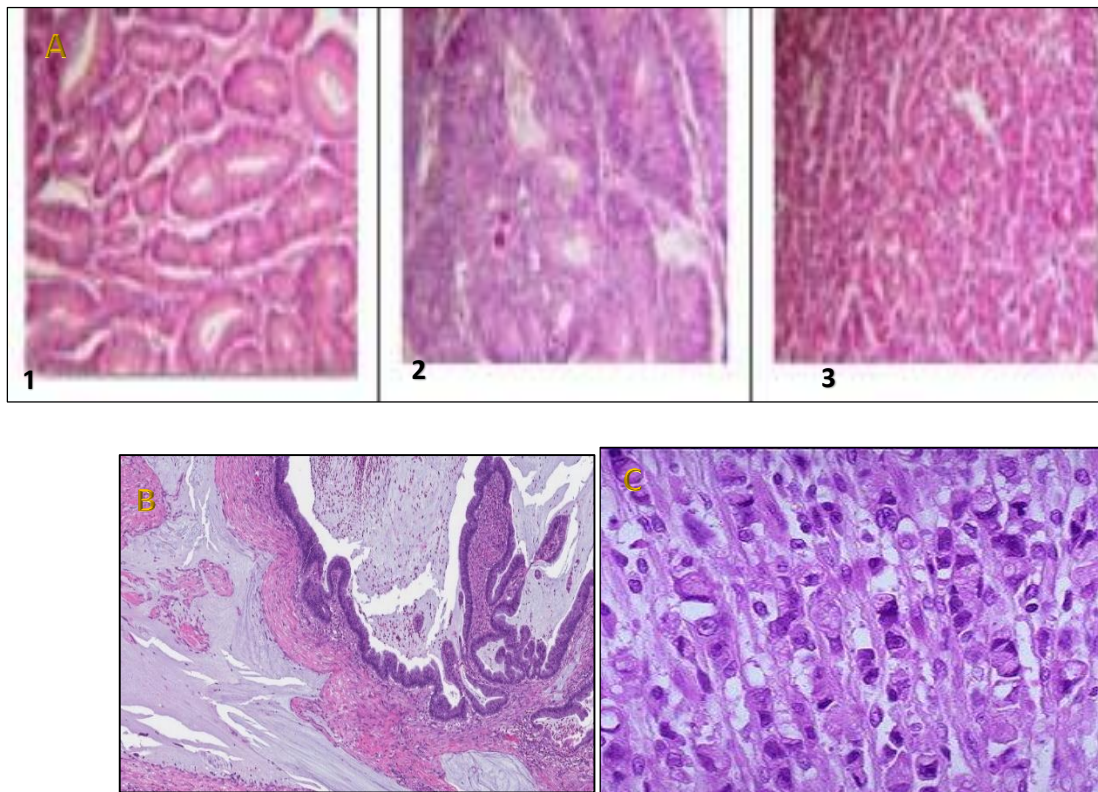


Figure 35 : Les différents sous-types histologiques du cancer colorectal [113]. A représente les différents grades de l'adénocarcinome lieberkhünien : 1 bien différencié, 2 moyennement différencié, 3 peu différencié. B représente le Carcinome colloïde (mucineux), C représente le carcinome en bague à chaton.

Concernant la stadification TNM (Tumeur, ganglions, métastases) : 72,6% des cas avaient des tumeurs classées pT3, 18,8% classées T4, 6,8% Classées T2 et 1,7% classées T1. 23% des patients présentaient des métastases situées majoritairement dans le foie 78% (1 cas au cerveau, 1 cas aux ovaires, 1 cas au poumon et 1 cas au niveau de l'appendice).

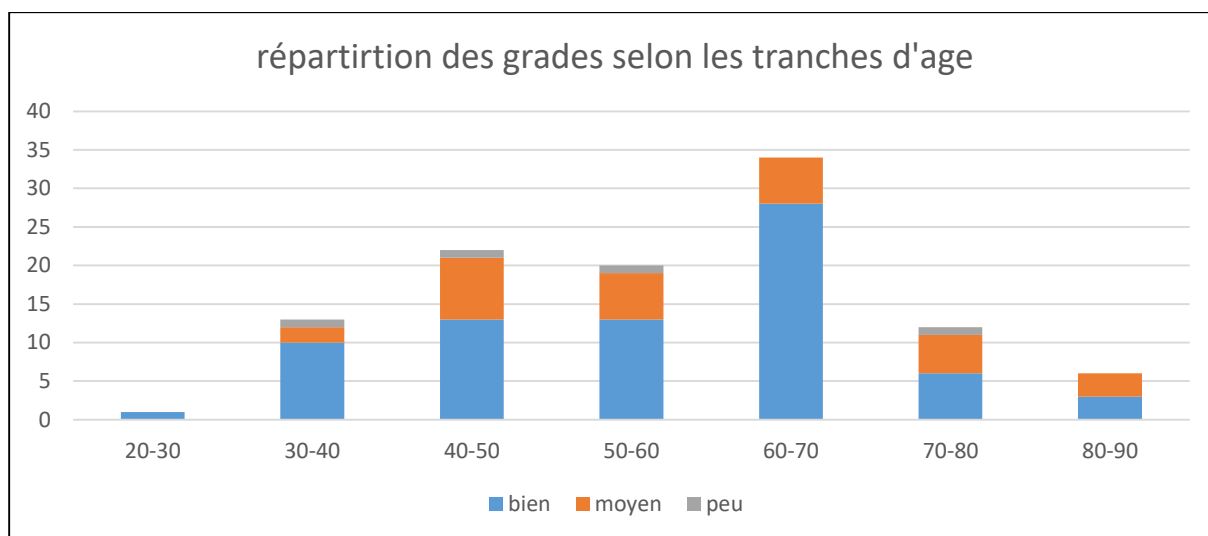


Figure 36 : Répartition des grades des CCR selon les tranches d'âge.

2.1.4. Comorbidités

Nous avons également relevé la fréquence des autres pathologies chez nos patients. Concernant les antécédents médicaux : l'hypertension artérielle (HTA) 26% et le Diabète (type 1 et 2) 18% des cas représentaient les comorbidités les plus courantes chez nos patients. 3 % des patients atteints de CCR présentaient d'autres pathologies cancéreuses. Et 43% des patients avaient des Antécédents chirurgicaux divers.

Le statut sérologique a également été colligé quand il est mentionné ; cinq patients étaient positifs au virus de l'hépatite B (HBV) deux positifs au virus de l'hépatite C (HCV) et un patient positif au Zona (VZV).

2.2. Analyse moléculaire

Notre cohorte d'étude comprenait 69 échantillons, dont 61 représentaient des biopsies de tumeurs colorectales. La tranche d'âge variait de 32 à 90 ans avec un âge moyen de 66 ± 9 ans. Le sexe-ratio était de 1,8 en faveur des hommes. Les adénocarcinomes étaient le sous-type histologique prédominant atteignant 92 % des cas, localisés principalement à la jonction recto-sigmoïdienne. A l'exception de 2 cas affectés par des syndromes de prédisposition héréditaires, les autres cancers ont été considérés comme sporadiques (Tableau 8).

Dans notre étude, nous avons d'abord procédé à un contrôle PCR avec des amorces B-actine pour évaluer la qualité de l'ADN extrait. La figure 30 montre une amplification positive du gène de contrôle utilisé (B-actine = 260bp), ce qui valide la qualité de nos échantillons.

Nous avons également testé la sensibilité de la PCR nichée avant d'effectuer l'amplification. Les résultats du gel d'électrophorèse d'agarose indiquent un seuil de détection allant jusqu'à 10^1 copies du contrôle positif TB40E (figure 37) comme concentration initiale.

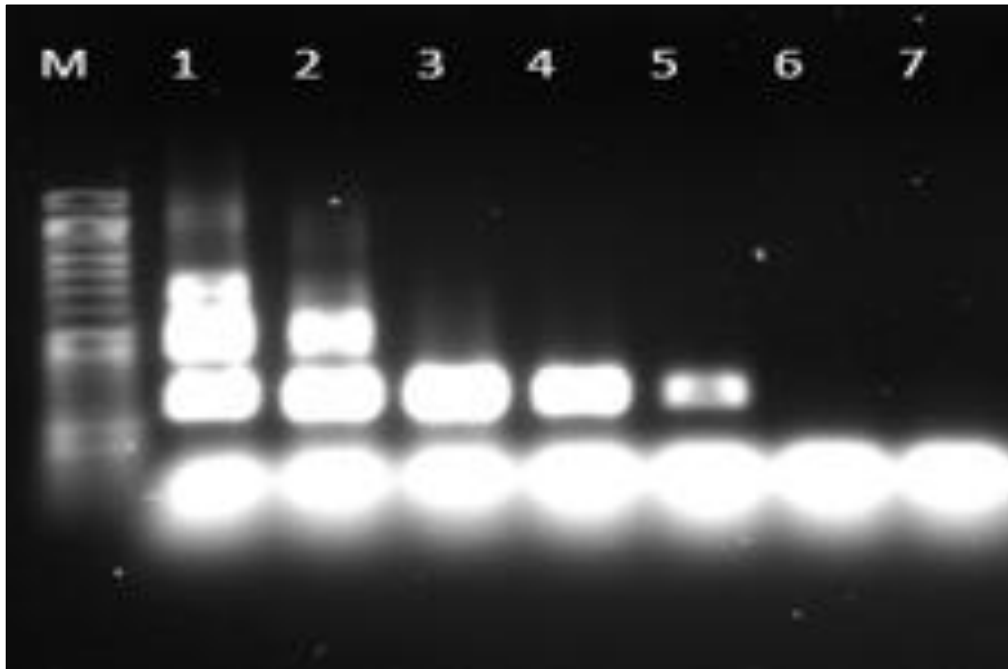


Figure 37 : Test de sensibilité de la PCR nichée. M : marqueur de taille (Nippon Genetics Fast Gene 50 bp DNA Maker, Duren, Allemagne), 1: 10^5 copies, 2: 10^4 copies, 3: 10^3 copies, 4: 10^2 copies, 5: 10^1 copies, 6: 10^0 copie, 7: control négatif.

La PCR nichée a été réalisée sur l'ensemble de notre cohorte ($n = 69$). Malgré la sensibilité de cette méthode, démontrée ci-dessus, la présence d'herpesvirus humains n'a pas été détectée ni dans la cohorte de patients ni dans les groupes témoins (Figure 38).

Les PCRs qualitatives effectuées sur 30 échantillons et réalisées avec des amorces ciblant le génome du HCMV n'ont pas révélé la présence du virus (Figure 39). Ce qui confirme les résultats précédents obtenus avec la PCR nichée.

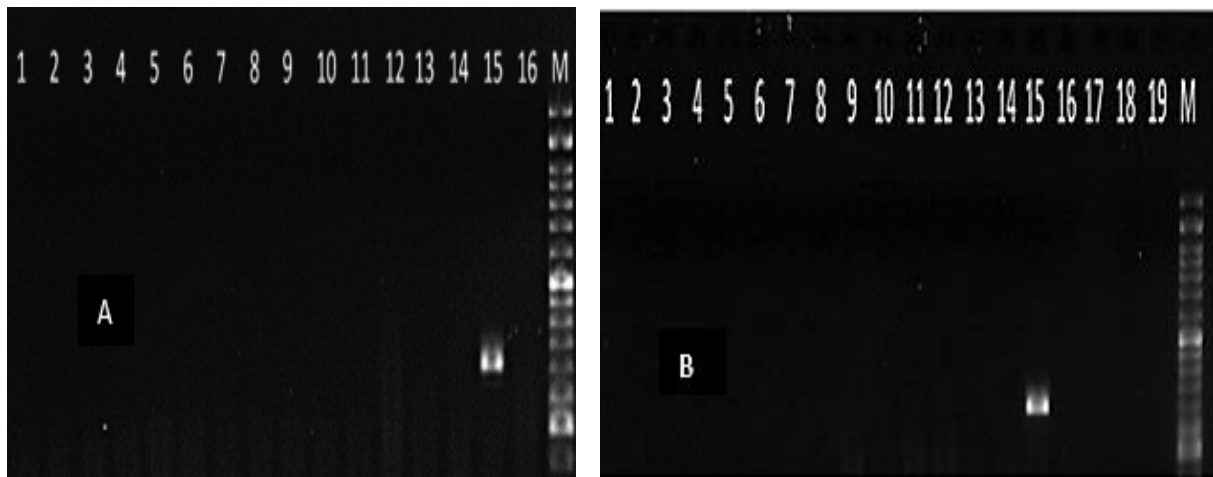


Figure 38 : PCR nichée pour détecter les herpesvirus dans nos échantillons. Tous les échantillons analysés étaient négatifs. A 1- 14 CRC, 15 : contrôle positif, 16 : contrôle négatif. B 1-5 : Maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), 6-7 : dysplasies de haut grade, 8 : rectum de bas grade, 9 : polypose adénomateuse familiale, 10 : syndrome de Peutz-Jeghers, 11-14 : cancer colorectal CRC, 15 : témoin positif, 16-18 : stroma tumoral, 19 : contrôle négatif. M : marqueur de taille.

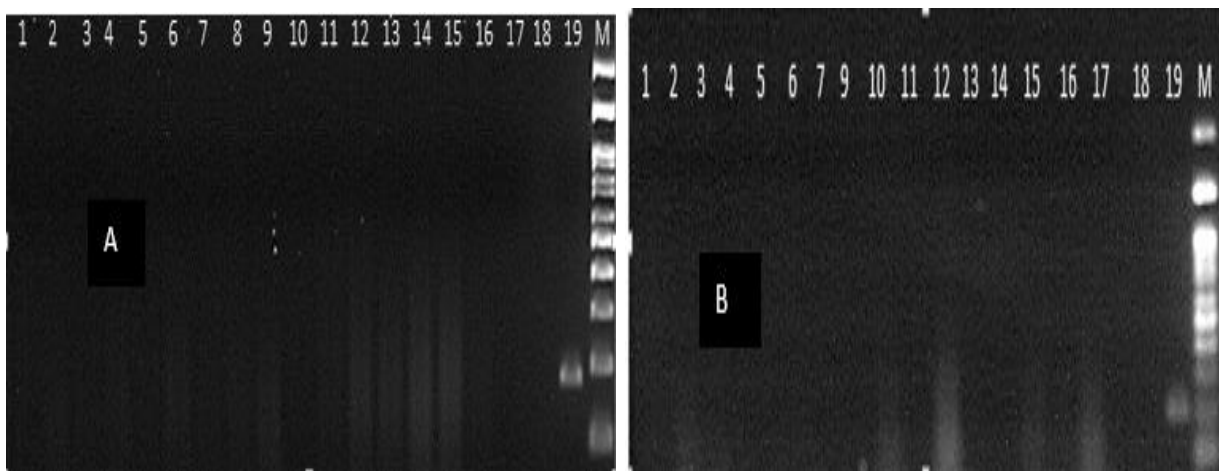


Figure 39 : PCRs pour détecter le cytomégalovirus humain (HCMV). Les PCRs sont effectuées sur un sous-ensemble randomisé de notre cohorte. A et B représentent l'électrophorèse en gel d'agarose des PCR UL54 et UL 55 respectivement et montrent l'absence de détection du HCMV. 1-17 : biopsies de cancer colorectal, 18 : contrôle négatif, 19 : contrôle positif,

3. Discussion

3.1. Évaluation des caractéristiques épidémiologiques :

Le cancer colorectal figure parmi les cancers les plus diagnostiqués dans le monde avec une incidence d'un million et demi de nouveaux cas chaque année. Il constitue la deuxième cause de mortalité par cancer atteignant 930,000 décès dans le monde [46]. Les perspectives relatives aux taux d'incidence de la maladie sont sombres, avec une augmentation de 60 % du fardeau mondial [114]. Lorsqu'il est détecté à un stade précoce de son évolution, le cancer colorectal offre un très bon pronostic, ainsi, grâce au dépistage on dénote une nette amélioration des taux de survie dans le CCR localisé avec une guérison complète dans 90 % des cas. Malencontreusement, le CCR métastatique présente toujours un mauvais pronostic. Or, la moitié des patients traités peuvent développer des métastases quel que soit le traitement prescrit [115].

Il est intéressant de constater que les données mondiales issues de 184 pays et fournies par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), par le biais de son institution spécialisée Globocan (global cancer observatory), révèlent une grande disparité entre les différentes régions du monde en ce qui concerne ces chiffres. En effet, l'incidence du cancer colorectal peut varier d'un facteur de 10 d'un point à l'autre du globe. L'Europe de l'Ouest, l'Amérique du Nord, l'Australie et le Japon se distinguent très nettement des autres parties du monde. En outre, il semblerait que l'épidémiologie de cette pathologie évolue au cours du temps (GLOBOCAN 2020). En ce sens, des chercheurs menant une étude rétro-prospective visant à interpréter ces estimations ont pu identifier différentes tendances relatives aux taux d'incidences et mortalités selon les pays [73]. Ces derniers ont été classés en trois groupes, premièrement ceux où l'incidence du cancer colorectal ainsi que sa mortalité se sont plutôt révélées à la hausse ; deuxièmement ceux où l'incidence a augmenté mais où la mortalité a diminué ; et enfin ceux où l'incidence comme la mortalité ont toutes deux baissé. Il est hautement probable que le dépistage plus systématique de la maladie, l'amélioration des procédures thérapeutiques et l'efficacité accrue des protocoles de chimiothérapie et de radiothérapie soient responsables de la diminution de la mortalité dans les groupes 2 et 3. A contrario, l'augmentation des nouveaux cas observée dans certains pays des groupes 1 et 2 est très probablement liée à leur adoption rapide d'un mode de vie occidentalisé caractérisé par la forte consommation d'alcool, le tabagisme, une alimentation déséquilibrée, une prévalence accrue de l'obésité et une diminution de l'activité physique qui représentent conjointement les principaux facteurs de risque de développement de CCR [116].

Conformément à ces données, l'Algérie fait partie du premier groupe avec une augmentation rapide de 3,7% par an. Si en 2020 on a enregistré 6 526 cas de CCR, le nombre de cas pourrait atteindre les 12000 cas en 2040. Selon ces mêmes prédictions la mortalité liée au CCR risquerait de passer de 3600 décès à 7300 décès en 2040 (GLOBOCAN2020). Au niveau locorégional l'Algérie occupe la première place en termes d'incidence suivi par le Maroc (4500 cas) puis par la Tunisie (3200 cas) (GLOBOCAN2020). Ces alarmantes statistiques suggèrent une augmentation de l'exposition à des facteurs de risque, en particulier suite aux mutations sociales importantes survenues dans le pays au cours des deux dernières décennies. Par ailleurs, ils témoignent de la nécessité d'une mise en place de programme de dépistage systématiques de cette pathologie ainsi qu'une plus fine connaissance de cette pathologie en Algérie.

Dans cette optique, nous avons voulu établir un état des lieux des CCR en réalisant une étude rétrospective, au niveau du CHUC un des plus grands centres hospitaliers de l'est du pays. Cependant, en raison des dossiers de malades qui ne sont toujours pas informatisés, nous nous sommes confrontés à une insuffisance de données qui a de ce fait entravé une parfaite homogénéisation de nos résultats quant aux différents aspects étudiés. Par ailleurs, la couverture de l'enregistrement épidémiologiques du cancer par les différents réseaux du pays est encore incomplète. Par conséquent, les chiffres disponibles ne permettant pas d'apprécier avec précision les différentes caractéristiques des CCR dans notre pays.

L'incidence du cancer colorectal varie selon plusieurs facteurs dont l'âge et le sexe. On observe une tendance à une incidence plus élevée chez les personnes plus âgées, ainsi qu'une légère prédominance chez les hommes par rapport aux femmes. Dans notre série de cas composée de 198 patients atteints de CCR, nous avons enregistré 111 hommes pour 87 femmes soit un sexe ratio de 1,28. Le sexe ratio au niveau mondial est d'environ 1,5 tandis qu'en Algérie, il est d'environ 1,16, de ce fait notre sexe ratio calculé de 1,28 rejoint cette tendance globale observée dans les autres études [117]. Cette légère disparité pourrait être expliquée par des différences comportementales telles que le tabagisme, la consommation d'alcool, les expositions professionnelles et par les facteurs hormonaux [118]. Il a été démontré que l'exposition aux hormones sexuelles féminines était associée à la promotion du cancer dans de nombreuses localisations [119], toutefois, l'exposition aux œstrogènes serait associée à un risque réduit de développement de cancer colorectal [118]. Bien que l'explication exacte soit encore inconnue, la découverte de récepteurs oestrogéniques au niveau des parois coliques saines possédant des activités antitumorales ; notamment l'activation des signaux pro-apoptotiques, modulation de

l'immuno- surveillance et l'inhibition de l'inflammation pourrait constituer un élément de réponse [120].

Concernant l'âge, il est établi que les personnes âgées présentent un risque plus élevé de développer cette maladie par rapport aux jeunes. Cela peut être dû à l'accumulation progressive de mutations génétiques et de facteurs de risque au fil du temps [121]. Selon l'OMS, la moyenne d'âge d'apparition du cancer colorectal dans le monde se situe généralement autour de 60 à 70 ans. Cependant, on observe récemment une incidence croissante chez les personnes plus jeunes âgés de moins de 50 ans chez qui le CCR est souvent diagnostiqué à un stade tardif où la maladie est plus difficile à traiter et par conséquent, le pronostic chez ces patients est plus sombre. Dans notre série de cas, nous avons observé une précocité d'apparition de CCR illustrée par une moyenne d'âge de 58 ans les deux sexes confondus. Malheureusement, les données précises sur la moyenne d'âge d'apparition du cancer colorectal en Algérie ne sont pas facilement accessibles. Néanmoins, certaines études universitaires semblent confirmer cette précocité d'apparition dans la moyenne d'âge [122] [123] [124]. Cette dernière est plus visible chez les femmes notamment dans l'atteinte colique avec une moyenne d'apparition de 56 ans vs 60 ans chez les hommes (figure 33). Cette précocité dans la moyenne d'âge suggère une potentielle implication d'une composante génétique héréditaire dans la survenue de ces CCR [125]. En effet l'atteinte d'un syndrome héréditaire telle que le syndrome de Lynch ou la PAF représentent un risque accru de développer un cancer colorectal particulièrement à un âge précoce [126]. Toutefois, dans notre cohorte d'étude comportant 198 patients, nous avons relevé uniquement deux cas de prédisposition héréditaire liés au syndrome Peutz-jeghers et à la PAF. Ceci dit, la présence d'une composante héréditaire non liée à des syndromes connus demeure envisageable. Il convient de noter que la prévalence spécifique de ces syndromes héréditaires en Algérie n'est pas clairement documentée. Cependant, des études algériennes portant sur le syndrome de Lynch ont pu identifier plusieurs familles atteintes par ce syndrome et grâce au séquençage génique, ils ont décrit de nouveaux variants de gènes impliqués dans ce syndrome [127] [128].

Le CCR est une pathologie hétérogène, elle est anatomiquement divisée en droite et gauche selon la localisation de la tumeur par rapport à l'angle splénique. Les données épidémiologiques montrent une augmentation de l'incidence du colon droit et du colon gauche plus rapide chez l'homme que chez la femme et une stabilité globale des cancers du sigmoïde et du rectum [129]. Or, plusieurs études affirment que cette localisation impacte le développement, les caractéristiques clinico-pathologiques, le traitement et le pronostic de la maladie [130].

Conformément à nos données (figure34) et aux données de la littérature, la localisation sigmoïdienne et recto-sigmoïdienne représentent la localisation la plus prépondérante quel que soit le sexe ou la tranche d'âge étudiés [131]. En parallèle, on observe un glissement progressif des cancers du côlon gauche au profit du côlon droit. Outre ce gradient d'incidence, la localisation colique droite est associée à un pronostic défavorable [132]. Plusieurs hypothèses avancent que ces divergences seraient liées à plusieurs facteurs dont les différents mécanismes moléculaires qui sous-tendent la pathologie suivant la localisation [133], l'anatomie et l'embryologie de l'intestin et l'action spécifique des aliments et nutriments qui varie selon la localisation colique [134]. Concernant les critères histo pronostiques, nos résultats semblent être globalement en accord avec les données de la littérature algérienne et internationale plaçant les adénocarcinomes liberkuhnien bien différenciés en première place en termes de fréquence [135] [136]. Selon la classification pTNM de dukes (Annexe3), la majorité de nos patients (72%) présentaient un stade T3 au moment du diagnostic à la différence d'une étude menée par des chercheurs tunisiens où le stade T2 était plus fréquent [137].

Malencontreusement, nous n'avons pas pu étudier les caractéristiques moléculaires des CCR de notre cohorte vu que la classification moléculaire n'est pas encore en vigueur dans les différents CHU du pays.

En conclusion, la progression rapide de ce cancer et sa concomitance avec les mutations sociales importantes vécues en Algérie durant les deux dernières décennies fait évoquer une exposition accrue à certains facteurs de risques parmi les plus importants nous citons le changement du mode de vie entraînant une mobilité individuelle réduite associée à un changement des habitudes alimentaires, ainsi qu'une modification profonde de l'environnement avec une industrialisation rapide et polluante. Par conséquent, la mise en place d'une stratégie efficace de dépistage est clairement justifiée et constitue conjointement avec une sensibilisation de la population, une priorité sanitaire majeure.

3.2. Investigation sur l'implication des herpesvirus dans le développement des CCR :

L'hétérogénéité du cancer colorectale associée à la surmortalité observée notamment dans les formes métastatiques, mettent en évidence un sérieux besoin de développer un traitement plus efficace et adapté pour chaque cas, en phase avec l'ère de la médecine personnalisée [115]. Pour ce faire ; une meilleure compréhension de cette pathologie à l'échelle clinique et moléculaire est indispensable. Les études épidémiologiques analytiques ont permis de mettre en évidence plusieurs facteurs de natures variables potentiellement impliqués dans le développement

tumoral [75]. Parmi ces facteurs, les agents pathogènes et principalement certains virus sont des facteurs extrinsèques souvent étudiés pour leur potentielle association avec le développement tumoral [138]. De par leur potentiel oncogénique, l'infection par des virus tels que le HPV ou le KHSV constitue un risque accru de développer certains cancers comme le cancer utérin, le sarcome de kaposi etc. Une éventuelle implication virale dans le développement du CCR pourrait d'une part servir comme biomarqueurs viraux caractéristiques de la pathologie, d'autre part fournir une nouvelle piste thérapeutique [56].

La pertinence d'une potentielle implication virale dans la pathogenèse du cancer colorectal est justifiée par une pléthore d'études qui ont montré la présence de certains oncovirus comme le HPV, le HBV et certains herpesvirus dans des échantillons cliniques de CCR, et ce à l'inverse des cohortes témoins étudiés [139,140]. Les infections herpétiques sont généralement asymptomatiques entraînant des maladies bénignes chez l'hôte immunocompétent lors de l'infection primaire ou dans la réactivation virale. A l'inverse, les herpesvirus induisent fréquemment des infections sévères chez l'hôte immunodéprimé ou chez le nourrisson dont l'immunité est encore immature. Dans ces circonstances, les symptômes peuvent être graves et la récurrence plus fréquente pouvant parfois mettre la vie du sujet en péril. Plusieurs études ont démontré l'association des herpesvirus avec des troubles humains multiples et variés, tels que l'encéphalite, le retard mental congénital et la perte auditive etc. [11] Récemment, de potentiels liens insoupçonnés avec des maladies multifactorielles telles que les lésions vasculaires, les maladies chroniques de l'intestin et le cancer ont été mis en évidence [141–143]. A ce jour, seuls le KSHV et l'EBV, deux gammaherpesvirus humains sont considérés comme des oncovirus associés à plusieurs types de cancers comme les sarcomes, les lymphomes et les carcinomes nasopharyngés [144,145]. D'autres membres de cette grande et large famille comme le HCMV sont étudiés pour leur éventuelle implication dans les pathologies malignes. En effet, ce bêtaherpesvirus disposerait de potentielles oncoprotéines virales pouvant initier ou promouvoir la transformation maligne. En outre, il est présenté comme un modèle caractéristique du nouveau paradigme qu'est l'oncomodulation [6].

Les HHV peuvent également avoir de potentiels rôles dans la cancérogenèse colorectale. Même si leurs effets ne sont pas encore clairement établis et restent encore controversés. Plusieurs arguments plaident en faveur de leur implication. D'abord, leur capacité à établir des infections latentes à vie - une caractéristique commune de tous les herpesvirus - pourrait conduire à une inflammation chronique et persistante [86]. Cette inflammation peut jouer un rôle pivot dans le développement du CCR, car elle peut agir soit comme facteur inducteur de la tumorigenèse,

comme dans le cancer associé à la colite (CAC), soit comme promoteur, en provoquant d'autres dommages à l'ADN et une instabilité dans les tumeurs déjà établies. Ensuite, les oncoprotéines virales synthétisés par ces virus sont capables d'altérer plusieurs voies de signalisations critiques au niveau des cellules infectées telles que MAPK/Ras, Wnt/ β -caténine, voie de signalisation de P53 etc. En perturbant ces voies de signalisation critiques, les oncoprotéines virales peuvent favoriser la survie cellulaire, la prolifération incontrôlée et l'échappement aux divers mécanismes cellulaires de suppression tumorale. Cela crée un environnement propice au développement de tumeurs et contribue à leur progression [146–148]. De façon intéressante, Il a été récemment mis en lumière qu'à l'échelle moléculaire, ces mêmes voies sont fréquemment altérées dans les carcinomes colorectaux, et seraient responsables de l'hétérogénéité observée au sein des CCR. Cette juxtaposition laisse supposer que ces herpesvirus pourraient jouer un rôle dans leur développement [149]. De plus, l'infection des cellules tumorales par certains virus de l'herpès tels que le HCMV peut causer une oncomodulation, affectant ainsi le comportement de la tumeur et augmentant l'agressivité du cancer [150].

Par ailleurs, malgré la rareté des études loco-régionales concernant la prévalence des herpesvirus au sein de la population générale, les statistiques montrent que l'Afrique du Nord (AN) est une région endémique de l'infection à certains herpesvirus comme l'EBV et l'HSV1 particulièrement pendant l'enfance et où l'incidence ne semble pas diminuer indépendamment des améliorations des conditions socio-économiques. Fait important, la primo-infection à EBV semble survenir plus tôt en Algérie que dans les pays industrialisés, comme la France [151,152]. De plus, nous enregistrons la plus forte incidence de cancers associés à l'EBV dans la région. Justifiant de ce fait l'intérêt accordé à cette famille virale [153].

Dans cette étude, nous avons cherché à vérifier la présence des herpesvirus humains et notamment le HCMV dans nos échantillons *via* une méthode sensible s'appuyant sur la PCR (nichée et standard). Cependant, tous les échantillons testés avec les deux méthodes étaient négatifs pour l'ensemble des herpesvirus humain y compris le HCMV. Nos résultats semblent concorder avec d'autres études similaires citées dans le tableau 11.

D'abord, nous soulignons que les caractéristiques cliniques de notre cohorte comprenant 69 échantillons sont conformes aux tendances mondiales. Les taux d'incidence sont plus élevés chez les hommes que chez les femmes (sexe ratio, SR = 1,8), l'âge moyen au début de la tumeur 66 ± 9 ans ainsi que les différents autres paramètres cliniques sont également en accord avec les

données mondiales (tableau 8). Ensuite, concernant l'association entre les HHVs et le développement de CCR, nous distinguons trois positions dans la littérature.

En premier lieu, de façon semblable à nos résultats, de nombreux chercheurs menant des études quantitatives ou qualitatives n'ont pas pu déceler la présence de HHV au sein des CCR (tableau 11). En effet, des études à grande échelle se basant sur différentes techniques telles que le séquençage à haut débit n'ont pas détecté les virus à ADN y compris les HHV [154]. Les mêmes observations ont été faites pour les études qualitatives basées sur la détection spécifique d'un virus [155,156]. Notons que les virus de l'herpès les plus fréquemment étudiés pour un potentiel rôle dans le développement du CCR sont le HCMV et l'EBV [157]. Malgré cela, leur lien avec le développement de CCR n'est toujours pas établi du fait de l'échec de plusieurs chercheurs à mettre en évidence le matériel génétique de ces virus via l'hybridation in situ (ISH) ou la PCR. Ces études ont été menées sur des échantillons provenant de tumeurs primaires ou secondaires en comparaison avec les tissus témoins mais les chercheurs n'ont pas détecté de présence virale dans les carcinomes, les métastases ou les tissus sains adjacents [158,159]. De façon intéressante, une expérience basée sur une culture à long terme de cellules de carcinome colorectal dérivées de patients atteints de CCR et en présence de particules virales, ne révèle aucune preuve d'infection ou d'intégration virale. Or, ces virus sont connus pour leur assez large tropisme pouvant infecter plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales, les cellules immunitaires et même les cellules tumorales [160]. Ce qui laisse suggérer que d'autres facteurs cellulaires et moléculaires sont responsables de cette restriction observée au sein de ces cellules tumorales.

En deuxième lieu, d'autres études épidémiologiques fondées sur diverses techniques analytiques n'attribuent pas un rôle majeur aux herpesvirus humains dans l'étiologie du CCR (tableau 11). Conformément à ces résultats, les tests sérologiques n'ont révélé aucune différence significative entre la prévalence de certains anticorps spécifiques à l'EBV, le HSV1 et le VZV chez les patients atteints de CCR et ceux des témoins [80]. A contrario, les variations de taux d'anticorps viraux observées chez certains patients ont été attribuées à la réactivation virale après la chimiothérapie ou la radiothérapie et n'impliquent pas nécessairement leur présence dans la tumeur [161]. Les patients inclus dans notre cohorte d'étude, principalement ceux qui présentent une atteinte au niveau du rectum, ont suivi des chimio-radiothérapies néoadjuvantes, c'est pourquoi nous n'avons pas effectué de sérologie dans notre étude. Des études complémentaires, basées sur la PCR quantitative en temps réel, le séquençage, l'immunohistochimie ou l'hybridation in situ, n'attribuent aucun rôle majeur aux herpesvirus

humain tels que le HSV2, VZV et le HCMV dans le CCR, malgré leur présence dans les échantillons cliniques. Toutefois, ils suggèrent une inhibition potentielle des CRC par le HSV1 [102,162,163].

Enfin, les partisans de l'association entre le CRC et les HHVs suggèrent que leur prévalence pourrait dépendre de certaines conditions expérimentales comme le choix de la méthode et sa sensibilité (tableau 11). Ainsi, les études utilisant la PCR, ont remarquablement observé les taux d'infection par les HHVs les plus élevés par rapport aux autres méthodes d'analyse [4]. Néanmoins, en utilisant cette technique, nous n'avons pas détecté ces virus dans nos échantillons. Certaines études suggèrent que la présence des HHVs dépendrait du sous-type histologique de la tumeur car les lymphomes seraient plus susceptibles d'être positifs que d'autres types histologiques. En effet, des études comparatives menées sur les adénocarcinomes et les lymphomes, ont révélé la présence exclusive de virus comme l'EBV dans les lymphomes et leur absence dans les adénocarcinomes [164,165]. Or, l'implication de certains HHVs dans le développement de certains lymphomes est un fait avéré [166]. Pour tester cette observation, nous nous sommes concentrés sur les adénocarcinomes de différents grades, et ils étaient tous négatifs. En outre, les ISH ont montré une localisation préférentielle des HHVs ; leurs génomes ne se propagent pas dans toute la tumeur mais s'agrègent plutôt dans des zones spécifiques [167]. Cela pourrait être dû à l'infiltration de leucocytes dans les tumeurs, lesquelles peuvent abriter des virus latents. En conséquence, dans les tests PCR, une potentielle charge virale présentes au sein des cellules inflammatoires infiltrantes pourrait contaminer considérablement la détection [160]. En effet, certaines études ont démontré que la présence virale globalement à l'état latent, était limitée à l'infiltrat lymphoïde des tumeurs et que les charges virales varient considérablement entre les échantillons en fonction du degré d'infiltration lymphocytaire (TIL) [168]. Par conséquent, les niveaux de TIL dans les CRC devraient être pris en compte dans les futures investigations.

Concernant le HCMV, plusieurs équipes ont exploré son éventuel rôle dans la tumorigenèse des cancers gastro-intestinaux y compris les CCR afin d'identifier de nouvelles stratégies de prévention et de traitement. Cependant, les résultats trouvés dans la littérature sont contradictoires entravant ainsi l'établissement d'un lien entre le HCMV et le développement CCR. De nombreuses études basées sur la détection directe (ADN virale) ou indirecte (sérologie) du virus, montrent une corrélation positive entre l'infection à HCMV et le risque de développer un cancer colorectal [31,62]. Cette présence virale au sein des tumeurs est associée à un pronostic de survie défavorable indépendamment du pronostic lié au stade TNM ; fait

vraisemblablement dû au pouvoir oncomodulateur du HCMV [150]. *A contrario*, d'autres études, confortent nos résultats et démontrent l'absence de HCMV (génomique ou produit protéique) dans les adénocarcinomes colorectaux humains et leurs lésions précurseurs [169,170].

Il est important de mentionner que la détection par PCR des acides nucléiques viraux peut échouer si le tissu a fait l'objet d'un traitement intensif au formaldéhyde. Néanmoins, de nombreux chercheurs ont réussi à amplifier l'ADN viral de l'herpès provenant de FFPE [105,171], tandis que d'autres n'ont pas pu amplifier l'ADN viral provenant de tissus fraîchement congelés ou de FFPE [102]. Dans notre étude, la période de stockage des échantillons était relativement courte (entre 1 et 18 mois), évitant ainsi une fragmentation importante de l'ADN [172], de plus nous sommes assurés de l'intégrité des ADN extraits par la PCR control que nous avons effectuée.

Par ailleurs, de par la localisation du CCR, il serait judicieux pour tenter d'expliquer les divergences susmentionnées d'approfondir nos connaissances sur l'interaction du microbiote intestinal, en particulier le virome avec le développement de tumeurs malignes colorectales. En effet, les perturbations de l'état d'équilibre du virome peuvent, directement et indirectement, initier/promouvoir des mécanismes oncogènes contribuant à l'initiation de la dysplasie et causant en définitive le cancer. Ainsi, ces perturbations peuvent d'une part, déclencher une inflammation chronique aboutissant au développement tumoral, d'autre part, elles peuvent être décisives pour faciliter l'infection par un autre agent infectieux pourvu de propriétés oncogéniques [156]. Ce modèle de coopération entre agents pathogènes a déjà été mis en évidence dans le cas de la co-infection par le HPV/l'EBV et l'EBV/HCMV où les deux virus agissent en synergie [173,174]. En outre, des études récentes révèlent des changements dans le virome fécal, en particulier dans la population de phages chez les patients atteints de CCR [175]. Il reste encore à déterminer si ces interactions sont responsables de la présence/absence des HHV dans les parois colorectales et dans quelles circonstances le virome et globalement le microbiote serait impliqué dans le développement du CCR.

En résumé, les résultats contradictoires de l'association entre les herpesvirus humains et le CCR peuvent être dus à de multiples limitations, telles que (i) les limitations expérimentales, dans notre cas l'absence d'un groupe témoin significatif, et (ii) l'étude préalable des caractéristiques du microenvironnement tumoral, qui peuvent être cruciales pour la présence des virus, (iii) une variabilité substantielle entre les méthodes de laboratoire avec des sensibilités différentes. Et

enfin une structure de cohorte distincte selon les populations étudiées. En raison de cette série de divergences, il est difficile de tirer des conclusions significatives sur le rôle étiologique possible des HHVs y compris le HCMV dans le développement des CCR.

En conclusion, les cancers colorectaux représentent actuellement un véritable problème de santé public. Les statistiques globales montrent une forte incidence et une mortalité accrue liée à cette pathologie de par le monde ; y compris en Algérie, où on observe ces mêmes tendances inquiétantes avec toutefois une légère précocité dans la moyenne d'âge de survenue des CCR. Ils sont principalement causés par une combinaison de facteurs environnementaux, de prédispositions génétiques et de modifications épigénétiques. Cependant, d'autres facteurs de risque sont en cours d'évaluation. En ce sens, de nombreuses études plaident en faveur d'une contribution des Herpesvirus dans le développement des CCR. En dépit de l'utilisation d'une technique sensible et consensuelle dans notre analyse moléculaire, nos résultats ne semblent pas indiquer l'implication des herpesvirus dans la pathogénèse des CCR chez les patients algériens. Néanmoins, il est crucial de mener des études à plus grande échelle, plus rigoureuses et homogènes dans lesquelles les méthodes et les contextes épidémiologiques seront correctement systématisés, afin d'élucider le rôle de cette famille virale y compris le HCMV dans le développement de ce cancer.

ADK: Adénocarcinome; AD: Adénomes; FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; CGI: Cancer Gastrointestinal cancer; IHC: immune-histochimie; ISH: in situ hybridization; Kras: Kirsten rat sarcoma; NGS: next generation sequencing; NM: Non mentionné; NP: Nested PCR; QPCR: Quantitative PCR; RNAseq: RNA sequencing analysis; RT PCR: Reverse transcription PCR; SB: Southern blot;

Tableau11 : Méta-analyse sur les études impliquant les HHV et le développement du CCR.

Auteurs	Méthode	Echantillons	HHV ciblés	Nombre	Résultats
Boguszaková et al. [155]	SB	NM	EBV HCMV	13 Adk 10 Ad	Absence de détection des virus à ADN
Khoury et al [154]	RNA seq	NM	HHV	Colon 138 Rectum 66	Absence de de séquences virales
Kijma et al [158,159]. Cho et al.	ISH	FFPE	EBV	102 274	Absence de l'EBV
Mariguela et al. [176]	NP /IHC	FFPE /sang	HCMV	14CRC/21 CU	Pas d'association entre HCMV ET CCR
Sarvary et al [177].	PCR	FFPE	EBV	70 CCR	1 CCR positif pour EBV Adénomes et tissu normal négatifs
Gock et al. [160]	RT PCR	Cellules dérivées de CCR	EBV	49 CRC	Pas d'association entre EBV et CCR
Militello et al. [102]	QPCR	FFPE/Frais	HCMV EBV	144 Adk 22 Ad	Pas de rôle important pour EBV HCMV dans le développement de CCR
Mehrabani et al. [161]	PCR	Frais	HCMV HSV1 EBV	35CCR et Polypes	Absence de preuve moléculaire directe pour l'association des HHV avec les CCR
Tavakolian et al. [162]	PCR	FFPE	HSV1 HSV2 VZV HCMV	88 ADK	Pas d'association entre ces virus et le CCR
Chen et al. [146]	NP SB IHC	NM	HCMV EBV HSV-1 VZV	ADK	Association entre HHV et CCR non prouvée
Avni et al. [178]	Test sérologique	Sérum	HCMV HSV EBV VZV	57 colon ADK	Taux élevés du HCMV HSV et EBV chez les patients traités uniquement
Sole et al. [171]	PCR QPCR	FFPE	HCMV EBV	38 ADK rectal	EBV /HCMV infections sont associés aux mutations métaboliques KRAS
Park et al. [179]	IHC ISH	FFPE	HCMV EBV	72 CCR	EBV plus fréquemment observé dans les stades avancés du CCR HCMV absent
Sultanova et al. [180]	NP	Sang	HHV6 HHV7	65 CGI	Association entre HHV6, HHV7 et l'aggravation de l'immunosuppression chez les patients
Karpinski et al. [181]	PCR	FF	KSHV EBV	186 CCR	Présence EBV et absence du KHSV
Fiorina et al [168].	PCR IHC	FFPE	KSHV EBV	44 Colon	Présence EBV (latent) dans les lymphocytes infiltrants
Salyakina et al. [174]	NGS	NM	HHV	Colon271 Rectum 111	Détection de EBV, HCMV et HHV6 Co-infection entre EBV et HCMV associée significativement au CCR
Marangiu et al [138]	NGS	Frais	EBV HCMV HHV6 HHV7	80 CCR	40% positifs HCMV 10% positifs HHV6 5% positifs HHV7 50% positifs EBV

CHAPITRE 4 : HCMV ET TC

1. Objectif de l'étude

Les tumeurs cérébrales (TC) forment une grande variété histologique de pronostic et d'évolution variables. En dépit de leur relative rareté chez les adultes, elles constituent de par leur gravité et leur complexité médicale un problème de santé publique majeur [182]. En Algérie, les rapports épidémiologiques révèlent une incidence plus élevée ainsi qu'une précocité d'apparition par rapport aux estimations mondiales [183].

L'évolution des tumeurs cérébrales est encore mal comprise. Cependant, Il est communément admis que des facteurs héréditaires et génétiques influencent leur développement. En contrepartie, le potentiel rôle des facteurs environnementaux demeure incertain, seule l'exposition aux rayonnements ionisants a été reconnue comme un agent étiologique dans le développement des néoplasmes cérébraux [184]. Parmi les nombreux agents environnementaux suggérés comme facteurs associés au développement de TC on retrouve les infections virales par les papillomes HPV, le SV40 et les herpesvirus comme le HCMV [185,186].

La probable implication du HCMV dans l'initiation et ou la progression des TC a été proposée il y a deux décennies suite à plusieurs études révélant sa présence au sein de certains types histologiques de TC comme les gliomes. Cette présence était corrélée à une agressivité tumorale accrue et à un pronostic vital plus court chez les patients positifs [187]. Cependant, d'autres études ont contesté ces conclusions et ont suggéré que la présence du HCMV dans les tumeurs cérébrales pourrait être le résultat d'une infection secondaire plutôt que la cause sous-jacente de la tumorigenèse [188,189].

Actuellement, cette controverse persiste du fait de la découverte de propriétés oncomodulatrices dont le HCMV dispose et qui seraient capables de modifier le comportement des cellules tumorales et celles qui constituent le microenvironnement[30]. De ce fait, cette probable implication pourrait expliquer l'évolution de cette pathologie maligne dont l'étiologie reste encore indéterminée. De surcroit, elle permettrait d'aboutir au développement de nouvelles thérapies ciblées et d'améliorer ainsi le sombre pronostic chez ces patients [190].

Afin d'étudier le potentiel rôle du HCMV dans le développement des TC, nous avons d'abord effectué une étude moléculaire visant à détecter la présence du HCMV au sein de biopsies tissulaires de TC. Puis nous avons procédé à la caractérisation moléculaire de nos échantillons tumoraux à travers l'étude de l'expression des enzymes APOBECs (enzyme d'édition d'ARNm de l'apolipoprotéine B, qui se comporte comme un polypeptide catalytique) qui en plus de leur

importante activité de restriction virale, seraient responsables de par leur pouvoir mutagène de l'hétérogénéité tumorale fréquemment observée dans les TC [191].

1.1. Étude de la prévalence du HCMV dans les Tumeurs cérébrales

Le but de cette étude est d'évaluer la présence du HCMV dans nos échantillons via l'amplification par polymérase en chaîne (PCR) du génome viral. En outre, nous avons examiné la présence des autres herpesvirus par la PCR nichée.

1.1.1. Échantillons cliniques :

Nous avons mené notre étude expérimentale sur des biopsies tissulaires provenant d'une exérèse tumorale effectuée sur des patients atteints de tumeurs cérébrales admis au niveau du service de neurochirurgie CHU khilil Amrane de Bejaia sur une période allant de janvier 2017 à juin 2019. Nous avons inclus essentiellement les patients atteints de tumeurs gliales ou de méningiomes primitifs, considérés comme étant les tumeurs cérébrales les plus fréquentes. Les anciennes biopsies ainsi que les autres sous-types histologiques n'ont pas été inclus dans notre investigation. Par ailleurs, nous avons colligé les données cliniques jugés pertinentes. Notre étude moléculaire a été effectuée sur un total de 48 échantillons de tissus inclus en paraffine (FFPE) comprenant 27 tumeurs gliales, 20 méningiomes et un échantillon sain utilisé comme témoin. Les prélèvements ont été inclus en paraffine après résection par les techniciens du laboratoire de recherche de la faculté de médecine affilié à l'équipe génie biologique des cancers (GBC) selon la procédure standard, puis ont fait l'objet d'un examen anatomopathologique par deux médecins anatomopathologistes pour confirmer le diagnostic (figure 40).

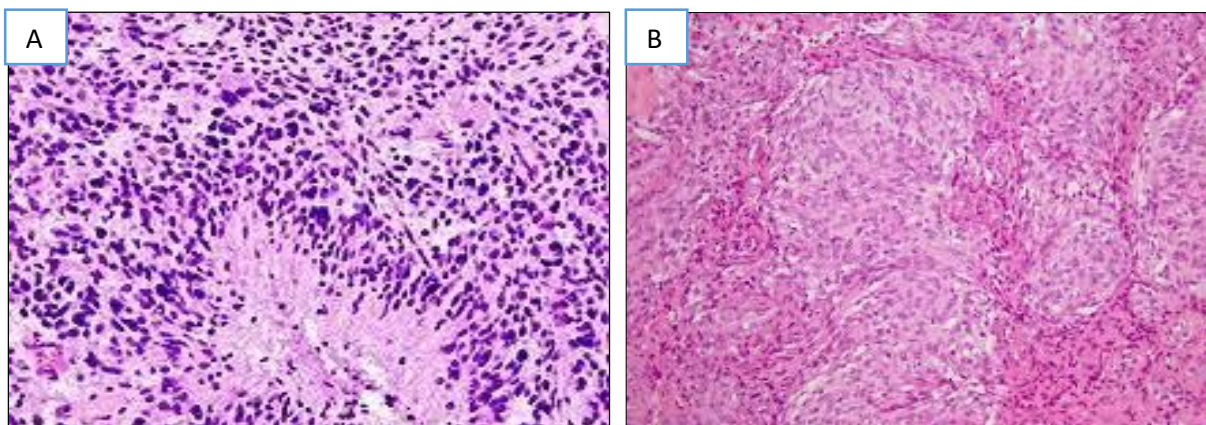


Figure 40 : Micrographies de Tumeurs cérébrales. Les coupes histologiques représentent un gliome de haut grade (GBM) en A et un méningiome Grade 1 en B. (interprétation effectuée par le Dr Nasri F. Médecin spécialiste en anatomie pathologique).

1.1.2. Méthodes

Pour effectuer notre analyse moléculaire, nous avons d'abord procédé à l'extraction des acides nucléiques (ADN/ARN) à partir des biopsies tissulaires de notre cohorte, puis nous avons déterminé leurs concentrations et leurs puretés. Enfin, pour examiner la présence du HCMV dans nos échantillons, nous avons réalisé une PCR nichée (décrite ci-dessous) ainsi que des PCR qualitatives visant à amplifier les gènes UL55 codant pour la protéine gB et UL54 codant pour l'ADN polymérase virale. Puis nous avons réalisé une PCR nichée (Panherpes Nested-PCR) pour évaluer la présence des autres HHVs au sein de nos échantillons.

NB. Nous avons suivi lors de la procédure d'extraction des acides nucléiques, les PCR qualitatives ainsi que la Panherpesvirus Nested-PCR les mêmes protocoles décrits précédemment dans le chapitre 3 HCMV et CCR.

Evaluation quantitative et qualitative des Acides nucléiques :

La quantité et la qualité de l'ADN ont été évaluées par spectrophotométrie (Implen N60 Nanophotometer) (figure 27). La concentration des ADNs obtenues était comprise entre [26ng/μl et 860ng/μl]. La pureté a été évaluée selon les ratios 260/280 et 260/230. En outre, nous avons effectué une PCR de contrôle en utilisant la bêta-actine pour vérifier l'intégrité des échantillons d'ADNs que nous avons extraits (figure 29).

PCR Nichée :

En parallèle des PCR qualitatives réalisées pour détecter la présence du HCMV, nous avons effectué une PCR nichée précédemment décrite par *Shamran et al* [192] (Tableau 12) qui vise à amplifier une région du promoteur du gène très précoce IE1 (Immediate early) du HCMV (Figure 41). Pour réaliser cette amplification nous avons utilisé le kit TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermofisher, Massachusetts, USA) et suivi les instructions fournis par le fabriquant.

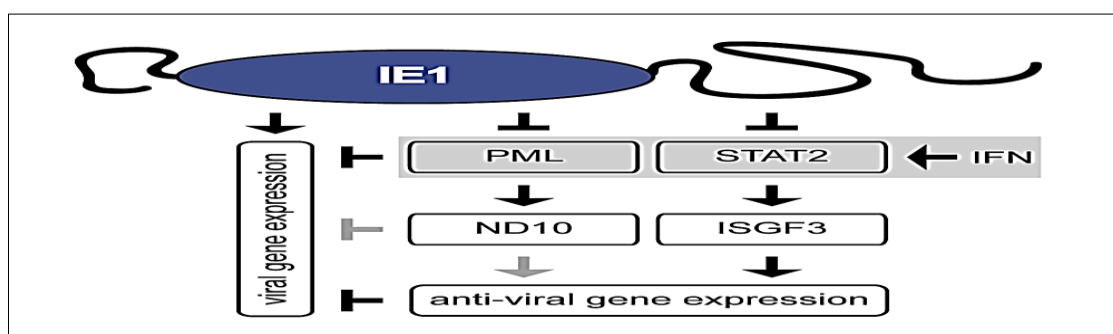


Figure 41 : Activités de la protéine virale IE1[193].

Tableau 12 : Description des conditions de la PCR nichée

Amorces	Séquences nucléotidiques	Taille de l'amplicon
Sens	5'CCGAAATACGCGTTTTGAGAT	1300 pb
Antisens	5'CCAAGCCAAAAACAGTATAGC	
Sens	5'GGCGGAGTT(G/A)TTACGACATTT	144 pb
Antisens	5'ATGCGGTTTTGGCAGTACAT	
Cycles	Températures	Durée
1	95°C	5 min
	94°C (×45 cycles)	30 sec
	56°C	30sec
	72°C	1min
	72°C	10 min
2	95°C	5 min
	94°C (×40 cycles)	20 sec
	65°C	20 sec
	72°C	20sec
	72°C	5min

1.2. Évaluation du profil d'expression de l'APOBEC

L'objectif de cette étude est la caractérisation moléculaire de nos échantillons tumoraux à travers l'évaluation du profil d'expression de l'enzyme APOBEC3A (A3A) au sein de nos échantillons par l'intermédiaire d'une RT-PCR (Reverse transcriptase).

1.2.1. Choix de la cible enzymatique

Comme nous l'avons précédemment exposé, les APOBEC sont une famille d'enzymes à activité cytidine-désaminase, constituée de 11 membres possédant une activité mutagène et qui font partie des agents responsables de la restriction virale *via* une pléthore de mécanismes (Figure 42). Toutefois, la fonction et l'expression spécifique au niveau des tissus varient considérablement pour chaque protéine APOBEC. La sous-famille APOBEC3 dont le A3A agissent sur une variété de virus à ARN comme le HIV ou à ADN comme les herpesvirus [194]. En outre, de récentes études révèlent que dans une cellule normale, l'enzyme A3A provoque un stress lors de la réplication et entraîne des dommages à l'ADN ce qui peut engendrer la mort cellulaire. A contrario, cette enzyme induit la mutagénèse dans les cellules cancéreuses et peut ainsi promouvoir la survie cellulaire. En outre, A3A est responsable de la désamination de la cytidine dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses provenant de gliomes ou de cancer colorectal (Figure 43). Aussi, il est le seul APOBEC dont l'expression correspond au taux de mutation induite par ces enzymes [195].

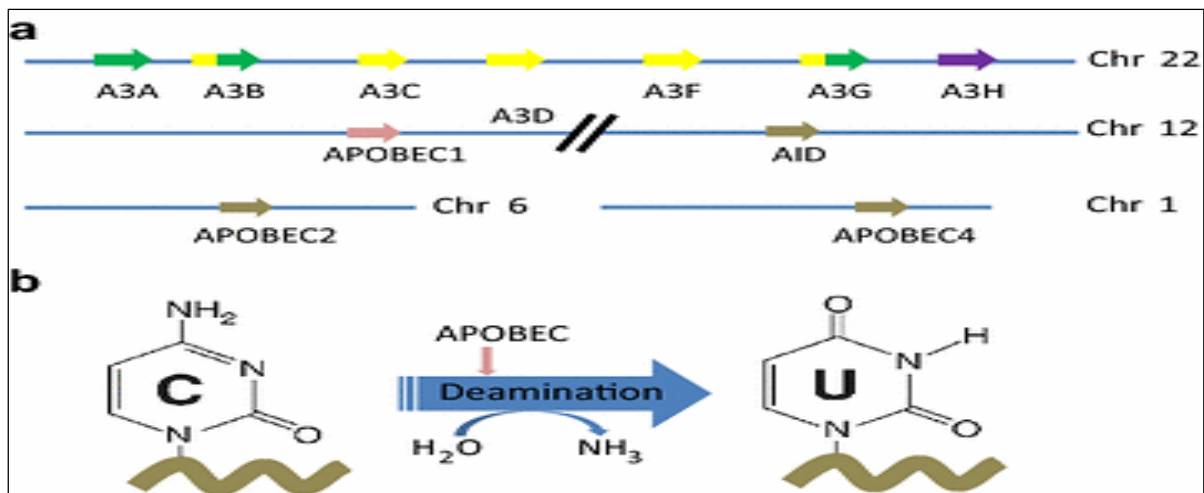


Figure 42 : Membres de la famille APOBEC. **a** : localisation chromosomique des 11 membres (A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H, A1, A2, A4 et AID) qui constituent la famille APOBEC. **b** : les APOBECs possèdent une activité enzymatique de cytosine désaminase, elle consiste en l'hydrolyse de la cytosine en l'uracile (C-to-U) sur un substrat d'ADN monocaténaire (DNAsb)[196].

1.2.2. Échantillons testés

Afin d'obtenir le profil d'expression de l'A3A au sein des TC nous avons effectué notre amplification sur 12 échantillons de TC (6 gliomes et 6 méningiomes) ainsi que sur 12 échantillons témoins provenant du tractus intestinal qui présentent le même niveau d'expression de l'enzyme qu'un tissu cérébral sain source : *human protein atlas* (A défaut d'avoir pu obtenir des échantillons d'un parenchyme cérébral sain). Des échantillons de CCR ont été également testés (n=6).

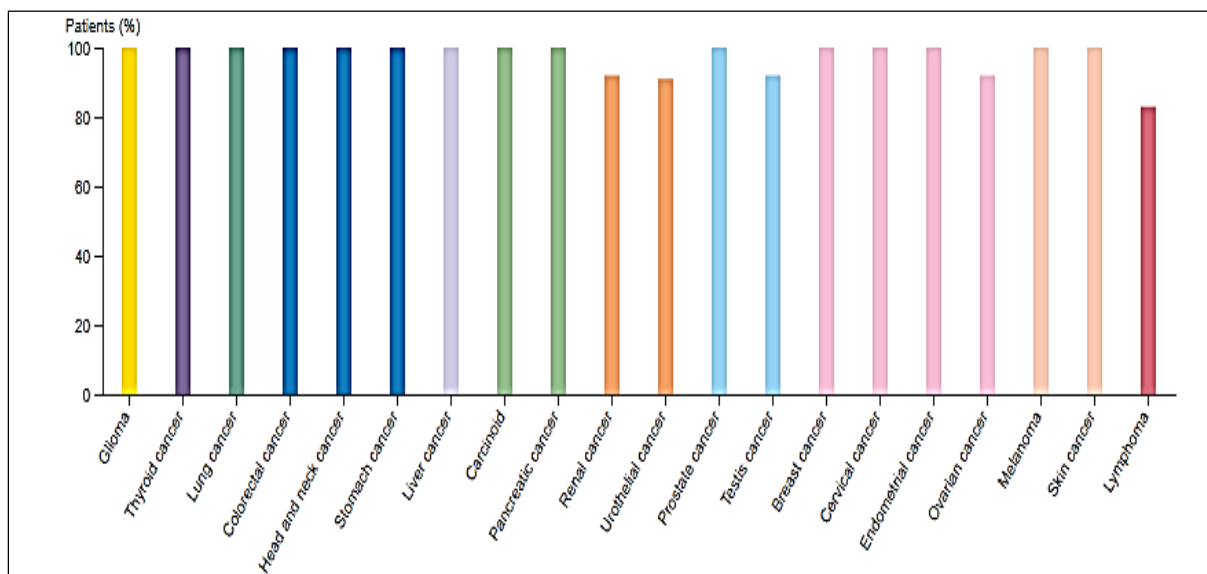


Figure 43 : Expression de l'enzyme A3A dans différents cancers humains. D'après the human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org/>

1.2.3. Méthodes :

Pour obtenir le profil d'expression de l'enzyme étudiée, nous avons d'abord procédé à l'isolation des ARNs totaux à partir des échantillons tumoraux et témoins sur lesquels nous avons déjà effectué l'extraction des acides nucléiques, puis nous avons déterminé leurs concentrations et leurs puretés, Ensuite nous avons réalisé une transcription inverse suivie par une amplification du gène cible avec des amorces spécifiques afin d'obtenir le profil d'expression de l'enzyme A3A au sein des échantillons de biopsies testées.

Isolation des ARNs totaux :

L'isolation des ARNs a été réalisée avec le kit (Promega, ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System, Wisconsin, USA) en suivant les instructions fournis par le fabricant. Brièvement, suite à l'extraction des acides nucléiques obtenus à partir des tissus FFPE provenant des biopsies des échantillons étudiés, nous avons effectué un traitement enzymatique sur nos échantillons qui nécessite l'utilisation de la DNAase puis nous avons procédé à l'élution des ARNs totaux.

La qualité ainsi que la quantité des ARNs obtenus ont été évaluées par spectroscopie. Pour considérer un échantillon pur en ARN le rapport de l'absorbance des longueurs d'ondes 260/280 nm doit être compris entre 1.8 et 2. De ce fait, les ARNs avec un rapport inférieur à 1.8 n'ont pas été inclus dans notre étude car ceci implique généralement une contamination protéique pouvant inhiber l'amplification. Les échantillons testés ont été choisis d'après l'analyse quantitative et qualitative des ARNs totaux obtenus après extraction.

Réalisation de la RT-PCR :

La PCR quantitative permet d'accéder de façon précise et spécifique au niveau d'expression d'un gène dans un échantillon d'ARN totaux donnée. Elle repose sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus d'amplification à l'aide d'un émetteur fluorescent qui se forme durant la PCR. Le signal d'émission récupéré est proportionnel à la quantité d'amplicons formés (Figure 44). Ce qui nous permet d'évaluer le niveau d'expression de notre gène cible A3A [197].

Principe :

La méthode utilisée est le système SYBR green qui est une molécule fluorescente se fixant préférentiellement sur l'ADN double brins. Cet agent intercalant émet un signal de fluorescence

quand il est excité par les rayonnements ultra-violet. Ces signaux sont collectés à chaque cycle de PCR et indiquent la quantité de l'amplicon à chaque instant.

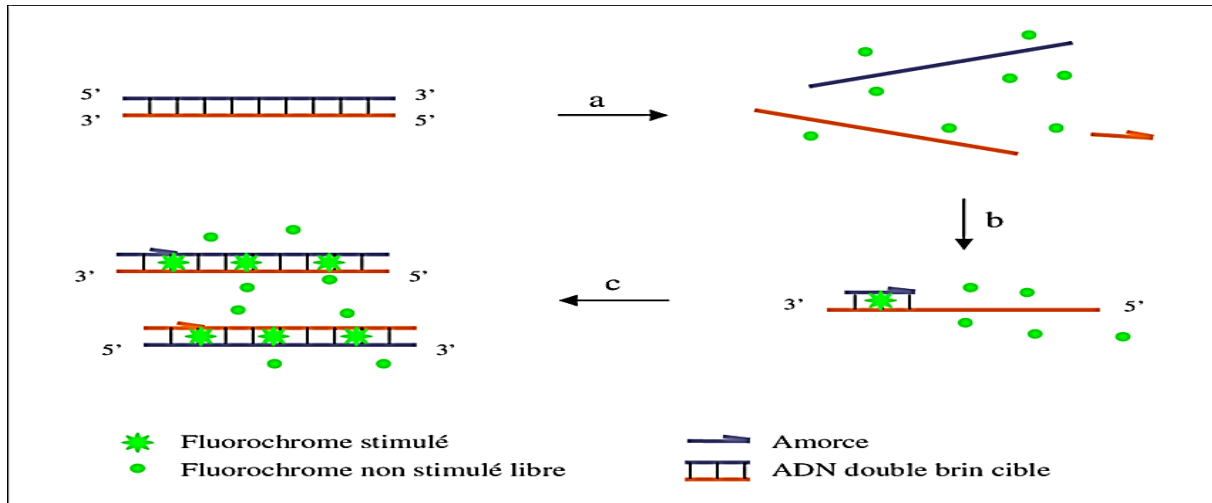


Figure 44 : Etapes de la PCR en temps réel. (a) Dénaturation : le SYBR Green I est libre, la fluorescence est faible. (b) Hybridation des amorces et liaison du SYBR Green à l'ADN double brin induit une augmentation de la fluorescence (c) Elongation : l'intensité du signal SYBR green est corrélée à la quantité d'ADN amplifié [198].

La quantification d'un échantillon est réalisée par la détermination du cycle seuil Ct (cycle threshold) qui indique le début de la phase exponentielle d'amplification du gène cible. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN cible (Figure 45). Par conséquent, la comparaison des valeurs des Ct entre les différents échantillons permet de comparer le niveau d'expression du gène codant pour notre enzyme d'intérêt A3A.

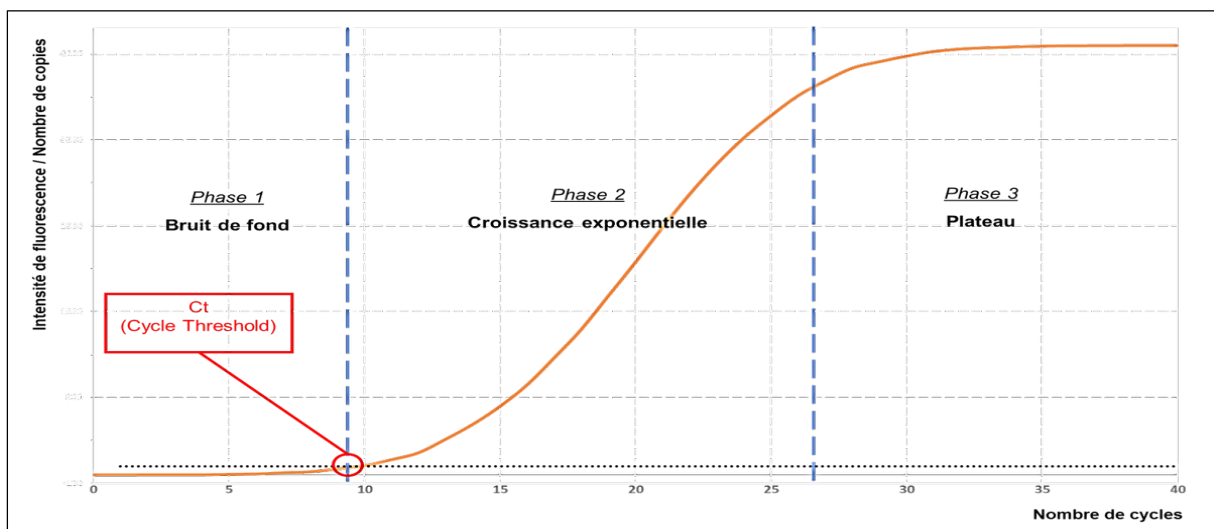


Figure 45 : Cinétique de la PCR en temps réel. Le Ct correspond au nombre de cycle à partir duquel le produit formé (gène cible) se distingue du bruit de fond. Plus un échantillon contiendra de gène cible plus l'amplification sera importante et donc plus le nombre de cycle nécessaire pour atteindre le seuil sera faible [198]

Description générale du protocole :

Pour amplifier notre gène cible à partir des ARN totaux, nous avons utilisé le kit Power SYBR® Green RNA-to- Ct 1step (Applied Biosystem AB, California USA). Ce kit permet la réalisation de la transcription inverse et de l'amplification quantitative dans la même réaction. Selon les instructions du fournisseur pour une plaque de 96 puits, le mélange réactionnel (20µl/réaction) contient : 0.16 µl de l'enzyme RT, 10 µl du Mix RT-PCR, 1µl de chaque amorce (droite et gauche), 2.84 µl d'eau sans nucléases et 5µl d'échantillon ARN. Chaque échantillon est testé en dupliquât. L'amplification est effectuée pour le gène étudié (A3A) et pour un gène de contrôle interne (Beta actine). Le même mélange réactionnel a été reproduit pour les deux couples d'amorces testés [199] (gène cible et gène contrôle).

Séquences nucléotidiques des amorces utilisés pour l'amplification de l'A3A

Amorce droite :5-TGGATCCATCAAGTGTCTGG

Amorce gauche :5-GAGAAGGGACAAGCACATGG

L'amplification a été réalisé avec le thermocycleur AB® 7500 fast real-time (AB, California USA). Les étapes du programme PCR sont mentionnées ci-dessous (tableau 13).

Tableau 13 : Programme de la RT-PCR

Étapes	Température (°C)	Durée	Cycles
Transcription inverse	48	30 min	/
Activation enzymatique	95	10 min	/
Dénaturation	95	15 sec	/
Hybridation /élongation	60	1 min	40

Traitement et analyse des données :

L'acquisition de données a été réalisée avec le logiciel 7500 fast system v1.3.1 softwares. Afin de déterminer le niveau d'expression relative de notre gène d'intérêt A3A, nous avons utilisé la méthode Livak ou la méthode $\Delta\Delta Ct$ qui utilise une formule arithmétique pour calculer le ratio d'expression d'un gène cible en le normalisant avec un gène de référence [200].

Tout d'abord, les différences ΔCt entre les valeurs de Ct du gène cible et du gène de référence sont déterminées pour l'échantillon à analyser et le contrôle :

$$\text{Delta Ct} = \text{Ct gène} - \text{Ct contrôle endogène}$$

Ensuite, le $\Delta\Delta Ct$ entre le contrôle et l'échantillon est calculé :

$$\text{Delta Delta Ct} = \Delta Ct \text{ échantillon1} - \Delta Ct \text{ calibrateur}$$

Enfin, le ratio d'expression ou Fold change (RQ : Relative quantification) normalisé d'un gène cible est déterminé par la formule :

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

L'ensemble des calculs est effectué avec le logiciel Excel, l'étude statistique et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel Graphpad Prism (version10)

2. Résultats

2.1. Prévalence du HCMV dans les TC

Notre étude moléculaire a été effectuée sur une cohorte de 48 échantillons tissulaires de tumeurs cérébrales inclus en paraffine (FFPE). La tranche d'âge des patients inclus variait entre 9 et 68 ans avec une moyenne d'âge de 49 ans et un sexe-ratio de 1.05 en faveur des males. Les glioblastomes (GBM) représentaient le sous-type histologique le plus fréquent (Tableau 14).

La présence du HCMV au sein de nos échantillons a été analysée par des amplifications par polymérisation en chaîne.

Les PCRs qualitatives effectuées sur la totalité de nos échantillons avec les amorces spécifiques aux gènes UL54 et UL55 n'ont pas révélé la présence du virus au sein de nos échantillons (figure 46).

Tableau 14 : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude

Caractéristiques cliniques	Gliomes (n=27)	Méningiomes (n=20)
Groupes d'âge		
>15	4	/
[15-68]	23	20
Sexe ratio	1.4 (en faveur des males)	1.6 (en faveur des femelles)
Grade		
Haut grade	13	1
Bas grade	4	9
	10 Non mentionnés	10 Non mentionnés

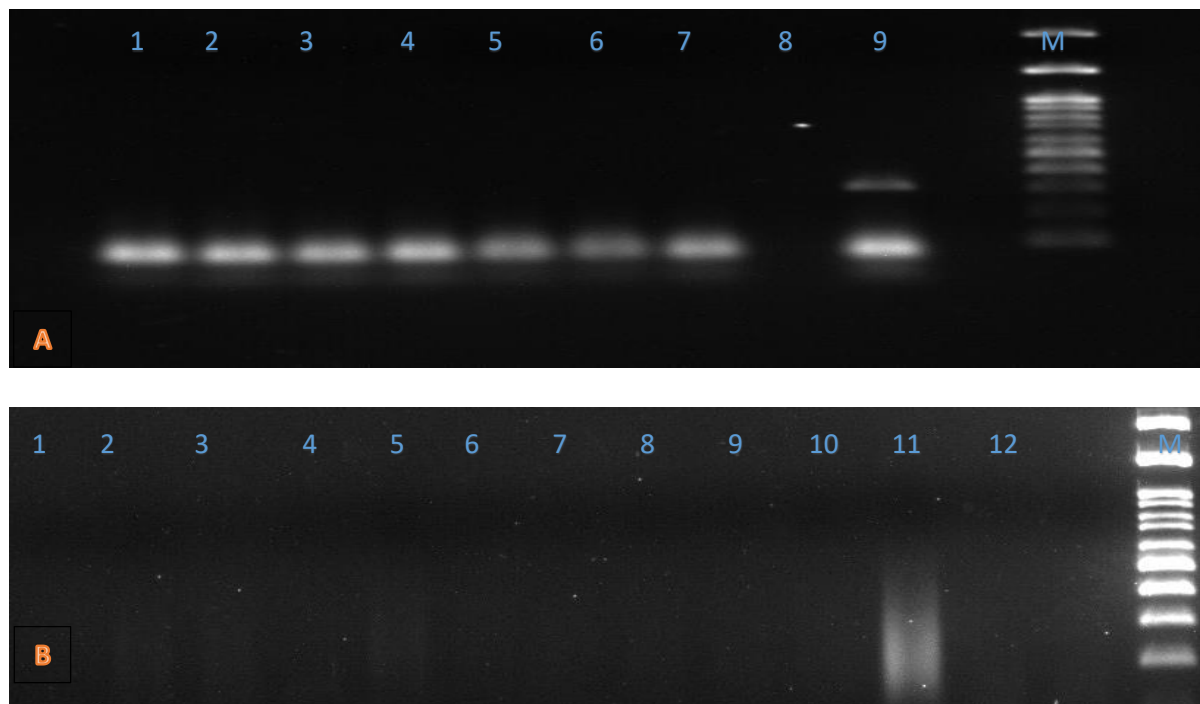


Figure 46 : PCRs spécifiques pour la détection du HCMV. Gel électrophorétique de l'amplification avec les amorces UL55 en A :1-7 : échantillons de TC, 8 : contrôle négatif, 9 : contrôle positif UL54 en B :1-10 : échantillons de TC,11 : contrôle positif, 12 : contrôle négatif, M : Marqueur de taille (100kb). La tache (smear) qui apparaît pourrait s'expliquer par un début de dégradation de notre contrôle positif.

La PCR nichée effectuée sur les gliomes (N=27) a également confirmé ces résultats, tous les échantillons étaient négatifs.

En outre aucun herpesvirus humain n'a été détecté au sein de notre cohorte de TC et ce malgré la sensibilité de la méthode PanHerpes Nested PCR démontrée préalablement (figure 47).

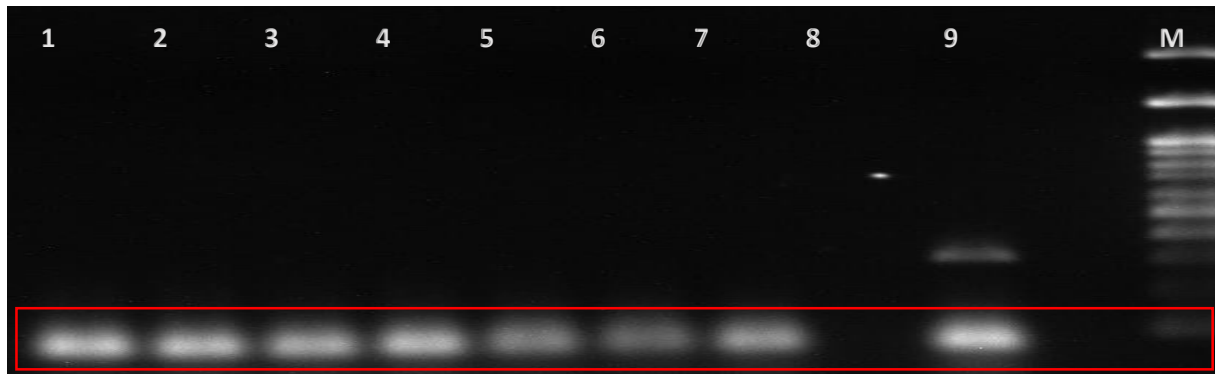


Figure 47 : PCR nichée pour détecter les herpesvirus dans nos échantillons. L'ensemble des échantillons testés étaient négatifs. 1-7 échantillons de tumeurs cérébrales, 8 contrôle négatif, 9 : contrôle positif. M : marqueur de taille (KB). Le marquage signalé sur le gel est dû à la dimérisation des couples d'amorces utilisés.

2.2. Profil de l'expression de L'A3A :

Le profil d'expression de l'enzyme APOBEC(A3A) a été déterminé par le calcul de l'expression relative du gène A3A entre les différents échantillons. L'analyse révèle qu'en moyenne, l'expression de notre gène cible (A3A) est 2.4 fois (Ecart type ou SD = ± 0.6246) plus importante dans les tumeurs cérébrales que dans les échantillons témoins que nous avons testés (figure 48).

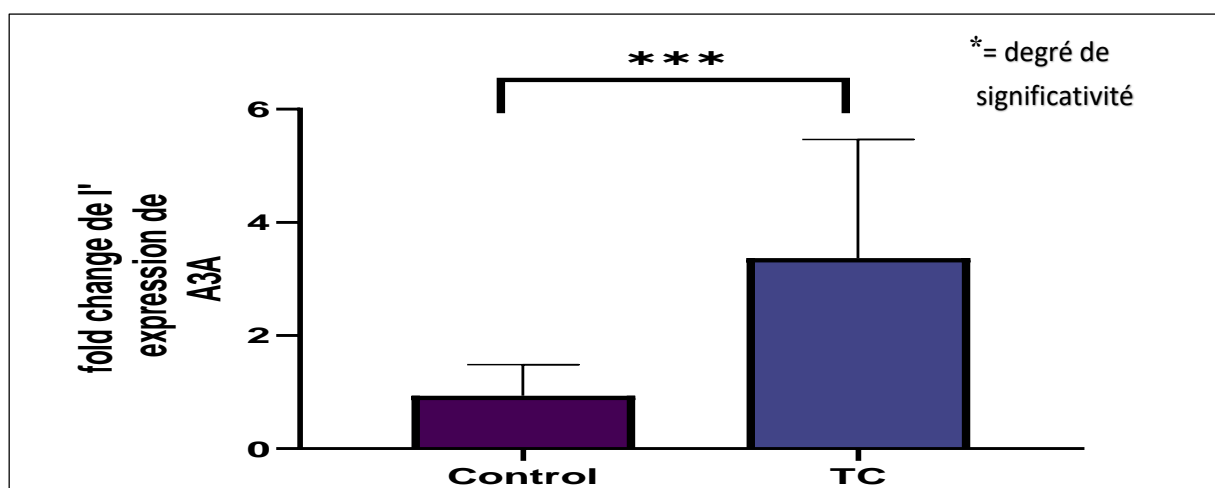


Figure 48 : Expression relative de L'A3A uans les TC et les contrôles. L'expression relative de l'A3A est exprimée en fold change. La différence d'expression est statistiquement significative P valeur = 0.0008 (***) signifie une p valeur ≤ 0.001)

En outre, nous avons mesuré l'expression relative du gène A3A dans les différents échantillons de tumeurs cérébrales (n=12) qui comprends six gliomes et six méningiomes de différents grades, illustrée par la courbe ci-dessous (figure 49). Celle-ci semble révéler une différence d'expression selon le type histologique.

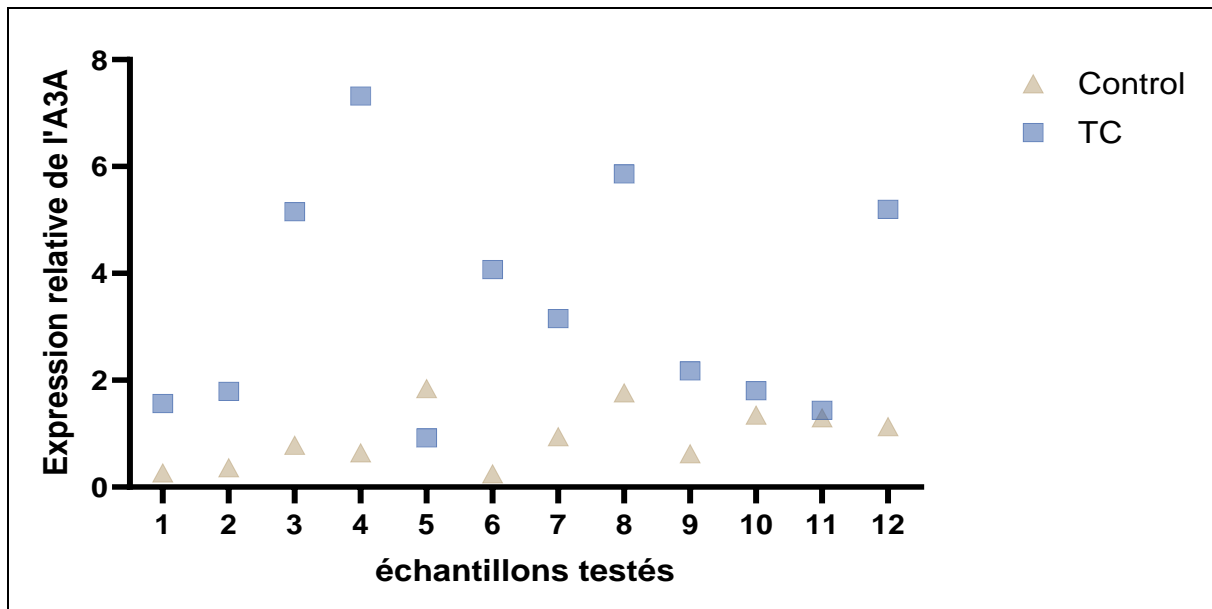


Figure 49 : Courbe de l'expression de L'A3A dans les différents échantillons testés. Les triangles représentent les échantillons contrôles, les carrés représentent les échantillons de TC testés (1,4,6,7,8,12 correspondent aux gliomes ; 2,3,5,9,10,11 correspondent aux méningiomes)

Pour confirmer cette différence d'expression nous avons mesuré l'expression relative de l'A3A au sein des gliomes et des méningiomes et nous avons trouvé que l'expression génique était en moyenne 2.3 fois (SD = ± 1.021) plus importante dans les gliomes que dans les méningiomes (figure 50). La différence d'expression est statistiquement significative avec une P valeur = 0.04.

Notons que les échantillons de gliomes et de méningiomes testés présentaient des grades de malignité différents :

Pour les gliomes, 4/6 des échantillons testés étaient des glioblastomes de grade 4. Quant aux méningiomes, 5/6 des échantillons testés étaient des méningiomes bénins de grade 1.

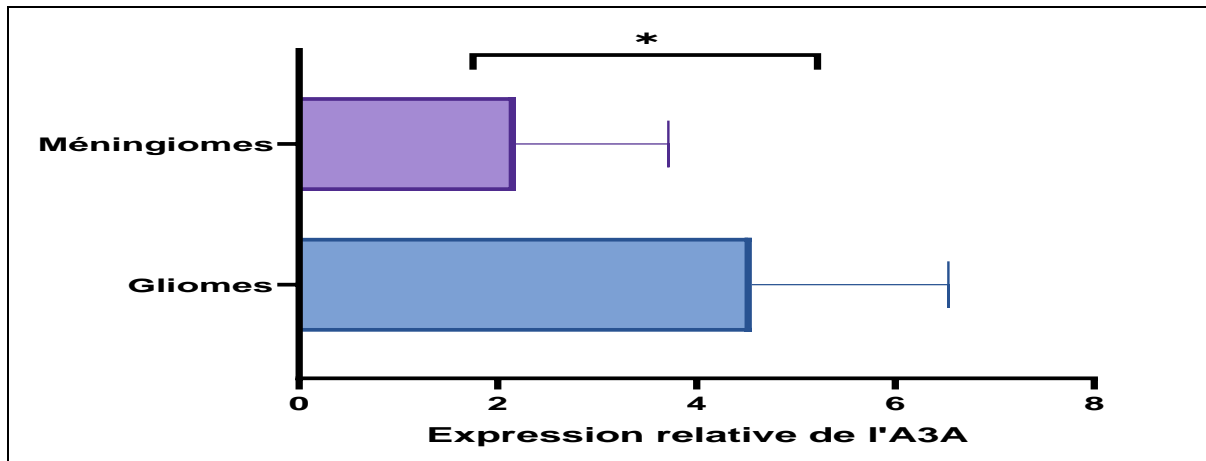


Figure 50 : Comparaison de l'expression relative de L'A3A dans les gliomes et les méningiomes. (* signifie une P valeur ≤ 0.05).

Par ailleurs, nous avons voulu comparer le profil d'expression de L'A3A entre les TC et les CCR. De façon intéressante, l'étude de l'expression du gène cible au sein des CCR révèle une légère surexpression de l'A3A par rapport aux échantillons témoins. Celle-ci était 0.68 fois (SD= ± 0.3196) plus élevée (Figure 51). Cependant, l'expression relative de notre gène cible était 1.78 plus élevée dans les TC que dans les CCR cependant la P valeur supérieur à 0.05 indique le seuil de significativité n'est pas atteint.

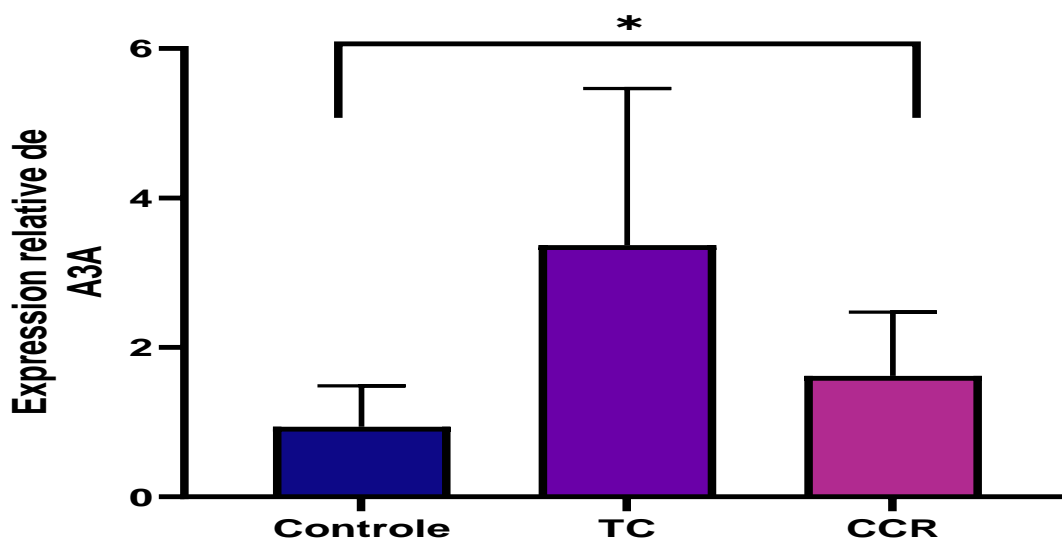


Figure 51 : Comparaison de l'expression relative de A3A entre les TC et les CCR. La différence d'expression est statistiquement significative (p valeur =0.04) (* signifie une P valeur ≤ 0.05)

3. Discussion

3.1. HCMV et tumeurs cérébrales :

Les tumeurs cérébrales constituent une proportion minoritaire parmi les néoplasmes observés chez l'homme. Néanmoins, du fait de la disproportion entre leur incidence et les conséquences significatives en termes de morbidité et de mortalité qu'ils engendrent, l'étude des mécanismes sous-jacents à leur étiopathogénie revêt une importance capitale sur le plan de la recherche scientifique [81]. Les glioblastomes (GBM) qui représentent les tumeurs cérébrales primaires malignes les plus fréquentes et les plus agressives chez l'adulte, illustrent parfaitement ce cas de figure ; caractérisés par un phénotype hautement invasif, le pronostic des patients atteints de GBM reste sombre avec une espérance de vie médiane de 15 mois et ce malgré la prise en charge [182]. De ce fait, la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques pourrait aboutir à un traitement ciblé plus efficace et moins invasif.

De par leur caractère neurotrophique et leur association avec plusieurs pathologies neurodégénératives, les herpesvirus représentent une intéressante piste de recherche dans le développement de malignités dans le SNC. En effet, ces virus peuvent contrôler l'activation des cellules gliales qui libèrent des médiateurs pro-inflammatoires et augmentent le stress oxydatif ce qui peut engendrer une cancérisation du tissu infecté. [185]

Actuellement, certaines études axées sur la relation entre le HCMV et le développement de TC attestent de son rôle majeur dans leur développement du fait de sa détection à une prévalence élevée dans différents échantillons de tumeurs cérébrales y compris les tumeurs gliales de haut grade, les médulloblastomes et les méningiomes [201]. La présence virale serait associée à un mauvais pronostic et un taux de survie globale plus court dus à une progression tumorale plus rapide et un taux de récurrence plus élevée après une exérèse chirurgicale chez les patients atteints de GBM [35]. Selon ces études, cette agressivité tumorale accrue pourrait être la conséquence des propriétés oncomodulatrices des protéines virales qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration, la formation de métastases et l'échappement au système immunitaire [150].

Toutefois, d'autres études qui n'ont pas pu détecter le virus ou bien sa prévalence n'était pas statistiquement significative entre les tissus tumoraux et les tissus contrôles testés ; contestent ces résultats et par conséquent ils n'attribuent aucun rôle significatif au HCMV dans l'évolution des TC [188,189].

Dans cette optique, nous avons voulu étudier la présence du virus via la polymérisation en chaîne car l'approche moléculaire est plus sensible que les techniques histologiques dans la détection du virus [202], ces PCRs visent à amplifier le génome viral au sein de notre cohorte de TC (n=48) constituée de différents grades de gliomes et de méningiomes. Cependant, nous n'avons pas détecté la présence du HCMV au sein de nos échantillons. Nos résultats rejoignent ceux de plusieurs chercheurs qui se sont intéressés à la potentielle association entre le HCMV et les TC et qui n'ont pas abouti à une corrélation significative en dépit des diverses techniques sensibles utilisées comme la PCR, le séquençage, l'IHC ou l'ISH [203] [204] et des modèles étudiés (lignés cellulaires, biopsies tissulaires ou sérums) [205–207].

De façon intéressante, il existerait une association plus importante entre le HCMV et la gliomagenèse par rapport aux autres types histologiques de TC [208]. Bien que la cause exacte demeure incertaine, des études stipulent que le HCMV possède la capacité d'infecter les cellules tumorales initiatrices des gliomes (cellules souches cancéreuses CSC) et qui sous certaines conditions permettraient l'expression de ses protéines aux propriétés oncovirales ou oncomodulatrices. Parmi ces conditions, l'expression du PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) par les CSC, permettrait la liaison du HCMV via la protéine gB puis sa pénétration et sa multiplication dans la cellule tumorale. Cette infection induit l'activation de la voie de signalisation de la phosphoinositidine-3 kinase (PI3K) impliquée dans la prolifération et la synthèse de l'IL10 responsable de la polarisation des macrophages en M2 qui infiltrent les tumeurs ce qui stimule en conséquence la croissance tumorale, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, la migration et l'invasion des cellules tumorales gliales [187,209].

Dans notre étude, nous avons évalué la présence virale sur des biopsies provenant de patients atteints de gliomes (N=27) avec une PCR nichée rapportée précédemment et qui a permis la détection du virus dans la majorité des échantillons testés (sur les 50 tissus FFPE de TC, 80% des étaient positifs) [192]. Néanmoins, la totalité des gliomes de notre cohorte étaient négatifs. En outre, ces résultats ont été confirmés par la PCR nichée Pan-Herpesvirus. Malgré la sensibilité de la technique aucune preuve de la présence du HCMV ou d'un autre membre de la famille des herpesvirus n'a été détecté.

Pour tenter d'expliquer ces résultats discordants retrouvés dans la littérature, des chercheurs ont proposés deux hypothèses qui permettraient de comprendre le mécanisme d'action du HCMV au sein des tumeurs qui sont les micro-infections et l'hypothèse du « *hit and run* » [187]

La micro-infection est définie comme une infection active de faible grade où le virus est présent à de faible taux, les cellules infectées sont rares et présentes uniquement dans les zones dans

lesquelles l'inflammation est présente. Cette micro-infection a été mise en évidence dans plusieurs pathologies inflammatoires comme les MICI mais aussi dans des pathologies cancéreuses comme les CCR et les gliomes. De ce fait, les partisans de cette théorie soulignent l'importance de la méthodologie suivie lors de la détection du virus qui n'est possible que lorsque des méthodes plus sensibles sont utilisées [4]. Toutefois, l'optimisation de ces méthodes s'appuie dans le cas de l'IHC sur l'utilisation de concentration élevée d'anticorps virales spécifiques ce qui favoriserait l'obtention d'échantillons « faux positifs » et pourrait ainsi biaiser les résultats [38]. En outre, on ne sait toujours pas si ces micro-infections sont un épiphénomène de l'inflammation ou facteur causal dans les maladies inflammatoires et cancéreuses.

Quant au "Hit and run " littéralement "frapper et s'enfuir", ce phénomène pourrait expliquer l'inconsistance de la présence du HCMV dans les différents échantillons testés. Cette hypothèse émane de certaines observations faites sur des études *in vitro* où l'infection par le HCMV provoque l'altération de plusieurs voies critiques pour la transformation maligne cependant l'expression des antigènes viraux diminue à travers les passages en culture et l'ADN viral n'est plus détectée dans la plupart des transformants [210]. Toutefois, l'existence d'un pareil mécanisme *in vivo* reste difficile à prouver.

En dépit des divergences quant au rôle du HCMV dans le développement des TC, plusieurs thérapies basées sur l'utilisation du HCMV comme nouvelle cible ont été proposées. Les résultats des études *in vivo* et *in vitro* qui ont utilisé les drogues anti HCMV sur des médulloblastomes, neuroblastomes et glioblastomes positifs au HCMV indiquent une réduction significative de la taille tumorale par rapport au placebo. En outre, les premiers essais cliniques sur des patients atteints de GBM à qui on a administré ces drogues anti HCMV en complément des thérapies conventionnelles ont obtenu une nette amélioration des taux de survie globale pouvant atteindre les 70 % sur 2 ans (vs 18% pour les contrôles) [211] [190].

Actuellement l'utilisation des antigènes viraux du HCMV dans les protocoles d'immunothérapie antitumorale suscite fortement l'intérêt des chercheurs. A cet effet, plusieurs stratégies comme la vaccination thérapeutiques avec des cellules dendritiques sensibilisées ou avec une thérapie cellulaire adoptive sont en cours d'évaluation mais présentent déjà des résultats très prometteurs. Cependant il est nécessaire d'évaluer la réelle efficacité de ces différents protocoles ciblant le HCMV sur un large nombre de patients en tenant compte de l'état immunosuppresseur des patients atteints de glioblastome [212,213].

3.2. Évaluation du rôle du HCMV dans la pathologie cancéreuse :

Les oncovirus jouent un rôle significatif dans la charge mondiale liée au cancer. Ces cancers viro-induits se distinguent par plusieurs caractéristiques comme l'établissement d'une infection persistante, la nécessité d'un laps de temps substantiel entre l'infection et l'émergence du cancer et enfin ces oncovirus sont des éléments nécessaires, mais non exclusifs, dans le processus de développement tumoral. Parmi les oncovirus connus, on compte deux herpesvirus humains, les autres membres sont actuellement en cours d'évaluation [214].

L'actuel consensus ne considère pas le HCMV comme un virus oncogène. Ce dernier, exercerait plutôt un rôle oncomodulateur qui peut soutenir la croissance tumorale en favorisant l'acquisition des différentes caractéristiques du cancer (hallmarks)[35]. Toutefois, de récentes données indiquent que deux souches isolées et caractérisées du HCMV codent pour des protéines possédant des propriétés biologiques directement liées à la transformation cellulaire et au développement tumoral, conférant ainsi un rôle direct au HCMV dans l'oncogénèse. Cependant, en l'absence d'un consensus définissant les critères de causalité des cancers, il est difficile de déterminer si un virus donné est un oncovirus [34]. Les critères de Bradford Hill, sont une mesure pertinente permettant d'établir un lien de causalité entre un facteur spécifique et une maladie. Parmi ces différents critères on retrouve : la force de l'association, sa stabilité, la spécificité, la relation temporelle, la relation dose-effet, la plausibilité, la preuve expérimentale et l'analogie. Habituellement et en règle générale, les critères majeurs pris en compte pour établir une causalité directe d'un virus sont la cohérence de l'association au niveau épidémiologique et/ou moléculaire, la tumorigénicité de l'agent dans les modèles animaux ou sa capacité de transformation en culture cellulaire [2]. Lorsque on applique ces critères sur le lien entre le HCMV et la tumorigénèse nous constatons que si les nouvelles données indiquent une plausibilité biologique où selon la souche étudiée, le HCMV pourrait présenter des propriétés oncogéniques démontrées *in vitro* et *in vivo* analogues à celles des oncovirus connus, l'association HCMV/cancer étudiée à travers les études épidémiologiques reste à ce jour controversée[3,30,190]. En outre, la correspondance d'une relation temporelle et géographique entre infection /cancer est extrêmement ardue à prouver notamment à cause de la prévalence mondiale élevée du virus [16]. Cependant il est important de préciser que tous ces critères n'ont pas besoin d'être remplis pour démontrer la plausibilité d'une association virus / cancer. De surcroît, l'étonnant effet de réduction de la croissance tumorale suite à l'utilisation de drogues

anti HCMV suggère que le HCMV tiendrait un rôle important dans le développement tumoral[7].

En conclusion, nos résultats n'indiquent pas de rôle majeur pour le HCMV dans le développement de néoplasmes cérébraux. Toutefois, notre étude a été menée sur un nombre restreint de patients et par conséquent une oncogenèse induite par le HCMV ne peut être écartée dans le cas des tumeurs cérébrales. De plus amples investigations sont nécessaires pour élucider cette question.

3.3. Expression des APOBEC dans la pathologie cancéreuse :

L'hétérogénéité tumorale est un trait caractéristique du cancer observé dans la majorité des tumeurs malignes. Elle peut être due à de nombreux facteurs tels que l'instabilité génomique ou l'état d'inflammation au niveau du microenvironnement tumoral. Cette hétérogénéité est généralement associée à un phénotype tumoral plus agressif et implique souvent une résistance aux différentes thérapies anti cancéreuses [215]. Parmi les agents intrinsèques qui peuvent potentiellement exacerber cette hétérogénéité, nous retrouvons la famille des APOBEC, dont la signature mutationnelle est présente dans de nombreux types de cancer [216].

Dans le but de caractériser les échantillons de tumeurs cérébrales de notre cohorte, nous avons évalué l'expression de l'A3A, un membre des APOBEC qui en parallèle de son importante activité de restriction virale, peut sous certaines conditions conduire à la cancérogenèse in vivo [217]. Notre analyse préliminaire révèle une surexpression statistiquement significative ($p < 0.005$) de l'A3A dans les tumeurs cérébrales par rapport aux contrôles que nous avons testés. Ceci rejoint les résultats de récents travaux révélant la présence de mutations spécifiques aux APOBEC au sein de tumeurs cérébrales [218,219]. Ces derniers, décrivent la surexpression de certains membres comme A3A, A3B ou A3G dans les tumeurs gliales. Par ailleurs, le niveau d'expression de ces gènes était plus élevé dans les groupes de gliomes affichant un phénotype IDH1 sauvage et absence de la co-délétion 1p/19, associés à un pronostic plus sombre. Notons qu'à ce jour l'expression des APOBEC dans les autres types histologiques de TC n'a pas encore été rapportée [220–222]. En outre, notre analyse sur l'expression de l'A3A au niveau des échantillons de CCR testés ne révèle pas de surexpression par rapport aux échantillons témoins ceci est en accord avec certains résultats qui n'indiquent pas une élévation significative de ces enzymes au sein de cancers coliques [223].

Il est important de noter que l'A3A et les autres membres ne sont pas ou peu exprimés dans les cellules normales comme les cellules coliques, cérébrales etc. Ils sont généralement exprimés suite à une infection virale pour défendre les cellules contre l'ADN ou l'ARN étranger où leur

expression est induite par les interférons et les signaux inflammatoires [224]. Dans un contexte tumoral, l'expression de ces enzymes est détectée dans environ 50 % des tumeurs malignes [223,225]. Cependant, il subsiste encore plusieurs questionnements relatifs aux mécanismes moléculaires permettant leur activation ainsi que la définition de leur véritable rôle dans la cancérogenèse. Une récente étude rapporte que l'A3A est activée de façon transitoire suite à une inflammation qui peut être causée par une infection virale, sauf que cette activation n'est pas maintenue de façon prolongée dans les cellules tumorales [226]. Ceci pourrait expliquer la faible abondance de ces enzymes au sein des tumeurs ce qui rends l'étude quantitative de l'activité de ces enzymes difficile à entreprendre [227].

De façon intéressante, l'infection virale par des souches virales à haut risque induit l'expression de A3A et A3B dans les cancers induits par les papillomes. Ces tumeurs présentaient d'importantes signatures mutationnelles propres aux APOBEC contrairement aux tumeurs où l'infection était absente. Des observations similaires ont été retrouvées sur des modèles de cellules tumorales mammaires avec toutefois une induction préférentielle de l'A3A au sein des cellules infectées [224,228]. Concernant les gliomes, même s'il n'existe actuellement aucune preuve reliant l'infection et l'induction des APOBEC dans les cellules tumorales, certains éléments comme la probable implication de l'infection par des herpesvirus comme le HCMV ou l'EBV dans la gliomagenèse [35], ainsi que la capacité du HCMV à induire l'expression des APOBEC, principalement l'A3A dans les cellules immunitaires et les cellules infectées [229], laissent supposer l'existence d'un mécanisme similaire dans les gliomes.

Au sein de nos échantillons, la surexpression de l'A3A suppose l'existence d'une inflammation sous-jacente. L'origine de cette inflammation est inconnue mais pourrait être liée à la tumeur elle-même, ou à l'exposition à des facteurs extrinsèques comme l'infection virale [59]. Bien que nos échantillons n'aient pas révélé la présence d'herpesvirus au sein de nos échantillons, l'existence du mécanisme hit and run ou encore l'implication d'autres familles virales n'est pas à écarter pour justifier cette inflammation.

Par ailleurs, nous avons observé en parallèle de la surexpression de l'A3A au sein des gliomes, une différence d'expression significative ($p < 0.005$) entre les méningiomes et les gliomes qui constituaient notre cohorte de cas. Il est important de souligner que la majorité des gliomes étudiés étaient principalement des GBM (4/6) contrairement aux méningiomes qui étaient pour la plupart de bas grade (5/6). Compte tenu de la corrélation entre l'inflammation et les tumeurs de hauts grades, l'expression significative de ces enzymes au sein des GBM pourrait être expliquée [230].

En ce sens, des chercheurs ont réussi à établir un lien entre un niveau d'expression des APOBEC élevé et les gliomes les plus agressifs. En outre, ces derniers présentaient une forte infiltration par des macrophages et une surexpression des checkpoints immunitaires [231].

Enfin, considérant l'importante hétérogénéité observée dans les gliomes, l'utilisation de ces enzymes comme biomarqueurs permettrait de les stratifier selon leur risque et d'identifier ceux qui pourront bénéficier d'une thérapie immunitaire ciblée améliorant ainsi le sombre pronostic de ces patients [227,232].

CONCLUSION

Conclusion et perspectives

L'étude des différents facteurs impliqués dans la cancérogenèse a pour but d'accroître les connaissances dans ce domaine mais aussi de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques plus efficaces au profit des patients. Actuellement, plusieurs virus y compris le HCMV sont en cours d'évaluation pour leur potentiel rôle dans l'initiation et le développement de diverses pathologies cancéreuses. Dans ce contexte, l'objectif principal de notre travail était d'étudier en profondeur la potentielle association de l'infection virale par le HCMV avec le développement de néoplasmes d'origines cérébrales et colorectales. Pour ce faire, nous avons d'abord procédé à la caractérisation de nos populations d'étude selon des paramètres cliniques et moléculaires puis nous avons évalué la présence du HCMV au sein d'échantillons de biopsies tumorales provenant de patients atteints par ces malignités.

Malgré nos investigations méthodiques basées sur des techniques moléculaires sensibles, nos résultats n'ont pas révélé la présence de ce virus dans nos séries de cas. Par conséquent, le HCMV ne semble pas avoir de rôle majeur dans la pathogenèse des tumeurs cérébrales ou colorectales malignes. Toutefois, bien que nos résultats ne permettent pas d'établir une corrélation significative entre le HCMV et les cancers que nous avons étudiés, la mise en lumière de certaines souches virales présentant un haut risque cancérigène suggèrent qu'une cancérogenèse médiée par le HCMV n'est pas à écarter. En outre, certaines études évoquent la possibilité d'utiliser le HCMV dans le développement des immunothérapies ciblées du fait de sa localisation préférentielle au sein des cellules tumorales. Conjointement ces faits soulèvent l'importance de mener de nouvelles investigations de plus grande ampleur, fondées sur une approche objective et rigoureuse qui permettra d'élucider le réel impact du HCMV sur le développement de pathologies malignes.

La complexité inhérente à la biologie garantit que chaque résultat, qu'il soit positif ou négatif, contribue à l'avancement de la science. Notre travail vient de ce fait enrichir la base de connaissances scientifiques qui guideront les recherches futures sur la relation entre le HCMV et les cancers. En perspective, nos résultats pourraient être utilement complétés par :

- L'élaboration de techniques consensuelles visant à détecter sensiblement le HCMV afin d'endiguer la controverse liée à l'inconsistance de sa présence au sein des échantillons testés.
- L'étude du microenvironnement tumoral à travers la caractérisation de l'infiltrat immunitaire et le déchiffrement des interactions entre le système immunitaire et le

HCMV dans un contexte tumoral représente une étape essentielle pour la compréhension des circonstances qui peuvent favoriser la transformation maligne.

- En vue de l'hétérogénéité tumorale observée dans la majorité des cancers, l'étude des différents facteurs impliqués dans ce phénomène comme l'intervention des enzymes APOBEC permettrait de mieux appréhender cette question et pourrait ouvrir la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Perrier A, Hainaut P, Guenoun A, Nguyen D-P, Lamy P-J, Guerber F, et al. En marche vers une oncologie personnalisée : l'apport des techniques génomiques et de l'intelligence artificielle dans l'usage des biomarqueurs tumoraux circulants. *Bulletin du Cancer*. 2022;109:170–84.
2. Morales-Sánchez A, Fuentes-Pananá E. *Human Viruses and Cancer*. *Viruses*. 2014;6:4047–79.
3. Soroceanu L, Cobbs CS. Is HCMV a Tumor Promoter? *Virus Res*. 2011;157:193–203.
4. Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Virol*. 2008;41:218–23.
5. Dell'Oste V, Biolatti M, Galitska G, Griffante G, Gugliesi F, Pasquero S, et al. Tuning the Orchestra: HCMV vs. Innate Immunity. *Front Microbiol*. 2020;11:661.
6. Wilski NA, Snyder CM. From Vaccine Vector to Oncomodulation: Understanding the Complex Interplay between CMV and Cancer. *Vaccines*. 2019;7:62.
7. Abdelaziz MO, Ossmann S, Kaufmann AM, Leitner J, Steinberger P, Willimsky G, et al. Development of a Human Cytomegalovirus (HCMV)-Based Therapeutic Cancer Vaccine Uncovers a Previously Unsuspected Viral Block of MHC Class I Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2019;10:1776.
8. Genus: Cytomegalovirus | ICTV [Internet]. [cited 2023 Mar 26]. Available from: <https://ictv.global/report/chapter/herpesviridae/herpesviridae/cytomegalovirus>
9. Bellec L, Desdevises Y. Quand virus et hôtes évoluent ensemble: la fidélité est-elle la règle?
10. Herpesviridae | ICTV [Internet]. [cited 2023 Sep 26]. Available from: https://ictv.global/report_9th/dsDNA/Herpesvirales/Herpesviridae
11. Burrell CJ, Howard CR, Murphy FA. Herpesviruses. *Fenner and White's Medical Virology* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2020 Apr 17]. p. 237–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123751560000175>
12. Halwachs-Baumann G, editor. *Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology, diagnosis, therapy*. Wien ; New York: Springer; 2011.
13. Shenk TE, Stinski MF, editors. *Human Cytomegalovirus* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cited 2023 Mar 26]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77349-8>
14. Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72:249–65, table of contents.
15. Cotin S. *Cytomégalovirus humain, mutations de résistances, et nouveaux antiviraux*.
16. Martí-Carreras J, Maes P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*. 2019;55:138–64.
17. Gerna G, Percivalle E, Perez L, Lanzavecchia A, Lilleri D. Monoclonal Antibodies to Different Components of the Human Cytomegalovirus (HCMV) Pentamer gH/gL/pUL128L and Trimer gH/gL/gO as well as Antibodies Elicited during Primary HCMV Infection Prevent Epithelial Cell Syncytium Formation. *J Virol*. 2016;90:6216–23.
18. La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol*. 2012;7:279–93.

19. Beltran PMJ, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11:697–711.
20. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [Internet]. 2020 [cited 2023 Mar 30];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00130>
21. Mana HA, Yassine HM, Younes NN, Al-Mohannadi A, Al-Sadeq DW, Alhababi D, et al. The Current Status of Cytomegalovirus (CMV) Prevalence in the MENA Region: A Systematic Review. *Pathogens* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 30];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963600/>
22. Adland E, Klenerman P, Goulder P, Matthews PC. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Front Microbiol* [Internet]. 2015 [cited 2023 Apr 9];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01016/abstract>
23. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15:680–715.
24. Plotkin SA, Boppana SB. Vaccination against the human cytomegalovirus. *Vaccine*. 2019;37:7437–42.
25. Riou R, Bressollette-Bodin C, Boutoille D, Gagne K, Rodallec A, Lefebvre M, et al. Severe Symptomatic Primary Human Cytomegalovirus Infection despite Effective Innate and Adaptive Immune Responses. Frueh K, editor. *J Virol*. 2017;91:e02245-16.
26. Fulkerson HL, Nogalski MT, Collins-McMillen D, Yurochko AD. Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2021;2244:1–18.
27. Clement M, Humphreys IR. Cytokine-Mediated Induction and Regulation of Tissue Damage During Cytomegalovirus Infection. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep 26];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00078>
28. La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol*. 2012;7:279–93.
29. Manandhar T, Hò G-GT, Pump WC, Blasczyk R, Bade-Doeding C. Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3626.
30. Herbein G. The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis. *Viruses*. 2018;10:408.
31. Akintola-Ogunremi O, Luo Q, He T-C, Wang HL. Is Cytomegalovirus Associated With Human Colorectal Tumorigenesis? *Am J Clin Pathol*. 2005;123:244–9.
32. Loit M-P, Adle-Biassette H, Bouazza S, Mazon M-C, Manivet P, Lehmann-Che J, et al. Multimodal techniques failed to detect cytomegalovirus in human glioblastoma samples. *J Neurovirol*. 2019;25:50–6.
33. Herbein G, Nehme Z. Polyploid Giant Cancer Cells, a Hallmark of Oncoviruses and a New Therapeutic Challenge. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 28];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.567116>
34. Herbein G. High-Risk Oncogenic Human Cytomegalovirus. *Viruses*. 2022;14:2462.

35. Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, McGregor Dallas SR, Smit M, et al. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2012;14:246–55.
36. Grey F, Meyers H, White EA, Spector DH, Nelson J. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog*. 2007;3:e163.
37. Perera MR, Roche KL, Murphy EA, Sinclair JH. A Viral Long Non-Coding RNA Protects against Cell Death during Human Cytomegalovirus Infection of CD14+ Monocytes. *Viruses*. 2022;14:246.
38. Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. The Story of Human Cytomegalovirus and Cancer: Increasing Evidence and Open Questions. *Neoplasia*. 2009;11:1–9.
39. Chaumorcel M, Lussignol M, Mouna L, Cavignac Y, Fahie K, Cotte-Laffitte J, et al. The Human Cytomegalovirus Protein TRS1 Inhibits Autophagy via Its Interaction with Beclin 1. *Journal of Virology*. 2012;86:2571.
40. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J Virol*. 2003;77:4588–96.
41. Vinogradskaya GR, Ivanov AV, Kushch AA. Mechanisms of Survival of Cytomegalovirus-Infected Tumor Cells. *Mol Biol*. 2022;56:668–83.
42. Green ML, Leisenring WM, Xie H, Walter RB, Mielcarek M, Sandmaier BM, et al. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122:1316–24.
43. Herbein G, Nehme Z. Tumor Control by Cytomegalovirus: A Door Open for Oncolytic Virotherapy? *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2020;17:1–8.
44. docThom. Définition de “Tumeur” [Internet]. Dictionnaire médical. [cited 2023 May 1]. Available from: <https://www.dictionnaire-medical.fr/definitions/471-tumeur/>
45. Cancer today [Internet]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>
46. Cancer Topics – IARC [Internet]. [cited 2023 May 17]. Available from: <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>
47. Les agents cancérogènes selon le CIRC [Internet]. PRC – CNRS. [cited 2023 May 17]. Available from: <https://www.prc.cnrs.fr/outils/les-agents-cancerogenes-selon-le-circ/>
48. Ségala G. Principes de l’oncogénèse : gène et épigénétique [Internet]. Futura. [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/5/>
49. Caldas C. Molecular assessment of cancer. *BMJ*. 1998;316:1360–3.
50. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9:138–41.
51. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
53. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Molecular Basis of Cancer-Cell Behavior. *Molecular Biology of the Cell* 4th edition [Internet]. Garland Science; 2002 [cited 2023 Sep 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26902/>

54. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Viruses associated with human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2008;1782:127–50.
55. Mui U, Haley C, Tyring S. Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *JCM*. 2017;6:111.
56. Müller-Coan BG, Caetano BFR, Pagano JS, Elgui De Oliveira D. Cancer Progression Goes Viral: The Role of Oncoviruses in Aggressiveness of Malignancies. *Trends in Cancer*. 2018;4:485–98.
57. Tumor-Immune Interactions - American Society for Radiation Oncology (ASTRO) - American Society for Radiation Oncology (ASTRO) [Internet]. ASTRO. [cited 2023 May 29]. Available from: <https://www.astro.org/Patient-Care-and-Research/Research/Professional-Development/Research-Primers/Tumor-Immune-Interactions>
58. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329–60.
59. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Sig Transduct Target Ther*. 2021;6:1–46.
60. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860–7.
61. Cambui RAG, do Espírito Santo GF, Fernandes FP, Leal VNC, Galera BB, Fávoro EGP, et al. Double-edged sword of inflammasome genetics in colorectal cancer prognosis. *Clinical Immunology*. 2020;213:108373.
62. Chen H-P, Chan Y-J. The Oncomodulatory Role of Human Cytomegalovirus in Colorectal Cancer: Implications for Clinical Trials. *Front Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Apr 17];4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00314/abstract>
63. Brennan CA, Garrett WS. Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer. *Annu Rev Microbiol*. 2016;70:395–411.
64. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol*. 2022;29:3044–60.
65. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500:415–21.
66. Bergstrom EN, Kundu M, Tbeileh N, Alexandrov LB. Examining clustered somatic mutations with SigProfilerClusters. *Bioinformatics*. 2022;38:3470–3.
67. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci*. 2016;41:578–94.
68. Natesan D, Zhang L, Martell HJ, Jindal T, Devine P, Stohr B, et al. APOBEC Mutational Signature and Tumor Mutational Burden as Predictors of Clinical Outcomes and Treatment Response in Patients With Advanced Urothelial Cancer. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 30];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.816706>
69. Siriwardena S, Chen K, Bhagwat AS. The Functions and Malfunctions of AID/APOBEC Family Deaminases: the known knowns and the known unknowns. *Chem Rev*. 2016;116:12688–710.
70. Cervantes-Gracia K, Gramalla-Schmitz A, Weischedel J, Chahwan R. APOBECs orchestrate genomic and epigenomic editing across health and disease. *Trends in Genetics*. 2021;37:1028–43.

71. Vile RG, Melcher A, Pandha H, Harrington KJ, Pulido JS. APOBEC and Cancer Viroimmunotherapy: Thinking the Unthinkable. *Clin Cancer Res.* 2021;27:3280–90.
72. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging.* 2016;11:967–76.
73. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut.* 2023;72:338–44.
74. Negrichi S, Taleb S. Hereditary, environmental, and dietary risk factors of colorectal cancer: a case-control study in the Algerian East. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28:12372–81.
75. Sninsky JA, Shore BM, Lupu GV, Crockett SD. Risk Factors for Colorectal Polyps and Cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2022;32:195–213.
76. Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev.* 2021;35:787–820.
77. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chin J Cancer.* 2016;35:4.
78. Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer.* 2022;21:144.
79. Olivier-Van Stichelen S, MIR A-M, Michalski J-C, Lefebvre T. Signalisation et prédispositions métaboliques liées au cancer colorectal. *Medecine sciences: M/S.* 2011;27:514–20.
80. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair–Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386:2363–76.
81. Masson E. Tumeurs cérébrales, du diagnostic au traitement. J. Philippon. Masson, Paris, 2004, 285 pages. ISBN 2-294-01288-7 [Internet]. EM-Consulte. [cited 2023 Jun 2]. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/1151681/tumeurs-cerebrales-du-diagnostic-au-traitement-j-p>
82. Hamilton W, Kernick D. Clinical features of primary brain tumours: a case–control study using electronic primary care records. *Br J Gen Pract.* 2007;57:695–9.
83. Thierheimer M, Cioffi G, Waite KA, Kruchko C, Ostrom QT, Barnholtz-Sloan JS. Mortality trends in primary malignant brain and central nervous system tumors vary by histopathology, age, race, and sex. *J Neurooncol.* 2023;162:167–77.
84. Sun T, Plutynski A, Ward S, Rubin JB. An integrative view on sex differences in brain tumors. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72:3323–42.
85. Ostrom QT, Francis SS, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021;21:68.
86. Bennett JM, Glaser R, Malarkey WB, Beversdorf DQ, Peng J, Kiecolt-Glaser JK. Inflammation and Reactivation of Latent Herpesviruses in Older Adults. *Brain Behav Immun.* 2012;26:739–46.
87. Zhang C, Zhu Q-X. Allergy is associated with reduced risk of glioma: A meta-analysis. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2017;45:553–9.
88. Brouland JP, Hottinger AF. Nouvelle classification OMS 2016 des gliomes : quels changements ? *Rev Med Suisse.* 2017;579:1805–9.

89. Kristensen BW, Priesterbach-Ackley LP, Petersen JK, Wesseling P. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Ann Oncol.* 2019;30:1265–78.
90. Liebelt BD, Shingu T, Zhou X, Ren J, Shin SA, Hu J. Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7849890.
91. Sasmita A, Wong YP, Ling A. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology.* 2018;14:40–51.
92. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Crinière E, Busato F, Marie Y, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2009;11:348–56.
93. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol.* 2017;134:541–9.
94. Luo J, Junaid M, Hamid N, Duan J-J, Yang X, Pei D-S. Current understanding of gliomagenesis: from model to mechanism. *Int J Med Sci.* 2022;19:2071–9.
95. Śledzińska P, Bebyn MG, Furtak J, Kowalewski J, Lewandowska MA. Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *Int J Mol Sci.* 2021;22:10373.
96. Wang J, Chi S. Characterization of the Immune Cell Infiltration Landscape and a New Prognostic Score in Glioblastoma. *J Healthc Eng.* 2022;2022:4326728.
97. Price G, Bouras A, Hambardzumyan D, Hadjipanayis CG. Current knowledge on the immune microenvironment and emerging immunotherapies in diffuse midline glioma. *eBioMedicine [Internet].* 2021 [cited 2023 Jun 4];69. Available from: <https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964%2821%2900246-2/fulltext>
98. Wang E, Young RJ, Bhatia A. Immunotherapy and Gliomas. In: Pope WB, editor. *Glioma Imaging: Physiologic, Metabolic, and Molecular Approaches [Internet].* Cham: Springer International Publishing; 2020 [cited 2023 Jun 4]. p. 251–65. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-27359-0_16
99. Classification du CIRC par localisations cancéreuses • Cancer Environnement [Internet]. *Cancer Environnement.* [cited 2023 Jun 18]. Available from: <https://www.cancer-environnement.fr/fiches/publications-du-circ/classification-du-circ-par-localisations-cancereuses/>
100. Ibragimova MK, Tsyganov MM, Litviakov NV. Human papillomavirus and colorectal cancer. *Med Oncol.* 2018;35:140.
101. Su F-H, Le TN, Muo C-H, Te SA, Sung F-C, Yeh C-C. Chronic Hepatitis B Virus Infection Associated with Increased Colorectal Cancer Risk in Taiwanese Population. *Viruses.* 2020;12:97.
102. Militello V, Trevisan M, Squarzon L, Biasolo MA, Rugge M, Militello C, et al. Investigation on the presence of polyomavirus, herpesvirus, and papillomavirus sequences in colorectal neoplasms and their association with cancer. *Int J Cancer.* 2009;124:2501–3.
103. Bedri S, Sultan AA, Alkhalaf M, Al Moustafa A-E, Vranic S. Epstein-Barr virus (EBV) status in colorectal cancer: a mini review. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;15:603–10.
104. Komaroff AL, Boeckh M, Eliason E, Phan T, Kaufer BB. Summary of the 10th International Conference on Human Herpesviruses-6 and -7 (HHV-6A, -6B, and HHV-7). *J Med Virol.* 2018;90:625–30.

105. Touma J, Liu Y, Rahbar A, Pantalone MR, Almazan NM, Vetvik K, et al. Detection of Human Cytomegalovirus Proteins in Paraffin-Embedded Breast Cancer Tissue Specimens—A Novel, Automated Immunohistochemical Staining Protocol. *Microorganisms*. 2021;9:1059.
106. Sadeghipour A, Babaheidarian P. Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:253–68.
107. ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System [Internet]. [cited 2023 Jun 24]. Available from: <https://worldwide.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/rna/reliaprep-ffpe-total-rna-miniprep-system/>
108. Chauhan DT. Advantages and Limitations of Spin Column DNA Extraction Technique [Internet]. Genetic Education. 2023 [cited 2023 Jun 24]. Available from: <https://geneticeducation.co.in/advantages-and-limitations-of-spin-column-dna-extraction-technique/>
109. UV-Vis Spectrophotometry – Easy and Quick Quantification of Nucleic Acids - Eppendorf Handling Solutions [Internet]. 2020 [cited 2023 Jun 24]. Available from: <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/photometry/applications/detailview-applications/news/uv-vis-spectrophotometry-easy-and-quick-quantification-of-nucleic-acids/>
110. Ehlers B, Borchers K, Grund C, Lich KF, Ludwig H, Buhk H-JR. Detection of New DNA Polymerase Genes of Known and Potentially Novel Herpesviruses by PCR with Degenerate and Deoxyinosine-Substituted Primers. 1999;10.
111. VanDevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, et al. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34:1666–71.
112. Prepens S, Kreuzer K-A, Leendertz F, Nitsche A, Ehlers B. Discovery of herpesviruses in multi-infected primates using locked nucleic acids (LNA) and a bigenic PCR approach. *Virol J*. 2007;4:84.
113. Histopathology of Colorectal Carcinoma [Internet]. [cited 2023 Jun 25]. Available from: <https://encyclopedia.pub/entry/33574>
114. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. COLORECTAL CANCER. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15065.
115. Lichtenstern CR, Ngu RK, Shalpour S, Karin M. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells*. 2020;9:618.
116. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66:683–91.
117. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67:177–93.
118. Rennert G. Reproductive factors, hormones and colorectal cancer—still unresolved. *Br J Cancer*. 2017;116:1–3.
119. Xhaard C, Rubino C, Cléro E, Maillard S, Ren Y, Borson-Chazot F, et al. Menstrual and reproductive factors in the risk of differentiated thyroid carcinoma in young women in France: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*. 2014;180:1007–17.
120. Caiazza F, Ryan EJ, Doherty G, Winter DC, Sheahan K. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis. *Front Oncol*. 2015;5:19.

121. Low EE, Demb J, Liu L, Earles A, Bustamante R, Williams CD, et al. Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020;159:492-501.e7.
122. Meddah D, Meddah B, Tir Touil A, Ghalek M, Sahraoui T. Étude épidémiologique du cancer du côlon chez des patients de l'Ouest algérien. *J Afr Cancer*. 2009;1:31–5.
123. aichouna wafa, bousebaine samah. Etude clinico-biologique et évaluation de marqueurs tumoraux des cancers colorectaux dans la Wilaya de Jijel [Internet] [mémoire de fin d'étude]. [jijel]: université mohemed ben seddik ben yahia; 2018 [cited 2023 Jul 6]. Available from: <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/786/M-B.M.C.%2003-19.pdf?sequence=1>
124. moussa amine. Etude épidémiologique et anatomopathologique du cancer colorectal au niveau de la wilaya de Bejaia [Internet] [mémoire de fin d'étude]. [bejaia]: université abderrahmane mira; 2021 [cited 2023 Jul 6]. Available from: <http://www.univ-bejaia.dz/xmlui/bitstream/handle/123456789/18856/Etude%20C3%A9pid%20miologique%20et%20anatomopathologique%20du%20cancer%20colorectal%20au%20niveau%20de%20la%20wilaya%20de%20Bejaia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
125. Stigliano V, Sanchez-Mete L, Martayan A, Anti M. Early-onset colorectal cancer: A sporadic or inherited disease? *World J Gastroenterol*. 2014;20:12420–30.
126. Jasperson KW, Vu TM, Schwab AL, Neklason DW, Rodriguez-Bigas MA, Burt RW, et al. Evaluating Lynch syndrome in very early onset colorectal cancer probands without apparent polyposis. *Fam Cancer*. 2010;9:99–107.
127. Ziada-Bouchaar H, Sifi K, Filali T, Hammada T, Satta D, Abadi N. First description of mutational analysis of MLH1, MSH2 and MSH6 in Algerian families with suspected Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2017;16:57–66.
128. Boumehdi A-L, Cherbal F, Khider F, Oukkal M, Mahfouf H, Zebboudj F, et al. Germline variants screening of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 genes in 64 Algerian Lynch syndrome families: The first nationwide study. *Ann Hum Genet*. 2022;86:328–52.
129. Chauvenet M, Cottet V, Lepage C, Jooste V, Faivre J, Bouvier A-M. Trends in colorectal cancer incidence: a period and birth-cohort analysis in a well-defined French population. *BMC Cancer*. 2011;11:282.
130. C G, S P, A Z, J T. Colorectal Cancer: Why Does Side Matter? *Drugs* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jul 8];78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29790124/>
131. Bouvier A-M, Launoy G. [Epidemiology of colorectal cancer]. *Rev Prat*. 2015;65:767–73.
132. Temraz S, Mukherji D, Nassar F, Moukalled N, Shamseddine A. Treatment sequencing of metastatic colorectal cancer based on primary tumor location. *Semin Oncol*. 2021;48:119–29.
133. Song Y, Wang L, Ran W, Li G, Xiao Y, Wang X, et al. Effect of Tumor Location on Clinicopathological and Molecular Markers in Colorectal Cancer in Eastern China Patients: An Analysis of 2,356 Cases. *Front Genet*. 2020;11:96.
134. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Sonesson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol*. 2014;25:1995–2001.
135. boudraa bilal, amara derajji. Etude épidémiologique anatomopathologique et immunohistochimique du cancer colorectal dans l'est algérien [Internet] [mémoire de fin d'étude]. [constantine]: mentouri; 2020 [cited 2023 Jul 8]. Available from:

<https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2020/Etude%20%20C3%A9pid%20%20miologique%20anatomopathologique%20et%20immunohistochimique%20du%20cancer%20colorectal%20dans%20l%E2%80%99est%20alg%C3%A9rien.pdf>

136. Hacking SM, Chakraborty B, Nasim R, Vitkovski T, Thomas R. A Holistic Appraisal of Stromal Differentiation in Colorectal Cancer: Biology, Histopathology, Computation, and Genomics. *Pathol Res Pract.* 2021;220:153378.

137. arfa. Survie et facteurs pronostiques des adénocarcinomes colorectaux : étude analytique uni- et multifactorielle de 150 cas. 2006; Available from: <https://www.em-consulte.com/article/39212/resume/survie-et-facteurs-pronostiques-des-adenocarcinome>

138. Marongiu L, Allgayer H. Viruses in colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2022;16:1423–50.

139. Baandrup L, Thomsen LT, Olesen TB, Andersen KK, Norrild B, Kjaer SK. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer.* 2014;50:1446–61.

140. Jung YS, Kim NH, Park JH, Park DI, Sohn CI. Correlation between Hepatitis B Virus Infection and Colorectal Neoplasia. *JCM.* 2019;8:2085.

141. Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER. Human cytomegalovirus infection and atherothrombosis. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;33:160–72.

142. Jovel J, Halloran B, Wine E, Patterson J, Ford G, O’Keefe S, et al. Metagenomic Analysis of Microbiome in Colon Tissue from Subjects with Inflammatory Bowel Diseases Reveals Interplay of Viruses and Bacteria: Inflammatory Bowel Diseases. 2015;1.

143. Alibek K, Baiken Y, Kakpenova A, Mussabekova A, Zhussupbekova S, Akan M, et al. Implication of human herpesviruses in oncogenesis through immune evasion and suppression. *Infect Agents Cancer.* 2014;9:3.

144. Elgui de Oliveira D, Müller-Coan BG, Pagano JS. Viral Carcinogenesis Beyond Malignant Transformation: EBV in the Progression of Human Cancers. *Trends in Microbiology.* 2016;24:649–64.

145. Jha H, Banerjee S, Robertson E. The Role of Gammaherpesviruses in Cancer Pathogenesis. *Pathogens.* 2016;5:18.

146. Chen J, Pitmon E, Wang K. Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Seminars in Immunology.* 2017;32:43–53.

147. Filippakis H, Spandidos DA, Sourvinos G. Herpesviruses: Hijacking the Ras signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2010;1803:777–85.

148. Zvezdaryk KJ, Combs JA, Morris CA, Sullivan DE. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by herpesviruses. *World J Virol.* 2016;5:144–54.

149. Peng J, Huang D, Poston G, Ma X, Wang R, Sheng W, et al. The molecular heterogeneity of sporadic colorectal cancer with different tumor sites in Chinese patients. *Oncotarget.* 2017;8:49076.

150. Blaylock RL. Accelerated cancer aggressiveness by viral oncomodulation: New targets and newer natural treatments for cancer control and treatment. *Surgical Neurology International.* 2019;10:199.

151. Chaabane S, Harfouche M, Chemaitelly H, Schwarzer G, Abu-Raddad LJ. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in the Middle East and North Africa: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *Sci Rep.* 2019;9:1136.

152. Belkaid MI, Briegre J, Djebbara Z, Beldjord K, Andrieu JM, Colonna P. Comparison of Epstein-Barr Virus Markers in Reed-Sternberg Cells in Adult Hodgkin's Disease Tissues from an Industrialized and a Developing Country. *Leukemia & Lymphoma*. 1995;17:163–8.
153. Hussein WM, Anwar WA, Attaleb M, Mazini L, Försti A, Trimbilas R-D, et al. A review of the infection-associated cancers in North African countries. *Infect Agents Cancer*. 2016;11:35.
154. Khoury JD, Tannir NM, Williams MD, Chen Y, Yao H, Zhang J, et al. Landscape of DNA Virus Associations across Human Malignant Cancers: Analysis of 3,775 Cases Using RNA-Seq. *Journal of Virology*. 2013;87:8916–26.
155. Boguszaková L, Hirsch I, Bricháček B, Faltýn J, Fric P, Dvoráková H, et al. Absence of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and papillomavirus DNA from adenoma and adenocarcinoma of the colon. *Acta Virol*. 1988;32:303–8.
156. Broecker F, Moelling K. The Roles of the Virome in Cancer. *Microorganisms*. 2021;9:2538.
157. Marônek M, Link R, Monteleone G, Gardlík R, Stolfi C. Viruses in Cancers of the Digestive System: Active Contributors or Idle Bystanders? *Int J Mol Sci*. 2020;21:E8133.
158. Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M, Natsugoe S, Yoshinaka H, et al. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol*. 2001;64:513–8.
159. Cho YJ, Chang MS, Park SH, Kim HS, Kim WH. In situ hybridization of Epstein-Barr virus in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes of the gastrointestinal tract. *Hum Pathol*. 2001;32:297–301.
160. Gock M, Kordt M, Matschos S, Mullins CS, Linnebacher M. Patient-individual cancer cell lines and tissue analysis delivers no evidence of sequences from DNA viruses in colorectal cancer cells. *BMC Gastroenterol*. 2020;20:260.
161. Mehrabani-Khasraghi S, Ameli M, Khalily F. Demonstration of Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer. *Iranian Biomedical Journal*. 2016;295–301.
162. Tavakolian S, Goudarzi H, Kazeminezhad B, Faghihloo E. Prevalence of herpes simplex, varicella zoster and Cytomegalovirus in tumorous and adjacent tissues of patients, suffering from colorectal cancer in Iran. *transl med commun*. 2019;4:20.
163. Lai Y-L, Su Y-C, Kao C-H, Liang J-A. Increased risk of varicella-zoster virus infection in patients with breast cancer after adjuvant radiotherapy: A population-based cohort study. Andrei G, editor. *PLoS ONE*. 2019;14:e0209365.
164. Wong N a. CS, Herbst H, Herrmann K, Kirchner T, Krajewski AS, Moorghen M, et al. Epstein-Barr virus infection in colorectal neoplasms associated with inflammatory bowel disease: detection of the virus in lymphomas but not in adenocarcinomas. *J Pathol*. 2003;201:312–8.
165. Nishigami T, Kataoka TR, Torii I, Sato A, Tamura K, Hirano H, et al. Concomitant adenocarcinoma and colonic non-Hodgkin's lymphoma in a patient with ulcerative colitis: a case report and molecular analysis. *Pathol Res Pract*. 2010;206:846–50.
166. Ambinder RF. Herpesviruses and lymphoma. *The Lymphoid Neoplasms 3ed* [Internet]. CRC Press; 2010 [cited 2023 Jul 18]. p. 116–25. Available from: <https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/herpesviruses-and-lymphoma>

167. Chen H-P, Jiang J-K, Chen C-Y, Chou T-Y, Chen Y-C, Chang Y-T, et al. Human cytomegalovirus preferentially infects the neoplastic epithelium of colorectal cancer: A quantitative and histological analysis. *Journal of Clinical Virology*. 2012;54:240–4.
168. Fiorina L, Ricotti M, Vanoli A, Luinetti O, Dallera E, Riboni R, et al. Systematic analysis of human oncogenic viruses in colon cancer revealed EBV latency in lymphoid infiltrates. *Infect Agent Cancer*. 2014;9:18.
169. Bender C, Zipeto D, Bidoia C, Costantini S, Zamò A, Menestrina F, et al. Analysis of colorectal cancers for human cytomegalovirus presence. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:6.
170. Bai B, Wang X, Chen E, Zhu H. Human cytomegalovirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7:76735–42.
171. Sole CV, Calvo FA, Ferrer C, Alvarez E, Carreras JL, Ochoa E. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection impact on 18F-FDG PET/CT SUVmax, CT volumetric and KRAS-based parameters of patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:186–96.
172. Yi Q, Yang R, Shi J, Zeng N, Liang D, Sha S, et al. Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity. *J Int Med Res*. 2020;48:0300060520931259.
173. Blanco R, Carrillo-Beltrán D, Osorio JC, Calaf GM, Aguayo F. Role of Epstein-Barr Virus and Human Papillomavirus Coinfection in Cervical Cancer: Epidemiology, Mechanisms and Perspectives. *Pathogens*. 2020;9:685.
174. Salyakina D, Tsinoremas NF. Viral expression associated with gastrointestinal adenocarcinomas in TCGA high-throughput sequencing data. *Hum Genomics*. 2013;7:23.
175. Rebersek M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2021;21:1325.
176. Mariguela VC, Chacha SGF, Cunha A de A, Troncon LE de A, Zucoloto S, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus in colorectal cancer and idiopathic ulcerative colitis. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2008;50:83–7.
177. Sarvari J, Mahmoudvand S, Pirbonyeh N, Safaei A, Hosseini SY. The Very Low Frequency of Epstein-Barr JC and BK Viruses DNA in Colorectal Cancer Tissues in Shiraz, Southwest Iran. 2018;8.
178. Avni A, Haikin H, Feuchtwanger MM, Sacks M, Naggan L, Sarov B, et al. Antibody Pattern to Human Cytomegalovirus in Patients with Adenocarcinoma of the Colon. *Intervirology*. 1981;16:244–9.
179. Park JM, Choi M-G, Kim SW, Chung I-S, Yang CW, Kim YS, et al. Increased Incidence of Colorectal Malignancies in Renal Transplant Recipients: A Case Control Study: Colorectal Neoplasia in Renal Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 2010;10:2043–50.
180. Sultanova A, Chistjakovs M, Chapenko S, Donina S, Murovska M. Possible interference of human beta-herpesviruses-6 and -7 in gastrointestinal cancer development. *Exp Oncol*. 2013;35:93–6.
181. Karpinski P, Myszka A, Ramsey D, Kielan W, Sasiadek MM. Detection of viral DNA sequences in sporadic colorectal cancers in relation to CpG island methylation and methylator phenotype. *Tumour Biol*. 2011;32:653–9.
182. Masson E. Tumeurs primitives du système nerveux central - Classifications histologique et topographique, et épidémiologie [Internet]. EM-Consulte. [cited 2023 Aug 16]. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/1263793/tumeurs-primitives-du-systeme-nerveux-central-clas>

183. Masson E. Étude épidémiologique des tumeurs cérébrales : cas du CHU de Bejaia [Internet]. EM-Consulte. [cited 2023 Aug 16]. Available from: <https://www.em-consulte.com/article/939828/etude-epidemiologique-des-tumeurs-cerebrales-cas>
184. Berlivet J, Hémon D, Cléro É, Ielsch G, Laurier D, Guissou S, et al. Exposition résidentielle aux radiations ionisantes naturelles et risque de tumeurs cérébrales chez l'enfant - France 2000–2012. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. 2020;68:S8–9.
185. Cai Z, Yang S, Li X, Chen F, Li W. Viral infection and glioma: a meta-analysis of prognosis. *BMC Cancer*. 2020;20:549.
186. Arsene DE, Milanesi E, Dobre M. Viral oncogenesis in tumours of the central nervous system: reality or random association? A retrospective study on archived material. *J Cell Mol Med*. 2022;26:1413–20.
187. Lisyany NI, Klyuchnikova AA, Belskaya LN, Lisyany AA, Gnedkova IA. Cytomegaloviruses and malignant brain tumors. *Exp Oncol*. 2019;41:300–3.
188. Lau SK, Chen Y-Y, Chen W-G, Diamond DJ, Mamelak AN, Zaia JA, et al. Lack of association of cytomegalovirus with human brain tumors. *Mod Pathol*. 2005;18:838–43.
189. Sardi I, Lucchesi M, Becciani S, Fachini L, Guidi M, Buccoliero AM, et al. Absence of human cytomegalovirus infection in childhood brain tumors. *Am J Cancer Res*. 2015;5:2476–83.
190. Söderberg-Nauclér C, Johnsen JI. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options. *World J Exp Med*. 2015;5:1–10.
191. Becker AP, Sells BE, Haque SJ, Chakravarti A. Tumor Heterogeneity in Glioblastomas: From Light Microscopy to Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*. 2021;13:761.
192. Shamran HA, Kadhim HS, Hussain AR, Kareem A, Taub DD, Price RL, et al. Detection of Human Cytomegalovirus in Different Histopathological Types of Glioma in Iraqi Patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015:642652.
193. Paulus C, Nevels M. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses*. 2009;1:760–79.
194. Meshcheryakova A, Pietschmann P, Zimmermann P, Rogozin IB, Mechtcheriakova D. AID and APOBECs as Multifaceted Intrinsic Virus-Restricting Factors: Emerging Concepts in the Light of COVID-19. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 16];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.690416>
195. Zou J, Wang C, Ma X, Wang E, Peng G. APOBEC3B, a molecular driver of mutagenesis in human cancers. *Cell Biosci*. 2017;7:1–7.
196. Pecori R, Di Giorgio S, Paulo Lorenzo J, Nina Papavasiliou F. Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination. *Nat Rev Genet*. 2022;23:505–18.
197. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5:209–19.
198. Amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) [Internet]. [cited 2023 Aug 16]. Available from: <https://microbiologiemedicale.fr/biologie-moleculaire-amplification-genique-pcr/>

199. Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, Harris RS. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:4274–84.
200. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402–8.
201. Hawkins C, Croul S. Viruses and human brain tumors: cytomegalovirus enters the fray. *J Clin Invest.* 2011;121:3831–3.
202. Persons DL, Moore JA, Fishback JL. Comparison of polymerase chain reaction, DNA hybridization, and histology with viral culture to detect cytomegalovirus in immunosuppressed patients. *Mod Pathol.* 1991;4:149–53.
203. Peredo-Harvey I, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Presence of the Human Cytomegalovirus in Glioblastomas—A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2021;13:5051.
204. Ghaffari H, Tavakoli A, Faranoush M, Naderi A, Kiani SJ, Sadeghipour A, et al. Molecular Investigation of Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in Glioblastoma Brain Tumor: A Case-Control Study in Iran. *Iran Biomed J.* 2021;25:426–33.
205. Priel E, Wohl A, Teperberg M, Nass D, Cohen ZR. Human cytomegalovirus viral load in tumor and peripheral blood samples of patients with malignant gliomas. *J Clin Neurosci.* 2015;22:326–30.
206. Johnson TS, Abrams ZB, Mo X, Zhang Y, Huang K. Lack of human cytomegalovirus expression in single cells from glioblastoma tumors and cell lines. *J Neurovirol.* 2017;23:671–8.
207. Habibi Z, Hajizadeh M, Nozarian Z, Safavi M, Monajemzadeh M, Meybodi KT, et al. Cytomegalovirus DNA in non-glioblastoma multiforme brain tumors of infants. *Childs Nerv Syst.* 2021;37:1581–6.
208. Peredo-Harvey I, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C. Presence of the Human Cytomegalovirus in Glioblastomas—A Systematic Review. *Cancers (Basel).* 2021;13:5051.
209. Joseph GP, McDermott R, Baryshnikova MA, Cobbs CS, Ulasov IV. Cytomegalovirus as an oncomodulatory agent in the progression of glioma. *Cancer Lett.* 2017;384:79–85.
210. Michaelis M, Mittelbronn M, Cinatl J. Towards an unbiased, collaborative effort to reach evidence about the presence of human cytomegalovirus in glioblastoma (and other tumors). *Neuro-Oncology.* 2015;17:1039–1039.
211. Cobbs CS. Cytomegalovirus and brain tumor: epidemiology, biology and therapeutic aspects. *Curr Opin Oncol.* 2013;25:682–8.
212. Wakefield A, Pignata A, Ghazi A, Ashoori A, Hegde M, Landi D, et al. Is CMV a target in pediatric glioblastoma? Expression of CMV proteins, pp65 and IE1-72 and CMV nucleic acids in a cohort of pediatric glioblastoma patients. *J Neurooncol.* 2015;125:307–15.
213. Ahn J, Shin C, Kim YS, Park J-S, Jeun S-S, Ahn S. Cytomegalovirus-Specific Immunotherapy for Glioblastoma Treatments. *Brain Tumor Res Treat.* 2022;10:135–43.
214. Schiller JT, Lowy DR. An Introduction to Virus Infections and Human Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2021;217:1–11.
215. Tellez-Gabriel M, Ory B, Lamoureux F, Heymann M-F, Heymann D. Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016;17:2142.

216. Mertz TM, Collins CD, Dennis M, Coxon M, Roberts SA. APOBEC-Induced Mutagenesis in Cancer. *Annu Rev Genet.* 2022;56:229–52.
217. Law EK, Levin-Klein R, Jarvis MC, Kim H, Argyris PP, Carpenter MA, et al. APOBEC3A catalyzes mutation and drives carcinogenesis in vivo. *Journal of Experimental Medicine.* 2020;217:e20200261.
218. Orr BA, Haffner MC, Nelson WG, Yegnasubramanian S, Eberhart CG. Decreased 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Neural Progenitor Phenotype in Normal Brain and Shorter Survival in Malignant Glioma. *PLOS ONE.* 2012;7:e41036.
219. COSMIC | Signatures of Mutational Processes in Human Cancer [Internet]. [cited 2023 Aug 25]. Available from: https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/signatures_v2/
220. Zhang H, Chen Z, Wang Z, Dai Z, Hu Z, Zhang X, et al. Correlation Between APOBEC3B Expression and Clinical Characterization in Lower-Grade Gliomas. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 23];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.625838>
221. Wang Y, Wu S, Zheng S, Wang S, Wali A, Ezhilarasan R, et al. APOBEC3G acts as a therapeutic target in mesenchymal gliomas by sensitizing cells to radiation-induced cell death. *Oncotarget.* 2017;8:54285–96.
222. C S, R L, M S, J H-F, K H. APOBEC3B is expressed in human glioma, and influences cell proliferation and temozolomide resistance. *Oncology reports* [Internet]. 2018 [cited 2023 Aug 25];40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30226610/>
223. Petljak M, Dananberg A, Chu K, Bergstrom EN, Striepen J, von Morgen P, et al. Mechanisms of APOBEC3 mutagenesis in human cancer cells. *Nature.* 2022;607:799–807.
224. Covino DA, Gauzzi MC, Fantuzzi L. Understanding the regulation of APOBEC3 expression: Current evidence and much to learn. *Journal of Leukocyte Biology.* 2018;103:433–44.
225. Kim Y, Sun DS, Yoon J, Ko YH, Won HS, Kim JS. Clinical implications of APOBEC3A and 3B expression in patients with breast cancer. *PLoS One.* 2020;15:e0230261.
226. Oh S, Bournique E, Bowen D, Jalili P, Sanchez A, Ward I, et al. Genotoxic stress and viral infection induce transient expression of APOBEC3A and pro-inflammatory genes through two distinct pathways. *Nat Commun.* 2021;12:4917.
227. Jalili P, Bowen D, Langenbucher A, Park S, Aguirre K, Corcoran RB, et al. Quantification of ongoing APOBEC3A activity in tumor cells by monitoring RNA editing at hotspots. *Nat Commun.* 2020;11:2971.
228. Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Wakae K, Aga M, Moriyama-Kita M, et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2019;145:1547–57.
229. Pautasso S, Galitska G, Dell’Oste V, Biolatti M, Cagliani R, Forni D, et al. Strategy of Human Cytomegalovirus To Escape Interferon Beta-Induced APOBEC3G Editing Activity. *J Virol.* 2018;92:e01224-18.
230. Galvão RP, Zong H. Inflammation and Gliomagenesis: Bi-Directional Communication at Early and Late Stages of Tumor Progression. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1:19–28.

231. Luo C, Wang S, Liao W, Zhang S, Xu N, Xie W, et al. Upregulation of the APOBEC3 Family Is Associated with a Poor Prognosis and Influences Treatment Response to Raf Inhibitors in Low Grade Glioma. *Int J Mol Sci.* 2021;22:10390.
232. Buisson R, Lawrence MS, Benes CH, Zou L. APOBEC3A and 3B Activities Render Cancer Cells Susceptible to ATR Inhibition. *Cancer Res.* 2017;77:4567–78.

ANNEXES

Annexe 1 : Certificat du comité d'éthique

MINISTERE DE LA SANTE ET DE LA REFORME HOSPITALIERE
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE « Dr BENBADIS » CONSTANTINE ALGERIE
COMITE D'ETHIQUE

*Pr. ABADI Noureddine
CHU CONSTANTINE
Department of Medicine.
University Salah Bouhider Constantine 3, Laboratory of Biology and Molecular Genetics, 25000
Constantine, Algeria.
Phone number: +213 771444061
E-mail: nouabadi@yahoo.fr*

The Ethics approval N°:04

Certificate of approval



The ethics committee of the Dr BENBADIS -Constantine University Hospital Centre has examined your request to carry out the above-mentioned study in the "Anatomy pathology- CHU Constantine" research laboratory with you as principal investigator.

Project title: "Relationship between viruses and the development of colorectal cancer".
Principal investigator: Mlle BOUCHEMAL Amina.
Study type: Original research.
The following documents were reviewed and approved:

- **Informed consent.**
- **Detailed questionnaire.**
- **Study protocol.**

We authorize the study to be carried out in the form presented.
We work in accordance with the Declaration of Helsinki (1964): Ethical principles applicable to medical research on human subjects and in accordance with the recommendations of the Algerian national council for ethics in health sciences.

The president of the ethics committee of the
Dr BENBADIS -Constantine University Hospital Centre
Pr. N. ABADI

Annexe 2 : Protocole détaillé de l'extraction des acides nucléiques :**➤ Préparation des solutions**

-Ajouter 30 µl du colorant bleu au tampon de lyse avant de commencer la procédure.

-Ajouter 120 µl d'éthanol à 95-100 % à la solution de lavage 1X avant de commencer la procédure.

➤ Déparaffinage à l'aide de l'huile minérale

1. Ajoutez de l'huile minérale à l'échantillon :

• Pour les coupes ≤ 50 microns, ajout de 300µl d'huile minérale.

• Pour les coupes > 50 microns, ajout de 500µl d'huile minérale.

2. Incuber à 80°C pendant 1 minute.

3. Mélanger avec un vortex.

➤ Lyse cellulaire

1. Ajouter 300 µl de tampon de lyse (avec le colorant bleu ajouté) à l'échantillon.

2. Centrifuger à 10 000 × g pendant 30 secondes. Deux phases seront formées, une phase bleue inférieure (aqueuse) et une phase supérieure (huileuse).

3. Ajouter 60 µl de protéinase K directement à la phase bleue inférieure et mélanger par pipetage.

4. Incuber à 56°C pendant toute une nuit.

5. Incuber à 80°C pendant 1 heure.

6. Placer les tubes sur de la glace pendant 1 minute pour refroidir. Placer ensuite les tubes à température ambiante pendant 15 minutes.

7. Centrifuger les échantillons pendant 2 min à la vitesse maximale.

Le traitement à la DNase I n'est pas effectué pour collecter à la fois l'ADN et l'ARN.

➤ Liaison de l'acide nucléique

Cette étape a été réalisée via l'utilisation de colonnes (Spin columns)

1. Ajouter 325 µl de tampon BL à l'échantillon lysé.

2. Ajouter 200µl d'isopropanol (100%). Mélanger brièvement avec un Vortex.

3. Centrifuger à $10\,000 \times g$ pendant 30 secondes. Deux phases seront formées, une phase bleue inférieure (aqueuse) et une phase supérieure (huileuse).

4. Pour chaque échantillon, placez une colonne de liaison dans un tube collecteur fourni.

Remarque : Portez des gants lors de la manipulation des colonnes et des tubes.

5. Transférer la totalité de la phase inférieure (aqueuse) de l'échantillon dans l'ensemble colonne de liaison/tube collecteur et boucher la colonne. Jeter l'huile minérale restante.

(L'huile minérale est inerte et n'interférera pas avec la procédure d'extraction si une partie de la phase huileuse est transposée sur la colonne de liaison).

6. Centrifuger l'assemblage à $10\,000 \times g$ pendant 30 secondes.

7. Jetez la solution éluée et changer le tube collecteur.

8. Passez immédiatement au lavage et à l'éluion de la colonne.

➤ **Lavage et éluion de la colonne**

1. Ajouter 500 μl de solution de lavage 1X (avec de l'éthanol) à la colonne de liaison.

2. Centrifuger à $10\,000 \times g$ pendant 30 secondes.

3. Jetez la solution éluée et changer le tube collecteur.

4. Répéter les étapes 1.2.3

5. Fermez le capuchon de la colonne et centrifugez l'ensemble colonne /tube collecteur à $16\,000 \times g$ pendant 3 minutes pour sécher la colonne. (Il est important de sécher la colonne pour éviter le transfert d'éthanol dans l'éluat).

6. Transférer la colonne de liaison dans un tube d'éluion propre et jeter le tube collecteur (nous avons utilisé des tubes à faible adsorption d'ADN pour minimiser les pertes).

7. Ajouter 30 à 50 μl d'eau sans nucléases à la colonne, la refermer puis incuber à température ambiante pendant 2 minutes.

8. Centrifuger à $16\,000 \times g$ pendant 1 minute. Retirer et jeter la colonne.

9. Boucher le tube d'éluion et stocker les acides nucléiques à $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Annexe 3 : Classification TNM des cancers colorectaux :

T	Tumeur
Tx	Tumeur primitive non évaluable
T0	Pas de tumeur primitive
Tis	Envahissement de l'épithélium ou de la lamina propria
T1	Envahissement de la sous-muqueuse
T2	Envahissement de la musculature
T3	Envahissement de la sous-séreuse ou des tissus péricolo-rectaux non péritonisés
T4	Atteinte de la séreuse ou des structures adjacentes T4a : perforation du péritoine viscéral T4b : adhésion ou invasion d'un organe de voisinage
N	Ganglion
Nx	Ganglions non évalués
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	1 à 3 ganglions métastatiques régionaux N1a : 1 ganglion métastatique N1b : 2 ou 3 ganglions métastatiques N1c : nodule(s) tumoraux, c-à-d satellite(s) dans la sous-séreuse, ou dans les tissus non péritonéalisés péricoliques ou périrectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2	4 ou plus ganglions métastatiques régionaux N2a : 4 à 6 ganglions métastatiques N2b : 7 ou plus ganglions
M	Métastase
M0	Pas de métastase
M1	Métastases à distance M1 a : Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional M1b Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Annexe 4 : Classification 2021 des tumeurs du système nerveux central

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	9493/0
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour</i>	
Gliosarcoma	9442/3	Central neurocytoma	9506/1
Epithelioid glioblastoma	9440/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Glioblastoma, NOS	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*	Tumours of the pineal region	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineocytoma	9361/1
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Pineoblastoma	9362/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Embryonal tumours	
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastomas, genetically defined	
Other astrocytic tumours		Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	9476/3*
Piloxyoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 3</i>	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 4</i>	
Ependymal tumours		Medulloblastomas, histologically defined	
Subependymoma	9383/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Ependymoma	9391/3	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Papillary ependymoma	9393/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
Tanyctic ependymoma	9391/3	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	9396/3*	<i>Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS</i>	9478/3
Anaplastic ependymoma	9392/3	Medulloepithelioma	9501/3
Other gliomas		CNS neuroblastoma	9500/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Angiocentric glioma	9431/1	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Astroblastoma	9430/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	9508/3

Résumé

L'évolution récente de la recherche en oncologie a été marquée par un intérêt grandissant pour les éventuelles associations entre les infections virales et le développement des cancers. Parmi les virus étudiés dans ce contexte, on retrouve le Cytomégalovirus Humain (HCMV), un herpesvirus très répandu dans la population mondiale. Principalement connu pour les graves complications qu'il induit chez les patients immunodéprimés et les femmes enceintes, il suscite actuellement un vif intérêt pour sa potentielle association avec le développement de malignités ainsi que son éventuelle utilisation dans le cadre de la thérapie ciblée. Durant cette recherche, nous nous sommes fixés pour objectif d'explorer en profondeur la présence du HCMV au sein de biopsies tumorales provenant d'une cohorte de patients atteints de tumeurs cérébrales ou colorectales dont les caractéristiques cliniques et moléculaires ont été définies et analysées. Cette étude s'est appuyée sur une approche moléculaire basée sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR), visant à détecter le génome viral et à évaluer son potentiel rôle dans le développement tumoral. En dépit de la sensibilité des techniques que nous avons utilisées, la totalité des échantillons que nous avons testés étaient négatifs pour l'infection à HCMV. Bien que nos résultats ne plaident pas en faveur d'un rôle majeur pour ce virus dans la pathogenèse des cancers étudiés, ils soulignent l'importance d'une méthodologie rigoureuse et consensuelle dans l'exploration des relations complexes qui sous-tendent l'infection par le HCMV et le développement de pathologies cancéreuses.

Mots clés : Cytomégalovirus, tumeurs cérébrales, tumeurs colorectales, oncogenèse, Herpesvirus, biologie moléculaire, biopsies tumorales, infection.

Abstract

Recent developments in oncology research have been marked by a growing interest in the possible association between viral infections and the development of cancers. Among the viruses studied in this context, we find Human Cytomegalovirus (HCMV) a widespread herpesvirus that is mainly known for the serious complications it induces in immunocompromised patients and pregnant women. It is currently arousing a huge interest for its potential association with the development of malignancies as well as its possible use in the context of targeted therapy. During this research we set the objective of exploring in depth the presence of HCMV in tumor biopsies from a cohort of patients with brain or colorectal tumors whose clinical and molecular characteristics have been defined and analyzed. This study relied on a molecular approach based on the polymerase chain reaction (PCR), aimed at detecting the viral genome and evaluating its potential role in tumor development. Despite the sensitivity of the techniques we used, the totality of the samples we tested were negative for HCMV infection. Our results do not argue in favor of a major role for this virus in the pathogenesis of the cancers studied. However, our findings highlight the importance of a rigorous and consensual methodology in the exploration of the complex relationships underlying the infection by HCMV and the development of malignancies.

Keywords: Cytomegalovirus, brain tumors, colorectal tumors, oncogenesis, Herpesvirus, molecular biology, tumor biopsies, infection.

ملخص

اتسمت التطورات الأخيرة في أبحاث الأورام بالاهتمام المتزايد بالارتباطات المحتملة بين الالتهابات الفيروسية وتطور السرطان. ومن بين الفيروسات التي تمت دراستها في هذا السياق، نجد الفيروس المضخم للخلايا البشرية، فيروس واسع الانتشار بين سكان العالم، ينتمي إلى عائلة الهربس. هو معروف بشكل رئيسي بالمضاعفات الخطيرة التي يسببها لدى المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة والنساء الحوامل، لكنه يثير حاليًا اهتمامًا كبيرًا لارتباطه المحتمل بتطور الأورام الخبيثة، إضافة إلى إمكانية استخدامه في سياق العلاج الموجه. خلال هذا البحث، وضعنا كهدف الاستكشاف المتعمق لوجود الفيروس في خزعات الورم لمجموعة من المرضى الذين يعانون من أورام المخ أو القولون والمستقيم الذين تم تحديد وتحليل خصائصهم السريرية والجزيئية. اعتمدت هذه الدراسة على المنهج الجزيئي المعتمد على تفاعل البوليميراز المتسلسل، بهدف الكشف عن الجينوم الفيروسي وتقييم دوره المحتمل في تطور الورم. وعلى الرغم من حساسية التقنيات التي استخدمناها، فإن جل العينات التي اختبرناها كانت سلبية بالنسبة لعدوى الفيروس المدروس. على الرغم من أن نتائجنا لا تؤيد وجود دور رئيسي لهذا الفيروس في ظهور السرطانات التي تمت دراستها، إلا أنها تسلط الضوء على أهمية اتباع منهجية صارمة وملتزم عليها في استكشاف العلاقات المعقدة الكامنة وراء العدوى بالفيروس وتطور الأمراض السرطانية.

الكلمات المفتاحية

الفيروس المضخم للخلايا، أورام الدماغ، أورام القولون والمستقيم تكوين الأورام، فيروس الهربس، البيولوجيا الجزيئية، خزعات الورم، العدوى.