MISE AU POINT SUR LES MARQUEURS DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR UTILISES POUR LE DIAGNOSTIC PRIMAIRE DU CANCER DU CAVUM ET LA DETECTION DE RECHUTE OU METASTASES APRES TRAITEMENT

EPSTEIN-BARR VIRUS MARKERS USED FOR PRIMARY DIAGNOSIS AND MONITORING TUMOR BURDEN AFTER THERAPY IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA: A REVIEW

H. KARRAY-HAKIM, W. AYADI, L. FEKI-BERRAJAH

Laboratoire Microbiologie, Faculté de Médecine de Sfax

Correspondance :

Héla KARRAY-HAKIM
Laboratoire Microbiologie
Faculté de Médecine de Sfax
Avenue Majida Bouleila. 3029 SFAX- TUNISIE
Tél : +21674456450
hela.karray@rns.tn

INTRODUCTION

Le carcinome nasopharyngé (NPC) est une tumeur d'origine épithéliale localisée dans la partie postérieure du cavum. C'est l'une des tumeurs les plus agressives de la tête et du cou avec une évolutivité tumorale importante et un potentiel métastatique élevé. Avec une incidence de 3,76 cas/100.000 habitants/an, la Tunisie constitue une zone d'incidence intermédiaire dans la distribution mondiale du NPC. Il s'agit du premier cancer des voies aérodigestives supérieures chez la femme et du deuxième, après le cancer du larynx, chez l'homme [1]. Par ailleurs, la Tunisie comme les autres pays du Maghreb se caractérise par une distribution bimodale des malades selon l'age avec un premier pic d'incidence entre 40 et 60 ans pareil aux autres régions du monde et un deuxième pic moins important qui se situe au dessous de 25 ans. Cette forme juvénile, qui représente 20% des cas en Tunisie, est absente ou rare dans les autres régions du monde [1, 2].

Le NPC puise son originalité dans son association étroite avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) et ceci dans sa forme indifférenciée ou peu différenciée [3,4]. Cette association a été établie depuis plus de 40 ans par la mise en évidence de l'ADN viral et de l'antigène EBNA dans les cellules tumorales, aussi bien dans les sites primaires que métastatiques [5, 6]. De plus, l'EBV a été détecté dans les lésions nasopharyngées prémalignes incluant carcinome in situ et dysplasie [7, 8]. Cette association a été également démontrée sur des critères sérologiques : en effet, on retrouve chez les malades NPC un profil sérologique particulier caractérisé par des titres élevés en IgG anti-EBV (en rapport avec une réactivation virale) et surtout des IgA anti-EBV [9, 10].

Sur le plan clinique, le NPC est un cancer de diagnostic difficile pour plusieurs raisons, essentiellement à cause de la localisation profonde de la tumeur qui se développe le plus souvent au niveau de la fossette de Rosenmüller et donc dans une région d'accès difficile pour l'examen et la biopsie ; cette localisation particulière explique aussi la symptomatologie d'emprunt souvent trompeuse par atteinte des structures anatomiques voisines (signes rhinologiques, otologiques, adénopathies cervicales…). Aucun de ces signes n'est typique et le délai moyen entre les premiers signes cliniques et le diagnostic varie souvent entre 8 et 10 mois [11, 12]. Or, la survie des malades est d'autant meilleure que le diagnostic est précoce d'où la nécessité de disposer de moyens permettant de faciliter ce diagnostic. Par ailleurs, le NPC est très radiosensible mais en dépit des excellentes réponses initiales au traitement, les meilleurs taux de survie globale ne dépassent pas 40% [13]. Ceci est expliqué par les taux d'incidence importants de récidive locorégionale et des métastases à distance d'où l'importance également de détecter précocement une rechute ou une métastase au cours de la surveillance après traitement. Si de tels patients avec un risque élevé de complications peuvent être identifiés, ils peuvent bénéficier d'un traitement primaire plus intensif ou d'un traitement adjuvant. Or, contrairement à d'autres cancers, le NPC n'a pas de marqueurs tumoraux associés. C'est ainsi que l'association EBV-NPC a été mise à profit pour le diagnostic et le suivi des malades en utilisant la sérologie EBV ou la charge en ADN viral.

Marqueurs EBV pour le diagnostic primaire du NPC

Différents marqueurs EBV ont été étudiés depuis que Old en 1966 [9] puis Henle en 1970 [10] ont

montré l'existence d'un profil sérologique EBV particulier chez les malades NPC. Les premières études réalisées ont essayé d'exploiter les résultats de la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour le diagnostic précoce du NPC. La constatation qui en ressort est la variabilité des taux de détection des marqueurs EBV d'une étude à une autre et selon la population étudiée. C'est ainsi que les titres élevés en IgG anti-VCA sont retrouvés chez les malades NPC avec une fréquence variant de 63,5% à Taiwan [14] à plus de 90% à Hong Kong [15]. La sensibilité des IgA anti-VCA varie également de 66,5% chez les malades algériens [16] à 98,2% à Hong Kong [17]. Dans une étude réalisée dans notre laboratoire sur 117 sérums de malades NPC prélevés au moment du diagnostic primaire de ce cancer, 89,7% de nos patients ont montré des titres élevés en IgG anti-VCA et 78,5% avaient des IgA anti-VCA [18]. Ces chiffres ainsi que ceux de la série algérienne réalisée par Boualga [16] sont plus bas que ceux retrouvés dans les séries sud-est asiatiques. Pour expliquer ces différences sérologiques entre les malades sud-est asiatiques et nord-africains, nous avons étudié la fréquence des marqueurs sus-cités selon différents paramètres cliniques et nous avons retrouvé une différence statistiquement significative entre les deux groupes d'age de nos malades concernant la détection des IgA anti-VCA qui étaient retrouvées chez 89,4% des sujets âgés contre seulement 50% chez les malades jeunes [18]. Cette différence remarquable a été également rapportée par d'autres équipes nord-africaines : Dardari et al retrouvent ce marqueur chez 50% seulement des jeunes patients marocains [19] alors que Bouguermouth et al le retrouvent encore moins fréquemment, chez moins de 50 % des jeunes patients algériens(données non publiées) [20]. Les titres élevés en IgG anti-EBV étaient également retrouvés plus fréquemment chez nos malades âgés que chez les jeunes sans que la différence soit statistiquement significative. Ainsi, les deux marqueurs EBV étudiés manquent de sensibilité chez nos malades ce qui explique que sur le plan pratique, l'absence de titres élevés en IgG et/ou l'absence d'IgA ne peut pas exclure le diagnostic de NPC surtout chez le sujet jeune parmi les malades nord-africains. De plus, ces marqueurs ont montré leur manque de spécificité et en particulier les IgA anti-VCA qui étaient considérées au début comme spécifiques du NPC mais qui ont été démontrées par la suite dans d'autres maladies associées ou non à l'EBV : dans d'autres cancers de la tête et du cou, les lymphomes non hodgkiniens, le lupus, etc [21,22,23].

Afin d'améliorer la sensibilité des marqueurs EBV, plusieurs auteurs ont testé la technique ELISA utilisant différentes protéines EBV recombinantes ou des peptides synthétiques des antigènes de la capside virale (VCA) ou des antigènes précoces (EA). Mais même avec cette technique plus sensible, les résultats des différentes études ne s'accordaient pas toujours. Une attention a été focalisée sur la valeur diagnostique des IgG anti-ZEBRA depuis que Joab et al en 1991 avaient mis en évidence ces anticorps chez 87% des malades NPC contre seulement 1% des porteurs sains d'EBV [24]. De plus, ce marqueur apparaissait intéressant chez les jeunes malades NPC marocains puisqu'il a été retrouvé par Dardari et al chez 100 % des patients âgés de moins de 15 ans et 93% des patients âgés de 15 à 30 ans alors que les IgA anti-VCA étaient détectées respectivement dans ces deux tranches d'age dans 45% et 85% des cas [25]. Cependant, Yip en 1994 avait retrouvé ce marqueur chez 97% des malades NPC mais également chez 85% des malades présentant une mononucléose infectieuse et 32% des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine d'où une bonne sensibilité de ce marqueur mais une faible spécificité [26].

Une méthode d'immunoblot a été utilisée récemment par Fachiroh et al pour étudier en détail la réponse en IgG et en IgA contre tout un panel de protéines EBV chez des malades NPC indonésiens, chinois et caucasiens et cette étude a montré des résultats très intéressants [27]. Nous avons donc appliqué cette même méthode pour analyser les réponses anticorps de nos malades tenant compte surtout de leur age. Nous avons également pris comme groupe témoin, différentes populations à savoir des malades atteints de maladies associées à l'EBV telles que le lymphome de Burkitt ou hodgkinien, des patients présentant des maladies auto-immunes et des porteurs sains. Nous avons ainsi confirmé que les jeunes malades ont une réponse IgG et IgA plus restreinte que les adultes avec une fréquence de détection significativement plus faible des marqueurs IgG anti-EA p138 et anti-VCA p40 et des marqueurs IgA anti-ZEBRA, -EAd p47/54 et –VCA p40 chez ces jeunes malades (article soumis pour publication). Ces résultats confirment donc la faible sensibilité des anticorps anti-EA et anti-VCA retrouvée par la technique d'IFI dans ce groupe d'âge. Le résultat le plus intéressant de cette étude a été de retrouver un marqueur à la fois sensible et spécifique et aussi bien chez les jeunes que les patients âgés, en l'occurrence les IgA anti-EBNA1.

Actuellement et depuis quelques années, différents auteurs se sont intéressés à la mesure de la charge en ADN de l'EBV par PCR dans le sang circulant comme marqueur tumoral du NPC et ceci en partant du postulat que cet ADN viral est libéré dans le sang à partir des cellules tumorales. Les

études utilisant des techniques de PCR classiques, retrouvaient une sensibilité de ce marqueur pour le diagnostic de NPC de seulement 59 à 75% selon les auteurs [28-30]. Mais actuellement avec la PCR en temps réel, l'ADN peut être détecté chez plus de 90 % des malades au moment du diagnostic et donc avant tout traitement [31]. Leung et al ont comparé les taux de détection, dans le sérum des malades NPC, de l'ADN viral recherché par PCR en temps réel et le marqueur IgA anti-VCA qui est le marqueur sérologique le plus recherché chez ces malades : ils rapportent une sensibilité de 95% pour le premier et de 81 % pour le deuxième avec une spécificité comparable de 98% et 96% respectivement [32]. En fait, la quantification de l'ADN viral circulant a surtout un intérêt pronostique tel qu'il a été démontré par différentes études.

Marqueurs EBV pour le suivi des malades NPC après traitement

Seules quelques études ont étudié la valeur pronostique de différents anticorps anti-EBV. Seulement, elles n'ont pas montré de différence significative entre l'existence de titres bas ou élevés des marqueurs classiques IgG et IgA anti-VCA/EA avant traitement et l'évolution ultérieure des malades après traitement. De même, le suivi séquentiel des titres de ces anticorps après traitement et la mise en évidence d'une élévation du titre de un ou plusieurs marqueurs à un moment donné de la surveillance ne permettent pas toujours de prédire l'évolution et ne signifient pas toujours l'existence sous-jacente d'une rechute tumorale ou d'une métastase. L'analyse des résultats du suivi sérologique de certains de nos patients NPC après traitement a montré également l'absence d'intérêt des marqueurs EBV classiques pour la détection de complications et donc comme marqueurs pronostiques (tableau I). En effet, chez 42 patients en rémission, le titre initial trouvé avant traitement des quatre types d'anticorps recherchés a diminué ou est resté stable au cours de l'évolution après traitement ; par contre, une augmentation de ces titres en faveur d'une complication n'a été détectée, pour le meilleur des marqueurs, que chez la moitié des 9 patients ayant présenté effectivement une complication au cours de la surveillance post-traitement.

C'est la mesure de la charge virale en ADN circulant avant et après traitement qui apparaît corrélée à la survie et au pronostic des patients. Twu et al ont suivi 114 patients et ont montré des corrélations statistiquement significatives entre le taux d'ADN retrouvé chez les malades avant traitement et le risque de complications et la survie à 4 ans : en effet, une rechute a été observée chez 43% des patients ayant présenté une charge virale pré-traitement supérieure ou égale à 1500 copies/ ml contre 17,5% seulement chez les patients avec ADN viral pré-traitement inférieur à 1500 copies/ ml et le taux de survie à 4 ans était de 60,3% dans le premier groupe contre 93% pour le deuxième. De même, le taux de rechute et la survie à 4 ans sont respectivement de 84,6% et 30,8 % chez les patients ayant de l'ADN viral circulant encore positif une semaine après la chimiothérapie contre 21,8 % et 84,6 % chez les patients qui négativent leur ADN [23].

Tableau I : Evolution des titres d'anticorps anti-EBV recherchés par IFI au cours de la surveillance après traitement chez 42 patients NPC en rémission et 9 patients NPC ayant présenté une récidive tumorale ou une métastase à distance.

Evolution clinique	Evolution des titres d'anticorps	IgG VCA	IgA VCA	IgG EA	IgA EA
Rémission (42 patients)	Diminués[1] ou stables[2]	97 %	100 %	100 %	100 %
	Augmentés[3]	3 %	0 %	0 %	0 %
Complications (9 patients)	Diminués ou stables	55.5 %	44.5 %	66.7 %	88.2 %
	Augmentés	44.4 %	55.5 %	33.3 %	11.1 %

1- On considère que les titres d'anticorps ont diminué d'une manière significative si on met en évidence une diminution d'au moins 2 dilutions entre deux sérums séquentiels d'un malade donné.
2- Les titres d'anticorps sont considérés stables s'ils restent les mêmes ou s'ils varient de plus ou moins une dilution entre deux sérums séquentiels d'un malade donné.
3- Les titres d'anticorps sont considérés augmentés d'une manière significative si on met en évidence une augmentation d'au moins 2 dilutions entre deux sérums séquentiels d'un malade donné.

Marqueurs EBV pour le dépistage précoce du NPC

Le dépistage précoce consiste à dépister les sujets à haut risque de faire un NPC dans la population générale en zones d'endémie ou dans la fratrie d'un malade (existence de cas familiaux) partant du fait que l'EBV peut être détecté dans les lésions prémalignes et que les marqueurs EBV se positivent bien avant l'apparition du cancer.

Zeng et al en 1982 ont réalisé un dépistage sérologique dans la population de la ville de Wuzhou en Chine en recherchant les IgA anti-VCA et les IgA anti-EA. Parmi les 12932 personnes, 5,3% avaient des IgA anti-VCA et 4.4 % avaient des IgA anti-EA. Le taux de détection du NPC était de 1,9% seulement chez les personnes IgA anti-VCA positives et de 30% chez celles présentant des IgA anti-EA [33]. De même, Deng et al en 1995 ont réalisé un dépistage sérologique

du NPC dans 21 cités du sud de la Chine qui est une zone de forte endémicité pour ce cancer et retrouvent également la sensibilité supérieure des IgA anti-VCA alors que les IgA anti-EA présentent une meilleure spécificité [34]. Il serait donc intéressant d'utiliser les Ac anti-VCA en première intention puis les Ac anti-EA en deuxième intention comme test de confirmation chez les personnes dépistées IgA anti-VCA positives.

En conclusion, malgré son intérêt, la sérologie EBV par la technique d'immunofluorescence indirecte apparaît limitée pour le diagnostic primaire ou le dépistage précoce du NPC surtout chez les jeunes malades nord-africains. En effet, chez un patient présentant une suspicion de NPC, l'absence de détection de titres élevés en IgG anti-EBV et/ou l'absence d'IgA ne doivent pas éliminer le diagnostic de NPC. En conséquence, il est nécessaire de trouver d'autres marqueurs EBV pour cette tranche d'age. Cependant, la sensibilité et la spécificité des divers anticorps anti-EBV étudiés par plusieurs auteurs diffèrent selon les études et les pays et selon le groupe témoin utilisé. Le choix des marqueurs doit donc être propre à chaque région.
Le suivi de la charge en ADN viral circulant semble être un bon marqueur pronostique mais coûte cher. Il reste beaucoup à faire et les études doivent continuer et tester d'autres marqueurs tels que les anticorps anti-LMP1, anti-BARF1…

Références

1- Boussen H, Bouaouina N, Mokni-Baizig N et *al*. Carcinomes du nasopharynx : données actuelles. Pathologie Biologie 2005 ; 53 (1) : 45-51.
2- Huang TB. Cancer of nasopharynx in childhood. Cancer 1990; 66 : 968-71.
3- Chan MKM, Huang DP, Ho YH et al. Detection of *Epstein-Barr virus* associated antigen in fine needle aspiration smears from cervical lymph nodes in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. Acta Cytol 1989 ; 33 : 351-4.
4- Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R et *al*. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine needle aspiration. N Engl J Med 1992 ; 326 : 17-21.
5- Wolf H, Zur Hausen H and Becker V. EBV viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. Nature New Biol 1973 ; 244 : 245-7.
6- Zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G et *al*. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 1970 ; 228 : 1056-8.
7- Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R et *al.* Clonal proliferations of cells infected with *Epstein-Barr virus* in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. N Engl J Med 1995 ; 333 (11) : 694-8.
8- Raab-Traub N, Sadler R, Hood Edwards R et *al.* EBV infection in nasopharyngeal carcinoma: viral expression and strain variation. Colloque INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd 1993 ; 225 : 467-75.
9- Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF et *al*. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1966 ; 56 : 1699-704.
10- Henle W, Henle G, Ho MC et al. Antibodies to EB virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms and control groups. J Natl Cancer Inst 1970 ; 44 : 225-31.
11- Schwaab G, Micheau C, Eschwege F et *al*. Les carcinomes du nasopharynx (NPC). Etude anatomopathologique, clinique, traitement, résultats. Actualités carcinologiques de l'IGR 1983.
12- Van Hasselt CA, John DG. Diagnosing nasopharyngeal cancer. Laryngoscope 1994 ; 104 :103-4
13- Teo PM, Yu P, Lee WY et *al.* Significant prognosticators after primary radiotherapy in 903 non-disseminated nasopharyngeal carcinomas evaluated by computer tomography. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996 ; 36 : 291-304.
14- Lynn TC, Tu SM And Kawamura A. Long-term follow-up of IgG and IgA antibodies against viral capsid antigens of *Epstein-Barr virus* in nasopharyngeal carcinoma. J Laryngol Otol 1985 ; 99 : 567-72.
15- Ho HC, Mun H. NG, Kwan HC and Chan JCW. *Epstein-Barr virus* specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. Br J Cancer 1976 ; 34 : 655-60.
16- Boualga K et Ghouadni R. Carcinomes du nasopharynx en Algérie. A propos d'une série de 213 cas. Ann Radiol 1984 ; 27 (7) : 621-8.
17- Tang JW, Rohwäder E, Chu IMT et *al*. Evaluation of *Epstein-Barr virus* antigen-based immunoassays for serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. J Clin Virol 2007 ; 40 : 284-8.
18- Karray H, Ayadi W, Fki L, et *al*. Comparison of three different serological techniques for primary diagnosis and monitoring of nasopharyngeal carcinoma in two age groups from Tunisia. J Med Virol 2005 ; 75 : 593-602.
19- Dardari R, Khyatti M, Benider A et *al*. Antibodies to the *Epstein-Barr virus* transactivator protein (ZEBRA) as a valuable biomarker in young patients with nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 2000 ; 86 : 71-5.
20- Bouguermouth A, Melouli H, Elhadjan M et *al*. Existence d'un profil particulier pour les marqueurs sérologiques et moléculaires du virus d'Epstein-Barr chez les jeunes algériens porteurs d'un carcinome nasopharyngé. Atelier Nord-Sud sur les carcinomes nasopharyngés, 4-6 Décembre 2003, Institut Gustave Roussy, Villejuif- France.
21- Chen CJ, Lin KH, Lin S et *al*. High prevalence of immunoglobulin A antibody against *Epstein-Barr virus* capsid antigen in adult patients with lupus with disease flare: case control studies. The Journal of Rheumatology 2005 ; 32 : 44-7.
22- Dölken G, Bross KJ, Hecht T et *al*. Increased incidence of IgA antibodies to the Epstein-Barr virus associated viral capsid antigen and early antigens in patients with chronic lymphocytic leukemia. Int J Cancer 1986 ; 38(1) : 55-9.
23- Twu CW, Wang WY, Liang WM et *al*. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. Int J Radiation Oncology Biol Phys 2007; 67(1) : 130-7.
24- Joab I, Nicolas JC, Schwaab G et al. Detection of Epstein-Barr virus transactivator (ZEBRA) antibodies in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 1991 ; 48 : 647-9.
25- Dardari R, Menezes J, Drouet E et *al*. Analyses of the prognostic significance of the *Epstein-Barr virus* transactivator ZEBRA protein and diagnostic value of its two synthetic peptides in nasopharyngeal carcinoma. J Clin Virol 2008 ; 41 : 96-103.
26- Yip TTC, Ngan RKC, Lau WH et *al*. A possible prognostic role of immunoglobulin-G antibody against recombinant *Epstein-Barr virus* BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer 1994 ; 74 (9) : 2413-24.
27- Fachiroh J, Schouten T, Hariwiyanto B et *al*. Molecular diversity of *Epstein-Barr virus* IgG and IgA antibody responses in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese and European subjects. J Infect Dis 2004 ; 190 : 53-62.
28- Hsiao JR, Jin YT, Tsai ST et *al*. Detection of cell free *Epstein-Barr virus* DNA in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer 2002 ; 94 : 723-9.

29- Mutirangura A, Pornthanakasem W, Theamboonlers A et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res 1998 ; 4 : 665-9.
30- Shotelersuk K, Khorprasert C, Sakdikul S et *al. Epstein-Barr virus* DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer. Clin Cancer Res 2000; 3 : 1046-51.
31- Lo YM, Chan LY, Lo KW et al. Quantitative analysis of cell-free *Epstein-Barr virus* DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res 1999 ; 59 : 1188-91.
32- Leung SF, Tam JS, Chan ATC et al. Improved accuracy of detection of nasopharyngeal carcinoma by combined application of circulating *Epstein-Barr virus* DNA and anti-Epstein-Barr viral capsid antigen IgA antibody. Clinical chemistry 2004 ; 50(2) : 339-345.
33- Zeng Y, Zhang LG, Li HY et al. Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in Wuzhou city, China. Int J Cancer 1982 ; 29 : 139-41.
34- Deng H, Zeng Y, Zhao Z et al. Serological survey of nasopharyngeal carcinoma in 21 cities of South China. Chinese Med J 1995 ; 108(4) : 300-3.