



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



UNIVERSITÉ ABOU BAKR BELKAID TLEMCCEN
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement

« LAMAABE »

THÈSE

Présentée par

M^{me} DAHMANI Bouchra

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en Microbiologie

**Étude épidémiologique et moléculaire des cancers colorectaux
dans une région de l'ouest Algérien**

Soutenue le 19/12/2023

Devant le jury :

HASSAINE Hafida	Pr	Présidente	Université Tlemcen
KHENCHOUCHE Abdelhalim	MCA	Examineur	Université de Sétif
CHABNI Nafissa	Pr	Examinatrice	Université Tlemcen
BELHADJ Amina	MCA	Examinatrice	Université d'Oran
BOUBLENZIA Lamia	MCA	Directrice	Université Tlemcen
BELHARRAZEM Djeda	Pr	Co-directrice	Université d'Allemagne

Année universitaire : 2022-2023

Remerciement

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à madame **Lamia BOUBLENZA** pour m'avoir encadrée. Un immense merci pour votre confiance, votre accompagnement tout au long du parcours, votre aide précieuse, vos conseils avisés, votre disponibilité et votre indulgence.*

*J'aimerais exprimer toute ma gratitude envers le Professeur **Djeda BEZLHARRAZEM** pour leur précieux co-encadrement, leur soutien personnel et ses encouragements. Sans leur projet de recherche, il aurait été difficile d'atteindre nos objectifs.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Professeur **Hafida HASSAINE** pour leur présence remarquable, pour leur aide précieuse et leur conseil avisé tout au long de ces années et d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement le Professeur **Nafissa CHABNI** pour leur aide précieuse et leurs conseils avisés tout au long de ces années ainsi que pour avoir accepté de participer au jury d'évaluation de ce travail en tant qu' examinatrice.*

*Je remercie le Professeur **Abdelahalim KHENCHOUCHE** du département de microbiologie, université de Sétif pour leur disponibilité, leur aide, leurs encouragements et d'avoir accepté de juger mon travail.*

Je remercie le docteur **BELHADJ Amina** du département de biologie, université d'Oran d'avoir accepté de participer au jury d'évaluation de ce travail en tant qu'examinateur.

De nombreuses expériences présentées ici n'auraient jamais pu être réalisées sans l'aide scientifique et technique des différents membres du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques d'EPH Ain Temouchent. Je tiens à remercier le Docteur **Belkacem BELATBI** et le Docteur **Amel BENFOULA** pour leur contribution sur le travail effectué à partir de la collection biologique. J'exprime mes sincères remerciements aux ingénieurs de laboratoire à **Ikram BREIK** pour leur contribution technique, leur aide, leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je voudrais aussi tout particulièrement remercier les responsables des laboratoires privées d'anatomie et cytologie pathologiques docteur **SAIM**, docteur **SARI HASSOUN**, docteur **KERMAS**, docteur **KARA SLIMANE** d'avoir accepté de participer à la collection d'échantillons.

Bien sûr, je n'oublie pas l'aide précieuse des responsables et des ingénieurs des laboratoires LAMAABE, CancerLab et PPABIONUT.

Ces années passées à LAMAABE n'auraient jamais été les mêmes sans la bonne humeur de tous les docteurs et les doctorants que j'ai eu la chance de côtoyer au cours de cette thèse.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à **Dalale BEHAR** avec qui j'ai partagé cette aventure depuis le master. Ce n'est pas très original mais la seule chose que je trouve à te dire est : merci pour tout.

Merci à ma famille et à mes amis pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'ont témoigné, me permettant ainsi de terminer cette thèse de doctorat. À mes parents **Mokhtar** et **Naima**, qui m'ont toujours encouragé calmement et soutenu dans tout ce que je fais- je vous suis éternellement reconnaissant.

*Je remercie de tout mon coeur mon mari **Mohamed** qui n'a cessé de m'encourager tout au long de ces années, d'être à côté de moi dans les moments les plus difficiles*

*Je dédie particulièrement ce travail à mon petit ange **Mohamed Khalil**, le rayon de soleil de ma vie.*

ملخص

يعتبر سرطان القولون والمستقيم (CRC) مشكلة صحية عامة حقيقية في كل من الجزائر والعالم بسبب انتشاره العالي ومعدل الوفيات الناتجة عنه. ويعد معظم حالات سرطان القولون والمستقيم نوعًا غير وراثي ويرجع سببها بشكل رئيسي إلى طفرات ناتجة عن التعرض لعوامل بيئية مثل العوامل المعدية بما في ذلك فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) وفيروس إبشتاين بار (EBV).

تمحور عملنا حول ثلاثة محاور أجريت فيها دراسة وبائية بأثر رجعي لسرطان القولون والمستقيم بين عامي 2012 و 2016 في منطقة تلمسان. بالإضافة إلى ذلك، أجريت دراسات فيروسية وجزئية لتقييم وجود فيروس HPV و EBV في 96 من أنسجة لسرطان القولون والمستقيم، ولتحديد نوع طفرات exon 2 في جين KRAS في 36 أنسجة من نفس المجموعة.

تم إجراء التحليل الوبائي باستخدام برنامج SPSS الإصدار 25 وبرنامج Microsoft Excel 2010 والتحليل الفيروسي باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR). مع مجموعات البادئات MY09 / MY11 و GP5 + / GP6 + لتضخيم جين HPV L1. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء تضخيم جينات LMP1 و EBNA1 للكشف عن وجود EBV. بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام طريقة التسلسل Sanger لتحديد تواتر طفرات KRAS.

كان CRC ثالث أكثر أنواع السرطانات وقوعًا بين النساء والرجال على حد سواء. تم العثور على ما مجموعه 581 حالة من حالات CRC خلال هذه الفترة مع غلبة الذكور (55.4٪) ومتوسط عمر 60 ± 13 سنة، سرطان القولون الغدي هو النوع السائد إلى حد كبير. تظهر نتائج الدراسة الفيروسية أن البادئات MY09 / MY11 لم تكن قادرة على تضخيم الحمض النووي لفيروس الورم الحليمي البشري في أي عينة، في حين أن البادئات GP6 + / GP5 + اكتشفت 3.12٪ (96/3 حالة) من العينات إيجابية، فيما يتعلق ب-VEB، فلم تتمكن أي من البادئات من اكتشاف هذا الفيروس. علاوة على ذلك، كشف تسلسل exon 2 لجين ASKR عن طفرة في 58.33٪ من الحالات (36/21) مع 12 نوعًا مختلفًا من الطفرات، منها الكودونات 31 و 25 و 35 كانت الأكثر تحورًا بنسبة 61.90٪ و 47.62٪ و 23.81٪ على التوالي.

من الضروري وضع سياسة تهدف إلى الوقاية من سرطان القولون والمستقيم، بالإضافة إلى برامج صحة عامة توعّي الجمهور بالعوامل المرتبطة بعوامل الخطر المتعلقة بنمط الحياة. قد تلعب هذه الإجراءات دورًا أساسيًا في الوقاية والحد من تطور هذه الأورام الخبيثة وانتشارها.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون والمستقيم، فيروس الورم الحليمي البشري، فيروس إبشتاين بار، جين KRAS.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est un véritable problème de santé publique aussi bien en Algérie que dans le monde par sa fréquence et sa mortalité élevée. La majorité des CCR sont de nature sporadique et principalement attribuables à des mutations somatiques résultant de l'exposition à des facteurs environnementaux, tels que les agents infectieux notamment le Papillomavirus humain (HPV) et le virus d'Epstein-Barr (EBV).

Notre travail s'est articulé autour de trois axes dans lesquels une étude rétrospective épidémiologique des cancers colorectaux entre 2012 et 2016 dans la région de Tlemcen a été menée. De plus, des études virologiques et moléculaires ont été effectuées pour détecter la présence de l'ADN du HPV et de l'EBV à partir de 96 tissus paraffinés de cancer colorectal, ainsi que pour déterminer la fréquence et le type des mutations de l'exon 2 du gène KRAS au niveau de 36 tissus de la même collection. L'analyse épidémiologique a été réalisée par le logiciel SPSS version 25 et Microsoft Excel 2010 et l'analyse virologique par la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) avec les jeux d'amorces MY09/MY11 et GP5+/GP6+ pour amplifier le gène L1 du HPV. De plus, l'amplification des gènes LMP1 et EBNA1 a été réalisée pour détecter la présence d'EBV. En outre, la méthode de séquençage Sanger a été utilisée pour déterminer la fréquence des mutations KRAS.

Le CCR était le 3ème cancer le plus incident chez les femmes ainsi que chez les hommes. Au total, 581 cas de CCR ont été trouvés durant cette période avec une prédominance masculine (55,4%) et un âge moyen de 60±13 ans, l'adénocarcinome colique était le type largement prédominant. Les résultats de l'étude virologique montrent que les amorces MY09/MY11 n'ont pas été capables d'amplifier l'ADN du HPV dans aucun échantillon, alors que les amorces GP5+/GP6+ ont détecté 3,12% (3/96 cas) d'échantillons HPV-positives, concernant l'EBV, aucune des amorces n'a pu détecter ce virus. Par ailleurs, le séquençage d'exon 2 du gène KRAS a révélé une mutation dans 58,33% des cas (21/36) avec 12 types de mutations différentes dont les codons 31, 25 et 35 étaient les plus mutés avec 61,90%, 47,62% et 23,81% respectivement. Il est nécessaire d'établir une politique visant à prévenir le cancer colorectal ainsi que des programmes de santé publique qui sensibilisent le public aux facteurs de risque liés au mode de vie. Ces mesures pourraient jouer un rôle essentiel dans la prévention et la diminution du développement de ces tumeurs malignes et de leurs métastases.

Les mots clés : cancer colorectal, les papillomavirus humains, le virus d'Epstein-Barr, gène KRAS.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a significant public health issue in both Algeria and the world due to its high frequency and mortality rate. The majority of CRC cases are sporadic in nature and primarily attributed to somatic mutations resulting from exposure to environmental factors, such as infectious agents including Human Papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV).

Our work focused on three main aspects, where a retrospective epidemiological study of colorectal cancer between 2012 and 2016 in the Tlemcen region was conducted. Additionally, virological and molecular studies were performed to detect the presence of HPV and EBV DNA in 96 paraffin-embedded colorectal cancer tissues, as well as to determine the frequency and type of exon 2 mutations in the KRAS gene in 36 tissues from the same collection. The epidemiological analysis was conducted using SPSS version 25 and Microsoft Excel 2010 software. The virological analysis was performed using the polymerase chain reaction (PCR) technique with the primer sets MY09/MY11 and GP5+/GP6+ to amplify the L1 gene of HPV. Additionally, amplification of the LMP1 and EBNA1 genes was carried out to detect the presence of EBV. Furthermore, the Sanger sequencing method was used to determine the frequency of KRAS mutations.

CRC ranked as the third most incident cancer in both women and men. A total of 581 cases of CRC were identified during this period, with a male predominance (55.4%) and a mean age of 60 ± 13 years. Colonic adenocarcinoma was the most common histological type. The virological study results showed that the MY09/MY11 primers were unable to amplify HPV DNA in any of the samples, while the GP5+/GP6+ primers detected HPV-positive samples in 3.12% (3/96 cases). Regarding EBV, none of the primers were able to detect the virus. Furthermore, sequencing of exon 2 of the KRAS gene revealed mutations in 58.33% of cases (21/36), with 12 different mutation types. Codons 31, 25, and 35 were the most commonly mutated, with mutation rates of 61.90%, 47.62%, and 23.81% respectively. It is necessary to establish policies aimed at preventing colorectal cancer, as well as public health programs that raise awareness about lifestyle-related risk factors. These measures could play a crucial role in the prevention and reduction of the development of these malignant tumors and their metastases.

Keywords: colorectal cancer, human papillomavirus, Epstein-Barr virus, KRAS gene.

Table des matières

Publications	1
Liste des abréviations.....	2
Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Introduction	7

Partie théorique

Chapitre 1 : le cancer colorectal

1. Epidémiologie de cancer colorectal.....	12
2. Anatomie	12
2.1.Anatomie de colon.....	12
2.2.Anatomie du rectum	13
3. Histologie	13
4. Développement de cancer colorectal	14
4.1.Aspect moléculaire de développement de cancer colorectal	14
4.1.1. Les mécanismes moléculaires de la carcinogénèse colorectale.....	14
4.1.1.1.Les altérations génétiques	14
a. L'instabilité génomique.....	14
b. Les mutations ponctuelles.....	15
4.1.1.2.Les voies de signalisation impliquée dans la progression tumorale....	16
4.1.2. Classification génétique de cancer colorectal.....	18
4.2.Aspect morphologique de développement de cancer colorectal.....	19
4.2.1. Les foyers de cryptes aberrantes.....	19
4.2.2. Les polypes	19
4.2.3. La dysplasie.....	20
4.2.4. L'adénocarcinome.....	20
4.2.5. La classification clinique	20
5. Les biomarqueurs utilisés en cancérologie colorectale.....	21
5.1.Les biomarqueurs de diagnostic-dépistage	22
5.2.Les biomarqueurs prédictifs	22
5.3.Les biomarqueurs pronostiques	23

6.	Facteurs de risque du CCR.....	23
6.1.	L'âge et sexe.....	23
6.2.	Facteur de risque lié à une maladie inflammatoire de colon.....	23
6.3.	Facteur de risque lié à un antécédent personnel ou familial d'adénome ou CCR.....	24
6.4.	Facteur de risque lié au mode de vie	24
6.5.	Maladies associées.....	24
6.6.	Facteur de risque lié à une infection microbienne.....	24

**CHAPITRE II : Les virus oncogènes et le développement de la carcinogénèse
colorectale**

1.	Virus d'Epstein-Barr (EBV).....	27
1.1.	Généralités.....	27
1.2.	Structure du virus et organisation génomique.....	28
1.3.	Le cycle biologique d'EBV	29
1.3.1.	Entrée des EBV dans la cellule hôte.....	29
1.3.2.	Le cycle lytique abortif pré-latent.....	30
1.3.3.	La phase de latence.....	30
1.3.4.	La phase lytique.....	32
1.4.	Pathologies associées au virus Epstein-Barr.....	32
2.	Papillomavirus humain.....	33
2.1.	Généralités	33
2.2.	Structure du virus et organisation génomique.....	34
2.3.	Cycle biologique de HPV.....	35
2.3.1.	Attachement et pénétration du virus.....	35
2.3.2.	Décapsidation et translocation.....	35
2.3.3.	Phases d'établissement et de maintien (Cycle non productif).....	35
2.3.4.	Phase de prolifération	36
2.3.5.	Phase d'amplification (Cycle productif).....	36
2.3.6.	Encapsidation et libération.....	36
2.3.7.	Intégration et carcinogénèse.....	36
2.4.	Pathologies associées à l'HPV.....	38
3.	EBV et HPV dans le développement de la carcinogénèse colorectale	38

3.1.EBV.....	38
3.2.HPV.....	39
4. La co-infection par HPV et EBV dans le développement de la carcinogénèse colorectale	40

Partie expérimentale

1. Etude de profil épidémiologique de cancer colorectal dans la région de Tlemcen entre 2012 et 2016.....	42
1.1.L'objectif.....	43
1.2.Méthodologie.....	43
1.3.Résultats	43
1.3.1. L'incidence du cancer colorectal.....	43
1.3.2. Répartition du cancer colorectal par sexe entre 2012 et 2016.....	44
1.3.3. Répartition du cancer colorectal par âge	45
1.3.4. Répartition du cancer colorectal selon sexe et l'âge.....	45
1.3.5. Répartition du cancer colorectal par année.....	46
1.3.6. Répartition du cancer colorectal selon la localisation	46
1.3.7. Répartition du cancer colorectal selon la morphologie.....	47
1.3.8. Répartition du cancer colorectal selon le stade de diagnostics	47
1.4.Discussion	47
2. La détection moléculaire du Papillomavirus humain et Epstein Barr virus au niveau du cancer colorectal.....	51
2.1.Objectif.....	52
2.2.Type de l'étude.....	52
2.3.Population d'étude	52
2.4.Type d'échantillons	52
2.5.Lieux d'étude.....	52
2.6.Matériel et méthodes	53
2.6.1. Préparation de tissus fixés au formol et inclus en paraffine.....	53
2.6.2. Extraction d'ADN.....	53
2.6.3. L'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)....	54
2.6.4. Electrophorèse	56
2.7.Résultats	55
2.7.1. Les caractéristiques clinico-histopathologiques.....	57
2.7.2. Résultats de la recherche d'ADN du HPV.....	57

2.7.3. Résultats de la recherche d'ADN d'EBV	58
2.8.Discussion	59
3. Profils des mutations du gène KRAS chez les patients atteints du cancer colorectal	63
3.1.Objectif.....	64
3.2.Sélection des cas	64
3.3.Lieu de l'étude.....	64
3.4.Matériel et méthodes	64
3.4.1. Amplification d'exon 2 du gène KRAS	64
3.4.2. Électrophorèse.....	65
3.4.3. Purification et séquençage	65
3.4.4. Analyse des données	66
3.5.Résultats	66
3.5.1. Les caractéristiques clinico-pathologiques des patients.....	66
3.5.2. Les caractéristiques de la mutation KRAS	67
3.5.3. Les caractéristiques clinico-pathologiques selon le statut mutationnel de KRAS	68
3.6.Discussion	68
Conclusion	71
Bibliographie	74
Annexe	104

Publications

Dahmani B, Boublenza L, Behar D, Belatbi B, Breik B, Benfoula A, et al. **The Frequency of Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer Samples in Algeria.** Research in Molecular Medicine. 2022; 10(1):1-8. <https://doi.org/10.32598/rmm.10.1.1236.1>

Dahmani B , Boublenza L , Chabni N , Behar D , Hassaine H , Masdoua N , Nahet A , Meguenni K, Zetla I .**Colorectal cancer in a region of western of Algeria: results of 581 cases in 5 years.** African health sciences. 2023; 23(2). DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v23i2.39>.

Behar D, Boublenza L, Chabni N, Hassaine H, **Dahmani B**, Masdoua N, Nahet A, Meguenni K. **Retrospective epidemiological study on stomach cancer in a region of western Algeria: about 394 cases between 2011 and 2015.** J Gastrointest Cancer. 2021 Jun;52(2):706-710. doi: 10.1007/s12029-020-00459-z. PMID: 32705578.

Behar D, Boublenza L, **Dahmani B**, Chabni N, kacem B, Breik I et al. **Investigation of the presence of Epstein-barr virus and human papillomavirus in gastric cancer in Algeria: molecular detection.** Current topics in virology. 2022; 19.

Liste des abréviations

μL : microlitre

μM : micromolaire

5-FU : 5-fluorouracile

AC : adénocarcinomes classiques

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

AJCC : *American Joint Committee on Cancer*

AKT : serine/threonine kinase

APC : *adenomatous polyposis coli*

ARMS; *amplification refractory mutation system*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNnc : Acide ribonucléique non codant

BART : *Bam HI-A region rightward transcrip*

BET : bromure d'éthidium

BL : lymphome de Burkitt

CAEBV : l'infection chronique active à EBV

CCR : cancer colorectal

CG : cancer gastrique

CHU : centre hospitalier universitaire

CIMP : *CpG island methylator phenotype*

CIN : *Chromosomal instability*

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CpG : Cytosine-phosphate-guanine

DL : *Duplicated Sequence Left*

dNTP : désoxynucléosides triphosphates

DPEP1 : dipeptidase 1

DR : *Duplicated Sequence Right*

E : *early region*

EBER : *Epstein-Barr encoded small RNA*

EBNA : *Epstein-Barr Nuclear antigen*

EBV: *Epstein Barr virus*

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

EPH : établissement public hospitalier

FAP : la polypose adénomateuse familiale

FFPE : *Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded*

GDP : guanosine diphosphate

GLOBACON : *Global Cancer Observatory*

GTP : guanosine triphosphate group

H&E : une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

HLA II: l'antigène des leucocytes humains antigène de classe II

HPV : papillomavirus humain

HPV-BR : Papillomavirus Humains à bas risque

HPV-HR : papillomavirus humain à haut risque

ICTV : le Comité international de la taxonomie des virus

IHC : l'immunohistochimie

IR: *Internal Repeats*

ISH : l'hybridation in situ

JC : le polyomavirus humain

KNG1 : kininogène-1

KRAS : *The Kristen Rat Sarcoma*

L : *late region*

LAMAABE : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement

LCL : lignées cellulaires lymphoblastoïdes

LCR : long control region

LHO : la leucoplasie buccale poilue

LMP : *Latent membrane protein*

LMP1 : la protéine membranaire latente 1

LNH : Lymphomes non hodgkiniens

MA : *membrane antigens*

MAC : adénocarcinomes mucineux

MAP : la polypose associée à MYH

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MI : la mononucléose infectieuse

MICI : Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MMR : réparation des mésappariements de l'ADN

MSI : L'instabilité des microsattellites

NF-κB : *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*

NGS : *next-generation sequencing*

OLFM4 : olfactoméline-4

OMS : l'organisation mondiale de la santé

ORF : *Open reading frame*

Ori-Lyt : origine de réplication lytique

OriP : Origine de réplication de l'ADN

P53 : *tumor protein p53*

pb : paires de bases

PCR : la réaction de polymérisation en chaîne

PI3K : phosphoinositide-3-kinase

PJS : le syndrome de Peutz-Jeghers

PPABIONUT : physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition

PTLD : lymphoprolifératives post-transplantation

SCNA : nombre de copies somatiques de l'ADN

Sec24C : la protéine de transport Sec24C

SIDA : syndrome de l'Immunodéficience acquise

SRCC : les carcinomes à cellules en anneau

TBE : le tampon Tris-Borate-EDTA

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

TGFBR2 : *transforming growth factor beta receptor 2*

TGFβ : Transforming Growth Factor β

TR : *Terminal Repeats region*

UL: *Unique Long region*

URR : région régulatrice en amont

US : *Unique Short region*

VCA : *viral capsid antigen*

Liste des figures

Figure 1: la transformation morphologique épithélium colique.

Figure 2 : Mécanismes possibles de la carcinogenèse colorectale induite par le virus

Figure 3 : Structure d'EBV en microscopie électronique

Figure 4 : Représentation schématique du génome d'EBV

Figure 5 : Structure du Papillomavirus humain

Figure 6 : La structure du papillomavirus humain (HPV)

Figure 7 : Déroulement d'une infection productive et non productive de HPV

Figure 8 : Répartition du cancer colorectal par sexe entre 2012 et 2016.

Figure 9 : Répartition du cancer colorectal par tranche d'âge.

Figure 10: Répartition du cancer colorectal selon sexe et l'âge.

Figure 11 : Répartition du cancer colorectal par année.

Figure 12 : Répartition du cancer colorectal selon la localisation.

Figure 13: Amplification du gène L1 d'HPV **(a)** Amplification d'HPV par MY09/ MY11 (450bp), M : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, de N 1 à N 5 : les échantillons. **(b)** Amplification d'HPV par GP5+/6+ (150bp), MT : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, de N 33 à N 60 : les échantillons, les cas HPV + : 34, 41 et 52.

Figure 14 : Amplification d'EBV **(a)** Amplification d'EBV par les amorces de LMP1, M : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, les échantillons : N93 a N 96. **(b)** Amplification d'EBV par EBNA-1 (262bp), M : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, les échantillons : N1 a N5.

Figure 15: Le schéma de séquençage du gène *KRAS* par séquençage Sanger : (a) la mutation C88C>G(pGlu30His) dans le cas n54 ; (b) la mutation C105T>G(pThr35Sér) dans le cas n 42.

Liste des tableaux

Tableau 1 : La stadification TNM dans le cancer colorectal

Tableau 2: Illustration des lésions cancéreuses suivant le stade

Tableau 3: taux d'incidence des 10 principaux cancers par sexe de 2012 à 2016.

Tableau 4: Répartition des cancers colorectaux selon la morphologie.

Tableau 5 : Répartition du cancer colorectal par stade de diagnostic.

Tableau 6 : Composition pour une réaction PCR avec les amorces MY09/MY11 et LMP1.

Tableau 7: Composition pour une réaction PCR avec les amorces GP5+/6+ et EBNA

Tableau 8 : Les caractéristiques clinico-histopathologique des patients.

Tableau 9 : Composition d'une réaction PCR avec les amorces du gène KRAS

Tableau 10 : La distribution des caractéristiques des tumeurs en fonction du statut KRAS

Tableau 11: La distribution des types de mutation KRAS

Introduction

Par sa fréquence et sa gravité, le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé publique, il est le troisième cancer le plus répandu dans le monde avec plus de 1,9 million de nouveaux cas de CCR et 930 000 décès qui ont été estimés en 2020. Selon Globacon, le fardeau du CCR devrait augmenter pour atteindre 3,2 millions de nouveaux cas et 1,6 million de décès d'ici 2040 (**Morgan et al., 2023**). En Algérie, il est le 1^{er} cancer le plus fréquent chez l'homme avec de 14,2 nouveaux cas pour 100 000 hommes, et le deuxième chez la femme après le cancer de sein avec 12,9 nouveaux cas/100 000 femmes (**GLOBOCAN, 2020**).

Le cancer colorectal est un cancer à développement lent qui commence par une tumeur sur la paroi interne du côlon ou du rectum (**Marley et Nan, 2016**). Cette transformation ne se produit que par l'accumulation de nombreuses anomalies génétiques, qui touchent potentiellement les gènes qui contrôlent le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration des cellules et tous les phénomènes de la cancérogenèse (**Bouguenouch et al., 2016**), dont l'une des plus courantes est la mutation du gène KRAS qui joue un rôle important dans l'initiation et la progression de la maladie et sont présents dans 40-50% des tumeurs colorectales (**Buyru et al., 2006**).

La majorité des CCR sont sporadique causés principalement par des mutations somatiques en réponse à des facteurs environnementaux, notamment les infections microbiennes (**Aran et al., 2016**). Plusieurs études ont lié le développement du CCR à des oncovirus (**Marongiu et Allgayer, 2022**) qui peuvent coopérer avec d'autres facteurs, tels que les défenses immunitaires de l'hôte, les conditions inflammatoires chroniques ou d'autres cancérigènes pour initier l'oncogenèse et/ou maintenir la tumorigénèse (**Bouvard et al., 2009**). Quatre virus sont actuellement reconnus comme étant prévalent dans le CCR, virus d'Epstein-Barr (EBV ou herpèsvirus humain de type 4), virus du papillome humain (HPV) ainsi que le cytomégalovirus (CMV ou herpèsvirus humain de type 5) et le virus John Cunningham (JCV) (**Marongiu et Allgayer, 2022**).

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est le premier oncovirus humain reconnu (**Bedri et al., 2018**), il est associé à plus de 200 000 cas de cancer par an, avec une prévalence qui a augmenté au cours des deux dernières décennies. De plus, il est responsable d'environ un dixième de tous les cas de cancer gastrique (**Khan et Hashim, 2014**). En ce qui concerne le cancer colorectal, plusieurs études ont établi un lien de causalité entre l'EBV et la carcinogenèse colorectale (**Fernandes et al., 2018**).

Quant à le HPV, il est l'agent étiologique central du cancer du col de l'utérus ainsi que des tumeurs malignes de la vulve, le vagin, l'anus et l'oropharynx (Lee *et al.*, 2013). La prévalence du HPV dans les tissus du CCR a été signalée avec une valeur moyenne de 41,7 % (Marongiu et Allgayer, 2022) qui varient d'une région à une autre, d'où l'intérêt à réaliser des études pour mieux comprendre la relation entre le HPV, le EBV et les différentes mutations somatiques qui contribuent à la formation ou à la progression du cancer colorectal.

Ce travail vise à étudier le profil épidémiologique rétrospectif du cancer colorectal dans la région de Tlemcen sur une période de cinq ans (2012-2016). De plus, il cherche à détecter la présence de l'ADN du Papillomavirus humain et du virus d'Epstein Barr au niveau des tissus paraffinés de patients atteints d'un cancer colorectal, au sein d'une population de l'ouest algérien. Par ailleurs, la fréquence des mutations d'exon 2 du gène KRAS chez des patients atteints du cancer colorectal a été recherchée avec l'étude de la corrélation entre ce type de mutation et la positivité de l'ADN viral, notamment en cas de fréquences élevées de HPV et EBV dans le cancer colorectal.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I :
Cancer colorectal

1. Épidémiologie du cancer colorectal (CCR)

Parmi tous les types de cancers, l'incidence et la mortalité du cancer colorectal (côlon + rectum) occupent le troisième rang après les cancers de la prostate, du poumon chez les hommes et après le cancer du sein, le cancer du poumon chez les femmes (**Siegel et al., 2023**). Selon GLOBACON, le CCR représente plus de 1,85 million de cas par an (9,8 % du total des cancers) et cause environ 850 000 décès par an (9,2 % du total des décès liés au cancer). (**Biller et Schrag, 2021**).

Un rapport récent a projeté environ 3,2 millions de cas de cancer colorectal en 2040, où la Chine et les États-Unis étant les principaux pays en termes de nombre d'incidences (**Chhikara et Parang, 2022**).

En Afrique, les taux normalisés selon l'âge des cas d'incidence et décès de CCR sont de 10,6 et 9,2 pour 100 000 chez les hommes respectivement, et 8,7 et 8 pour 100 000 chez les femmes respectivement (**Awedew et al., 2022**). L'Afrique australe a l'incidence la plus élevée, suivie de l'Afrique du Nord (**Hamdi et al., 2021**), où le taux d'incidence de CCR pour 100 000 habitants est de 10,4 chez les hommes et 9,1 chez les femmes (**The Global Cancer Observatory, 2021**).

En Algérie, le CCR est le 1er cancer le plus fréquent chez l'homme avec de 14,2 nouveaux cas pour 100 000 hommes, et le deuxième cancer le plus incident chez la femme après le cancer de sein avec 12,9 nouveaux cas/100 000 femmes (**GLOBOCAN, 2020**).

2. Anatomie

2.1. Anatomie de colon

Le côlon est un long organe tubulaire composé de muscles et de tissu conjonctif avec une couche muqueuse interne. La longueur totale est variable avec une longueur moyenne d'environ 150 cm. Le côlon est généralement situé à la périphérie de l'abdomen (**Steele et al., 2016**).

Il se divise en plusieurs segments

- **Le cæcum** : est un grand segment, d'un diamètre de 7,5 cm et d'une longueur de 10 cm, il contient trois Taenia coli longitudinaux (**Standring, 2019**).

- **Côlon ascendant** : côlon droit occupe la fosse iliaque, le flanc droit et l'hypocondre droit. Il remonte jusqu'au niveau du foie pour faire un angle appelé l'angle colique droit.
- **Le côlon transverse** : s'étend de l'angle colique droit à l'angle colique gauche (**Gallot, 2006**).
- **Le côlon descendant** : ou côlon gauche descend de l'angle colique gauche et se termine par le côlon sigmoïde (**Mahadevan et Vishy, 2017**).
- **Le côlon sigmoïde** : mesure généralement de 35 à 45 cm de long. Il est recouvert par un péritoine viscéral, ce qui le rend mobile (**Steele et al., 2016**).

2.2. Anatomie du rectum

Le rectum, segment terminal du tube digestif mesurant entre 12 et 15 cm de long, fait suite au côlon sigmoïde au niveau de la troisième vertèbre sacrée et se termine à la ligne ano-cutanée ou marge anale. Il comporte deux parties totalement différentes : le rectum pelvien ou ampoule rectale et le rectum périnéal ou canal anal (**de Calan et al., 2004**).

3. Histologie

La paroi colique et rectale est constituée de quatre couches :

- **La muqueuse** : qui est le revêtement interne du côlon et du rectum. Elle est constituée d'une couche mince de cellules épithéliales, une couche de tissu conjonctif appelée lamina propria et une couche mince de muscle (**Jass, 2000**).
- **La sous-muqueuse** : est une couche de tissu conjonctif qui entoure la muqueuse il contient des nerfs, des vaisseaux sanguins et des fibres élastiques avec du collagène (**Petras et Frankel, 2009**).
- **La musculuse** : est composée d'une couche circulaire interne et d'une couche externe longitudinale de muscle lisse qui se condense en trois Taeniae coli longitudinaux (**Mills, 2019**).
- **La sous-séreuse et la séreuse (côlon) ou mésorectum (rectum)** : est composée de tissu fibro-adipeux et est recouverte par la séreuse tapissée de cellules mésothéliales cuboïdes (**Gartner et Hiatt, 2014**).

4. Le développement de cancer colorectal

La plupart des tumeurs du côlon se développent via un processus en plusieurs étapes impliquant une série de changements histologiques, morphologiques et génétiques qui s'accumulent au fil du temps (Simon, 2016).

4.1.Aspect moléculaire du développement du cancer colorectal

4.1.1. Les mécanismes moléculaires de la carcinogénèse colorectale

Le CCR résulte de l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques conduisant à la transformation de l'épithélium colique normal en adénocarcinome du côlon. Ces mutations affectant les voies de signalisation qui régulent les comportements caractéristiques du cancer, et créent la croissance de plus en plus de cellules malignes qui se manifeste finalement comme un adénocarcinome invasif (Grady et Carethers, 2008).

4.1.1.1.Les altérations génétiques

a. L'instabilité génomique

La cancérogenèse est maintenant considérée comme un déséquilibre entre le développement de la mutation et les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire. Lorsque le cycle cellulaire n'est plus en mesure de contrôler le taux de mutations, on parle alors d'instabilité génomique. Trois voies distinctes ont été identifiées qui contribuent à ce déséquilibre :

- **Instabilité Chromosomique (CIN)**

Également appelée voie de suppression, est le type d'instabilité génomique le plus courant, englobant 50 à 85% des CCR (Sideris et Papagrigroriadis, 2014). La CIN comprend divers mécanismes : des réarrangements chromosomiques, des modifications de séquence, des modifications du nombre chromosomique et les défauts de ségrégation chromosomique (Kaemmerer *et al.*, 2013).

- **L'instabilité des microsatellites (MSI)**

Les microsatellites sont des séquences mono à tétra-nucléotidiques répétées du génome particulièrement sujet aux erreurs de réplication d'ADN, au cours de la division cellulaire. Les mutations dans les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) entraînent une incapacité à réparer les erreurs qui se produisent lors de la réplication de l'ADN dans des séquences répétitives, entraînant une accumulation de mutations de décalage de cadre dans les

gènes qui contiennent MSI (**Pritchard et Grady, 2011**). MSI est détectée dans 15% des CCR (**Kanthan et al., 2012**).

- **Instabilité épigénétique (CIMP)**

Dans la cancérogenèse, la méthylation des îlots CpG (Cytosine-phosphate-guanine) : conduit à un silence transcriptionnel des gènes impliqués dans la suppression des tumeurs, l'apoptose, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (**Goel et al., 2007**), aboutissant ainsi à des changements structuraux des histones ou de la chromatine et des altérations dans l'expression des ARN non codants (**Cheng et al., 2008**). Les gènes qui sont fréquemment affectés par cette modification épigénétique sont P16, MGMT et MLH1 (**Costedio et Church, 2011**). La positivité de CIMP est retrouvée dans 35 à 40% des CCR et a également été identifiée dans les adénomes (**Kanthan et al., 2012**).

b. Les mutations ponctuelles

Dans leurs travaux publiés en 2007, le groupe de Vogelstein a montré qu'une tumeur colique présentait environ 80 mutations différentes. Certains gènes mutés sont communément partagés par les tumeurs analysées (APC, KRAS, TP53, PIK3CA, FBXW7, ...) (**Vogelstein et al., 2013**).

- **APC (*adenomatous polyposis coli*)**

L'APC est un régulateur négatif clé de la voie de signalisation canonique Wnt (**Armaghany et al., 2012**). L'APC mutant stimule la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la croissance et l'invasion tumorale, y compris CCND1, C-MYC et CRD-BP (**Kwong et Dove, 2009**), il est signalé que dans 80 % des cas de CCR sporadiques, APC est inactivé par des mutations somatiques qui entraînent une perte d'expression d'une protéine ou l'expression d'une protéine tronquée (**Pino et Chung, 2010**).

- **TP53 (*tumor protein 53*)**

La dérégulation du gène suppresseur de tumeur TP53 est la deuxième étape génétique clé du CCR, qui coïncide avec la transition des gros adénomes à l'adénocarcinome. La mutation TP53 se produit dans 40% à 50% des CCR sporadiques (**Naccarati et al., 2012**). Les mutants TP53 peuvent acquérir de nouvelles fonctions oncogènes pour favoriser la transformation cellulaire, la progression tumorale, les métastases et la chimiorésistance (**Feng et al., 2018**).

- **KRAS (*Kirsten rat sarcoma*)**

L'oncogène RAS appartient à la famille des gènes ras (H-, K et N-RAS) (Sameer, 2013), il a un rôle bien établi dans la croissance et la régulation des cellules ; et son produit protéique affecte de nombreuses fonctions cellulaires, notamment la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration et la différenciation (Almoguera *et al.*, 1988).

A l'état normal, les protéines ras existent à l'état inactif dans une cellule donnée. La cascade des signaux intracellulaires facilite l'activation de ras en remplaçant le GDP inactif par GTP, si KRAS est muté, il reste à l'état GTP (Arrington *et al.*, 2012).

Les mutations activatrices du proto-oncogène KRAS sont impliquées dans 25 à 60% des CCR (Vogelstein *et al.*, 1988), il se trouvent principalement (90%) dans les codons 12 et 13, mais peuvent également affecter le codon 61 . Les mutations les plus fréquemment observées sont les substitutions de base unique G> A, G> T et G> C (Sameer, 2013) ce qui entraînent le remplacement de l'acide aminé glycine par un autre acide aminé (Arrington *et al.*, 2012). Au total, environ 85 mutations KRAS ont été identifiées (Sideris et Papagrigoriadis, 2014).

4.1.1.2. Les voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale

Cinq voies de signalisation sont très fréquemment impliquées dans la carcinogénèse colique, comme dans de nombreux autres cancers : Wnt/ β -caténine, EGFR/RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT, TGF β /SMAD, et TP53. Quel que soit le type d'instabilité génomique impliqué dans le CCR ces mêmes voies de signalisation sont habituellement touchées (Stefani *et al.*, 2021).

- **La voie de signalisation Wnt (*Wingless integration site*)**

La voie WNT est dans l'état actuel des connaissances, la voie de signalisation la plus importante dans le côlon. Elle est impliquée dans le développement de cet organe, son homéostasie mais aussi et surtout dans le développement des cancers du côlon (Zhao *et al.*, 2022), par la perturbation génétique de l'APC (Armaghany *et al.*, 2012).

- **La voie de signalisation MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)**

La fonction de la voie RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) est de transduire les signaux du milieu extracellulaire vers le noyau cellulaire où des gènes spécifiques est activé pour la croissance, la division et la différenciation cellulaires (Cary *et al.*, 1999). Ainsi, la signalisation via le MAPK régule une variété de fonctions cellulaires qui sont importantes

pour la tumorigenèse (Molina et Adjei, 2006). Dans le CCR, les mutations des gènes KRAS et NRAS sont retrouvées dans environ 40 à 50% des tumeurs CIN, le taux de mutation B-RAF est de 5 à 22% (Li et al., 2016).

- **La voie de signalisation TGF β (*transforming growth factor beta*)**

La voie de signalisation du TGF- β est impliquée dans le contrôle de plusieurs processus biologiques, notamment la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration, l'apoptose et l'adhésion (Jung et al., 2017).

Cette voie de signalisation est impliquée dans les cancers colorectaux par plusieurs mécanismes : le TGFBR2 (*transforming growth factor beta receptor 2*) est inactivé en cas de phénotype MSI dans 60 à 90% des cas (Markowitz et al., 1995), des mutations germinales sur SMAD4 ou BMPR1A prédisposent aux polyposes juvéniles, SMAD4 est également inactivé par perte d'hétérozygotie dans 20 à 30% des cas (Houlston et al., 2008).

- **La voie de signalisation p53**

Dans des conditions homéostatiques, la concentration de p53 est de faible niveau, cependant, le début du stress cellulaire qui suit l'apparition des dommages d'ADN propagent des signaux provenant des protéines spécialisées, qui modifient ensuite post-traductionnellement la p53 (Zilfou et Lowe, 2009).

La fonction de suppression de la tumeur du p53 dans le cancer colorectal peut toutefois être gravement compromise par des mutations géniques importantes, qui modifient sa conformation structurale, empêchent sa liaison à l'ADN de manière spécifique à la séquence critique et par conséquent, inactivent la voie de signalisation p53 (Toledo et Wahl, 2007).

- **La voie de signalisation PI3K (*Les phosphoinositide 3-kinases*)**

Les phosphoinositide 3-kinases sont une famille de lipides kinases qui propagent des cascades de signalisation intracellulaires régulant un large éventail de processus cellulaires (Wong et al., 2010).

Les mutations activatrices de la PI3K/AKT sont courantes dans les tumeurs colorectales et peuvent donc favoriser la croissance des tumeurs (Fujishita et al., 2008). C'est pourquoi, ces dernières années, des cibles médicamenteuses pour la PI3K ou l'AKT ont été largement développées et des essais cliniques ont été menés (Papadatos-Pastos et al., 2015).

4.1.2. Classification génétique de cancer colorectal

Après analyse de 18 ensembles de données d'expression génique différents du CCR, y compris des données de TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) en conjonction avec des données moléculaires sur les mutations et les SCNA (nombre de copies somatiques de l'ADN) pour un sous-ensemble des échantillons, un consortium international d'experts est parvenu à un accord qui décrit quatre sous-types moléculaires consensus (CMS) (**Müller et al., 2016**), CMS-1 (immunitaire MSI), CMS-2 (canonique), CMS-3 (métabolique) et CMS-4 (mésenchymateux) (**Khaliqet al., 2022**). Il faut noter que 13 % des CCR n'appartiennent à aucun de ces 4 groupes (**Philip, 2018**).

✓ Groupe CMS-1

Représente 14% des CCR et caractérisé par des tumeurs avec instabilité des microsatellites et souvent CIMP élevé avec des mutations fréquentes de BRAF et une localisation préférentielle de colon droit (**Philip, 2018**). Les patients atteints du sous-type CMS-1 ont un très faible taux de survie après rechute (**Müller et al., 2016**).

✓ Groupe CMS-2

CMS-2 reflète la voie canonique de la carcinogénèse telle que définie par la séquence adénome-carcinome. Il représente 37% des CCR localisés plutôt à gauche (**Stintzing et al., 2019**). Le CCR présente principalement des signatures épithéliales avec une activation de signalisation WNT et MYC et présente plus souvent une perte de gènes suppresseurs de tumeurs et des gains en nombre de copies d'oncogènes que les autres sous-types. Les patients CMS-2 ont un meilleur taux de survie après rechute par rapport aux autres sous-types (**Müller et al., 2016**).

✓ Groupe CMS-3

Représente 13 % des CCR, de type épithélial, sans instabilité des microsatellites (MSS) dans 90 % des cas et une dérégulation au niveau du métabolisme. Il est caractérisé par des mutations RAS fréquentes et des altérations ubiquitaires de la voie MAPK. Elles sont réparties de manière assez homogène entre le côlon gauche et le côlon droit [(**Philip, 2018**) ; (**Martini et al., 2020**)].

✓ **Groupe CMS-4**

Représente 23 % des CCR, il se caractérise par une activation importante du TGF- β , avec l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation associée au complément, le remodelage de la matrice, l'invasion stromale et l'angiogenèse (Müller *et al.*, 2016). Les patients avec le sous-type CMS-4 avaient une survie globale et une survie sans récurrence plus grave que les patients des autres groupes (Ibrahim *et al.*, 2012).

4.2. Aspect morphologique de développement de cancer colorectal

La carcinogenèse colique débute à partir d'une cellule épithéliale intestinale qui sous l'effet de différents événements, acquiert des atypies cyto-nucléaires (adénome dysplasique), puis échappe progressivement aux mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire et devient une cellule cancéreuse (figure 1) (Goldman et Masson, 2015).

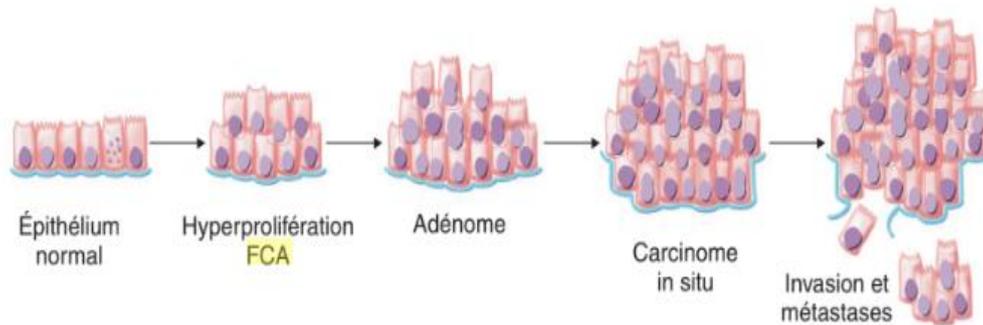


Figure 1: la transformation morphologique épithélium colique (Goldman et Masson, 2015)

Au plan morphologique les étapes de développement de cancer colorectal sont :

4.2.1. Les foyers de cryptes aberrantes (FCA)

Ces FCA existent sous la forme d'une hyperplasie c'est-à-dire des cryptes à lumière ronde ou ovale, associées à un élargissement de l'espace intercryptique, ils sont caractérisés par un aspect de pseudo-stratification des noyaux et une augmentation du nombre des mitoses (> 3 par crypte), (Heresbach et Le Berre, 2003). Dans les FCA le gène KRAS est très fréquemment muté alors qu'il n'y a qu'un faible taux de mutation du gène APC (environ 5 %) (Heinenet *et al.*, 1996).

4.2.2. Les polypes

Il existe deux principaux types de polypes à potentiel malin : les adénomes (les polypes adénomateux) qui sont des polypes sporadiques dysplasiques et représentent la lésion

précurseur la plus importante du CCR (*Giacosa et al., 2004*), ils sont caractérisés par l'implication de la voie de l'instabilité chromosomique dans 65% à 70% (*Klos et Dharmarajan, 2016*), et les polypes dentelés qui remplacent l'adénome traditionnel en tant que lésion précurseur du cancer colorectal dans environ 10 % de tous les CCR (*Makinen, 2007*).

4.2.3. La dysplasie

Dans les lésions dysplasiques, la perte de sensibilité à l'apoptose des cellules néoplasiques permet l'augmentation du nombre total de cellules ce qui entraîne la restructuration de l'épithélium et l'apparition de troubles architecturaux. Les anomalies sont d'intensité variable classées selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) en dysplasie de bas grade et de haut grade (*Yamane et al., 2014*).

4.2.4. L'adénocarcinome

La classification pathologique gastro-intestinale de OMS répertorie une quantité de sous-types histologiques de carcinomes colorectaux, tels que les adénocarcinomes classiques (AC), les adénocarcinomes mucineux (MAC), les carcinomes à cellules en anneau (SRCC) et d'autres variantes rares de carcinomes colorectaux y compris les carcinomes épidermoïdes, neuroendocriniens, adénosquameux, à cellules fusiformes et indifférenciés (*Nitsche et al., 2013*).

4.2.5. La classification clinique

Le système de stadification des métastases tumorales (TNM) de AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) est la norme pronostique la plus largement utilisée pour le CCR (*Greene, 2007*). La lettre T est l'initiale de tumeur et correspond à la taille de la tumeur; la lettre N est l'initiale de node qui signifie ganglion en anglais et indique si des ganglions lymphatiques ont été envahis ou non ; la lettre M est l'initiale de métastase et signale la présence ou l'absence de métastases (**tableau 1**). Elle est régulièrement mise à jour et la dernière édition (TNM 8ème édition) est applicable depuis 2017 (*Weiser, 2018*).

Tableau 1 : La stadification TNM dans le cancer colorectal (GowdraHalappa *et al.*, 2012).

T Tumeur primitive	
Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signes de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculéuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péricoliques et péri-rectaux non péritonéalisés
T4	T4a : Tumeur perforant le péritoine viscéral T4b : Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures
N Adénopathies régionales	
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1b	Métastase dans 2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
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
N2a	Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastase dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
M Métastases à distance	
M0	Pas de métastases à distance
M1a	Métastase localisée à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s), autre que régional)
M1b	Métastases dans plusieurs organes ou péritonéales

Cette classification permet de se rendre compte du stade d'un cancer (**tableau 2**) qui doit être précisé au moment du diagnostic pour le choix des traitements (GowdraHalappa *et al.*, 2012).

Tableau 2: Illustration des lésions cancéreuses suivant le stade (GowdraHalappa *et al.*, 2012).

STADE	TNM		
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	Quel que soit T	N1, N2	M0
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	
	T1, T2	N2b	
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	
	T4b	N1, N2	
Stade IVA	Quel que soit T	Quel que soit N	M1a
Stade IVB	Quel que soit T	Quel que soit N	M1b

5. Les biomarqueurs utilisés en oncologie colorectale

On définit sous le nom de biomarqueur du cancer, les marqueurs biologiques qui influencent sa prise en charge thérapeutique. Ceux-ci peuvent être sériques (ex : ACE, cellules tumorales circulantes, ADN circulant), tumoraux (ex : IMS, RAS, BRAF) ou constitutionnels (ex : DPD, UGT1A1, FcγRIIA) (Laurenty *et al.*, 2014).

5.1. Les biomarqueurs de diagnostic–dépistage

Un biomarqueur de diagnostic peut être défini comme une caractéristique biologique qui détecte ou suggère la présence d'une maladie ou d'un état d'intérêt ou identifie un individu avec un sous-type de la maladie (Califf, 2018).

De nombreuses approches protéomiques ont été utilisées dans la recherche de biomarqueurs de diagnostics potentiels telles que actin beta-like 2 (Ghazanfar *et al.*, 2017), a dipeptidase 1 (DPEP1) (Hao *et al.*, 2017), d'olfactoméline-4 (OLFM4), kininogène-1 (KNG1) et la protéine de transport Sec24C (Sec24C) (Quesada-Calvo *et al.*, 2017). Malgré l'expansion de la recherche en protéomique et le grand nombre des biomarqueurs de diagnostics, aucun d'entre eux n'a été traduit avec succès en pratique clinique (Alves Martins *et al.*, 2019).

5.2. Les biomarqueurs prédictifs

Les biomarqueurs prédictifs sont utilisés pour indiquer la réponse à un traitement spécifique et pour guider le processus de prise de décision (Alves Martins *et al.*, 2019).

Les mutations de KRAS sont associées à une mauvaise réponse au traitement des récepteurs anti-EGFR, y compris le cétuximab et le panitumumab. Il y a eu une augmentation de 16 % du taux de réponse global chez les patients KRAS de type sauvage avec folfiri et cetuximab, par rapport à une diminution de 4 % chez les mutants KRAS (Palomaki *et al.*, 2009). Le rôle prédictif de résistance aux anti-EGFR de mutations BRAF dans le traitement des CCR est largement suspecté par un rationnel préclinique fort et des analyses rétrospectives de séries cliniques non randomisées et non contrôlées (Lièvre *et al.*, 2010).

PTEN pourrait aussi représenter un marqueur prédictif utile pour les patients KRAS-WT (*KRAS wild type*) traités avec un traitement anti-EGFR (Scalise *et al.*, 2016).

5.3. Les biomarqueurs pronostiques

Les biomarqueurs pronostiques peuvent être utilisés pour prédire la progression de la maladie, y compris la récurrence précoce et la mortalité (**Patel et al., 2019**). Le principal biomarqueur pronostique utilisé en pratique clinique est l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), une glycoprotéine de haut poids moléculaire exprimée dans le tissu embryonnaire et les tumeurs malignes colorectales. Cet antigène a été découvert en 1965, mais il reste le biomarqueur sanguin le plus largement utilisé pour le CCR (**Alves Martins et al., 2019**).

Plus tard, d'autres paramètres ont été utilisés pour déterminer le pronostic, l'effet de l'instabilité des microsatellites et de la mutation BRAF sur la survie dans le carcinome colorectal a été élucidé et ces marqueurs génétiques ont déjà des applications cliniques (**Cohen et al., 2009**).

Les miARN recherchés dans le sang ou sur les tissus tumoraux seraient également des indicateurs pronostiques intéressants (**Perez-Carbonell et al., 2015**) tel que le miR-320e qui est associé à des résultats cliniques indésirables chez les patients atteints d'un CCR de stade III traités par une chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU (5-fluorouracile) (**Perez-Carbonell et al., 2015**).

6. Facteurs de risque du CCR

Environ 30 % des cas de CCR ont une prédisposition génétique, alors que 70 % des cas sont sporadiques (**Jaspersen et al., 2010**).

6.1. L'âge et sexe

Le taux d'incidence du CCR augmente rapidement avec l'âge : il double à chaque augmentation de l'âge de 5 ans jusqu'à l'âge de 50 ans, puis augmente de 30 % dans les groupes suivants âgés de 55 ans et plus (**Yang et al., 2020**). En ce qui concerne le sexe, les hommes présentent un risque 2,2 fois plus élevé que les femmes de développer un cancer colorectal à un âge précoce (**Yang et al., 2020**).

6.2. Facteur de risque lié à une maladie inflammatoire de colon

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent deux maladies : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont considérées comme facteur de risque du CCR [(**Crohn et Rosenberg, 1925**) ; (**Gyde et al., 1982**)].

6.3. Facteur de risque lié à un antécédent personnel ou familial d'adénome ou CCR

Comme c'est le cas pour de nombreux cancers, les personnes ayant des antécédents familiaux de CCR chez un parent au premier degré courent un risque environ deux fois plus élevé de contracter la maladie (**Kroser et al., 1997**). Les syndromes génétiques liés au CCR sont le syndrome de Lynch, la polypose adénomateuse familiale (FAP), la polypose associée à MYH (MAP), le syndrome de Peutz-Jeghers (PJS) et la polypose de l'adolescent et ils sont causés par des mutations génétiques spécifiques de la lignée germinale (**Monahan et al., 2020**).

6.4. Facteur de risque lié au mode de vie

La profession, le manque d'activité physique, le tabagisme et la consommation d'alcool ont tous été associés à un risque accru de cancer colorectal dans des études épidémiologiques (**Lin, 2009**). La consommation de viande rouge et de viande transformée ont également été associés à un risque accru de cancer colorectal (**Vieira et al., 2017**).

6.5. Maladies associées

D'une manière générale, les maladies chroniques courantes qui ont été identifiées comme des facteurs de risque de CCR sont le diabète sucré, l'hypertension et les maladies coronariennes (**Ali Khan et al., 2020**). Le Centre international de recherche sur le cancer a signalé que l'obésité peut aussi entraîner directement un risque accru de CCR (**Lauby-Secretan et al., 2016**).

6.6. Facteur de risque lié à une infection microbienne

Des études métagénomiques ont suggéré une relation causale entre la dysbiose microbienne et le CCR avec un risque 1,4 fois plus élevé de CCR chez les patients atteints de *Helicobacter pylori* (**Guo et Li., 2014**). De plus, les chercheurs ont trouvé une corrélation significative entre *Clostridium difficile*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* et le CCR [(**Allen-Vercoe et al., 2011**) ; (**Kho et al., 2018**) ; (**Long et al., 2019**)].

Un certain nombre d'études ont suggéré que des virus tels que le papillomavirus humain (HPV), le virus BK, le polyomavirus humain (JC) et le virus d'Epstein Barr (EBV) (**figure 2**) pouvaient être liés à l'issue du cancer colorectal (**Antonicet et al., 2013**). De plus, des études récentes sur le microbiome ont mis en évidence l'importance des bactériophages dans l'étiologie du CCR (**Massimino et al., 2020**).

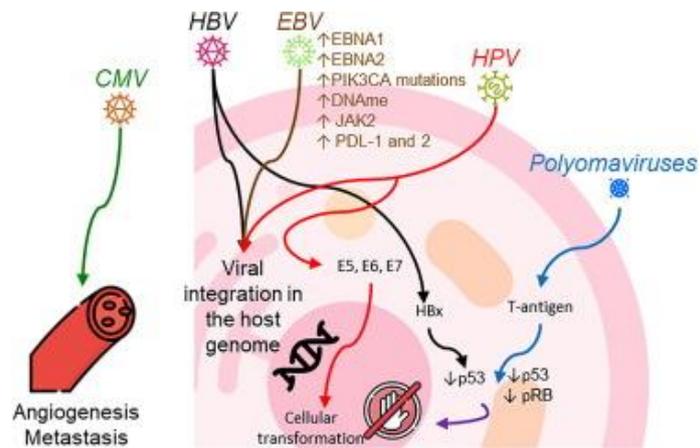


Figure 2 : Mécanismes possibles de la carcinogénèse colorectale induite par le virus
(Massimino *et al.*, 2020).

CHAPITRE II :
**Les virus oncogènes et le
développement de la
carcinogénèse colorectale**

1. Virus d'Epstein-Barr (EBV)

1.1. Généralités

En 1958, Denis Burkitt, un chirurgien britannique a décrit cliniquement une tumeur du maxillaire survenant chez des enfants africains appelée lymphome de Burkitt (BL, *Burkitt lymphoma*) (**Burkitt, 1958**) et en 1964, Epstein, Achong et Barr ont identifié par microscopie électronique des particules de type herpèsvirus dans les lignées cellulaires issues de lymphome de Burkitt (**Epstein and Barr, 1964**), auquel ils ont donné le nom de virus d'Epstein-Barr (EBV) (**Epstein et al., 1965**).

Il y a donc eu des spéculations immédiates selon lesquelles le virus pourrait être impliqué dans le développement du cancer. Par la suite, on s'est rendu compte que l'infection à EBV était endémique dans le monde entier (**Henle et al., 1969**).

L'EBV est un herpèsvirus humain, classé dans la sous-famille des gamma-herpèsvirus. Conformément à la nomenclature systématique adoptée pour tous les herpèsvirus humains, la désignation officielle de l'EBV est l'herpèsvirus humain 4 (HHV-4) (**McGeoch et al., 1995**).

Deux principaux types d'EBV ont été détectés chez l'homme : EBV-1 et EBV-2 (anciennement appelés types A et B). Ils diffèrent par la séquence des gènes qui codent pour les antigènes nucléaires de l'EBV (EBNA-2, EBNA-3A/3, EBNA-3B/4 et EBNA-3C/6) dans des cellules infectées de manière latente [(**Gerber et al., 1976**) ; (**Sample et al., 1990**)]. Au sein des deux types différentes souches virales ont été définies à cause d'une hétérogénéité significative des séquences d'ADN (polymorphismes) qui a été trouvée lors de la comparaison des régions sélectionnées du génome de l'EBV isolées dans certaines zones géographiques ou même dans la même zone (**Aitken et al., 1994**).

Chez les hôtes sains, les lymphocytes B et les cellules épithéliales sont les cibles cellulaires de la primo-infection à EBV. Cependant, l'EBV peut infecter un large éventail de lymphocytes non B tel que les lymphocytes T, les plasmocytes, les cellules NK, les monocytes, les cellules folliculaires dendritiques squameuses, les cellules épithéliales myoépithéliales et glandulaires et les cellules musculaires lisses [(**Audouin et al., 2010**) ; (**Hussein et al., 2013**)].

Près de 95% de la population mondiale d'adultes est infectée par le virus d'Epstein Barr (**Parkin, 2006**). Une petite fraction des personnes infectées par l'EBV développe des tumeurs

malignes (**Henry et al., 2001**), dont environ 140 000 personnes meurent chaque année de cancers associés à l'EBV (**Khan et Hashim, 2014**).

La transmission du virus Epstein Barr se produit généralement avec les sécrétions oropharyngées qui contiennent les particules virales infectieuses ou le partage de nourriture (**Dunmire et al., 2018**). La transmission s'est produite aussi par la transplantation de cellules souches et d'organes, ainsi que par la transfusion sanguine [(**Odumade et al., 2011**) ; (**Dunmire et al., 2018**)].

1.2. Structure du virus et organisation génomique

Le virion de l'EBV présente une structure commune à tous les herpèsvirus. Il est sphérique, mesure entre 120 et 200 nm de diamètre et comprend quatre composants majeurs de la périphérie vers le centre (**figure 3**) (**Rickinson et Kieffe, 2001**).

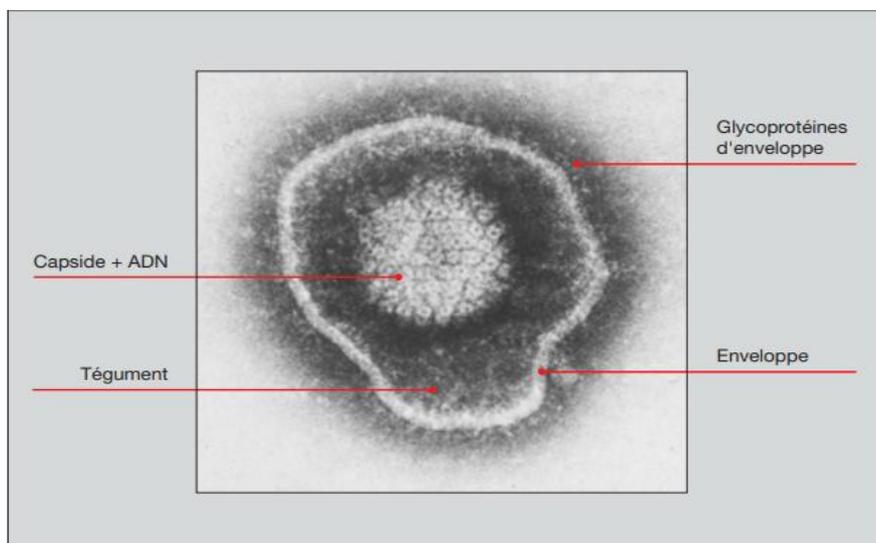


Figure 3 : Structure d'EBV en microscopie électronique (**Rickinson et Kieffe, 2001**).

Une enveloppe lipidique dérivée des membranes cellulaires de la cellule hôte (**Young and Rickinson, 2004**). Un tégument protéique qui sépare l'enveloppe lipidique de la nucléocapside (**Tomaszewski, 2008**), cette dernière de forme icosaédrique entoure le core qui contient le génome viral sous forme d'ADN enroulé autour d'une structure protéique (**Epstein et al., 1965**).

Le génome EBV a été complètement séquencé en 1984 et consiste en ADN linéaire, double brin, d'environ 172 kb qui code pour plus de 85 gènes (**Santpere et al., 2014**) et environ 46 petits ARN non traduits (**Rickinson et Kieff, 2001**).

Les virus oncogènes et le développement de la carcinogénèse colorectale

Le génome viral (**figure 4**) est divisé en plusieurs domaines uniques (U1 à U5), séparés par des séquences internes (IR ; *Internal Repeats*) (IR1-IR4) répétées en tandem de 0,5 kb, la séquence IR1 de 3000 pb divise le génome en un domaine unique long (UL ; *Unique Long*) et un domaine unique court (US ; *Unique Short*). Chaque extrémité comporte des répétitions terminales (TR ; *Terminal Repeats*) de 538 pb, qui permettent la circularisation du génome (**Baer et al., 1984**).

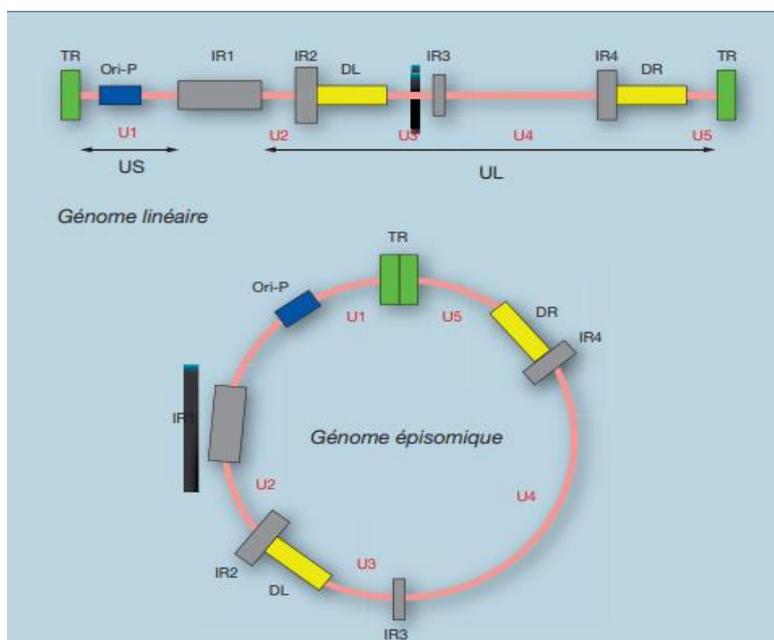


Figure 4 : Représentation schématique du génome d'EBV (**Rickinson et Kieffe, 2001**).

OriP est l'origine de la réplication de l'ADN EBV utilisée pendant la latence, les deux autres origines de réplication hautement homologues, oriLyt Left et oriLyt Right, sont actifs pendant l'infection productive (lytique), ces derniers sont logés dans des domaines de séquence dupliquée DS L et DS R (**Yetming et al., 2020**).

1.3. Le cycle biologique d'EBV

L'essentiel des connaissances acquises sur le cycle biologique du virus Epstein-Barr provient d'expériences conduites sur des lignées cellulaires transformées par ce virus (**Maréchal et Piolot, 2001**).

1.3.1. Entrée des EBV dans la cellule hôte

L'attachement initial de l'EBV sur la membrane plasmique cellulaire des lymphocytes B est principalement régulé par l'association entre sa protéine d'enveloppe (gp350/220) et le récepteur 2 du complément cellulaire (CR2/CD21), ainsi que par la glycoprotéine virale gp42 et le récepteur de l'antigène des leucocytes humains antigène de classe II (HLA classe II)

[(Chang *et al.*, 1999) ; (Mohammed *et al.*, 2021)]. Pour les cellules épithéliales, comme il n'y a pas de molécules CD21 ou HLA de classe II à leur surface, la protéine virale BMRF2 peut médier l'interaction avec les intégrines $\beta 1$ cellulaires (Chang *et al.*, 1999).

Les nucléocapsides du virion sont libérées dans le cytoplasme et transportées vers les pores nucléaires des microtubes. En conséquence, le génome linéaire viral est transféré dans le noyau de la cellule et retenu sous forme d'épisome extrachromosomique (Chesnokova et Hutt-Fletcher, 2014).

1.3.2. Le cycle lytique abortif pré-latent

Peu de temps après la primo-infection, l'EBV entre dans un état lytique transitoire appelé cycle lytique abortif pré-latent. Dans ce cycle, des gènes latents et certains gènes lytiques sont exprimés (Yoshida *et al.*, 2017), l'expression précoce de ces gènes lytiques est essentielle pour la contribution à la survie initiale et à l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules B au repos pour favoriser leur prolifération et maintenir une infection latente (Inagaki *et al.*, 2021).

1.3.3. La phase de latence

Le virus établit une latence principalement dans les cellules B sous forme de multiples épisomes circulaires. De temps en temps, l'EBV latent est réactivé, exécute son cycle lytique et produit des virus descendants, qui sont excrétés dans la salive [(Cohen, 2000) ; (Kenney, 2007)].

Au cours de la division cellulaire, afin de maintenir cet épisome comme des plasmides, deux composants sont nécessaires : un segment d'ADN agissant en cis (oriP) et une protéine nucléaire agissant en trans (Wensing et Farrell, 2000). En latence, seuls quelques gènes viraux sont exprimés, dont les six protéines nucléaires : EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, en plus de trois protéines membranaires latentes : LMP-1, LMP-2A, LMP-2B et Les ARN viraux EBER et BART (Groganet *et al.*, 1987).

- **Les programmes de latence**

La forme latente de l'infection à EBV est classée en cinq modèles, latence 0 à III, en fonction de l'expression du gène latent viral (Thorley-Lawson *et al.*, 2013). Il est possible d'associer chaque type de latence à des pathologies précises (Thorley-Lawson *et al.*, 2013).

➤ **La latence de type III :**

Également appelée « programme de croissance », exprime tous les antigènes latents et se retrouve généralement dans les maladies lymphoprolifératives post-transplantation (PTLD) associées à l'EBV, les lymphomes associés au SIDA et les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) (**Kang et Kieff, 2015**). Les cellules de latence III sont caractérisées par une activité élevée de la voie NFκB (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) de l'hôte, qui est principalement transmise par la protéine virale LMP1 (**Mosialos et al., 1995**).

➤ **La latence de type IIa :**

Cette forme de latence se caractérise par l'absence d'expression d'EBNA à partir de Cp ou Wp, l'expression conservée de LMP1 et LMP2A, l'expression d'EBNA1 à partir d'un promoteur unique (Qp) et l'expression d'ARN EBER et de miARN BART (**Kis et al., 2010**), ce type de latence est associée au lymphome de Hodgkin (HL) et au carcinome du nasopharynx (NPC) (**Bajaj et al., 2007**).

➤ **La latence de type IIb :**

Elle a été nommée latence IIb par Eva Klein car le phénotype d'expression du gène EBNA2+/LMP1- est directement opposé au phénotype EBNA2-/LMP1+ observé dans la latence IIa (**Klein et al., 2013**). Un sous-ensemble de tumeurs malignes associées à l'EBV, y compris les lymphomes associés au VIH et les lymphomes post-transplantation, présente une expression hétérogène de latence IIb en plus de la latence III (**Saha et al., 2009**).

➤ **La latence de type I :**

Elle exprime principalement EBNA1 et les EBERs, le promoteur Qp est à l'origine du profil d'expression des protéines de ce type de latence, il est associé au lymphome de Burkitt (BL) et au carcinome gastrique (GC) (**Grywalska et Rolinski, 2015**).

➤ **La latence de type 0 :**

Encore appelée latence vraie, lors de laquelle aucune protéine de latence n'est exprimée à l'exception des EBERs (**Grywalska et Rolinski, 2015**). L'EBV peut échapper à la réponse immunitaire anti-EBV, les ARNs de LMP2A étant peu immunogènes et non détectables par le système immunitaire de l'hôte (**Robertson, 2010**). Ce type de latence n'est pas associé à des tumeurs malignes, probablement en raison de la dormance pendant ce programme (**Kenney, 2007**).

1.3.4. La phase lytique

Le cycle de multiplication de l'EBV dans la cellule (encore appelé cycle lytique ou infection productive) correspond à la phase du cycle biologique au cours de laquelle les particules infectieuses sont produites (**Henle et Henle, 2007**).

La cascade d'événements dans la phase lytique du cycle de vie de l'EBV est divisée en trois phases d'expression génique régulée : immédiate-précoce, précoce et tardive (**Biggin et al., 1987**), dont plus de 80 gènes sont exprimés durant les trois phases (**Packham et al., 1990**).

Le passage de l'état latent à l'état lytique est déclenché par l'expression de deux facteurs de transcription codés par le virus, Zta et Rta (les produits géniques exprimés respectivement par BZLF1 et BRLF1) (**Chiu et al., 2016**), ce qui conduit à l'activation de l'expression des gènes précoces. Les produits de ces derniers, comme l'ADN polymérase virale et les autres enzymes responsables de la synthèse de l'ADN, répliquent l'ADN par l'intermédiaire d'une origine de réplication lytique (ou Ori-Lyt) (**Biggin et al., 1987**).

Les gènes lytiques tardifs codent pour des protéines structurales virales, notamment des protéines tégmentaires, des glycoprotéines et des protéines de la capside, principalement les BcLF 1 sont exprimés (**Murata et Tsurumi, 2014**). Après la réplication du génome viral, les antigènes tardifs MA (*membrane antigens*), VCA (*viral capsid antigen*) et BCRF1 sont exprimés (**Murata et Tsurumi, 2014**).

L'ADN viral nouvellement synthétisé est rassemblé dans les nucléocapsides au niveau du noyau de la cellule, qui traverse la membrane nucléaire pour se rendre dans le cytoplasme, créant des vésicules portant des virions avec une enveloppe. Les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule et les particules virales sortent par exocytose avec une lyse cellulaire (**Murata et Tsurumi, 2014**).

Il existe de plus en plus de preuves que la phase lytique de l'EBV contribue à la tumorigénèse principalement de deux manières, par la production de particules infectieuses pour infecter plus de cellules, et la régulation des voies oncogènes cellulaires, médiée par les protéines lytiques et les miARN (**Rosemarie et Sugden, 2020**).

1.4. Pathologies associées au virus Epstein-Barr

L'EBV est la principale cause de la mononucléose infectieuse (MI) qui est également connu sous le nom de « fièvre glandulaire » ou « la maladie du baiser » (**Macsween et Crawford, 2003**). Il est également connu depuis longtemps pour être impliqué dans d'autres

pathologies bénignes autre que la MI tels que la leucoplasie buccale poilue (LHO), l'infection chronique active à EBV (CAEBV) [(**Komatsu et al., 2005**) ; (**Kim et al., 2019**)], le syndrome lympho-prolifératif associé au chromosome X (Syndrome de Duncan) et au syndrome lympho-pro-lifératif post- transplantation d'organe (**Marsh et Filipovich, 2011**).

Cependant, chez certaines personnes, le virus latent est capable de provoquer des tumeurs malignes, telles que Le lymphome de Burkitt , Lymphome de Hodgkin, Lymphomes non hodgkiniens (LNH), Carcinome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD) , le carcinome du nasopharynx et le cancer gastrique [(**Raghupathy et al., 2014**) ;(**Zheng et al., 2022**)], de plus, plusieurs études ont établi un lien de causalité entre l'EBV et la carcinogénèse colorectale (**Bedri et al., 2019**).

2. Papillomavirus humain

2.1.Généralités :

Le papillomavirus humain impose un énorme fardeau sur le système de santé mondial. Chaque année, 630 000 cas de cancers (4,5 % de tous les cas de cancers) peuvent être attribués au HPV, dont 83 % sont des cancers du col de l'utérus (**Serrano et al., 2018**).

Les expériences sur le papillomavirus ont commencé au 19^{ème} siècle. Dans les années 1980 (**Guilfoile, 2019**), un virologue allemand, Harald zur Hausen, a établi un lien de ce virus avec le cancer du col de l'utérus, qui a ensuite reçu un prix Nobel pour ses découvertes scientifiques (**Leto et al., 2011**).

Les Papillomavirus ont été initialement classé dans la famille des Papovaviridae, ils ont ensuite été classés dans la famille des Papillomaviridae depuis 2003 (**de Villiers et al., 2004**). La nomenclature des Papillomavirus est établie par le Comité international de la taxonomie des virus (ICTV) (**de Villiers et al., 2004**). Ils sont classés selon des niveaux taxonomiques comprenant le genre (<60 % d'identité), l'espèce (60-70 % d'identité) et un type distinct est établi lorsque la séquence nucléotidique du gène L1 d'un virus cloné diffère de celle de tout autre type caractérisé d'au moins 10 % (**Bernard et al., 2010**). Ils peuvent être classés aussi en fonction de leur tropisme tissulaire et on distingue des types d'HPV à tropisme cutané et des types à tropisme muqueux (**Monsonogo, 2007**). Ils se caractérisent également par leur pouvoir oncogène, douze HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 et 59) sont définis par OMS comme étant des types cancérigènes à haut risque avec d'autres types (68,73) étant reconnus comme "probablement " cancérigènes et on distingue des HPV non cancérologènes dits à bas risque (**Schiffman et al., 2009**).

Jusqu'à présent 229 génotypes différents de HPV ont été identifiés [www.hpvcenter.se , consulté le 15/01/2023], classés en cinq genres : α , β , γ , ν et μ , sur la base de différences dans leurs cycles de vie, leurs séquences d'ADN et également dans leur association à la maladie (Egawa *et al.*, 2015).

2.2. Structure du virus et organisation génomique

Les papillomavirus sont des petits virus à ADN, icosaoédrique, non enveloppés qui ont un diamètre de 52 à 55 nm (**figure 5**) (Kirnbauer *et al.*, 1992).

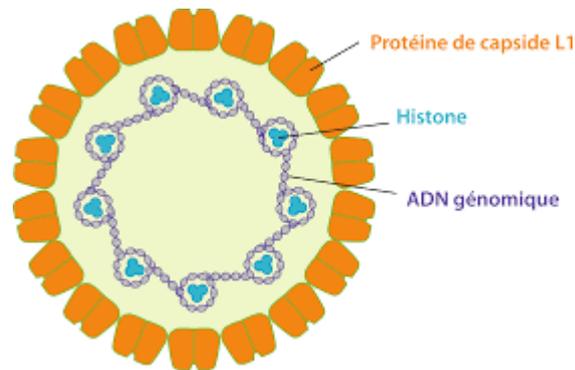


Figure 5 : Structure du Papillomavirus humain (Lefevre et Apaire-Marchais, 2019).

Tous les HPV possèdent un génome d'ADN épisomique d'environ 8 kb. Le génome peut être divisé en trois sections fonctionnelles (**figure 6**), la région précoce (E : *early*) codant pour au moins sept protéines virales qui ont des fonctions régulatrices dans la cellule épithéliale infectée (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8), la région tardive (L : *late*) qui code pour les deux protéines structurales virales L1 et L2 et la LCR (*long control region*) autrement appelée région régulatrice en amont (URR) qui contrôlent la répllication et la transcription virales (Fehrmann et Laimins, 2003). Le génome est lié à des histones cellulaires et contenue dans une capsid e d'une symétrie icosaoédrique composée de 360 copies de la protéine L1 organisée en 72 capsomères pentamériques qui ont une copie de L2 au centre (Kirnbauer *et al.*, 1992).

2.3.4. Phase de prolifération

Les génomes de HPV dans les cellules basales infectées se répliquent en synchronisation avec la réplication de l'ADN chromosomique en phase S, et les génomes nouvellement répliqués sont distribués de manière égale aux deux cellules filles (**Moody et Laimins, 2010**). Une cellule fille reste dans la couche basale pour continuer à proliférer, tandis que les autres cellules filles migrent vers les couches suprabasales et subissent une différenciation où il y a un rôle important des protéines virales E6 et E7 (**Doorbar et al., 2012**).

2.3.5. Phase d'amplification (Cycle productif)

Au fur et à mesure que les cellules HPV-positives subissent une différenciation, la réplication du génome viral passe à un mode productif concomitant à des niveaux accrus d'expression de E1 et E2, entraînant la synthèse de milliers de copies du génome (**McKinney et al., 2015**). Dans la couche différenciée terminale de l'épithélium, les protéines de capsid L1 et L2 sont exprimées sous le contrôle du promoteur tardif (**McKinney et al., 2015**).

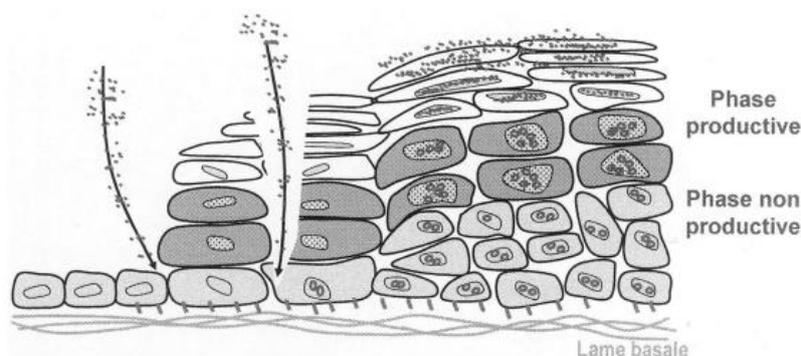


Figure 7 : Déroulement d'une infection productive et non productive de HPV (**Doorbar, 2005**).

2.3.6. Encapsidation et libération

Après l'amplification du génome viral, l'encapsidation a lieu et les nouvelles particules virales infectieuses sont libérées dans le milieu extérieur au rythme des desquamations cellulaires. La muqueuse devient très infectante et le risque de transmission à un partenaire est important (**Ozbun et Meyers, 1997**).

2.3.7. Intégration et carcinogénèse

Dans les lésions précancéreuses hébergeant HPV-HR, les génomes sont présents sous forme d'épisomes extra-chromosomiques. En revanche, dans les carcinomes épidermoïdes

Les virus oncogènes et le développement de la carcinogénèse colorectale

cervicaux, l'ADN HPV-HR est fréquemment retrouvé intégré dans le génome humain (**Moody et Laimins, 2010**). L'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire se fait généralement au hasard, en privilégiant toutefois les sites fragiles. Il a été décrit des intégrations à proximité de proto-oncogènes (TP63, NR4A2, APM-1, TNFAIP2 et hTERT), le site le plus fréquent étant la bande chromosomique 8q24 dans laquelle se localise c-myc (**Couturier et al., 1991**).

Après l'intégration, l'ADN viral est fréquemment clivé au niveau des POL (POL ou ORF : *Open Reading Frame*) E1 et E2. La rupture de POL E2 entraîne une perte d'expression de la protéine E2 qui n'exerce plus son effet trans inhibiteur sur les promoteurs précoces. Ceci conduit à une surexpression des protéines E6 et E7 (**Romanczuk et Howley, 1992**).

Par conséquent, la combinaison de l'expression du E6 et E7 perturbe les fonctions physiologiques normales des protéines suppressives de tumeurs, favorisant ainsi le développement du cancer (**Longworth et al., 2005**).

Les protéines E6 sont surtout connues pour leur capacité à s'associer avec le suppresseur de tumeurs cellulaire p53 (**Werness et al., 1990**). L'association de E6 avec p53 entraîne sa dégradation via le recrutement d'une ubiquitine ligase, E6-AP (**Werness et al., 1990**), et entraîne l'inhibition des activités de régulation transcriptionnelle de la protéine p53 (**Mietz et al., 1992**). E6 se lie à des nombreuses autres protéines cellulaires tels que de facteurs de transcriptionnels, les facteurs qui déterminent l'adhésion, le cytosquelette et la polarité, les facteurs d'apoptose, les facteurs de réplication et des facteurs de réparation de l'ADN (**IARC, 2007**).

Le principal partenaire cellulaire de E7 est la protéine suppresseur de tumeur p105Rb. L'association de E7 avec p105Rb provoque sa dégradation et entraîne la perte du contrôle de p105Rb sur les facteurs de transcription E2F (**Chellappan et al., 1992**). Un autre aspect important de la biologie d'E7 indépendant de la liaison avec p105Rb est la capacité de déstabiliser les centrosomes, ce qui entraîne des défauts mitotiques et une instabilité du génome (**Duensing et al., 2001**). En plus de se lier à p105Rb, E7 peut se lier à p107 et p130 et amener à immortalisation des cellules (**Zerfass-Thome et al., 1996**).

E5 est considéré comme tumorigène car il renforce le potentiel d'immortalisation de E6 et E7 et en coopération avec ce dernier, il stimule la prolifération de l'ADN de cellules primaires humaines (**IARC, 2007**).

2.4. Pathologies associées à l'HPV

Le HPV est responsable de plusieurs maladies bénignes, par exemple les verrues cutanées et l'pidermodysplasie verruciforme qui peut subir une transformation maligne (Sterling *et al.*, 2001). Il peut induire aussi des infections des muqueuses associées aux types α -HPV, c'est le cas des condylomes (Cubie, 2013) en plus, les HPV à bas risque peuvent induire des verrues urétrales, la papulose bowénoïde et condylome acuminé géant ainsi qu'une papillomatose laryngée (Clifford *et al.*, 2005).

Le HPV a également un rôle bien connu dans les lésions cancéreuses du col de l'utérus, de la vulve et du vagin, et le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a soutenu la cancérogénicité du HPV dans le pénis, anus et le carcinome de la tête et du cou (HNSCC) [(Zhang *et al.*, 2018) ; (Szymonowicz et Chen, 2020)], de plus, La détection de l'ADN du HPV dans les tissus du cancer colorectal a suggéré que l'infection par le HPV pourrait être associée à la carcinogénèse du cancer colorectal (Bodaghi *et al.*, 2005).

3. EBV et HPV dans le développement de la carcinogénèse colorectale

3.1. EBV

La structure similaire, histologique et embryogénèse commune de l'estomac et d'autres organes du tube digestif suggèrent un rôle possible de l'EBV dans le développement de tumeurs épithéliales, y compris le CCR (Oleynikova *et al.*, 2021), ainsi, un taux de positivité pour l'EBV dans le CCR varie dans une large gamme allant de 0 % jusqu'à 46 % (Bedri *et al.*, 2019).

En particulier dans le CCR, il a été rapporté que des lymphocytes B peuvent transmettre les molécules dérivées de l'EBV aux cellules épithéliales via des microvésicules telles que LMP1, l'un des principaux oncogènes liés à l'EBV, ou des ARN non codants (ncRNAs ; EBERs), par conséquent ces vésicules peuvent déclencher des changements oncogènes dans les cellules épithéliales colorectales, d'autant plus que des lymphocytes B infectés au repos dans l'intestin ont été signalés et peuvent être réactivés dans certains cas pour produire le virus, ou produits viraux, capables de contribuer au phénotype malin lors d'une réactivation de la croissance cellulaire (Oleynikova *et al.*, 2021).

Dans les kératinocytes, il a été montré que l'EBV induit des altérations moléculaires des cellules (Cadigan et Waterman, 2012). LMP1 est connu pour activer STAT3 avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), inhiber l'activité de p53 et réguler positivement la β -caténine en réduisant sa dégradation protéasomique (Chatterjee *et al.*,

Les virus oncogènes et le développement de la carcinogénèse colorectale

2019). Il est intéressant de noter qu'il a été rapporté que toutes ces molécules jouent un rôle déterminant dans la progression du CCR (Marongiu et Allgayer, 2022). De plus, l'EBV pourrait moduler les voies de signalisation telle que Wnt et NF- κ B, d'un autre côté ces voies moléculaires sont essentielles dans la carcinogénèse et la progression du CCR (Marongiu et Allgayer, 2022).

De tels exemples invitent à se demander si des mécanismes similaires d'interaction entre les cellules colorectales (cancéreuses), les cellules immunitaires et les cellules du microenvironnement pourraient également être actifs et contribuer à la carcinogénèse ou à la progression du CCR (Marongiu et Allgayer, 2022).

3.2.HPV

Le HPV peut infecter la région colorectale via une infection ascendante à partir de sites anogénitaux ou par propagation hématogène ou lymphatique. Le HPV a été suggéré comme un facteur de risque potentiel pour le développement des CCR (Deniz *et al.*, 2022). Les taux de prévalence de HPV dans le CCR varient selon les données disponibles, allant de 0% à 85% (Fernandes *et al.*, 2020).

Bien que les mutations de p53 soient un point de repère du CCR, les tissus du CCR infectés par le HPV présentent souvent un gène Tp53 intact. Pourtant, la fonctionnalité de p53 dans les cellules CCR est perturbée, ce qui suggère que le HPV inactive p53, favorisant ainsi le cancer (Marongiu et Allgayer, 2022).

De plus, le E7 peut se lier aux cyclines A, D et E en l'absence de pRb, et inhibe la déphosphorylation de la protéine kinase B, qui est réalisée par la protéine phosphatase 2A (PP2A), ainsi l'activation de la voie de signalisation PI3K qui est l'un des axes de signalisation importants dans le CCR (Brazil et Hemmings, 2001).

L'expression ectopique de E6 et E7 est associée à une diminution d'expression des protéines Siah-1, E3-ubiquitine ligases qui interagissent avec le complexe de destruction qui dégrade la β -caténine une des molécules clef de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. L'expression de E6 peut aussi stabiliser la β -caténine et améliorer l'expression de la boîte à fourche M1 (FOX1), augmentant le taux de translocation nucléaire pour la β -caténine (Rampiaset *al.*, 2010). E7 se lie également aux histones désacétylases et au suppresseur E2F p21, prolongeant globalement la phase S. Les conséquences de cette action peuvent être multiples : par exemple, E7 induit une instabilité chromosomique qui est souvent détectée dans le CCR (Bodily et Laimins, 2011).

Les virus oncogènes et le développement de la carcinogénèse colorectale

Ces dernières années, il est devenu en outre évident que l'HPV peut transcrire des ARNnc. Cependant, bien que l'implication de ARNnc codé par l'HPV dans la promotion de plusieurs types de carcinomes épidermoïdes (cervical, tête et cou et oropharyngé) ait été établie, l'ARNnc viral dans la genèse du CCR est encore mal compris [(Casarotto *et al.*, 2020) ; (Yu *et al.*, 2022)].

Ces cibles moléculaires de HPV sont évidemment des acteurs essentiels dans la carcinogénèse, la progression et/ou la métastase du CCR, et pourraient être, en théorie, des médiateurs idéaux de la carcinogénèse et/ou de la progression favorisée par l'HPV dans ce contexte (Casarotto *et al.*, 2020).

3.3.La co-infection par HPV et EBV dans le développement de la carcinogénèse colorectale

Des investigations récentes, ont souligné que les oncovirus (HPV-HR et EBV) peuvent être coprésents dans plusieurs types de cancers humains, dont les CCR, où ils peuvent coopérer à l'initiation et à la progression de ces cancers via la diaphonie de leurs oncoprotéines (Al Moustafa *et al.*, 2016).

Récemment, la coprésence de HPV et d'EBV a été signalée dans 16 % des échantillons de CCR de Bosnie-Herzégovine (Gupta *et al.*, 2020). De plus, des études supplémentaires sont essentielles pour élucider les mécanismes sous-jacents du rôle coopératif des HPV-HR et de l'EBV dans l'initiation et/ou la progression du CCR.

PARTIE
EXPERIMENTALE

1. Etude de profil épidémiologique de cancer colorectal dans la région de Tlemcen entre 2012 et 2016

1.1.L'objectif

L'objectif de ce travail consiste à évaluer le profil épidémiologique des cancers colorectaux, histologiquement prouvés pendant une période de cinq ans (2012-2016) dans la région de Tlemcen.

1.2.Méthodologie

Il s'agit d'une étude rétrospective de 581 cas de cancer colorectal recueillis au service d'épidémiologie et de médecine préventive du centre hospitalier universitaire (CHU) de Tlemcen entre janvier 2012 et décembre 2016. Les variables démographiques étudiées sont l'âge au moment du diagnostic et le sexe. Les caractéristiques cliniques incluses sont la présentation clinique, le site de la tumeur, le stade et le type de la tumeur.

✓ Critères d'inclusion et d'exclusion

Seuls les cancers du côlon et du rectum confirmés histologiquement ont été inclus, alors que les cas en double ont été exclus.

✓ Analyse des données

Les données recueillies ont été organisées et analysées avec le logiciel SPSS version 25 et Microsoft Excel 2010.

1.3.Résultats

L'étude épidémiologique rétrospective réalisée sur des patients atteints de cancer colorectal, hospitalisés au CHU Tlemcen durant la période s'étalant de 2012 à 2016 a permis d'analyser un effectif de 581 cas. Une répartition selon les facteurs suivants a été réalisée :

1.3.1. L'incidence du cancer colorectal

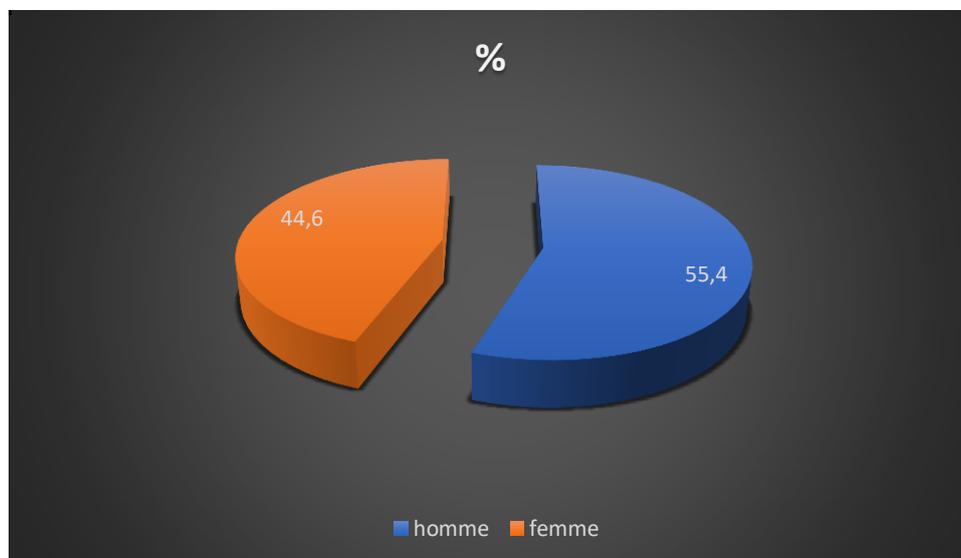
L'évaluation du profil épidémiologique a montré que le cancer colorectal dans notre région était le 3ème cancer le plus fréquent après le cancer du sein et de la thyroïde chez les femmes avec 10,7 / 100 000 habitants et après le cancer de la vessie et de la prostate chez les hommes avec 14,3 / 100 000 habitants (**Tableau 3**).

Tableau 3: taux d'incidence des 10 principaux cancers par sexe de 2012 à 2016.

Type de cancer	Incidence (hommes)	Incidence (femmes)
Sein	-	61.9
Colon, rectum, anus	14.3	10.7
Lymphome	11.3	8.8
Vessie	17.9	2.2
Estomac	9.4	6.1
Thyroïde	2.6	12.8
Poumon, trachée, bronches	12.6	2.0
Prostate	14.4	
Cerveau et système nerveux	5.3	5.8
Bouche et pharynx	7.1	2.9

1.3.2. Répartition du cancer colorectal par sexe entre 2012 et 2016

La répartition du cancer du côlon selon le sexe indique que la population masculine était la plus touchée sans être significative ; puisque sur les 581 patients analysés, 322 hommes étaient atteints (55,4 %) contre 259 femmes (44,6 %) (**Figure 8**), avec un sex ratio de 1,2.

**Figure 8 :** Répartition du cancer colorectal par sexe entre 2012 et 2016.

1.3.3. Répartition du cancer colorectal par âge

La figure 9 montre que la tranche d'âge la plus représentée dans cette étude était celle de 50-60 avec 27,1 %, suivie de celle de 60-70 avec 24,8 %. L'âge moyen de survenu du cancer colorectal était de 60 ± 13 ans, avec des extrêmes d'âge de 16 à 90 ans.

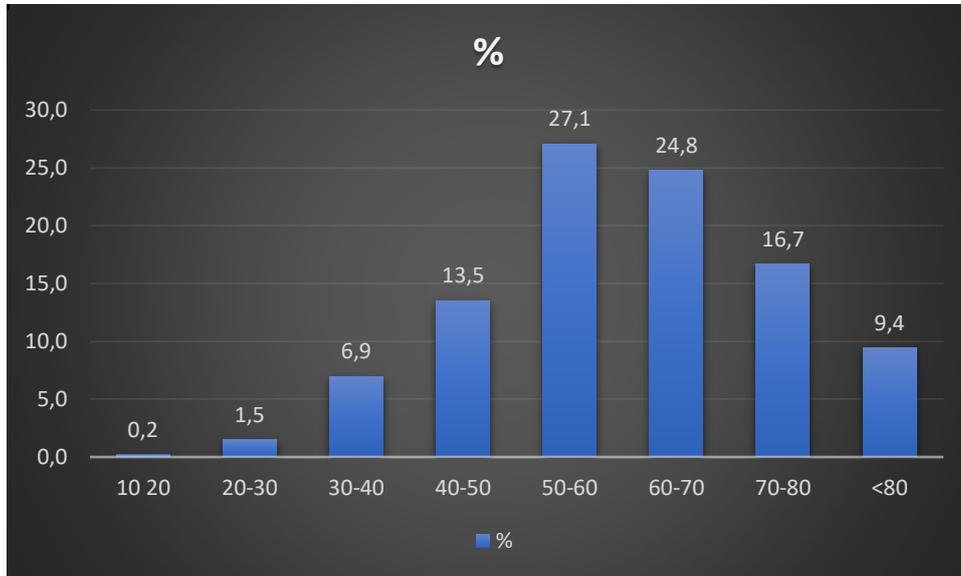


Figure 9 : Répartition du cancer colorectal par tranche d'âge.

1.3.4. Répartition du cancer colorectal selon sexe et l'âge

La figure 10 montre que la tranche d'âge 50-60 était la plus représentative pour le sexe féminin tandis que la tranche d'âge la plus représentative pour le sexe masculin était celle de 60-70.

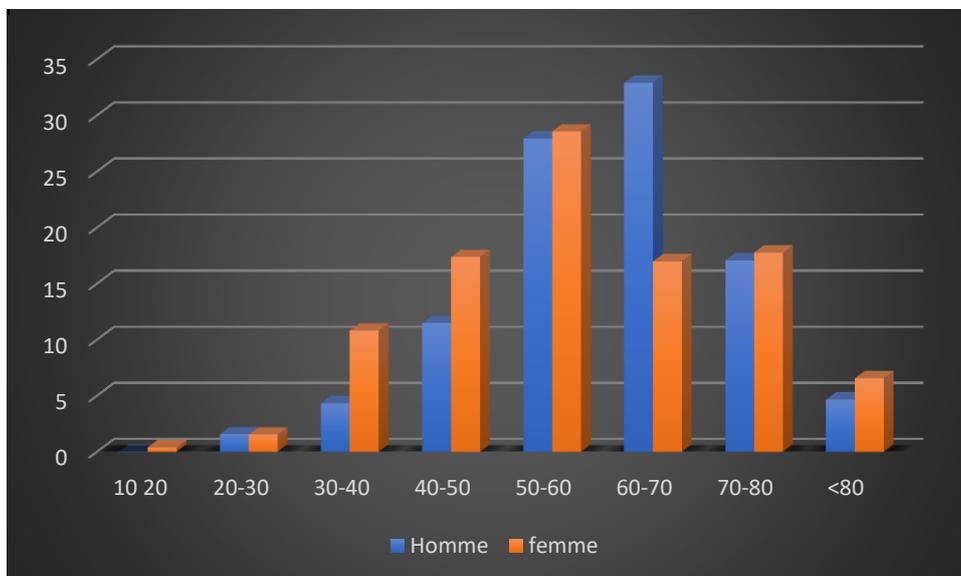


Figure 10: Répartition du cancer colorectal selon sexe et l'âge.

1.3.5. Répartition du cancer colorectal par année

Des taux variables ont été enregistrés durant les cinq années (**Figure 11**) avec un pic en 2014 (27,9%), et une moyenne annuelle de 116 cas pour un total de 581 cas. Ce qui a été remarqué aussi est la diminution importante de ces cancers en 2016 avec 13,4%.

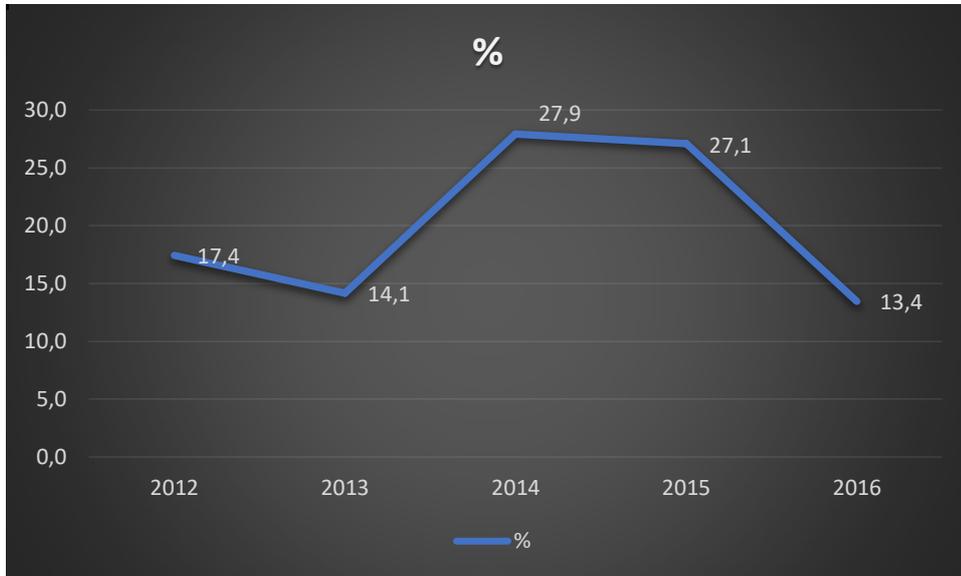


Figure 11 : Répartition du cancer colorectal par année.

1.3.6. Répartition du cancer colorectal selon la localisation

Cette analyse statistique réalisée sur l'ensemble de la population cible étudiée nous a permis de montrer un taux plus élevé pour le cancer de colon avec 52,3% dont le côlon sigmoïde présentait un taux de 5,7% suivi par le cæcum (3,8%) et le colon ascendant (1,4%), contre 47,8% de cancer du rectum (**Figure 12**).

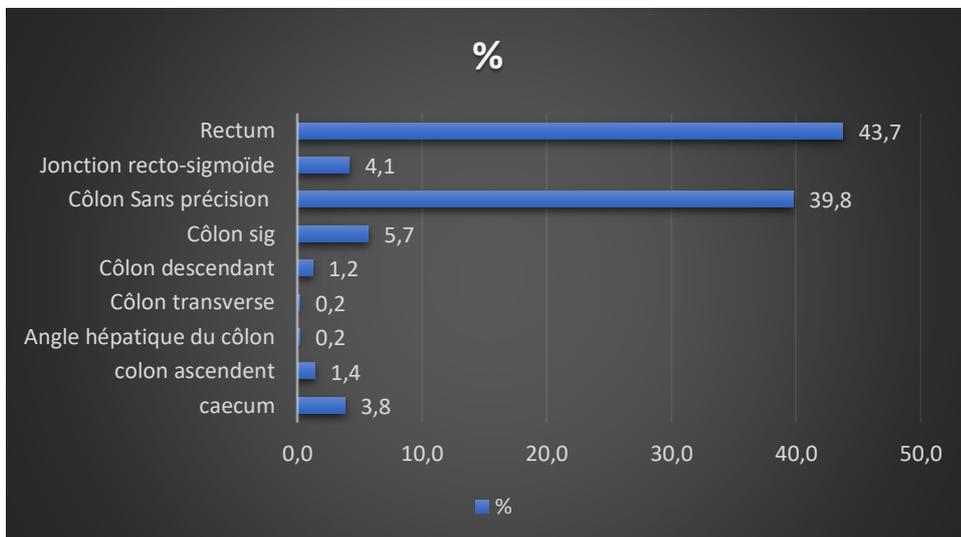


Figure 12 : Répartition du cancer colorectal selon la localisation.

1.3.7. Répartition du cancer colorectal selon la morphologie

Dans cette analyse (**Tableau 4**), l'adénocarcinome semble être le type de cancer le plus prédominant avec 81,8% suivi par le carcinome avec 12,5%.

Tableau 4: Répartition des cancers colorectaux selon la morphologie.

Morphologie	N (%)
Carcinome	37(6,37)
Adénocarcinome	481(82,79)
Mélanome	2(0,34)
Sarcome	1(0,17)
Autres	60(10,33)

1.3.8. Répartition du cancer colorectal selon le stade de diagnostics

Selon la 8ème édition de la classification TNM des cancers publiée par l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), 26,3% des patients étaient au stade I, 17,4% au stade IV alors que 38,5% des cas le était indéterminé (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Répartition du cancer colorectal par stade de diagnostic.

Stade du diagnostic	N (%)
Stade I	153(26,3)
Stade II	103(17,8)
Stade III	0(0%)
Stade IV	101(17,4)
stade indéterminé	224(38,5)

1.4. Discussion

Le cancer colorectal est un véritable problème de santé publique, aussi bien en Algérie que dans le monde entier par sa fréquence et sa mortalité élevée (**Baidoun *et al.*, 2021**).

Le taux d'incidence du CCR a augmenté de 90 % entre 1980 et 2016, cette évolution est largement attribuable à la constellation de facteurs liés à l'alimentation et au mode de vie, tels qu'une mauvaise alimentation caractérisée par une consommation élevée de viande rouge

et transformée et de boissons alcoolisées et une faible consommation d'aliments riches en fibres, une faible activité physique et l'obésité (**Høydahl et al., 2020**).

L'évaluation du profil épidémiologique a montré que le cancer colorectal dans notre région est le 3ème cancer le plus fréquent après le cancer du sein et de la thyroïde chez la femme (10,7 / 100 000 habitants) et après le cancer de la vessie et de la prostate chez l'homme (14,3 / 100 000 habitants). L'incidence du cancer colorectal dans notre région reste supérieure à celle du Maroc (2,5 à 3,3/100 000 habitants) (**Belhamidi et al., 2018**), de l'Egypte (6,3/100 000 habitants et 6,6/100 000 habitants pour les femmes et les hommes respectivement) et de l'Inde (3,1/100 000 habitants et 5,8/100 000 habitants pour les femmes et les hommes respectivement) (**Bray et al., 2018**). Cependant, elle est inférieure à celle des pays occidentaux, notamment les États-Unis d'Amérique (22,6/100 000 habitants chez les femmes et 28,8/100 000 habitants chez les hommes), l'Allemagne (21,1/100 000 habitants chez les femmes et 31/100 000 habitants chez les hommes), Canada (28/100 000 habitants chez les femmes et 35,2/100 000 habitants chez les hommes) et la France (24/100 000 habitants chez les femmes et 36,9/100 000 habitants chez les hommes) (**Bray et al., 2018**).

Le taux d'incidence standardisé pour l'âge estimé par GLOBOCAN montre que l'Australie et la Nouvelle-Zélande ont les taux de CCR les plus élevés au monde, avec respectivement 44/100 000 habitants chez les femmes et 56/100 000 habitants chez les hommes et 37,5/100 000 habitants chez les femmes et 44,1/100 000 habitants chez les hommes [(**Globacon, 2020**) ; (**Blackmore et al., 2020**)].

Dans notre étude, 581 cas de CCR ont été trouvés sur une période de 5 ans. Ce résultat est supérieur à ceux trouvés dans la littérature africaine, où des études réalisées au Togo et au Gabon ont déclaré seulement 57 (**Darré et al., 2014**) et 51 cas (**Trop, 2011**) respectivement durant une période de 10 ans.

Une prédominance masculine a été observée dans notre étude (55,4%) avec un sex-ratio de 1,2 est conforme aux résultats de plusieurs auteurs, confirmant ainsi les données de la littérature [(**Darré et al., 2014**) ; (**Abbes et al., 2018**)].

L'âge est l'un des facteurs impliqués dans l'apparition de ces cancers, et dans ce travail l'âge moyen de survenue du cancer était de 60±13 ans, ce qui est en accord avec une étude réalisée au Maroc en 2015 (**El Housse et al., 2015**) ainsi qu'une étude réalisée en Asie (**Magaji et al., 2014**). D'autre part, des études réalisées en Afrique subsaharienne montrent que les cancers colorectaux touchent particulièrement la population jeune dont l'âge moyen

est de 48 ans et 46,7 ans enregistrés respectivement au Gabon (**Darré et al., 2014**) et au Togo (**Trop, 2011**). Alors que, l'âge moyen déclaré aux États-Unis (**SEER, 2013**) et en France (**Aparicio et al., 2005**) est situé dans la septième décennie.

Le taux le plus élevé a été observé dans l'intervalle de 50-60 ans avec 27,1%, ce qui confirme une étude réalisée sur une population de l'ouest algérien (**Meddah et al., 2009**), une autre étude marocaine fait état de la même tranche d'âge la plus touchée (**Darré et al., 2014**).

En outre, dans notre série, le site du cancer était, par ordre de fréquence, le colon (52,3%), suivi par le rectum (47,8%). Ces résultats sont en accord avec une étude de revue systématique où les auteurs ont rapporté que le principal site anatomique du CCR en Afrique subsaharienne était le colon (54%) (**Graham et al., 2012**), avec ceux de **Lelong et al (2004)** en France où le cancer du côlon présente globalement 2/3 des CCR et 1/3 pour ceux du rectum, et ceux de **Ibrahim et al (2022)** en Irak dont les fréquences des cancers coliques et rectaux sont respectivement 66% et 34%.

Une autre étude réalisée par **Bensaada et al (2017)** à l'ouest Algérien indique que la localisation tumorale était prédominante dans le côlon si on la compare aux segments du rectum avec 80% et 20% respectivement.

Tandis que notre série ne concorde pas avec une autre étude faite en Ghana qui marque une dominance de l'implication maligne du rectum avec 59,01% suivi par le colon (40, 98%) (**Agyemang-Yeboah et al., 2017**).

Bien que le pourcentage de cas dans chaque sous-site anatomique variait d'un article à l'autre, notre étude qui présentait 5,7 % au niveau de côlon sigmoïde, 3,8 % au niveau de cæcum et 1,4% de colon ascendant est similaire a une étude en Europe qui a révélé que les sites de cancer du colon les plus courants étaient, le côlon sigmoïde (21 %) et le caecum (10 %) (**Gatta et al., 2003**), alors qu'il est différent par rapport à une étude réalisée en Arabie Saudite qui déclare que le cæcum (22,8%) présente le sous type de cancer du colon le plus répondu suivi par le colon sigmoïde (22%) (**Guraya et Eltinay, 2006**).

Les adénocarcinomes sont la variété histologique qui domine les cancers colorectaux dans notre série avec 82,79% des cas. Ce chiffre est comparable avec ceux rapportés dans d'autres études réalisées au Togo (91,2%) (**Darré et al., 2014**), au Gabon 98% (**Diallo Owono et al., 2011**), au Maroc (95%) (**Belhamidi et al., 2018**), en Egypte (76,2%) (**Suliman et al., 2020**), en Arabie Saoudite (81%) (**Mansour et al., 2002**), en Irak (84,0%) (**Al Dahhan et Al Lami, 2018**) et en Iran avec 96,4% (**Bray et al., 2018**).

L'analyse descriptive des anomalies a montré un taux de 26,3 % de cancers de stade I, 17,8 % de stade II et 17,4 % de stade IV, ce qui est conforme à une étude réalisée par les registres du cancer du réseau Francium en France (**Bouvier *et al.*, 2018**).

**2. La détection moléculaire du
Papillomavirus humain et Epstein Barr
virus au niveau de cancer colorectal**

2.1.Objectif

L'objectif de cette étude est de détecter la présence de l'ADN du papillomavirus humain et du virus d'Epstein-Barr dans le cancer colorectal.

2.2.Type de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective, quantitative réalisée au service d'anatomie pathologique de l'hôpital d'Ain Temouchent entre janvier 2012 et décembre 2019 et aux laboratoires privés d'anatomie pathologique de l'ouest Algérien.

2.3.Population d'étude

Cette étude inclut 96 blocs des patients atteints d'un cancer colorectal qui ont été référés au service d'anatomie pathologique de l'hôpital d'Ain Temouchent diagnostiqué entre janvier 2012 et décembre 2019 et aux laboratoires privés d'anatomie pathologique de l'ouest Algérien.

2.4.Type d'échantillons

Les échantillons qui ont été envoyés au laboratoire d'anatomie pathologique dans du formol à 10 % puis fixés et inclus en paraffine (FFPE) pour une évaluation histologique ; ont été utilisés dans cette étude. Les échantillons comprenaient des colectomies et des biopsies qui ont été exercés à l'aide de coloscopie ou d'une sigmoïdoscopie.

Tous les échantillons qui ont une qualité ou une quantité insuffisante de tissu ont été exclus de cette étude, ainsi que les échantillons avec des fiches de renseignement incomplètes.

2.5.Lieux d'étude

La préparation de tissus fixés au formol et inclus en paraffine a été réalisée au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique d'EPH Dr Benzardjeb Ain-Temouchent, ensuite l'extraction d'ADN a été effectuée au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), suivi par l'étape d'amplification par PCR et l'électrophorèse qui ont été réalisées au niveau du laboratoire CancerLab, laboratoire PPABIONUT (physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition) et Wiragen.

2.6. Matériel et méthodes

2.6.1. Préparation de tissus fixés au formol et inclus en paraffine

Pour chaque échantillon, quatre lames de 10 µm à 15 µm ont été coupées à partir des blocs FFPE à l'aide de microtome, une 5eme lame de 0,5 µm a été coupée pour une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E).

Les coupes H&E de chaque cas ont été évaluées au microscope optique par un médecin pathologiste afin d'identifier la zone tumorale et la disséquer manuellement afin de faciliter le grattage des cellules tumorales seulement.

2.6.2. Extraction d'ADN

Les lames de chaque patient macro-disséquées étaient grattées avant d'être soumises à l'extraction d'ADN à l'aide du kit Puregene (Qiagen, Hilden, Allemagne) avec des modifications pour optimiser le rendement en ADN. En bref, 900 µL de xylène a été ajoutés aux échantillons pour éliminer la paraffine, suivis de 900 µL d'éthanol à 100% ; les échantillons ont ensuite été incubés à 55°C dans 300 µL de la solution de lyse et 20 µL de la protéinase K pendant une nuit, une étape d'incubation à 90° pendant une heure avec une dose de protéinase k a été ajoutée pour une lyse complète. Après la lyse complète des échantillons, 100 µL de la solution de précipitation des protéines a été ajoutée. Le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol à 70% ; puis dissous dans 20 µl de solution d'élution avec une incubation à 65° pendant 1h.

La pureté de l'ADN extrait a été évaluée par le spectrophomètre. Le rapport 260:280, qui mesure la quantité d'absorption de la lumière aux longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm, a été utilisé pour mesurer de la pureté de l'ADN. Une valeur comprise entre 1,8 et 2,0 est considérée comme optimale.

La qualité de l'ADN purifié a été aussi évaluée en faisant passer l'ADN sur un gel d'agarose à 0,7 % pour vérifier la présence d'une bande distincte d'ADN de poids moléculaire élevé.

Enfin, l'ADN extrait a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2.6.3. L'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

➤ Amplification de gène L1 d'HPV par MY09/MY11

Une première PCR a été réalisée en utilisant les amorces MY09/MY11 pour l'obtention d'un amplicon de 450 bp.

MY09 : 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3',

MY11 : 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'.

Pour les réactions PCR standard, le mélange réactionnel (réactifs du kit PCR WiraGen) a été utilisé pour obtenir un volume de réaction de 25µl (**tableau 6**).

Tableau 6 : Composition pour une réaction PCR avec les amorces MY09/MY11 et LMP1.

Composant	Concentration	Volume (µl)
10X Taq buffer	1X	2,5
2,5 Mm dNTPs	200 µM	2
Amorce F	0,25 µM	0,625
Amorce R	0,25 µM	0,625
Taq polymerase	2,5 U	0,5
H ₂ O	-	17,75
ADN	-	1

Le programme PCR a été réalisé comme suit :

- Pré-dénaturation à 95°C pendant 15 min
- 40 cycles de :
 - Dénaturation à 95°C pendant 30 s,
 - Hybridation à 53°C pendant 45 s,
 - Elongation à 72°C pendant 1 min,
- Elongation finale à 72°C pendant 5 min.

➤ Amplification de gène L1 d'HPV par GP5+/GP6+

Une seconde amplification a été réalisée par les amorces GP5+/GP6+ pour obtenir un amplicon de 150 bp.

GP5+ : 5' TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC 3'

GP6+ : 5' GAAAAArAAACTGTAAATCAATTC 3'

Pour les réactions PCR standard, le mélange réactionnel (PCR Master Mix WiraGen) contenant le tampon PCR, les dNTP ainsi que la Taq polymérase a été utilisé pour obtenir un volume de réaction de 25µl (**tableau 7**).

Tableau 7: Composition pour une réaction PCR avec les amorces GP5+/6+et EBNA.

Composant	Concentration	Volume (µl)
2X PCR Master Mix	1X	12,5
Amorce F	0,4 µM	1
Amorce R	0,4 µM	1
H₂O	-	9,5
ADN	-	1

Le programme PCR a été réalisé comme suit :

- Pré-dénaturation à 95°C pendant 10 min
- 35 cycles de :
Dénaturation à 95°C pendant 30 s,
Hybridation à 50°C pendant 1 min,
Elongation à 72°C pendant 1 min,
- Elongation finale à 72°C pendant 10 min.

➤ **Amplification de gène LMP1 d'EBV**

Nous avons choisi d'amplifier la région du gène LMP1 d'EBV qui donne un amplicon de 509 bp avec les amorces suivantes :

LMP1 F :5' AATAGACAGCCCAGTTGAAA 3'

LMP1 R :5' GCAGTGCCATATCTGACGTG 3',

L'amplification PCR a été réalisée dans un volume de réaction de 25 µl (**tableau 6**).

Le programme PCR a été réalisé comme suit :

- Pré-dénaturation à 94°C pendant 5 min,
- 35 cycles :
Dénaturation à 94°C pendant 30 s,
Hybridation à 55°C pendant 1 min,
Elongation à 72°C pendant 3 min,
- Elongation finale à 72°C pendant 5 min.

➤ **Amplification de gène EBNA d'EBV**

Pour détecter l'ADN d'EBV, nous avons utilisé, les amorces suivantes qui donnent des amplicons de 262bp :

EBNA F : 5'TGAATACCACCAAGAAGGTG 3'

EBNA R : 5'AGTTCCTTCGTCGGTAGTC3'

Pour les réactions PCR standard, le mélange (PCR Master Mix WiraGen) a été utilisé pour obtenir un volume de réaction de 25µl (**tableau 7**).

Le programme PCR a été réalisé comme suit :

- Pré-dénaturation à 95°C pendant 10 min
- 35 cycles de :
 - Dénaturation à 95°C pendant 30 s,
 - Hybridation à 50°C pendant 1 min,
 - Elongation à 72°C pendant 1 min,
- Elongation finale à 72°C pendant 10 min.

Les échantillons de contrôle négatif contenant de l'eau au lieu de l'ADN ainsi que le contrôle positif ont toujours été traités parallèlement aux échantillons du patient dans toutes les séries de PCR.

2.6.4. Electrophorèse

Les produits PCR amplifiés ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pour les amplicons de moins de 200 bp et 1,5% pour les amplicons de plus de 200 bp, qui a été réalisé en dissolvant l'agarose (SIGMA) dans le tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X (SIGMA). Le mélange a été chauffé jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous. La solution d'agarose a été refroidie et avant la gélification de la préparation, 1µl de colorant BET (bromure d'éthidium) a été ajouté. Les produits de PCR ainsi que le témoin négatif et positif additionnés au tampon de charge et le marqueur de taille ont été déposés dans les puits de gel et la migration a été déroulée pendant 40 min à 90 V avant la visualisation sur une table UV. La taille de la bande a été mesurée à l'aide de la migration du marqueur de poids moléculaire

2.7.Résultats

La recherche de l'ADN de HPV a été réalisée par PCR à l'aide des amorces MY09/11 et GP5+/6+ et de celle de l'ADN d'EBV avec les amorces de LMP1 et EBNA1 sur une collection de 96 tumeurs colorectales.

2.7.1. Les caractéristiques clinico-histopathologiques

La population étudiée était de 96 patients ayant un cancer colorectal dont l'âge moyen était $65,8 \pm 12,28$ avec des extrêmes d'âge de 25-98 ans (**Tableau 8**). La majorité des cas étaient des cancers coliques (80,2%) tandis que 19,79% présentaient un cancer rectal. Concernant le degré de différenciation des adénocarcinomes, 63,54 % des échantillons étaient à un degré bien différencié alors que 20,83% et 15,62% étaient moyennement et peu différencié respectivement.

Tableau 8 : Les caractéristiques clinico-histopathologique des patients.

	Variables	N (%)
Sexe	Homme	50 (52,08%)
	Femme	46 (47,91%)
Tranche d'âge	>50	15 (15,62%)
	51-60	25 (26,04%)
	61-70	20 (20,83%)
	<70	36 (37,5%)
Localisation	Colon	77 (80,2%)
	Rectum	19 (19,79%)
Degrés de différenciation	Peu différencié	15(15,625%)
	Moyennement différencié	20(20,83%)
	Bien différencié	61(63,54%)
Morphologie	Adénocarcinome	91(94,79%)
	Carcinome colloïde	5(5,21%)

2.7.2. Résultats de la recherche d'ADN du HPV

Les amorces MY09/MY11 n'ont pas été capables d'amplifier l'ADN du HPV dans aucun échantillon (**Figure 13**), alors que les amorces GP5+/GP6+ ont pu détecter 3,12% (3/96 cas) d'échantillons HPV-positives.

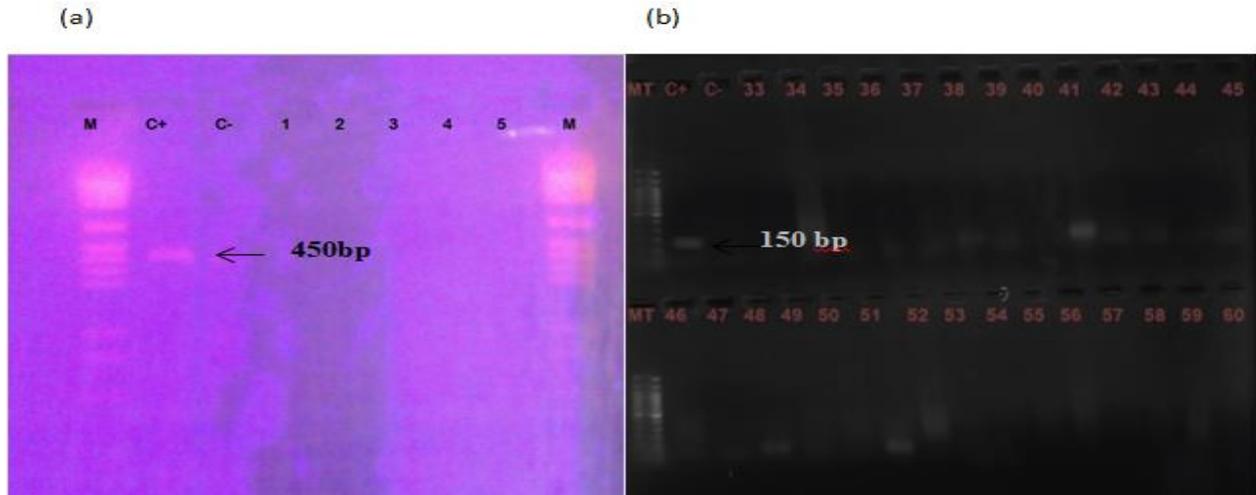


Figure 13: Amplification du gène L1 d'HPV (a) Amplification d'HPV par MY09/ MY11 (450bp), M : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, de C1 à C5 : les échantillons. (b) Amplification d'HPV par GP5+/6+ (150bp), MT : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, de C33 à C60 : les échantillons, les cas HPV + : C34, C41 et C52.

2.7.3. Résultats de la recherche d'ADN d'EBV

Le génome d'EBV n'a pas été détecté dans aucun échantillon de tumeurs colorectales à l'exception de témoin positif dont la taille d'amplicon est de 509 paires de bases pour le gène LMP1 et de 262 paires de bases pour EBNA1 (**Figure 14**).

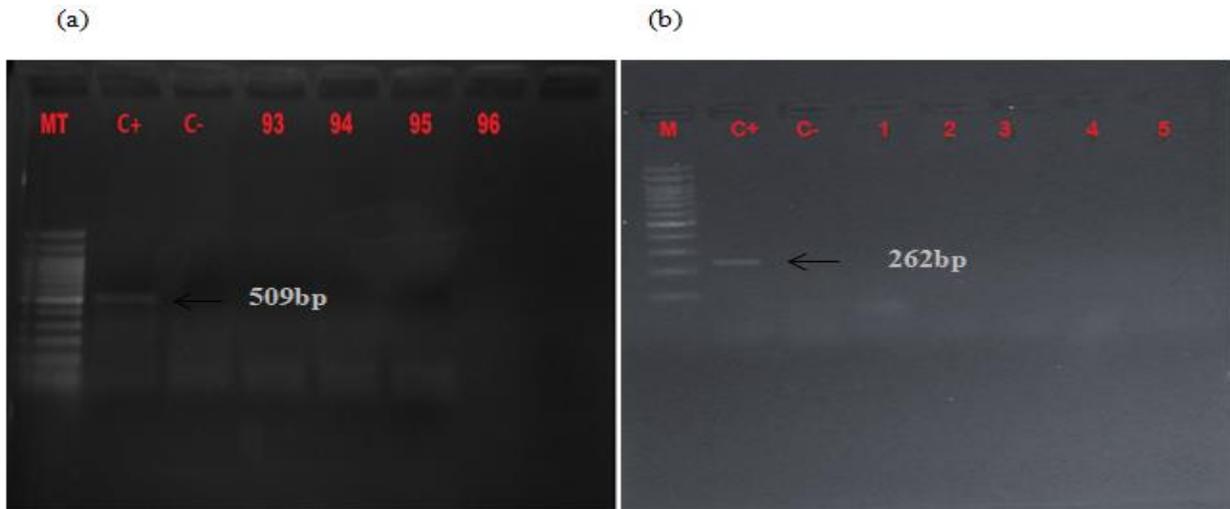


Figure 14 : Amplification d'EBV (a) Amplification d'EBV par les amorces de LMP1, M : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, les échantillons : C93 à C96.
 (b) Amplification d'EBV par EBNA-1 (262bp), M : marqueur de taille, C+ : contrôle positif, C- : contrôle négatif, les échantillons : C1 à C5.

2.8. Discussion

De nombreuses études se concentrent sur l'identification de nouvelles altérations génétiques et les facteurs de risque impliqués dans le développement du CCR. Il est de plus en plus évident que les maladies infectieuses, notamment les infections virales, peuvent également jouer un rôle majeur dans la formation ou la progression de ce type de cancer, parmi ces infections, le HPV et le EBV sont particulièrement considérés comme des causes primaires importantes (Tavakolian *et al.*, 2020).

Les HPV à haut risque sont corrélés à l'apparition et au développement de cancers humains, principalement le cancer du col de l'utérus, et certains sous-ensembles de cancers génitaux, ainsi que celui de la tête et du cou, ... (Fernandes *et al.*, 2020). Les données suggérant un impact d'une infection par le HPV dans le développement du cancer colorectal sont apparues en 1990. Les taux de prévalence de HPV dans le CCR varient selon les données disponibles, allant de 0% (Tavakolian *et al.*, 2020) à 85% (Kirgan *et al.*, 1990).

Par ailleurs, l'EBV infecte plus de 90 % de la population mondiale (Bedri *et al.*, 2019). Il a été décrit comme étant associé à plusieurs maladies cancéreuses humaines telles que les carcinomes nasopharyngés et gastriques et divers lymphomes, comme le lymphome de Burkitt, les lymphomes NK/T et certains lymphomes de Hodgkin (Borza *et al.*, 2002). En ce

qui concerne le cancer colorectal, plusieurs études ont établi un lien de causalité entre l'EBV et la carcinogénèse colorectale (**Fernandes et al., 2018**).

La PCR est la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN de HPV à haut risque dans les tissus tumoraux frais ou fixés au formol et inclus en paraffine (**Ibragimova et al., 2018**). De plus les méthodes utilisées par les différentes études pour la détection de l'EBV dans les échantillons humains (sang, tissus) comprennent l'immunohistochimie (IHC), l'hybridation in situ (ISH) et la PCR. Pour obtenir des résultats plus fiables, plusieurs études ont utilisé des dosages combinés (IHC et ISH) (**Bedri et al., 2019**). Ces techniques peuvent avoir des sensibilités différentes pour détecter les cibles de l'EBV (gènes ou protéines), ce qui peut expliquer en partie les écarts dans le pourcentage de positivité de l'EBV rapporté dans la littérature actuelle (0 % à 46 %) (**Fernandes et al., 2018**).

L'objectif de la présente étude est de rechercher la présence de HPV et EBV au niveau de cancer colorectal. A notre connaissance, il s'agit de la première étude rapportant sur la présence de HPV et d'EBV dans le CCR humain dans la population algérienne.

La recherche de la présence de l'ADN du HPV a été réalisée à l'aide de deux ensembles d'amorces MY09/MY11 et GP5+/GP6+ qui donnent des fragments de 450bp et 150bp respectivement, limitant des régions conservées du gène L1. La méthode MY09/11 est plus sensible pour la détection de plusieurs types d'HPV (**Camargo et al., 2011**), tandis que la méthode GP5+/6+ génère des fragments courts et peut obtenir des résultats plus fiables pour les échantillons de type FFPE qui peuvent contenir un ADN dégradé en fragments courts (inférieurs à 250 paires de bases), à cause de la fixation de l'échantillon par le formol (**Venceslau et al., 2014**).

Les amorces MY09/MY11 n'ont pas été capables d'amplifier l'ADN du HPV dans aucun échantillon, alors que les amorces GP5+/GP6+ ont détecté 3,12% (3/96 cas) d'échantillons HPV-positives, ce qui concorde avec des études utilisant la PCR à Arabie Saoudite, en Iran et en Pologne qui ont révélé la présence du HPV dans 0,8% (**Gazzaz et al., 2016**), 1% (**Meshkat et al., 2014**) et 2,5% (**Biesaga et al., 2013**) respectivement.

Alors que dans d'autres études précédentes qui ont utilisé des techniques de détection similaires à celles utilisées ici, la présence de HPV était plus importante en Belgique (14,2%) (**Deschoolmeester et al., 2010**), en Italie (15,8%) (**Tanzi et al., 2015**) à Cuba (35,7%) (**Soto et al., 2016**) et en Syrie (37%) (**Malki et al., 2020**).

Les taux de positivité au HPV les plus élevés dans les cas de CCR ont été détectés aux États-Unis (51 %) (**Bodaghi et al., 2005**), au Liban (64%) (**Nagi et al., 2021**), en Argentine (74 %) (**Pérez et al., 2005**), au Brésil (83 %) (**Damin et al., 2007**) et en Turquie (83 %) (**Salepci et al., 2009**).

Par contre des études réalisées en Australie (**Kulski et al., 1990**), la France (**Vuitton et al., 2017**) et le Portugal (**Martins et al., 2020**) n'ont pas réussi à détecter la présence du HPV dans aucun des échantillons de CCR.

Ces résultats divergents pourraient être expliqués par la différence géographique dans les populations étudiées, ou des variations dans les méthodes de détection du HPV mais surtout le choix du matériel d'analyse (frais/FFPE) (**Pérez et al., 2005**).

Concernant l'EBV, dans notre étude, deux PCR différentes spécifiques de 2 régions distinctes du génome viral, la protéine membranaire latente 1 (LMP1) et l'antigène nucléaire d'EBV (EBNA1) ont été réalisées pour la détection de l'EBV.

La présente étude n'a pas réussi à détecter l'ADN d'EBV dans les échantillons de CCR ce qui est en accord avec une étude tchécoslovaque (**Boguszaková et al., 1988**) et une étude iranienne (**Mehrabani-Khasraghi et al., 2016**). De même, **Cho et al., (2001)** n'ont signalé aucun signe d'expression du gène EBER par ISH dans des échantillons de tumeurs colorectales provenant de 274 patients coréens. De plus, une étude Japonaise utilisant ISH a montré qu'elle n'a trouvé aucune relation entre l'EBV et les tissus cancéreux colorectaux (**Kijima et al., 2001**).

En revanche, d'autres études ont trouvé une corrélation entre l'EBV et le cancer colorectal humain dont la positivité à l'EBV la plus élevée rapportée dans le CCR atteignait 52% en Italie, lors de l'étude des blocs de paraffine par RT-PCR (**Fiorina et al., 2014**). Des résultats similaires ont été obtenus par **Sole et al (2015)** en Chile dont le virus a été détecté dans 46 %, la technique utilisée dans cette étude était la PCR.

De plus, la présence d'une infection à EBV a été explorée dans une cohorte de 102 échantillons de CCR de Syrie par PCR et analyse IHC en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes LMP1 et EBNA1, ils ont révélé que 36,27 % des échantillons étaient positifs pour l'EBV (**Al-Antary et al., 2017**). Sur une cohorte chinoise, ils ont étudié l'expression de LMP1 par PCR et EBNA1 par IHC, LMP1 a été détectés dans 32,2% des 90 échantillons de carcinome colorectal. Sur les 29 tumeurs positives au LMP1 23 (79,3 %) étaient positives pour EBNA1 (**Song et al., 2006**). En parallèle, une étude bosniaque utilisait la technique de

PCR avec les mêmes amorces a indiqué la présence des gènes EBNA1 et LMP1 de l'EBV dans 14 % et 25 % des échantillons, respectivement (**Gupta et al., 2020**). D'autre part, une étude iranienne utilisant la PCR aussi déclare que l'ADN de l'EBV a été détecté dans seulement 1 des 70 (1,4%) tissus colorectaux d'adénocarcinome (**Sarvari et al., 2018**).

Des investigations récentes ont souligné que les oncovirus (HPV-HR et EBV) peuvent être coprésents dans plusieurs types de cancers humains, dont les CCR, où ils peuvent coopérer à l'initiation et à la progression de ces cancers via la coopération de leurs oncoprotéines (**Fernandes et al., 2018**). Une étude menée par **Guidry et Scott (2017)** ont montré que la coïnfection par le HPV et l'EBV améliore la persistance de l'EBV soit via la latence ou l'augmentation de la réplication virale. Une autre étude réalisée par **Cyprian et al. (2018)** démontrait que le co-présence de HPV et EBV peuvent entraîner par la suite la progression des métastases via la transition épithéliale-mésenchymateuse et l'activation des voies Erk1/Erk2 et β -caténine des cellules cancéreuse, suggérant un mécanisme plausible pour les cellules cancéreuses colorectales (**Gupta et al., 2021**).

Par ailleurs, Plusieurs autres études révèlent que les HPV à haut risque peuvent également entraîner l'activation d'oncogènes comme KRAS et C-MYC (**Qiu et al., 2020**). Le proto-oncogène KRAS, situé sur le chromosome 12, code pour une protéine impliquée dans la prolifération, la différenciation ainsi que la transduction du signal. Sa pathogenèse dans le cancer colorectal est liée à plusieurs mutations au niveau des codons 12, 13 et 61 qui conduisent à une prolifération incontrôlée (**Vogelstein et al., 2013**). Les mutations KRAS sont responsables de la transition des adénomes vers les carcinomes ; et sont présents dans 56% des tumeurs HPV positives (**Buyru et al., 2006**). Une étude réalisée en Chine par **Qiu et al., (2020)** a constaté que le KRAS est régulé positivement dans le CCR HPV-positif. Les fonctions de ces gènes dans le CCR associé au virus nécessitent une enquête plus approfondie.

3. Profils des mutations du gène KRAS chez les patients atteints du cancer colorectal

3.1.Objectif

L'objectif de cette partie de l'étude est de déterminer la fréquence et le type des mutations d'exon 2 du gène KRAS à partir de tissus paraffinés de cancer colorectal.

3.2.Sélection des cas

Trente-six extraits d'ADN ont été choisis au hasard à partir de notre collection qui inclut 96 tumeurs colorectales.

3.3.Lieu de l'étude

Les étapes d'amplification par PCR et l'électrophorèse ont été réalisées au niveau du laboratoire CancerLab et LAMAABE de l'université de Tlemcen, suivi par une purification et un séquençage Sanger qui ont été réalisés par une prestation de service chez Gene life science à la wilaya de Sidi Bel abbes.

3.4.Matériel et méthodes

3.4.1. Amplification d'exon 2 du gène KRAS

L'amplification a été réalisée par des amorces spécifiques pour obtenir un amplicon de 179 bp.

KRAS F ; 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA-3'

KRAS R ; 5'-TGTATCAAAGAATGGTCCTGCAC-3'.

Les amplifications étaient réalisées dans un milieu réactionnel de 25 µl détaillé dans le tableau ci-dessous (**tableau 9**).

Tableau 9 : Composition d'une réaction PCR avec les amorces du gène KRAS.

Composant	Concentration	Volume (µl)
10X Taq buffer	1X	2,5
2,5 Mm dNTPs	200 µM	2
Amorce F	0, 25 µM	0, 625
Amorce R	0, 25 µM	0, 625
Taq polymerase	2,5 U	0,5
H ₂ O	-	17,75
ADN	-	1

Les conditions d'amplification optimales ont été déterminées. Pour cela, nous avons testés les différentes températures d'hybridation comprises entre 5°C en dessous et en dessus du Tm des amorces, la condition retenue correspond à celle permettant une amplification maximale et sont les suivants :

- Pré-dénaturation à 95°C pendant 15 min
- 35 cycles de :
 - Dénaturation à 95°C pendant 30 s,
 - Hybridation à 60°C pendant 90 s,
 - Extension à 72°C pendant 90 s,
- Post-extension à 72°C pendant 10 min.

3.4.2. Électrophorèse

Un volume de 5 µL de chaque produit d'amplification par PCR additionnés au tampon de charge et le marqueur de taille était déposé sur un gel d'agarose (BET 1 %). L'électrophorèse était réalisée à 100 Volts pendant 40 minutes dans du tampon TBE 1X. L'ADN amplifié était visualisé sous les rayons UV.

3.4.3. Purification et séquençage

Cette étape a été réalisée par une prestation de service au niveau de laboratoire de Gene Life Science.

Les produits PCR purifiés ont été séquencés dans les directions sens et anti sens dans des réactions séparées et en double. Chaque réaction contenait 4 µl d'ADN matrice, 2 µl de l'amorce PCR appropriée, 10 µl d'eau et 2 µl de BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems).

Chaque réaction a été chauffée à 96 °C pendant 1 min, suivie de 25 cycles à 96 °C pendant 10 s pour la dénaturation, 50 °C pendant 5 s (hybridation) et l'élongation à 60 °C pendant 4 s. Les produits de séquençage ont été purifiés à l'aide d'une méthode de précipitation à l'éthanol afin d'éliminer les réactifs non incorporés et de garantir une charge neutre. En bref, les produits de séquençage ont été lavés dans 80 µl de mélange de précipitation à l'éthanol (3 µl de NaAc, 62,5 µl d'éthanol à 95 % et 14,5 µl d'eau) et l'ADN a été regroupé par centrifugation (13 000, 15 min). Le culot a de nouveau été lavé dans 200 µl d'éthanol à 75 % et centrifugé (13 000, 5 min). L'ADN concentré a été séché à l'air et réhydraté dans 15 µl de formamide, puis chargé sur une matrice capillaire 3130 Genetic Analyzer pour la détection (Applied Biosystems).

Deux séquences pour chaque échantillon ont été alignées à l'aide de Bionumerics v3.5 (Applied Maths) pour obtenir une séquence composite. La qualité de chaque trace de séquence a été évaluée visuellement et la séquence de mauvaise qualité a été éditée et supprimée.

3.4.4. Analyse des données

L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel IVG 2.16.1 (The Integrative Q12 Genomics Viewer) ainsi que le site NCBI utilisant le génome humain (hg19/GRCh37), le Microsoft Excel 2019 a été également utilisé pour l'étude de la corrélation entre le type de mutation de gène KRAS exon 2 et les caractères clinico-pathologiques.

3.5. Résultats

L'étude de l'expression moléculaire d'exon 2 du gène KRAS de 36 cas de cancer colorectal pris au hasard de notre collection a été réalisée par séquençage de Sanger. La relation de cette mutation avec les caractéristiques clinico-pathologiques a été étudiée.

3.5.1. Les caractéristiques clinico-pathologiques des patients

Parmi les trente-six cas de CCR qui ont été sélectionnés : 19 (52,78%) étaient des hommes et 17(47,2%) des femmes avec un sex ratio de 1,12. L'âge moyen était de $67,57 \pm 10,77$ ans avec des extrêmes d'âge de 47-90 ans (**tableau 10**). La majorité des cas étaient des adénocarcinomes coliques (26) soit un taux de 72,22%, tandis que 10 cas (27,78%) présentaient un adénocarcinome rectal. Concernant le degré de différenciation des adénocarcinomes, 72,22 % des échantillons étaient à un degré bien différencié alors que 16,67% et 11,11% étaient moyennement et peu différencié respectivement.

Tableau 10 : La distribution des caractéristiques des tumeurs en fonction du statut KRAS

Les caractéristiques <u>clinicopathologiques</u>	N(%)	cas muté	Cas non muté
Total	36(100%)	21(58,33%)	15(41,66%)
Le sexe			
Femme	17(47,2%)	13(76,47%)	4(23,53%)
Homme	19(52,78%)	8(42,11%)	11(57,89%)
Groupes d'âge			
≥59	12(33,33%)	9(75%)	3(25%)
≤60	24(66,67%)	12(50%)	12(50%)
Localisation			
Colon	26(72,22%)	15(57,70%)	11(42,30%)
Rectum	10(27,78%)	6(60%)	4(40%)
Degrés de différenciation			
Peu différencié	4(11,11%)	3(75%)	1(25%)
Moyennement différencié	6(16,67%)	4(66,67%)	2(33,33%)
Bien différencié	26(72,22%)	14(53,84%)	12(46,15%)

3.5.2. Les caractéristiques de la mutation KRAS

Au total, 12 mutations différentes du KRAS ont été observées chez 21 patients (58,33%). Les mutations et leurs fréquences sont détaillées dans le tableau 11. Les trois principales mutations trouvées étaient dans le codon 31 (61,90%), le codon 25 (47,62%) et le codon 37 (42,85%) (**Figure 17**). Parmi les mutations détectées dans le codon 31, 47,61% avaient la mutation C93T>G(pGlu31His) et 14,28% avaient la mutation C91C>A(pGlu31Stop).

Environ 75% (09/12) des mutations étaient des nouvelles mutations qui n'avaient pas été signalées dans la version 90 de COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, consulté pour la dernière fois le 15/05/2023).

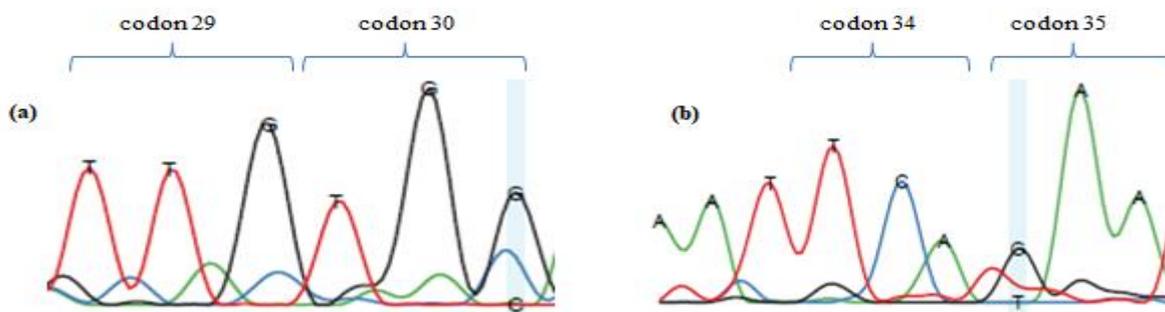


Figure 15: Le schéma de séquençage du gène *KRAS* par séquençage Sanger : (a) la mutation C88C>G(pAsp30His) dans le cas n54 ; (b) la mutation C105T>G(pThr35thr) dans le cas n 42.

Il est important de noter que 18 échantillons (85,71 %) présentait plus d'une mutation.

Tableau 11: La distribution des types de mutation KRAS

Changement de base	Changement d'acide aminé	Fréquence	%
C109C>A	Glu37Stop	9	42,85
C106T>G	Ile36Leu	1	4,76
C105T>G	Thr35thr	5	23,80
C93T>G	Glu31His	3	14,28
C91C>A	Glu31Stop	10	47,61
C88C>G	Asp30His	4	19,04
C86A>T	Val29Glu	4	19,04
C83A>T	Phe28Tyr	1	4,76
C82A>C	Phe28Val	1	4,76
C81A>C	His27Gln	2	9,52
C78A>C	Asn26Lys	3	14,28
C75C>A	Gln25Asp	10	47,61

Glu : acide glutamique, **Ile** : Isoleucine, **Leu** : leucine, **Thr** : Thréonine, **Asp** : acide aspartique, **His** : Histidine, **Val** : Valine, **Phe** : phénylananine, **Tyr** : Tyrosine, **Gln** : Glutamine, **Asn** : Asparagine, **Lys** : Lysine.

3.5.3. Les caractéristiques clinico-pathologiques selon le statut mutationnel de KRAS

Comme le tableau 10 le montre, 76,47% des femmes et 42,11% des hommes présentaient une mutation du l'exon 2 du gène KRAS. 75% (n=9) des cas de moins de 59 ans présentaient une mutation KRAS, on citant 5 cas qui montraient une mutation C109C>A(pGlu37stop) et 4 cas qui présentaient la substitution C91C>A(pGlu31stop), cette dernière était présente même chez 6 cas du groupe muté (50%, n= 12) de plus de 60 ans.

Il a été observé aussi que 57,70% des cas de cancer colique révèle une mutation KRAS dont les codons 25 (C75C>A) et 37 (C109C>A) présentaient la fréquence la plus élevée, d'un autre côté 60 % de cancer rectal ont montré une positivité pour la mutation KRAS.

Pour le degré de différenciation des adénocarcinomes, 53,84% de degrés bien différenciés, 66,67% moyennement différencié et 75% mal différencié présentaient des mutations KRAS.

3.6. Discussion

Le CCR est largement considéré comme une maladie hétérogène, avec de multiples altérations génétiques et de nombreuses voies impliquées dans sa pathogenèse (**Fearon et Vogelstein, 1990**). Le réseau Cancer Genome Atlas (TCGA) a réalisé une caractérisation

moléculaire complète des tumeurs coliques et rectales (**Mondaca et Yaeger, 2018**). Les mutations génétiques les plus courantes dans le CCR sont la mutation du gène APC (30 à 70 %), la mutation TP53 (43 %), de plus environ 40 à 52 % des cas de CCR sont caractérisés par une mutation du gène KRAS (**Ye et al., 2020**).

Le gène KRAS contient 4 exons codants et 1 exon non codant, dont l'exon 2 a le taux de mutation le plus élevé, ce qui est directement associé à la survenue d'un mauvais pronostic et d'une résistance aux médicaments (**Perkins et al., 2014**). Selon la base de données du catalogue des mutations somatiques dans le cancer (COSMIC), les mutations au niveau du codon 12 (G12A, G12V, G12S, G12R, G12C, G12D) sont les plus importantes (>90%), suivies de celles affectant le codon 13 (G13D et G13C) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

Il existe un certain nombre de méthodologies différentes qui peuvent être utilisées pour la détection des mutations de l'ADN mais le séquençage direct, à savoir la PCR suivie d'un séquençage, reste la méthode de référence pour détecter les mutations. Cette méthode est capable de détecter toutes les mutations dans la région d'intérêt, mais elle nécessite une fréquence allélique élevée de mutation (10 à 30 %) pour atteindre le niveau de détection, ce qui suggère qu'elle peut ne pas être appropriée pour une application clinique en raison de sa sensibilité (**Do et al., 2008**), c'est pour cela, de nouvelles méthodologies permettant une analyse plus rapide et plus fiable est utilisé notamment la PCR numérique, la PCR spécifique d'allèle (l'ARMS; *amplification refractory mutation system*) et le séquençage de nouvelle génération (NGS) (**Tol et al., 2009**). Il convient de noter que pour la détection des mutations du gène KRAS, on utilise le plus souvent des échantillons de tissus d'archives paraffinés, d'où l'importance de la méthodologie utilisée pour l'extraction de l'ADN. La sensibilité et la spécificité de chaque méthode étant influencées par la proportion de cellules cancéreuses dans l'échantillon, la macrodissection est généralement utilisée pour enrichir l'échantillon en cellules tumorales et éliminer les cellules normales (**Whitehall et al., 2009**).

Dans cette partie de notre travail, l'expression moléculaire de l'exon 2 du gène KRAS a été étudiée par séquençage Sanger au niveau de 36 cas de CCR, et la corrélation de cette mutation avec les caractères clinico-pathologiques a été réalisée.

Les échantillons analysés dans notre étude avait une fréquence de mutation de 58,33%, similaire à ce qui a été rapporté dans une étude de l'est Algérien réalisé par **Mazouzi (2017)** dont ils ont trouvé 51.17% des patients avec KRAS muté, mais plus élevés qu'une autre réalisé dans notre pays aussi par **Boudida-Berkane et al (2016)** qui ont identifié la mutation KRAS dans 31.3% des échantillons.

Des études sur le CCR en Afrique du Nord y compris le Maroc, la Tunisie, l'Égypte et la Libye ont montré des différences frappantes dans la fréquence du KRAS. Au Maroc la fréquence de mutation d'exon 2 du gène KRAS a été rapportée comme étant de l'ordre de 29% à 51% (**Jafari et al., 2022**). La Tunisie met en évidence un large éventail de taux de mutations KRAS, allant de 23,1 % (**Sammoud et al., 2012**) à 65,11% (**Jouini et al., 2019**), par rapport aux autres pays de la région. En Égypte, 27,4% des cas testés présentaient un KRAS muté (**Garawin et al., 2016**), et en Libye, la fréquence était de 38,2% (**Abudabous et al., 2022**).

D'autres études autour du monde ont rapporté des fréquences divergentes de ce type de mutation tels que Nigeria (21%), l'Arabie Saoudite (32%), Espagne (48%), la Turquie (49,1 %) et les États-Unis avec une fréquence allant jusqu'à 83% (**Jafari et al., 2022**).

En désaccord avec COSMIC et la littérature scientifique, les types des mutations les plus fréquentes qui ont été détectées dans notre population étaient le codon 31 (lys31Glu, lys31Asp) avec 61,90%, le codon 25 (47,62%) et le codon 35 (23,81%), en plus aucune mutation n'a été détecté au niveau de codon 12 ou 13 qui sont considéré comme des points chauds des mutations, ces résultats doivent être étudiés et clarifiés par d'autres analyses moléculaires.

La mutation de codon 35 a été déjà décrite dans une étude de pays bas et présentait 10% des cas étudiés (**Mostert et al., 2013**), par ailleurs, La mutation du codon 31 a déjà été décrite dans une étude Pakistanaise ainsi qu'une autre en Chine mais avec une faible fréquence (5% et 7% respectivement) [(**Murtaza et al., 2014**) ; (**Li et al., 2017**)]. De plus, nous avons détecté une mutation au niveau du codon 30 dans 4/21 cas (19,05%) ce qui a été déjà identifié dans une étude Italienne mais avec un plus faible taux (0,9%) (**Palmirota et al., 2012**). En revanche, tous les autres types de mutation a été identifiés pour la première fois dans le CCR dans notre population étudiée.

À l'échelle mondiale, un constat récurrent dans la littérature concerne la diversité significative de la fréquence ainsi que des types de mutations du gène KRAS, observée parmi les différents groupes raciaux, sous l'influence de divers facteurs environnementaux et génétiques (**Yoon et al., 2015**).

Conclusion

Conclusion

En conclusion, notre étude a pu mettre en évidence une hétérogénéité tumorale et mutationnelle dans les CCR. L'évaluation du profil épidémiologique a montré que le cancer colorectal dans notre région est le 3ème cancer le plus incident chez les femmes ainsi que chez les hommes. Au total, 581 cas de CCR ont été trouvés durant cette période avec une prédominance masculine (55,4%) et un âge moyen de 60 ± 13 ans, l'adénocarcinome colique était le type largement prédominant.

Malgré les avancées continues dans le domaine de la prise en charge médicale des patients atteints de cancer colorectal, la mortalité liée à cette maladie demeure préoccupante. Ce constat soulève l'importance de développer de nouvelles approches pour améliorer les résultats et réduire la mortalité associée à cette forme de cancer.

Dans le deuxième volet de notre recherche, dont l'objectif était de détecter la présence de l'ADN de Papillomavirus humain et le virus d'Epstein Barr au niveau de cancer colorectal sur une collection de 96 échantillons paraffiné. Le HPV a été détecté dans seulement 3/96 cas (3,12%), alors que le EBV n'a pas pu être détectée dans aucun des échantillons. Il est important de noter que la prévalence des HPV et d'EBV peut varier d'une zone géographique à l'autre. Cette variation peut être attribuée aussi à plusieurs facteurs, tels que la taille des études réalisées, la sensibilité de la technique utilisée pour la détection, les types de tissus examinés et la diversité de la population étudiée.

Dans le dernier volet de notre recherche, la fréquence des mutations d'exon 2 du gène KRAS au sein de 36 échantillons du cancer colorectal a été déterminé. 12 mutations différentes chez 21 patients (58,33%) ont été détectées, dont les trois principales mutations trouvées étaient dans le codon 31 (61,90%), le codon 25 (47,62%) et le codon 35 (23,81%), ces résultats sont contradictoires avec la littérature qui indique que le codon 12 et 13 sont les points chauds des mutations de gène KRAS (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) doivent être confirmés par d'autres techniques.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de réaliser des études sur un plus grand échantillonnage de patients provenant de plusieurs centres, ainsi que l'utilisation du séquençage de nouvelle génération (NGS) pour obtenir des informations précises sur les multiples mutations grâce à un seul test. Cette approche permettrait également de collecter des données sur les sites d'intégration du génome viral et les éventuels réarrangements du génome humain qui en découlent, offrant ainsi une compréhension approfondie des mécanismes moléculaires mis en jeu.

Conclusion

Il est recommandé que le gouvernement mette en place une politique de prévention du cancer colorectal et des programmes de santé publique afin d'accroître la sensibilisation du public aux facteurs de risque liés au mode de vie, notamment l'activité physique, le tabagisme, l'alcool, la consommation excessive de viande rouge ainsi qu'une mise en place d'une politique de dépistage des infections par les oncovirus, ce qui pourraient contribuer à la prévention et à la réduction du développement de ces tumeurs malignes et de leurs métastases y compris les cancers colorectaux.

Bibliographie

Abbes, A., Rechreche, H., Brinet, R., Boulkhiout,S., Souilah,N., Benali, M. (2018). Retrospectivestudy of epidemiological, clinicopathological and biological profiles of 62 colorectal cancers cases in jijel province (Algeria). *Journal of fundamental and applied sciences*, 10(1): 59-82.

Abraham L Kierszenbaum., Laura L Tres. (2019). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology 5th Edition.* Elsevier. 978-0323673211

Abudabous, A., Drah, M., Aldehmani, M., Parker, I., & Alqawi, O. (2021). KRAS mutations in patients with colorectal cancer in Libya. *Molecular and clinical oncology*, 15(4), 1-6.

Agyemang-Yeboah, F., Yorke, J., Obirikorang, C., Batu, E. N., Acheampong, E., Frempong, E. A., Anto, E. O., & Amankwaa, B. (2017). Patterns and presentations of colorectal cancer at Komfo-Anokye teaching hospital Kumasi, Ghana. *The Pan African medical journal*, 28, 121. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.121.12927>

Aitken, C., Sengupta, S. K., Aedes, C., Moss, D. J., & Sculley, T. B. (1994). Heterogeneity within the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 gene in different strains of Epstein-Barr virus. *The Journal of general virology*, 75 (Pt 1), 95–100. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-1-95>

Al Dahhan, S. A., Al Lami, F. H. (2018). Epidemiology of Colorectal Cancer in Iraq, 2002-2014. *The Gulf journal of oncology*, 1(26), 23–26.

Al Moustafa, A. E., Al-Antary, N., Aboukassim, T., Akil, N., Batist, G., & Yasmeen, A. (2016). Co-prevalence of Epstein-Barr virus and high-risk human papillomaviruses in Syrian women with breast cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(7), 1936–1939. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1139255>

Al-Antary, N., Farghaly, H., Aboukassim, T., Yasmeen, A., Akil, N., & Al Moustafa, A. E. (2017). Epstein-Barr virus and its association with Fascin expression in colorectal cancers in the Syrian population: A tissue microarray study. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(7), 1573–1578. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1302046>

Ali Khan, U., Fallah, M., Tian, Y., Sundquist, K., Sundquist, J., Brenner, H., & Kharazmi, E. (2020). Personal History of Diabetes as Important as Family History of Colorectal Cancer for Risk of Colorectal Cancer: A Nationwide Cohort Study. *The American journal of gastroenterology*, 115(7), 1103–1109. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000669>

Allen-Vercoe, E., Strauss, J., & Chadee, K. (2011). Fusobacterium nucleatum: an emerging gut pathogen?. *Gut microbes*, 2(5), 294–298.

<https://doi.org/10.4161/gmic.2.5.18603>

Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53(4), 549–554. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90571-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90571-5)

Alves Martins, B. A., de Bulhões, G. F., Cavalcanti, I. N., Martins, M. M., de Oliveira, P. G., & Martins, A. M. A. (2019). Biomarkers in Colorectal Cancer: The Role of Translational Proteomics Research. *Frontiers in oncology*, 9, 1284. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01284>

Antonic, V., Stojadinovic, A., Kester, K. E., Weina, P. J., Brücher, B. L., Protic, M., Avital, I., & Izadjoo, M. (2013). Significance of infectious agents in colorectal cancer development. *Journal of Cancer*, 4(3), 227–240. <https://doi.org/10.7150/jca.5835>

Aparicio, T., Mittr, Y E., Sa Cunha, A., Giprad, L. (2005). Prise en charge des cancers colorectaux des sujets âgés. *Gastroenterol clin biol*. 29: 1014-23.

Aran, V., Victorino, A. P., Thuler, L. C., & Ferreira, C. G. (2016). Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. *Clinical colorectal cancer*, 15(3), 195-203.

Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal cancer research : GCR*, 5(1), 19–27.

Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Garcia-Aguilar, J., & Kim, J. (2012). Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 13(10), 12153–12168. <https://doi.org/10.3390/ijms131012153>

Audouin, J., Diebold, J., Nathwani, B., Ishak, E., MacLennan, K., Mueller-Hermelink, H. K., ... & Weisenburger, D. D. (2010). Epstein–Barr virus and Hodgkin’s lymphoma in Cairo, Egypt. *Journal of hematopathology*, 3, 11-18.

Awedew, A.F., Asefa, Z. & Belay, W.B. (2022). Burden and trend of colorectal cancer in 54 countries of Africa 2010–2019: a systematic examination for Global Burden of Disease. *BMC Gastroenterol* 22, 204. <https://doi.org/10.1186/s12876-022-02275-0>

Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., & Séguin, C. (1984). DNA sequence and

expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207–211.
<https://doi.org/10.1038/310207a0>

Baidoun, F., Elshiw, K., Elkerai, Y., Merjaneh, Z., Khoudari, G., Sarmini, M. T., Gad, M., Al-Husseini, M., & Saad, A. (2021). Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Current drug targets*, 22(9), 998–1009.
<https://doi.org/10.2174/1389450121999201117115717>

Bajaj, B. G., Murakami, M., & Robertson, E. S. (2007). Molecular biology of EBV in relationship to AIDS-associated oncogenesis. *Cancer treatment and research*, 133, 141–162.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-46816-7_5

Bedri, S., Sultan, A. A., Alkhalaf, M., Al Moustafa, A. E., & Vranic, S. (2019). Epstein-Barr virus (EBV) status in colorectal cancer: a mini review. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(3), 603–610. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1543525>

Belhamidi, M. S., Sinaa, M., Kaoukabi, A., Krimou, H., Menfaa, M., Sakit, F., & Choho, A. (2018). Profil épidémiologique et anatomopathologique du cancer colorectal: à propos de 36 cas [Epidemiological and pathological profile of colorectal cancer: about 36 cases]. *The Pan African medical journal*, 30, 159.
<https://doi.org/10.11604/pamj.2018.30.159.15061>

Bensaada, F. Z., Cadi, H. O., Sahraoui, T., & El Kebir, F. Z. (2017). Colorectal Cancer: Epidemiological Study, Clinical, Histological and Immunohistochemistry Examination in Patient of West Algeria. *Journal of Cancer Therapy*, 8(01), 26.

Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., Van Doorslaer, K., Zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70-79.

Biesaga, B., Janecka-Widla, A., Kolodziej-Rzepa, M., Slonina, D., Darasz, Z., & Gasińska, A. (2019). The prevalence of HPV infection in rectal cancer - Report from South - Central Poland (Cracow region). *Pathology, research and practice*, 215(9), 152513.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152513>

Biggin, M., Bodescot, M., Perricaudet, M., & Farrell, P. (1987). Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells. *Journal of virology*, 61(10), 3120–3132.
<https://doi.org/10.1128/JVI.61.10.3120-3132.1987>

Biller LH, Schrag D.(2021). Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *JAMA*; 325(7):669-685.

Blackmore, T., Lao, C., Chepulis, L., Page, B., & Lawrenson, R. (2020). The characteristics and outcomes of patients with colorectal cancer in New Zealand, analysed by Cancer Network. *The New Zealand medical journal*, 133(1513), 42–52.

Bodaghi, S., Yamanegi, K., Xiao, S. Y., Da Costa, M., Palefsky, J. M., & Zheng, Z. M. (2005). Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(8), 2862–2867. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1680>

Bodily, J., & Laimins, L. A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology*, 19(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.10.002>

Boguszaková, L., Hirsch, I., Bricháček, B., Faltýn, J., Fric, P., Dvoráková, H., & Vonka, V. (1988). Absence of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and papillomavirus DNA from adenoma and adenocarcinoma of the colon. *Acta virologica*, 32(4), 303–308.

Borza, C. M., & Hutt-Fletcher, L. M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature medicine*, 8(6), 594–599. <https://doi.org/10.1038/nm0602-594>

Boudida-Berkane, K., Benchaa, H., Kaci, H. A., Oukkal, M., Mahfouf, H., & Bouzid, K. (2016). Molecular analysis and clinicopathologic features of advanced colorectal cancer in algerian patients. *Edorium Journal of Tumor Biology*, (3), 1-8.

Bouguenouch, L., Samri, I., Belhassan, K., Sayel, H., Abbassi, M., Bennis, S., ... & Ouldim, K. (2016). Syndrome de Lynch: à propos d'un cas et revue de la littérature. *The Pan African Medical Journal*, 24.

Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., ... & Coglianò, V. (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The lancet oncology*, 10(4), 321-322.

Bouvier, AN., Trélarre, B., Delafosse, P., Grosclaude, P., Jéhannin-Ligier, K., Marrer, E., Woronoff, A S., Uhry, Z. (2018). Stade au diagnostic des cancers de sein du colon et du rectum. *Registre des cancers du réseau Francim*.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Brazil, D. P., & Hemmings, B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in biochemical sciences*, 26(11), 657–664. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01958-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01958-2)

Broniarczyk, J., D. Pim, P. Massimi, M. Bergant, A. Gozdicka-Jozefiak, C. Crump and L. Banks (2017). "The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly." *Sci Rep* 7: 45159.

Brown, J. C., Caan, B. J., Prado, C. M., Cespedes Feliciano, E. M., Xiao, J., Kroenke, C. H., & Meyerhardt, J. A. (2020). The Association of Abdominal Adiposity With Mortality in Patients With Stage I-III Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 112(4), 377–383. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz150>

Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in african children. *Br. J. Surg.* 46, 218–223.

Buyru, N., Tezol, A., & Dalay, N. (2006). Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC cancer*, 6, 1-5.

Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a007906. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>

Califf, RM. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med.* 243:213–21. doi: 10.1177/1535370217750088

Camargo, M., Soto-De Leon, S., Sanchez, R., Munoz, M., Vega, E., Beltran, M., Perez-Prados, A., Patarroyo, M. E., & Patarroyo, M. A. (2011). Detection by PCR of human papillomavirus in Colombia: Comparison of GP5+/6+ and MY09/11 primer sets. *Journal of virological methods*, 178(1-2), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.08.014>

Cary, L. A., Han, D. C., & Guan, J. L. (1999). Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histology and histopathology*, 14(3), 1001–1009. <https://doi.org/10.14670/HH-14.1001>

Casarotto, M., Fanetti, G., Guerrieri, R., Palazzari, E., Lupato, V., Steffan, A., Polesel, J., Boscolo-Rizzo, P., & Fratta, E. (2020). Beyond MicroRNAs: Emerging Role of Other Non-Coding RNAs in HPV-Driven Cancers. *Cancers*, 12(5), 1246. <https://doi.org/10.3390/cancers12051246>

Chang, Y., Tung, C. H., Huang, Y. T., Lu, J., Chen, J. Y., & Tsai, C. H. (1999). Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal

carcinoma cells and keratinocytes. *Journal of virology*, 73(10), 8857–8866.
<https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8857-8866.1999>

Chatterjee, K., Das, P., Chattopadhyay, N. R., Mal, S., & Choudhuri, T. (2019). The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon*, 5(11), e02624.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02624>

Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., & Nevins, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4549–4553.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4549>

Cheng, L., Maurange, C., Gould, A. (2008). Temporal transcription factors schedule the end of neurogenesis via cell cycle exit or apoptosis. *A. Dros. Res. Conf.* 49 : 144.

Chesnokova, L. S., & Hutt-Fletcher, L. M. (2014). Epstein-Barr virus infection mechanisms. *Chinese journal of cancer*, 33(11), 545–548.
<https://doi.org/10.5732/cjc.014.10168>

Chhikara, B. S., & Parang, K. (2022). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451. Retrieved from <https://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/451>

Chiu, Y. F., & Sugden, B. (2016). Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annual review of virology*, 3(1), 359–372. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042358>

Cho, Y. J., Chang, M. S., Park, S. H., Kim, H. S., & Kim, W. H. (2001). In situ hybridization of Epstein-Barr virus in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes of the gastrointestinal tract. *Human pathology*, 32(3), 297–301.
<https://doi.org/10.1053/hupa.2001.22766>

Clifford, G. M., Gallus, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P. J., Vaccarella, S., Anh, P. T., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Matos, E., Molano, M., Rajkumar, R., Ronco, G., de Sanjosé, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Thomas, J. O., Tunsakul, S., Meijer, C. J., Franceschi, S., ... IARC HPV Prevalence Surveys Study Group (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled

analysis. *Lancet* (London, England), 366(9490), 991–998. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67069-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67069-9)

Cohen, J. I. (2000). Epstein–Barr virus infection. *New England journal of medicine*, 343(7), 481-492.

Cohen, S. J., Punt, C. J., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M. A., Mitchell, E., Miller, M. C., Doyle, G. V., Tissing, H., Terstappen, L. W., & Meropol, N. J. (2009). Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 20(7), 1223–1229. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn786>

Costedio, M., & Church, J. (2011). Pathways of carcinogenesis are reflected in patterns of polyp pathology in patients screened for colorectal cancer. *Diseases of the colon & rectum*, 54(10), 1224-1228.

Couturier, J., Sastre-Garau, X., Schneider-Maunoury, S., Labib, A., & Orth, G. (1991). Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *Journal of virology*, 65(8), 4534–4538. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4534-4538.1991>

Crohn,B; Rosenburg, H.(1925). The simoidoscopic picture of ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci* ; 170: 220–8.

Cubie H. A. (2013). Diseases associated with human papillomavirus infection. *Virology*, 445(1-2), 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.007>

Cyprian, F. S., Al-Farsi, H. F., Vranic, S., Akhtar, S., & Al Moustafa, A. E. (2018). Epstein–Barr virus and human papillomaviruses interactions and their roles in the initiation of epithelial–mesenchymal transition and cancer progression. *Frontiers in Oncology*, 8, 111.

Damin, D. C., Caetano, M. B., Rosito, M. A., Schwartzmann, G., Damin, A. S., Frazzon, A. P., Ruppenthal, R. D., & Alexandre, C. O. (2007). Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 33(5), 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2007.01.014>

Darré,T., Amégbor,K., Bagny,A., Sewa, E., Tchangai, B., Sakiye,A. Allasani, F., Bouglouga, O., Lawson, AO., Napo-Koura,G.(2014). Histo-epidemiological profile of the colorectal cancers in Togo. *Journal Africain d’Hépatogastroentérologie*. 8:226-229.

DOI 10.1007/s12157-014-0568-2.

Day, P. M., C. C. Baker, D. R. Lowy and J. T. Schiller (2004). "Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14252-14257.

de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17–27

Deniz, Z., Uraz, S., Holem, R., Ozaras, R., & Tahan, V. (2022). Human Papillomavirus Infection and Oropharyngeal and Gastrointestinal Cancers: A Causal Relationship?. *Diseases* (Basel, Switzerland), 10(4), 94. <https://doi.org/10.3390/diseases10040094>

Deschoolmeester, V., Van Marck, V., Baay, M., Weyn, C., Vermeulen, P., Van Marck, E., Lardon, F., Fontaine, V., & Vermorken, J. B. (2010). Detection of HPV and the role of p16INK4A overexpression as a surrogate marker for the presence of functional HPV oncoprotein E7 in colorectal cancer. *BMC cancer*, 10, 117. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-117>

Di Gregorio, C., Losi, L., Fante, R., Modica, S., Ghidoni, M., Pedroni, M., Tamassia, M. G., Gafà, L., Ponz de Leon, M., & Roncucci, L. (1997). Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology*, 30(4), 328–334. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1997.d01-626.x>

Diallo Owono, F. K., Nguema Mve, R., Ibaba, J., Mihindou, C., & Ondo N'dong, F. (2011). Aspects épidémiologiques et diagnostiques des cancers colorectaux à Libreville (Gabon) [Epidemiological and diagnostic features of colorectal cancer in Libreville, Gabon]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*, 71(6), 605–607.

Do, H., Krypuy, M., Mitchell, P.L., Fox, S.B., and Dobrovic, A. (2008). High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 8, 142.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55–F70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>

Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P., & Münger, K. (2001). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer research*, 61(6), 2356–2360.

Dunmire, S. K., Verghese, P. S., & Balfour, H. H., Jr (2018). Primary Epstein-Barr virus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 102, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.03.001>

El Housse, H., Ajbara, W., Amsaguine, S., El Amrani, N., Drissi, H., Ahallat, M., Radallah ; M. (2015). Profils épidémiologique et anatomoclinique d'une population marocaine atteinte de cancer colorectal. *J Afr Cancer* 7, 95–99. <https://doi.org/10.1007/s12558-014-0352-3>

Epstein, M.A., and Barr, Y.M. (1964). CULTIVATION IN VITRO OF HUMAN LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S MALIGNANT LYMPHOMA. *Lancet Lond. Engl.* 1, 252–253.

Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J. Exp. Med.* 121, 761–770.

Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, 61(5), 759-767.

Fehrmann, F., & Laimins, L. A. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22(33), 5201–5207. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206554>

Feng, Y. C., Ji, W. L., Yue, N., Huang, Y. C., & Ma, X. M. (2018). The relationship between the PD-1/PD-L1 pathway and DNA mismatch repair in cervical cancer and its clinical significance. *Cancer management and research*, 10, 105–113. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S152232>

Fernandes, Q., Gupta, I., Murshed, K., Abo Samra, H., Al-Thawadi, H., Vranic, S., Petkar, M., Babu, G. R., & Al Moustafa, A. E. (2023). Coinfection of HPVs Is Associated with Advanced Stage in Colorectal Cancer Patients from Qatar. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(3), 424. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030424>

Fernandes, Q., Gupta, I., Vranic, S., & Al Moustafa, A. E. (2020). Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus Interactions in Colorectal Cancer: A Brief Review. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(4), 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040300>

Fernandes, Q., Merhi, M., Raza, A., Inchakalody, V. P., Abdelouahab, N., Zar Gul, A. R., Uddin, S., & Dermime, S. (2018). Role of Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers and Its Potential as an Immunotherapeutic Target. *Frontiers in oncology*, 8, 257. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00257>

Fink, S. E. K., Gandhi, M. K., Nourse, J. P., Keane, C., Jones, K., Crooks, P., ... & Trappe, R. U. (2014). A comprehensive analysis of the cellular and EBV-specific

microRNAome in primary CNS PTLID identifies different patterns among EBV-associated tumors. *American Journal of Transplantation*, 14(11), 2577-2587.

Fiorina, L., Ricotti, M., Vanoli, A., Luinetti, O., Dallera, E., Riboni, R., Paolucci, S., Brugnatelli, S., Paulli, M., Pedrazzoli, P., Baldanti, F., & Perfetti, V. (2014). Systematic analysis of human oncogenic viruses in colon cancer revealed EBV latency in lymphoid infiltrates. *Infectious agents and cancer*, 9, 18. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-18>

Fujishita, T., Aoki, K., Lane, H. A., Aoki, M., & Taketo, M. M. (2008). Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in *ApcDelta716* mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13544–13549. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800041105>

Gallot, D. (2006). Anatomie chirurgicale du côlon. EMC - Techniques Chirurgicales - Appareil Digestif, 1(2), 1–8. doi:10.1016/s0246-0424(06)43514-7

Garawin, T., Lowe, K., Kafatos, G., & Murray, S. (2016). The prevalence RAS and BRAF mutations among patients in the Middle East and Northern Africa with metastatic colorectal cancer.

Gartner et Hiatt (2014). *Color Atlas and Text of Histology* (6e éd.). Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins. [ISBN 978-1-4511-1343-3](https://doi.org/10.1016/s0246-0424(06)43514-7).

Gatta, G., Ciccolallo, L., Capocaccia, R., Coleman, M. P., Hakulinen, T., Møller, H., ... & EURO CARE Working Group. (2003). Differences in colorectal cancer survival between European and US populations: the importance of sub-site and morphology. *European journal of cancer*, 39(15), 2214-2222.

Gazzaz, F., Mosli, M. H., Jawa, H., & Sibiany, A. (2016). Detection of human papillomavirus infection by molecular tests and its relation to colonic polyps and colorectal cancer. *Saudi medical journal*, 37(3), 256–261. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.3.13514>

Gerber, P., Nkrumah, F. K., Pritchett, R., & Kieff, E. (1976). Comparative studies of Epstein-Barr virus strains from Ghana and the United States. *International journal of cancer*, 17(1), 71–81. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170111>

Ghazanfar, S., Fatima, I., Aslam, M., Musharraf, S. G., Sherman, N. E., Moskaluk, C., Fox, J. W., Akhtar, M. W., & Sadaf, S. (2017). Identification of actin beta-like 2 (ACTBL2) as novel, upregulated protein in colorectal cancer. *Journal of proteomics*, 152, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.011>

Giacosa, A., Frascio, F., & Munizzi, F. (2004). Epidemiology of colorectal polyps. *Techniques in coloproctology*, 8 Suppl 2, s243–s247. <https://doi.org/10.1007/s10151-004-0169-y>

GLOBOCAN2020_Annex_E.xlsx is available at <https://gco.iarc.fr>

Goel, A., Nagasaka, T., Arnold, C. N., Inoue, T., Hamilton, C., Niedzwiecki, D., ... & Boland, C. R. (2007). The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*, 132(1), 127-138.

Goldman, L ; Masson, P.L. (2015). *Goldman's Cecil Medicine Cancérologie*. Elsevier Health Sciences. 24 edition . 336p.

Gowdra Halappa, V., Corona Villalobos, C. P., Bonekamp, S., Gearhart, S. L., Efron, J., Herman, J., & Kamel, I. R. (2012). Rectal imaging: part 1, High-resolution MRI of carcinoma of the rectum at 3 T. *AJR. American journal of roentgenology*, 199(1), W35–W42. <https://doi.org/10.2214/AJR.11.8134>

Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076>

Graham, A., Adeloje, D., Grant, L., Theodoratou, E., & Campbell, H. (2012). Estimating the incidence of colorectal cancer in Sub-Saharan Africa: A systematic analysis. *Journal of global health*, 2(2), 020404. <https://doi.org/10.7189/jogh.02.020204>

Greene, FL. (2007). Stadification TNM actuelle du cancer colorectal. *L'oncologie lancette*. ; 8 (7):572–573.

Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L., & Miller, G. (1987). Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), 1332–1336. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1332>

Grywalska, E., & Rolinski, J. (2015). Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Seminars in oncology*, 42(2), 291–303. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.030>

Guidry, J. T., & Scott, R. S. (2017). The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus research*, 231, 139-147.

Guilfoile, P. (2019). *Human Papillomavirus*. Infobase Holdings. 1438139438, 9781438139432.

Guo, Y., & Li, H. Y. (2014). Association between *Helicobacter pylori* infection and colorectal neoplasm risk: a meta-analysis based on East Asian population. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10 Suppl, 263–266. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.151482>

Gupta, I., Al Farsi, H., Jabeen, A., Skenderi, F., Al-Thawadi, H., AlAhmad, Y. M., Al Moustafa, A. E., & Vranic, S. (2020). High-Risk Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer and Their Association with Clinicopathological Status. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(6), 452. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060452>

Gupta, I., Jabeen, A., Vranic, S., Al Moustafa, A. E., & Al-Thawadi, H. (2021). Oncoproteins of high-risk HPV and EBV cooperate to enhance cell motility and invasion of human breast cancer cells via Erk1/Erk2 and β -catenin signaling pathways. *Frontiers in Oncology*, 11, 630408.

Guraya, S. Y., & Eltinay, O. E. (2006). Higher prevalence in young population and rightward shift of colorectal carcinoma. *Saudi medical journal*, 27(9), 1391–1393.

Gyde, S., Prior, P., Dew, M. J., Saunders, V., Waterhouse, J. A., & Allan, R. N. (1982). Mortality in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 83(1 Pt 1), 36–43.

Hamdi Y, Abdeljaoued-Tej I, Zatchi AA, Abdelhak S, Boubaker S, JS and Benkahla A (2021). Cancer in Africa: The Untold Story. *Front. Oncol.* 11:650117. doi: 10.3389/fonc.2021.65011

Hao, J. J., Zhi, X., Wang, Y., Zhang, Z., Hao, Z., Ye, R., Tang, Z., Qian, F., Wang, Q., & Zhu, J. (2017). Comprehensive Proteomic Characterization of the Human Colorectal Carcinoma Reveals Signature Proteins and Perturbed Pathways. *Scientific reports*, 7, 42436. <https://doi.org/10.1038/srep42436>

Heinen C.D., Shivapurkar N., Tang Z., Groden J., Alabaster O. (1996). Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons *Cancer Res.* 56 : 5339-5341

Henle G, Henle W (1966). Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* 91:1248–1256

Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G. W., Kirya, B. G., Klein, G., Morrow, R. H., Munube, G. M., Pike, P., Tukei, P. M., & Ziegler, J. L. (1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *Journal of the National Cancer Institute*, 43(5), 1147–1157.

Henry, S., Sacaze, C., Berrajah, L., Karray, H., Drira, M., Hammami, A., Icart, J., & Mariame, B. (2001). In nasopharyngeal carcinoma-bearing patients, tumors and lymphocytes are infected by different Epstein-Barr virus strains. *International journal of cancer*, 91(5), 698–704. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::aid-ijc1110>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1110>3.0.co;2-2)

Heresbach, D ; Le Berre, H.N. (2003). Les foyers de cryptes aberrantes (FCA) coliques : une lésion précancéreuse à dépister ?. *La lettre du l'hépto-gastroentérologue* . vol. VI (1).

Houlston, R. S., Webb, E., Broderick, P., Pittman, A. M., Di Bernardo, M. C., Lubbe, S., Chandler, I., Vijaykrishnan, J., Sullivan, K., Penegar, S., Carvajal-Carmona, L., Howarth, K., Jaeger, E., Spain, S. L., Walther, A., Barclay, E., Martin, L., Gorman, M., ... Dunlop, M. G. (2008). Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nature Genetics*, 40(12), 1426-1435. <https://doi.org/10.1038/ng.262>

Høydahl, Ø., Edna, TH., Xanthoulis, A., Lydersen, S., Endreseth, BH. (2020). Long-term trends in colorectal cancer: incidence, localization, and presentation. *BMC Cancer* 20, 1077. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07582-x>

Hussein, K., Maecker-Kolhoff, B., Donnerstag, F., Laenger, F., Kreipe, H., & Jonigk, D. (2013). Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumours after transplantation, infection with human immunodeficiency virus and congenital immunodeficiency syndromes. *Pathobiology*, 80(6), 297-301.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Meeting, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. (2007). Human Papillomaviruses Volume 90 de IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals. IARC Monographs. World Health Organization. ISSN 1017-1606

Ibragimova, M. K., Tsyganov, M. M., & Litviakov, N. V. (2018). Human papillomavirus and colorectal cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 35(11), 140. <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1201-9>

Ibrahim, S., Ahmed, H., & Zangana, S. (2022). Trends in colorectal cancer in Iraq over two decades: incidence, mortality, topography and morphology. *Annals of Saudi medicine*, 42(4), 252–261. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2022.252>

Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2012). Molecular typing of colorectal cancer: applications in diagnosis and treatment. *Diagnostic Histopathology*, 18(2), 70-80.

Ickinson, AB., Kieff, E. (2007). Epstein–Barr virus. In *Fields Virology*, ed. DM Knipe, PM Howley, pp. 2655–700.

Inagaki, T., Sato, Y., Ito, J., Takaki, M., Okuno, Y., Yaguchi, M., Masud, H. M. A. A., Watanabe, T., Sato, K., Iwami, S., Murata, T., & Kimura, H. (2021). Direct Evidence of Abortive Lytic Infection-Mediated Establishment of Epstein-Barr Virus Latency During B-Cell Infection. *Frontiers in microbiology*, 11, 575255. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575255>

Iorga, L., Dragos Marcu, R., Cristina Diaconu, C., Maria Alexandra Stanescu, A., Pantea Stoian, A., Liviu Dorel Mischianu, D., Surcel, M., Bungau, S., Constantin, T.,

Boda, D., Fekete, L., & Gabriel Bratu, O. (2020). Penile carcinoma and HPV infection (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 20(1), 91–96.

<https://doi.org/10.3892/etm.2019.8181>

Jafari, M., Laraqui, A., Baba, W., Benmokhtar, S., Zaitouni, S. E., Ali, A. A., Bounaim, A., Moujahid, M., Tanz, R., Mahfoud, T., Sbitti, Y., Annaz, H. E., Abi, R., Tagajdid, M. R., Kochri, S. E., Lahlou, I. A., Hsaini, H. E., Belayachi, L., Benjouad, A., Ichou, M., ... Ennibi, K. (2022). Prevalence and patterns of mutations in RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK signaling pathway in colorectal cancer in North Africa. *BMC cancer*, 22(1), 1142. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10235-w>

Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>

Jass, J. R. (2000). Mucin core proteins as differentiation markers in the gastrointestinal tract. *Histopathology*, 37(6), 561-564.

Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D., & Kieff, E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16286–16291.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0407320101>

John Doorbar (2005). The papillomavirus life cycle. , 32(supp-S), 0–15. doi:10.1016/j.jcv.2004.12.006

Jones, P. H., Simons, B. D., & Watt, F. M. (2007). Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell?. *Cell stem cell*, 1(4), 371–381.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.014>

Jouini, R., Ferchichi, M., BenBrahim, E., Ayari, I., Khanchel, F., Koubaa, W., Saidi, O., Allani, R., & Chadli-Debbiche, A. (2019). KRAS and NRAS pyrosequencing screening in Tunisian colorectal cancer patients in 2015. *Heliyon*, 5(3), e01330.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01330>

Jung, B., Staudacher, J. J., & Beauchamp, D. (2017). Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 152(1), 36–52.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.015>

Kaemmerer, E., Klaus, C., Jeon, M. K., & Gassler, N. (2013). Molecular classification of colorectal carcinomas: the genotype-to-phenotype relation. *World journal of gastroenterology*, 19(45), 8163–8167. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i45.8163>

- Kang, M. S., & Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Experimental & molecular medicine*, 47(1), e131. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.84>
- Kanthan, R., Senger, J. L., & Kanthan, S. C. (2012). Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Pathology research international*, 2012, 597497. <https://doi.org/10.1155/2012/597497>
- Kenney, S. C. (2007). Reactivation and lytic replication of EBV. *Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis*.
- Khaliq, A. M., Erdogan, C., Kurt, Z., Turgut, S. S., Grunvald, M. W., Rand, T., Khare, S., Borgia, J. A., Hayden, D. M., Pappas, S. G., Govekar, H. R., Kam, A. E., Reiser, J., Turaga, K., Radovich, M., Zang, Y., Qiu, Y., Liu, Y., Fishel, M. L., Turk, A., ... Masood, A. (2022). Refining colorectal cancer classification and clinical stratification through a single-cell atlas. *Genome biology*, 23(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02677-z>
- Khan, G., & Hashim, MJ (2014). Fardeau mondial des décès dus aux tumeurs malignes attribuables au virus Epstein-Barr 1990-2010. *Agents infectieux et cancer*, 9 (1), 38. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-38>
- Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018). The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. *Frontiers in microbiology*, 9, 1835. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01835>
- Kijima, Y., Hokita, S., Takao, S., Baba, M., Natsugoe, S., Yoshinaka, H., ... & Aikou, T. (2001). Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *Journal of medical virology*, 64(4), 513-518.
- Kim, W. Y., Montes-Mojarro, I. A., Fend, F., & Quintanilla-Martinez, L. (2019). Epstein-Barr virus-associated T and NK-cell lymphoproliferative diseases. *Frontiers in pediatrics*, 7, 71.
- Kirgan, D., Manalo, P., Hall, M., & McGregor, B. (1990). Association of human papillomavirus and colon neoplasms. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 125(7), 862–865. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1990.01410190060009>
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(24), 12180–12184. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12180>
- Kis, L. L., Salamon, D., Persson, E. K., Nagy, N., Scheeren, F. A., Spits, H., Klein, G., & Klein, E. (2010).** IL-21 imposes a type II EBV gene expression on type III and type I B cells by the repression of C- and activation of LMP-1-promoter. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 107(2), 872–877.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912920107>

Klein, E., Nagy, N., & Rasul, A. E. (2013). EBV genome carrying B lymphocytes that express the nuclear protein EBNA-2 but not LMP-1: Type IIb latency. *Oncoimmunology*, 2(2), e23035. <https://doi.org/10.4161/onci.23035>

Klos, C. L., & Dharmarajan, S. (2016). Polyp Genetics. *Clinics in colon and rectal surgery*, 29(4), 289–295. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1582442>

Komatsu, T. L., Rivero, E. R. C., Magalhães, M. H. C. G. D., & Nunes, F. D. (2005). Epstein-Barr virus in oral hairy leukoplakia scrapes: identification by PCR. *Brazilian Oral Research*, 19, 317-321.

Kulski, J. K., Demeter, T., Mutavdzic, S., Sterrett, G. F., Mitchell, K. M., & Pixley, E. C. (1990). Survey of histologic specimens of human cancer for human papillomavirus types 6/11/16/18 by filter in situ hybridization. *American journal of clinical pathology*, 94(5), 566–570. <https://doi.org/10.1093/ajcp/94.5.566>

Kwong, L. N., & Dove, W. F. (2009). APC and its modifiers in colon cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 656, 85–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1145-2_8

De Calan, L., Gayet, B., Bourlier, P., & Perniceni, T. (2004). Cancer du rectum: anatomie chirurgicale, préparation à l'intervention, installation du patient. *EMC-Chirurgie*, 1(3), 275-292.

Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group (2016). Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *The New England journal of medicine*, 375(8), 794–798. <https://doi.org/10.1056/NEJMs1606602>

Laurenty, A. P ; Selves, J ; Guimbaud, R. (2014). Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique. POST'U 2014 – Paris.

Lee, S. J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2016). Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. *Journal of gynecologic oncology*, 27(5), e51. <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e51>

Lefeuvre, C., & Apaire-Marchais, V. (2019). Stratégie de prévention du cancer du col utérin. *Actualités Pharmaceutiques*, 58(588), 33-37.

Lelong, B., Moutardier, V., & Delpero, J. R. (2004). Prise en charge des tumeurs primitives colo-rectales [Colorectal cancer: what should be the management of primary tumour?]. *La Revue du praticien*, 54(2), 155–166.

Leto, M. D. G. P., Santos Júnior, G. F. D., Porro, A. M., & Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais brasileiros de dermatologia*, 86, 306-317.

Li, C., Zheng, H., Jia, H., Huang, D., Gu, W., Cai, S., & Zhu, J. (2019). Prognosis of three histological subtypes of colorectal adenocarcinoma: A retrospective analysis of 8005 Chinese patients. *Cancer medicine*, 8(7), 3411–3419. <https://doi.org/10.1002/cam4.2234>

Li, H., Zhang, J., Tong, J. H. M., Chan, A. W. H., Yu, J., Kang, W., & To, K. F. (2019). Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5999. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20235999>

Li, J., Guo, B. C., Sun, L. R., Wang, J. W., Fu, X. H., Zhang, S. Z., Poston, G., & Ding, K. F. (2014). TNM staging of colorectal cancer should be reconsidered by T stage weighting. *World journal of gastroenterology*, 20(17), 5104–5112. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i17.5104>

Li, L., Ni, B. B., Zhong, Q. H., Liu, Y. H., Zhang, M. H., Zhang, K. P., Chen, D. C., & Wang, L. (2017). Investigation of correlation between mutational status in key EGFR signaling genes and prognosis of stage II colorectal cancer. *Future oncology (London, England)*, 13(17), 1473–1492. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0040>

Li, L., Zhao, G. D., Shi, Z., Qi, L. L., Zhou, L. Y., & Fu, Z. X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncology letters*, 12(5), 3045–3050. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5110>

Lièvre, A., Rouleau, E., Buecher, B., & Mitry, E. (2010). Intérêt clinique des mutations de BRAF dans le cancer colorectal [Clinical significance of BRAF mutations in colorectal cancer]. *Bulletin du cancer*, 97(12), 1441–1452. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1225>

Lin, O.S. Acquired Risk Factors for Colorectal Cancer. Verma, M (ed.), *Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology*, vol. 472 © 2009 Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, Totowa, NJ Book doi: 10.1007/978-1-60327-492-0

Long, X., Wong, C. C., Tong, L., Chu, E. S. H., Ho Szeto, C., Go, M. Y. Y., Coker, O. O., Chan, A. W. H., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2019). Peptostreptococcus anaerobius promotes colorectal carcinogenesis and modulates tumour immunity. *Nature microbiology*, 4(12), 2319–2330. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0541-3>

Longworth, M. S., Wilson, R., & Laimins, L. A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *The EMBO journal*, 24(10), 1821-1830.

Macsween, K. F., & Crawford, D. H. (2003). Epstein-Barr virus—recent advances. *The Lancet infectious diseases*, 3(3), 131-140.

Magaji, B. A., Moy, F. M., Roslani, A. C., & Law, C. W. (2014). Descriptive epidemiology of colorectal cancer in University Malaya Medical Centre, 2001 to 2010. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(15), 6059–6064. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.15.6059>

Mahadevan, Vishy (2017). Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*, 35(3), 115–120. doi:10.1016/j.mpsur.2017.01.014

Makinen, MJ. (2007). Adénocarcinome colorectal dentelé. *Histopathologie.* ; 50 :131–150

Malki, I., Al Farsi, H., Jabeen, A., Skenderi, F., Al-Thawadi, H., AlAhmad, Y. M., Al Moustafa, A. E., & Vranic, S. (2020). High-Risk Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer and Their Association with Clinicopathological Status. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(6), 452. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060452>

Mansour, I., Zahrani, IH., Abdul Aziz, S.(2002). Colorectal cancers in Saudi Arabia. *Saudi Med journal.* ;23(3): 322-327.

Maréchal, V ; Piolot, T. (2001). Le virus epstein-barr : structure et cycle biologique. 337, 25–31. doi:10.1016/s0338-9898(01)80420-0

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5215), 1336–1338. <https://doi.org/10.1126/science.7761852>

Marley, A. R., & Nan, H. (2016). Epidemiology of colorectal cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 7(3), 105.

Marongiu, L., & Allgayer, H. (2022). Viruses in colorectal cancer. *Molecular oncology*, 16(7), 1423–1450. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13100>

Marsh, R. A., & Filipovich, A. H. (2011). Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and X-linked lymphoproliferative disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1238(1), 106-121.

Martini, G., Dienstmann, R., Ros, J., Baraibar, I., Cuadra-Urteaga, J. L., Salva, F., Ciardiello, D., Mulet, N., Argiles, G., Taberero, J., & Elez, E. (2020). Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. *Therapeutic*

advances in medical oncology, 12, 1758835920936089.
<https://doi.org/10.1177/1758835920936089>

Martins, S. F., Mariano, V., Rodrigues, M., & Longatto-Filho, A. (2020). Human papillomavirus (HPV) 16 infection is not detected in rectal carcinoma. *Infectious agents and cancer*, 15, 17. <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00281-z>

Massimino, L., Lovisa, S., Antonio Lamparelli, L., Danese, S., & Ungaro, F. (2020). Gut eukaryotic virome in colorectal carcinogenesis: Is that a trigger?. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.055>

McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E., & Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of molecular biology*, 247(3), 443–458.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0152>

McKinney, C. C., Hussmann, K. L., & McBride, A. A. (2015). The role of the DNA damage response throughout the papillomavirus life cycle. *Viruses*, 7(5), 2450-2469.

Meddah, D., Meddah, B., Touil, A., Ghalek, M., Sahraoui, T. (2009). An epidemiological study of west Algerian patients with colon cancer. *African Journal of Cancer*; 1, 31-35.

Mehrabani-Khasraghi, S., Ameli, M., & Khalily, F. (2016). Demonstration of Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer. *Iranian biomedical journal*, 20(5), 302–306. <https://doi.org/10.22045/ibj.2016.08>

Meshkat, M., Tayyebi Meibodi, N., Sepahi, S., Fadaee, N., Salehpour, M., & Meshkat, Z. (2014). The frequency of human papillomaviruses in colorectal cancer samples in Mashhad, northeastern Iran. *Turkish journal of medical sciences*, 44(3), 501–503.
<https://doi.org/10.3906/sag-1303-81>

Mietz, J. A., Unger, T., Huibregtse, J. M., & Howley, P. M. (1992). The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *The EMBO journal*, 11(13), 5013–5020. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05608.x>

Mills SE. *Histology for Pathologists*, 5^e. 2019 . wolters kluwer.

Mohammed A. J, M., Mohammed.M, M., Hafedh.H., M. (2021). Human Herpetic Viruses and Immune Profiles. *Innate Immunity in Health and Disease*. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.96340>

Molina, J. R., & Adjei, A. A. (2006). The Ras/Raf/MAPK pathway. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 1(1), 7–9.

Monahan, K. J., Bradshaw, N., Dolwani, S., Desouza, B., Dunlop, M. G., East, J. E., Ilyas, M., Kaur, A., Lalloo, F., Latchford, A., Rutter, M. D., Tomlinson, I., Thomas, H. J. W., Hill, J., & Hereditary CRC guidelines eDelphi consensus group (2020). Guidelines for the management of hereditary colorectal cancer from the British Society of Gastroenterology (BSG)/Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland (ACPGBI)/United Kingdom Cancer Genetics Group (UKCGG). *Gut*, 69(3), 411–444. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319915>

Mondaca, S., & Yaeger, R. (2018). Colorectal cancer genomics and designing rational trials. *Annals of Translational Medicine*, 6(9).

Monsonogo, J. (2007). *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus*. Springer-Verlag France, Paris.

Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550-560.

Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., ... & Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2), 338-344.

Mostert, B., Jiang, Y., Sieuwerts, A. M., Wang, H., Bolt-de Vries, J., Biermann, K., Kraan, J., Lalmahomed, Z., van Galen, A., de Weerd, V., van der Spoel, P., Ramírez-Moreno, R., Verhoef, C., Ijzermans, J. N., Wang, Y., Gratama, J. W., Foekens, J. A., Sleijfer, S., & Martens, J. W. (2013). KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *International journal of cancer*, 133(1), 130–141. <https://doi.org/10.1002/ijc.27987>

Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 469(2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>

Murata, T., & Tsurumi, T. (2014). Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Reviews in medical virology*, 24(3), 142-153.

Murtaza, B. N., Bibi, A., Rashid, M. U., Khan, Y. I., Chaudri, M. S., & Shakoori, A. R. (2014). Spectrum of K ras mutations in Pakistani colorectal cancer patients. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 47(1), 35–41. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133046>

Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., & Vodicka, P. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2), 211–218. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger067>

Nagi, K., Gupta, I., Jurdi, N., Yasmeen, A., Vranic, S., Batist, G., & Moustafa, A. A. (2021). Copresence of High-Risk Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer: A Tissue Microarray and Molecular Study from Lebanon. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8118. <https://doi.org/10.3390/ijms22158118>

Odumade, O. A., Hogquist, K. A., & Balfour, H. H., Jr (2011). Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 193–209. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-10>

Oleynikova, N. A., Danilova, N. V., Grimuta, M. O., & Malkov, P. G. (2021). Epstein-Barr Virus in the Development of Colorectal Cancer (Review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine*, 13(4), 82–91. <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.09>

Ozbun, M. A., & Meyers, C. (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *Journal of virology*, 71(7), 5161-5172.

Packham, G., Economou, A., Rooney, C. M., Rowe, D. T., & Farrell, P. J. (1990). Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *Journal of virology*, 64(5), 2110-2116.

Palmirotta, R., Ludovici, G., De Marchis, M. L., Leone, B., Formica, V., Ettorre, G. M., Cavaliere, F., Della-Morte, D., Ferroni, P., Roselli, M., & Guadagni, F. (2012). A comprehensive procedural approach to genotyping KRAS and BRAF from paraffin embedded tissues for diagnostic purposes. *In vivo (Athens, Greece)*, 26(4), 537–547.

Palomaki, G. E., Bradley, L. A., Douglas, M. P., Kolor, K., & Dotson, W. D. (2009). Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 11(1), 21–34. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31818efd77>

Papadatos-Pastos, D., Rabbie, R., Ross, P., & Sarker, D. (2015). The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 94(1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.12.006>

Parkin D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer*, 118(12), 3030–3044. <https://doi.org/10.1002/ijc.21731>

Patel, J. N., Fong, M. K., & Jagosky, M. (2019). Colorectal Cancer Biomarkers in the Era of Personalized Medicine. *Journal of personalized medicine*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.3390/jpm9010003>

Patel, S., Alam, A., Pant, R., & Chattopadhyay, S. (2019). Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights. *Frontiers in immunology*, 10, 2872. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02872>

Pérez, L. O., Abba, M. C., Laguens, R. M., & Golijow, C. D. (2005). Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 7(5), 492–495. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2005.00774.x>

Perez-Carbonell, L., Sinicrope, F. A., Alberts, S. R., Oberg, A. L., Balaguer, F., Castells, A., Boland, C. R., & Goel, A. (2015). MiR-320e is a novel prognostic biomarker in colorectal cancer. *British journal of cancer*, 113(1), 83–90. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.168>

Perkins, G., Pilati, C., Blons, H., & Laurent-Puig, P. (2014). Beyond KRAS status and response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics*, 15(7), 1043-1052.

PETRAS, R. E., & FRANKEL, W. L. (2009). Large intestine (colon). *Modern Surgical Pathology*, 755.

Philip, JM. (2018). Cancer du côlon : classification moléculaire et anatomique nécessaire à la décision thérapeutique. *Cancérologie*.

Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059–2072. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>

Price, A. M., Tourigny, J. P., Forte, E., Salinas, R. E., Dave, S. S., & Luftig, M. A. (2012). Analysis of Epstein-Barr virus-regulated host gene expression changes through primary B-cell outgrowth reveals delayed kinetics of latent membrane protein 1-mediated NF- κ B activation. *Journal of virology*, 86(20), 11096–11106. <https://doi.org/10.1128/JVI.01069-12>

Pritchard, C. C., & Grady, W. M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 60(1), 116–129. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.206250>

Qiu, Q., Li, Y., Fan, Z., Yao, F., Shen, W., Sun, J., ... & Jiao, X. (2020). Gene expression analysis of human papillomavirus-associated colorectal carcinoma. *BioMed Research International*, 2020.

Quesada-Calvo, F., Massot, C., Bertrand, V., Longuespée, R., Blétard, N., Somja, J., Mazzucchelli, G., Smargiasso, N., Baiwir, D., De Pauw-Gillet, M. C., Delvenne, P., Malaise, M., Coimbra Marques, C., Polus, M., De Pauw, E., Meuwis, M. A., & Louis, E. (2017). OLFM4, KNG1 and Sec24C identified by proteomics and immunohistochemistry as potential markers of early colorectal cancer stages. *Clinical proteomics*, 14, 9. <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9143-3>

Raghupathy, R., Hui, E. P., & Chan, A. T. C. (2014). Epstein-Barr virus as a paradigm in nasopharyngeal cancer: from lab to clinic. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 34(1), 149-153.

Rampias, T., Boutati, E., Pectasides, E., Sasaki, C., Kountourakis, P., Weinberger, P., & Psyrri, A. (2010). Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Molecular cancer research : MCR*, 8(3), 433–443. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0345>

Revue des statistiques du cancer SEER, 1975–2013. Bethesda, MD: Institut national du cancer; 2013. Disponible sur: <http://seer.cancer.gov/csr/19752013/> [cité le 26.03.17].

Rickinson, AB., Kieffe, E.(2001). Epstein-Barr Virus, in *Fields Virology*, Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia, pp 2575-2627.

Robertson, E. S. (2010). Epstein-Barr virus: latency and transformation. (No Title).

Romanczuk, H., & Howley, P. M. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 3159–3163. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.3159>

Rosemarie, Q., & Sugden, B. (2020). Epstein-Barr Virus: How Its Lytic Phase Contributes to Oncogenesis. *Microorganisms*, 8(11), 1824. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111824>

Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K., & Robertson, E. S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *Journal of virology*, 83(9), 4652–4669. <https://doi.org/10.1128/JVI.02408-08>

Salepci, T., Yazici, H., Dane, F., Topuz, E., Dalay, N., Onat, H., Aykan, F., Seker, M., & Aydinler, A. (2009). Detection of human papillomavirus DNA by polymerase chain

reaction and southern blot hybridization in colorectal cancer patients. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 14(3), 495–499.

Sameer A. S. (2013). Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Frontiers in oncology*, 3, 114. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00114>

Sammoud, S., Khiari, M., Semeh, A., Amine, L., Ines, C., Amira, A., ... & Saadia, B. (2012). Relationship between expression of ras p21 oncoprotein and mutation status of the K-ras gene in sporadic colorectal cancer patients in Tunisia. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 20(2), 146-152.

Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., & Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *Journal of virology*, 64(9), 4084–4092. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>

Santpere, G., Darre, F., Blanco, S., Alcami, A., Villoslada, P., Mar Albà, M., & Navarro, A. (2014). Genome-wide analysis of wild-type Epstein-Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome biology and evolution*, 6(4), 846–860. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu054>

Sarvari, J., Mahmoudvand, S., Pirbonyeh, N., Safaei, A., & Hosseini, S. Y. (2018). The Very Low Frequency of Epstein-Barr JC and BK Viruses DNA in Colorectal Cancer Tissues in Shiraz, Southwest Iran. *Polish journal of microbiology*, 67(1), 73–79. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0011.6146>

Scalise, J. R., Poças, R. C., Caneloi, T. P., Lopes, C. O., Kanno, D. T., Marques, M. G., Valdivia, J. C., Maximo, F. R., Pereira, J. A., Ribeiro, M. L., & Priolli, D. G. (2016). DNA Damage Is a Potential Marker for TP53 Mutation in Colorectal Carcinogenesis. *Journal of gastrointestinal cancer*, 47(4), 409–416. <https://doi.org/10.1007/s12029-016-9846-0>

Schiffman, M., Clifford, G., & Buonaguro, F. M. (2009). Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious agents and cancer*, 4(1), 1-8.

Seigneurin, J. M., Desgranges, C., Seigneurin, D., Paire, J., Renversez, J. C., Jacquemont, B., & Micouin, C. (1983). Herpes simplex virus glycoprotein D: human monoclonal antibody produced by bone marrow cell line. *Science (New York, N.Y.)*, 221(4606), 173–175. <https://doi.org/10.1126/science.6304881>

Serrano, B., Brotons, M., Bosch, F. X., & Bruni, L. (2018). Epidemiology and burden of HPV-related disease. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 47, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.006>

Sideris M, Papagrigroriadis S. (2014). Molecular Biomarkers and Classification Models in the Evaluation of the Prognosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Research*. 34 (5) 2061-2068.

Siegel, RL, Miller, KD, Wagle, NS, Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023; 73(1): 17- 48. doi:[10.3322/caac.21763](https://doi.org/10.3322/caac.21763)

Simon K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*, 11, 967–976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>

Smith, J. L., S. K. Campos and M. A. Ozbun (2007). "Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes." *J Virol* 81(18): 9922-9931.

Sole, C. V., Calvo, F. A., Ferrer, C., Alvarez, E., Carreras, J. L., & Ochoa, E. (2015). Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection impact on 18 F-FDG PET/CT SUVmax, CT volumetric and KRAS-based parameters of patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant therapy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 42, 186-196.

Song, L. B., Zhang, X., Zhang, C. Q., Zhang, Y., Pan, Z. Z., Liao, W. T., ... & Zeng, M. S. (2006). Infection of Epstein-Barr virus in colorectal cancer in Chinese. *Ai zheng= Aizheng= Chinese journal of cancer*, 25(11), 1356-1360.

Soto, Y., Limia, C. M., González, L., Grá, B., Hano, O. M., Martínez, P. A., & Kourí, V. (2016). Molecular evidence of high-risk human papillomavirus infection in colorectal tumours from Cuban patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(12), 731–736. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160217>

Standring, S. (2019). The Anatomy of the Large Intestine. *Lower Gastrointestinal Tract Surgery: Vol.1, Laparoscopic Procedures*, 27–89. doi:[10.1007/978-3-030-05240-9_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-05240-9_2)

Steele, Scott R.; Hull, Tracy L.; Read, Thomas E.; Saclarides, Theodore J.; Senagore, Anthony J.; Whitlow, Charles B. (2016). The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery || Anatomy and Embryology of the Colon, Rectum, and Anus. , [10.1007/978-3-319-25970-3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25970-3)(Chapter 1), 3–26. doi:[10.1007/978-3-319-25970-3_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25970-3_1)

Stefani, C., Miricescu, D., Stanescu-Spinu, I. I., Nica, R. I., Greabu, M., Totan, A. R., & Jinga, M. (2021). Growth Factors, PI3K/AKT/mTOR and MAPK Signaling Pathways in

Colorectal Cancer Pathogenesis: Where Are We Now?. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10260. <https://doi.org/10.3390/ijms221910260>

Sterling, J. C., Handfield-Jones, S., & Hudson, P. M. (2001). Guidelines for the management of cutaneous warts. *British Journal of Dermatology*, 144(1), 4-11.

Stintzing, S., Wirapati, P., Lenz, H. J., Neureiter, D., Fischer von Weikersthal, L., Decker, T., Kiani, A., Kaiser, F., Al-Batran, S., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G., Kullmann, F., Moehler, M., Scheithauer, W., Held, S., Modest, D. P., Jung, A., Kirchner, T., ... Heinemann, V. (2019). Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(11), 1796–1803. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz387>

Suliman, MA., Zamzam, ML., Omar, AT., Fahmy, NN. (2020). Clinicopathological Profile of Colorectal Cancer Patients in Suez Canal University Hospitals-Egypt. *J Cancer Biol Res* 8(1): 1127.

Szymonowicz, K. A., & Chen, J. (2020). Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer biology & medicine*, 17(4), 864.

Tanzi, E., Bianchi, S., Frati, E. R., Amicizia, D., Martinelli, M., Bragazzi, N. L., Brisigotti, M. P., Colzani, D., Fasoli, E., Zehender, G., Panatto, D., & Gasparini, R. (2015). Human papillomavirus detection in paraffin-embedded colorectal cancer tissues. *The Journal of general virology*, 96(Pt 1), 206–209. <https://doi.org/10.1099/vir.0.070672-0>

Tavakolian, S., Goudarzi, H., Eslami, G., Dayyani, F., Kazeminezhad, B., & Faghihloo, E. (2020). Prevalence of human papilloma virus and Epstein–Barr virus in tumorous and adjacent tissues of colorectal cancer in Iran. *Gene Reports*, 20, 100774.

The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved - March, 2021

Thorley-Lawson, D. A., Hawkins, J. B., Tracy, S. I., & Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Current opinion in virology*, 3(3), 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.04.005>

Thorley-Lawson, DA. (2005). EBV the prototypical human tumor virus – just how bad is it? . *the Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 116, 251–261.

Tol, J., Koopman, M., Cats, A., Rodenburg, C. J., Creemers, G. J., Schrama, J. G., ... & Punt, C. J. (2009). Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 563-572.

Toledo, F., & Wahl, G. M. (2007). MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(7-8), 1476–1482. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.022>

Tomaszewski-Flick, M. J. (2008). Functional Analysis and Characterization of Epstein Barr

Venceslau, E. M., Bezerra, M.M., Mota Lopes, A.C., Souza, E.V., Casimiro Onofre, A.S., de Melo, C.M., Jeraldo, V.L.S., Miranda Onofre, F.B. (2014). HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *J Bras Patol Med Lab*, v. 50, n. 4, p. 280-285

Vieira, A. R., Abar, L., Chan, D. S. M., Vingeliene, S., Polemiti, E., Stevens, C., Greenwood, D., & Norat, T. (2017). Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(8), 1788–1802. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx171>

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., & Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>,

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr, and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Vuitton, L., Jaillet, C., Jacquin, E., Monnier, F., Heberle, M., Mihai, M. I., Lassabe, C., Raffoul, J., Puyraveau, M., Lakkis, Z., Lamfichekh, N., Picard, A., Pr etet, J. L., Mougin, C., & Valmary-Degano, S. (2017). Human papillomaviruses in colorectal cancers: A case-control study in western patients. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 49(4), 446–450. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2016.11.003>

Weiser, M. R. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. Ann. Surg. Oncol. 25, 1454–1455 (2018).

Weniger, M. A., & K uppers, R. (2021). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, 35(4), 968-981.

Wensing, B., & Farrell, P. J. (2000). Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. *Microbes and infection*, 2(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00282-3](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00282-3)

Werness, B. A., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4951), 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.2157286>

Westerhoff : *Histology for Pathologists*, 5e édition, 2019.

Whitehall, V., Tran, K., Umapathy, A., Grieu, F., Hewitt, C., Evans, T.J., Ismail, T., Li, W.Q., Collins, P., Ravetto, P., et al. (2009). A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting. *J Mol Diagn* 11, 543-552.

Who.The Global Cancer Observatory - March, 2021. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/36-australia-fact-sheets.pdf>

Williams, R. R., Stegens, N. L., & Goldsmith, J. R. (1977). Associations of cancer site and type with occupation and industry from the Third National Cancer Survey Interview. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(4), 1147–1185. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.4.1147>

Wong, K. K., Engelman, J. A., & Cantley, L. C. (2010). Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 20(1), 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.002>

Yamane, L., Scapulatempo-Neto, C., Reis, R. M., & Guimarães, D. P. (2014). Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World journal of gastroenterology*, 20(10), 2634–2640. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2634>

Yang, Y., Han, Z., Li, X., Huang, A., Shi, J., & Gu, J. (2020). Epidemiology and risk factors of colorectal cancer in China. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen Yang cheng yen chiu*, 32(6), 729–741. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.06>

Ye, J., Lin, M., Zhang, C., Zhu, X., Li, S., Liu, H., ... & Zhu, K. (2020). Tissue gene mutation profiles in patients with colorectal cancer and their clinical implications. *Biomedical reports*, 13(1), 43-48.

Yetming, K. D., Lupey-Green, L. N., Biryukov, S., Hughes, D. J., Marendy, E. M., Miranda, J. L., & Sample, J. T. (2020). The BHLF1 Locus of Epstein-Barr Virus Contributes to Viral Latency and B-Cell Immortalization. *Journal of virology*, 94(17), e01215-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01215-20>

Yoshida, M., Watanabe, T., Narita, Y., Sato, Y., Goshima, F., Kimura, H., & Murata, T. (2017). The Epstein-Barr Virus BRRF1 Gene Is Dispensable for Viral Replication in HEK293 cells and Transformation. *Scientific reports*, 7(1), 6044. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06413-7>

Yu, I., Wu, R., Tokumaru, Y., Terracina, K. P., & Takabe, K. (2022). The Role of the Microbiome on the Pathogenesis and Treatment of Colorectal Cancer. *Cancers*, 14(22), 5685. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14225685>

Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W., & Jansen-Dürr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*, 13(11), 2323–2330.

Zhang, J., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2018). Prevalence of human papillomavirus and its prognostic value in vulvar cancer: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 13(9), e0204162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204162>

Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., Tao, Q., & Xu, H. (2022). Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular cancer*, 21(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01616-7>

Zheng, X., Huang, Y., Li, K., Luo, R., Cai, M., & Yun, J. (2022). Immunosuppressive Tumor Microenvironment and Immunotherapy of Epstein–Barr Virus-Associated Malignancies. *Viruses*, 14(5), 1017.

Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), a001883. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001883>

Annexe

Colorectal cancer in a region of western of Algeria: results of 581 cases in 5 years

Bouchra Dahmani¹, Lamia Boublenza¹, Naffissa Chabni^{2,3}, Dalale Behar¹, Hafida Hassaine¹,
Nabila Masdoua¹, Amira Nahet¹, Kaouel Meguenni^{2,3}, Ilyes Zetla¹

1. Laboratory of Microbiology Applied to the Food Industry, to Biomedical and to the Environment (LAMAABE), Department of Biology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.
2. Department of Epidemiology, Dr Tidjani Damerdji University Hospital, Tlemcen, Algeria.
3. Cancer Lab N° 30 Laboratory, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

Abstract

Aims: The objective of this work is to evaluate the epidemiological profile of colorectal cancers, histologically proven over a 5-year period (2012-2016) in the Tlemcen region.

Methods: A retrospective study of 581 cases of colorectal cancer collected at the epidemiology department of the University Hospital Center (UHC) of Tlemcen between January 2012 and December 2016 was performed. Epidemiological data were processed using SPSS version 25 and Microsoft Excel 2010.

Results: The epidemiological profile has shown that colorectal cancer in our region ranks 3rd in both sexes. There were 322 men (55.4%) affected compared to 259 women (44.6%) with a sex ratio of 1.2. A predominance of males is noted in 50-60 age group, while for the female sex, the dominance is between 60-70 years old. The mean age of CRC occurrence was 60±13 years, with an extremity ranging from 16 to 90. A significantly higher rate was recorded for rectal cancer (43.7%) followed by sigmoid colon (5.7%). Variable rates were recorded during the 5 years with a peak in 2014 (27.9%).

Conclusion: Regular analysis of these data, if supplemented with additional data on diagnostic modalities like circular RNA diagnostic, will contribute to the assessment of the impact over time of public policies on nationally organized CRC screening.

Keywords: Colorectal cancer; epidemiology; Algeria; Tlemcen province.

DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v23i2.39>

Cite as: Dahmani B, Boublenza L, Chabni N, Behar D, Hassaine H, Masdoua N, et al. Colorectal cancer in a region of western of Algeria: results of 581 cases in 5 years. *Afri Health Sci.* 2023;23(2).

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a major public health concern around the world. It is the third most common malignant neoplasm in the world and the second most common cause of cancer death, with an estimated 935,000 deaths in 2020; of which 54.2% occurred in Asia, 26.2% in Europe, and 4.6% in Africa¹.

The term colorectal cancer refers to a slow-growing cancer that begins as a tumor or tissue growth on the inner wall of the rectum or the colon. If this abnormal growth, called a polyp, ends up becoming cancerous, it can form a tumor on the wall rectum or colon and subsequently

develop into blood or lymphatic vessels, increasing the risk of metastasis to other anatomical sites^{2,3}.

The incidence of CRC varies significantly from country to country depending on their economic development but the standard myth of colorectal cancer being a disease limited to western countries need to be dispelled⁴.

In Algeria, after an annual meeting of the National Cancer Registries Network held in Algiers in 2020, Pr Bouzid announces that colorectal cancer in women over 40 is the most common after breast cancer, and the first cancer common in men, well before that of lung⁵⁻⁶.

The objective of this work consists of assess the epidemiological profile of colorectal cancers, histologically proven over a of 5 years period (2012-2016) in Tlemcen region.

Methods

Study design

A retrospective study of 581 cases of colorectal cancer collected at the Epidemiology Department of the Univer-

Corresponding author:

Bouchra Dahmani,
Laboratory of Microbiology Applied to the Food Industry, to Biomedical and to the Environment (LAMAABE), Department of Biology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.
Email: bouchradah@yahoo.com

sity Hospital Center (UHC) of Tlemcen between January 2012 and December 2016. more than 70% of the cancers are diagnosed by histopathology Demographic variables studied were: age at the time of diagnosis, gender. The clinical characteristics included are; clinical presentation, tumor site, stage and type of the tumor.

Inclusion and exclusion criteria

Only data from the cancer registry of the Epidemiology Department of the University Hospital Center Dr. Tidjani Demerdji in Tlemcen have been included, therefore All histologically confirmed colon and rectal cancers were included.

While all data from other registries have been excluded, thus All duplicate cases.

Data analysis

The data collected were organized and analysed with SPSS version 25 software and Microsoft Excel 2010.

This study was approved by the ethics committee of Dr Tidjani Damerdji University Hospital-Tlemcen (173.FM.UABB.23).

Results

The evaluation of the epidemiological profile has shown that colorectal cancer in our region is the 3rd most incident cancer after breast and thyroid cancer in women with 10.7 / 100,000 inhabitants and after bladder and prostate cancer in men with 14.3 / 100,000 inhabitants (Table 1).

Table 1: The incidence rate of the top 10 cancers by sex from 2012 to 2016

Type of cancer	Incidence (Male)	Incidence (Female)
Breast	-	61.9
Colon, rectum, anus	14.3	10.7
Lymphoma	11.3	8.8
Bladder	17.9	2.2
Stomach	9.4	6.1
Thyroid	2.6	12.8
Lung, trachea, bronchus	12.6	2.0
Prostate	14.4	
Brain & nervous system	5.3	5.8
Mouth & pharynx	7.1	2.9

The distribution of colorectal cancer by sex indicates that the male population is the most affected; since out of the 581 patients analysed, 322 men are affected (55.4%) against 259 women (44.6%), with a sex ratio of 1.2.

Figure 1 shows that the age group most represented in this study is that of 50-60 with 27.1%, followed by that

of 60-70 with 24.8%. The mean age of onset of colorectal cancer was 60 ± 13 years, with an extremity ranging from 16 to 90.

When gender is considered, a predominance of males is noted in 50-60 age group, while for the female sex, the dominance is between 60-70 years old (Figure 2).

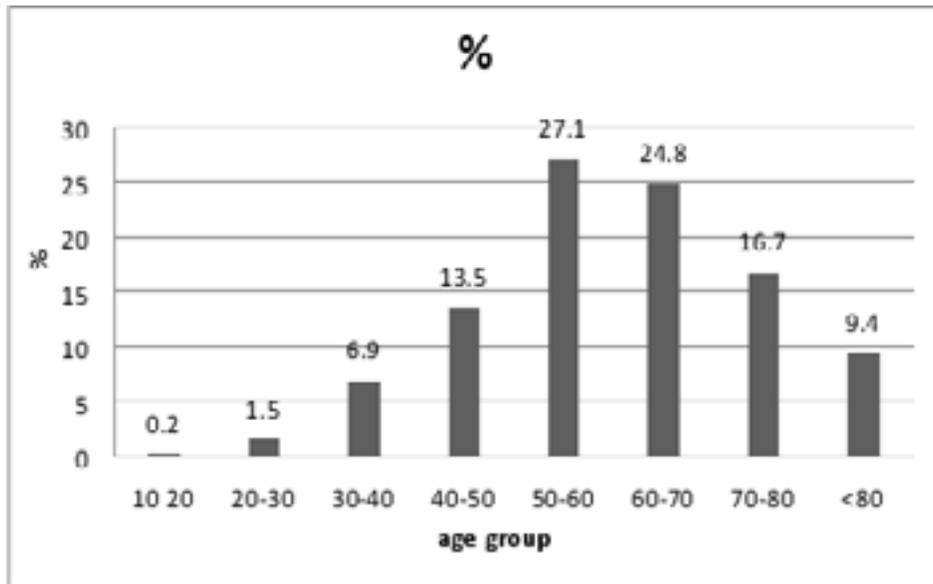


Figure 1: distribution of colorectal cancer by age group percent

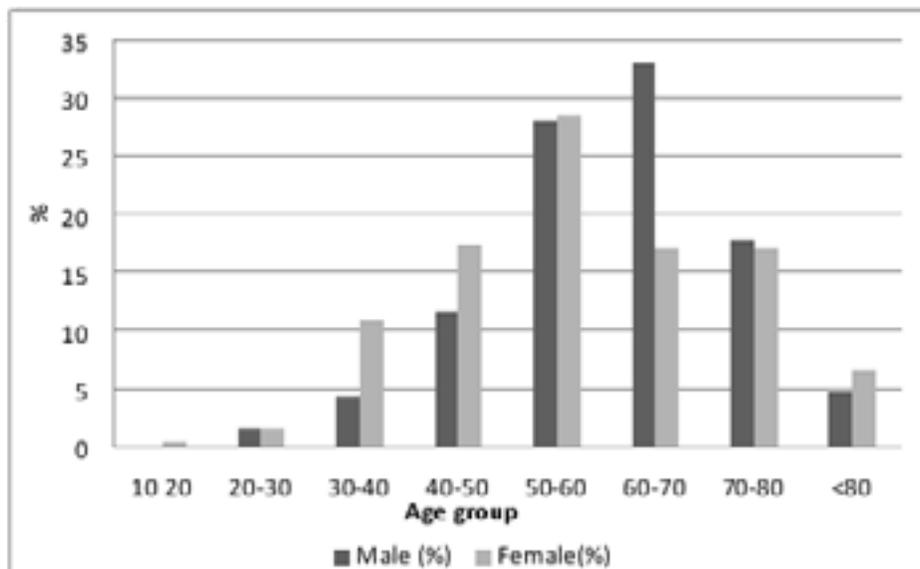


Figure 2: Distribution of colorectal cancer by sex and age groups

Variable rates were recorded during the 5 years (Figure 3) with a peak in 2014 (27.9%), and an annual average of 116 cases for a total of 581 cases. What was also noticed is the significant decrease in these cancers in 2016 with 13.4%.

This statistical analysis carried out on the whole target population studied allowed us to show a significantly higher rate for rectal cancer (43.7%) followed by the sigmoid colon (5.7%), the rectosigmoid junction (4.1%) and the caecum (3.8%) while 39.8% of colon cancers were unspecified (Figure 4).

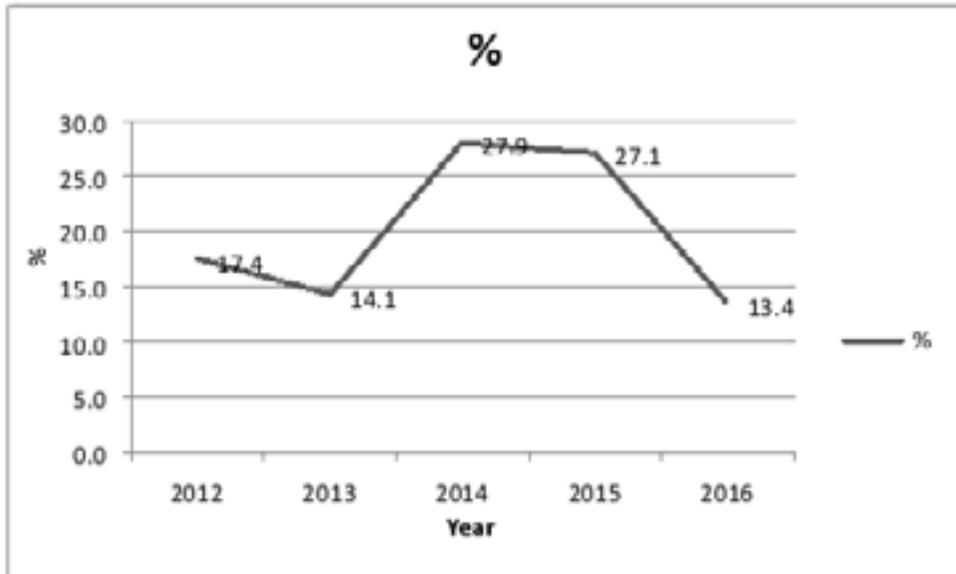


Figure 3: Year wise distribution of colorectal cancer cases

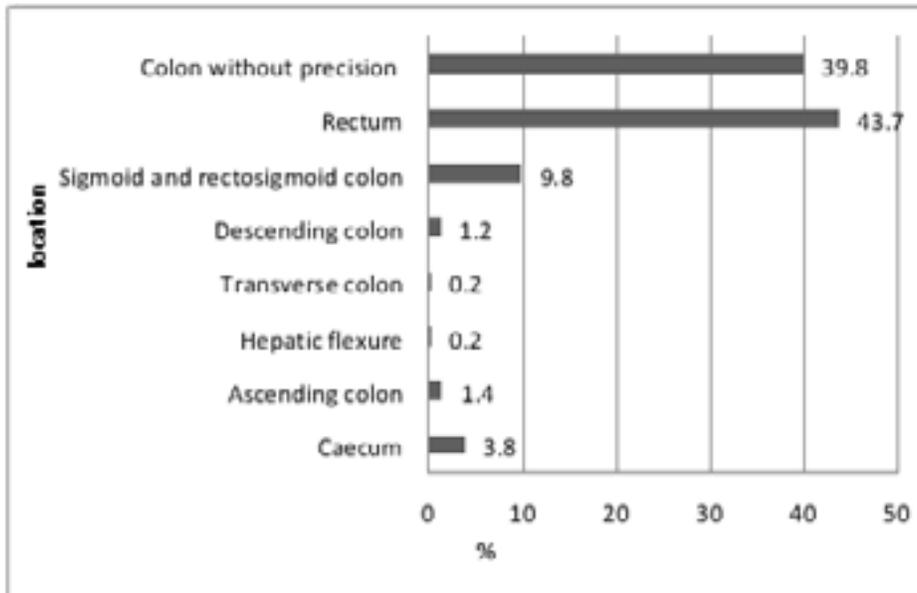


Figure 4: Distribution of colorectal cancer according to location

In this analysis (Table 2), adenocarcinoma appears to be the most predominant type of cancer with 82,79%, followed by carcinoid with 6,37%.

According to AJCC 8th edition staging, a rate of 26.3% was on stage I, 17.4% of patients presented with stage IV while 38.5% were at an undetermined stage (Table 3).

Table 2: Distribution of colorectal cancer according to morphology

Morphology	N (%)
Carcinoid	37(6,37)
Adenocarcinoma	481(82,79)
Melanoma	2(0,34)
Sarcoma	1(0,17)
Others	60(10,33)

Table 3: Distribution of colorectal cancer by stage of diagnosis

Stage of diagnosis	N (%)
Stage I	153(26,3)
Stage II	103(17,8)
Stage III	0(0%)
Stage IV	101(17,4)
Undetermined	224(38,5)

Discussion

Colorectal cancer is a real public health problem, both in Algeria and the whole world by its frequency and high mortality. More than a third of new cases of colorectal cancer occur outside of the industrialized countries⁹.

The CRC incidence rate increased by 90% from 1980 to 2016, this development is largely attributable to the constellation of dietary and lifestyle factors such as poor diet characterized by high intakes of red and processed meat and alcoholic drinks and low intakes of fiber-rich foods, low physical activity, and obesity⁷.

The evaluation of the epidemiological profile has shown that colorectal cancer in our region is the 3rd common cancer after breast and thyroid cancer among females (10.7 / 100,000 inhabitants) and after bladder and prostate cancer among males (14.3 / 100,000 inhabitants). The incidence of colorectal cancer in our region remains higher than that of Morocco (2.5 to 3.3/100,000 inhabitants)⁸, Egypt (6.3/100,000 inhabitants and 6.6/100,000 inhabitants for women and men respectively) and India (3.1/100,000 inhabitants and 5.8/100,000 inhabitants for women and men respectively)⁹.

However, it is lower than that of western countries including the United States of America (22.6/100,000 inhabitants among females and 28.8/100,000 inhabitants among males), Germany (21.1/100,000 inhabitants among females and 31/100,000 inhabitants among males), Canada (28/100,000 inhabitants among females and 35.2/100,000 inhabitants among males) and France (24/100,000 inhabitants among females and 36.9/100,000 inhabitants among males)⁹.

The GLOBOCAN age-standardised estimated incidence rate shows Australia and New Zealand as having the highest rates of CRC in the world with 44/100,000 inhabitants among females and 56/100,000 inhabitants among males and 37.5/100,000 inhabitants among females and 44.1/100,000 inhabitants among males respectively¹⁰⁻¹¹.

In our study, 581 cases of CRC were found over a period of 5 years. This result is higher than those found in the African literature, a study carried out in Togo declared 57 cases of colorectal cancer during 10 years¹², another study from Gabon declared 51 cases of this cancer over 10 years¹³. The male predominance observed in our study (55.4%) with a sex ratio of 1.2 was consistent with

the results of several authors, thus confirming the data in the literature¹²⁻¹⁴.

Age is one of the factors involved in the appearance of these cancers, and in this work the average age of cancer onset was 60.05 years which is in agreement with a study carried out in Morocco in 2015¹⁵, another study carried out in Asia whose average age was 61 years which is similar to our result¹⁶. On the other hand, studies carried out in sub-Saharan Africa show that colorectal cancers affect particularly the younger population whose average age is 48 years and 46.7 years recorded in Gabon and Togo respectively¹²⁻¹³.

Conversely the average age of our population is even younger than the corresponding age in the United States (69 for men and 73 for women)¹⁷, and in France which declares an average age which is in the seventh decade. The number of new cases of colorectal cancer estimated was 31.2% occurring in patients aged from 65 to 74 years and 42.5% in patients aged 75 and over¹⁸. The highest rate was observed in the interval of 50-60 years with 27.1%, which confirms a study that was carried out on a population of western Algeria¹⁹, another Moroccan study states the same most affected age group¹².

In addition; in our series, the cancer site in order of frequency was the rectum (43.7%), sigmoid colon (5.7%), rectosigmoid junction (4.1%) and cecum (3.8%) which is in agreement with a study carried out in Iraq in 2019¹⁸. Another study in Iran indicated that the rectum (31.1%), the sigmoid colon (20.4%) and the ascending colon (18.6%) were the most common tumor sites²¹, whilst our series do not agree with the literature done in Algeria whose Malignant involvement of the left colon shows a predominance with 61.8%¹⁷, and even with another study done in Jordan in 2018 which marks a dominance of Malignant involvement of the left colon with 77.12%²². while 39.8% are colon cancers without precision, which represents a limit of the study.

Adenocarcinomas are the histological variety that dominates colorectal cancers in our series with 82,79% of cases. This Figure is compatible with those reported in other studies carried out in Togo (91.2%), Gabon 98%, Morocco (95%), Egypt (76.2%), Saudi Arabia (81%), Iraq (84.0%) and Iran with 96.4%^{8,9,13,23,24,25}.

The descriptive analysis of the abnormalities showed a 26.3% rate of cancers that were at a stage I, 17.8% at a stage II and 17.4% at a stage IV which is consistent with a study carried out by the cancer registries of the Francium network in France²⁶.

Conclusion

The evaluation of the epidemiological profile has shown that colorectal cancer in the region of Tlemcen is the 3rd most incident cancer after breast and thyroid cancer in women and also the most common one after bladder and prostate cancer in men with an average age of 60 ± 13 years and age extremes of 16 to 90 years and a predominance of colon cancer (56.3%) compared to rectal cancer (43.7%).

Regular analysis of these data, if enriched with additional diagnostic methods like circular RNA method which have relatively high diagnostic accuracy in distinguishing CRC patients from normal controls²⁵, would help to assess the impact over time of public screening policies organized at national level for colorectal cancer and they will provide useful information for the various work of clinicians and researchers.

Acknowledgments

The authors are thankful to all the members of epidemiology department at Tlemcen Hospital.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. WHO. Colorectal cancer. International agency for research on cancer; 2020. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>
2. Bouguenouch L, Samri I, Belhassan K, Sayel H, Abbasi M, Bennis S et al. Syndrome de lynch: à propos d'un cas et revue de la littérature. *The pan African medical journal*. 2016; 24: 142 <https://europepmc.org/article/med/276>
3. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *British medical cancer*. 2002; 64, 1-25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12421722/>
4. Turano M, Delrio P, Rega D, Cammarota F, Polverino A, Duraturo F et al. Promising Colorectal Cancer Biomarkers for Precision Prevention and Therapy. *Cancers*. 2019; 11(12), 19-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966638/>
5. <https://fr.sputniknews.com/afrique/201907171041689126-algerie-premiere-cause-proliferation-inquietante-cancer-culinaire/>
6. [http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/](http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue93.htm)
7. Høydahl Ø, Edna TH, Xanthoulis A, Lydersen S, Endreseth BH. Long-term trends in colorectal cancer: inci-

- dence, localization, and presentation. *BMC Cancer*. 2020 Nov 10;20(1):1077. Doi: 10.1186/s12885-020-07582-x. PMID: 33167924; PMCID: PMC7653698.
8. Belhamidi MS, Sinaa M, Kaoukabi A, Krimou H, Menfaa M, Sakit F et al. Epidemiological and pathological profile of colorectal cancer: about 36 cases. *Pan African Medical Journal*. 2018; 30,159. doi:10.11604/pamj.2018.30.159.15061.
 9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68:394–424 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30207593/>
 10. <https://ncci.canceraustralia.gov.au/diagnosis/cancer-incidence/cancer-incidence>
 11. Blackmore T, Lao C, Chepulis L, Page B, Lawrenson R. The characteristics and outcomes of patients with colorectal cancer in New Zealand, analysed by Cancer Network. *N Z Med J*. 2020 Apr 24;133(1513):42-52. PMID: 32325467.
 12. Darré T, Amégbor K, Bagny A, Sewa E, Tchangai B, Sakiye A, et al. Histo-epidemiological profile of the colorectal cancers in Togo. *Journal Africain d'Hépatogastro-entérologie*. 2014; 8:226-229 PubMed .
 13. Diallo Owono FK, NguemaMve R, Ibaba J, Mihindou C, Ondo N'dong F. Aspects épidémiologiques et diagnostiques des cancers colorectaux à Libreville (Gabon). *Medical tropical*. 2011; 71: 605-607 PubMed .
 14. Abbes A, Rechreche H, Brinet R, Boukhiout S, Souilah N, Benali M. Retrospectivestudy of epidemiological, clinicopathological and biological profiles of 62 colorectal cancers cases in jijel province (Algeria). *Journal of fundamental and applied sciences*. 2018; 10(1): 59-82.
 15. El housse H, Ajbara W, Amsaguine S, El Amrani N, Ahallat M, Radallah D. Epidemiological and clinicopathological profiles in Moroccan population with colorectal cancer. *African Journal of cancer*. 2014; DOI 10.1007/s12558-014-0352-3. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12558-014-0352-3>
 16. Magaji BA, Moy FM, Roslani AC, Law CW. Descriptive Epidemiology of Colorectal Cancer in University Malaya Medical Centre, 2001 to 2010. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15(15), 6059-6064. DOI: <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.15.6059>
 17. Revue des statistiques du cancer SEER, 1975–2013. Bethesda, MD: Institut national du cancer; 2013. *Disponible sur*: <http://seer.cancer.gov/csr/19752013/> [cité le 26.03.17].
 18. Aparicio T, Mitr Y E, Cunma, GipradL Prise en charge des cancers colorectaux des sujets âgés. *Gastroenterol clin biol* 2005; 29: 1014-23 PubMed . <https://www.em-consulte.com/article/100051/prise-en-charge-des-cancers-colorectaux-des-sujets>
 19. Meddah D, Meddah B, Touil A, Ghalek M, Sahraoui T. An epidemiological study of west Algerian patients with colon cancer. *African Journal of Cancer*. 2009; 1, 31-35. https://www.researchgate.net/publication/225950270_Etude_epidemiologique_du_cancer_du_colon_chez_des_patients_de_l'Ouest_algerien
 20. Alrubaie A, Alkhalidi N, Abd-Alhusain S. A clinical study of newly-diagnosed colorectal cancer over 2 years in gastroenterology center in Iraq. *J. of coloproctology*. 2019; 39 (3) <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2019.05.010>
 21. Navabi SJ, Beiranvand B, Pournia Y, Izadi B, Hosseini J, Obeidavi Z, Nasiri B, Rahbar S. Epidemiology of Colorectal Cancer in Patients admitted to Imam Reza hospital in Kermanshah from 2006 to 2011. *Basic Clin Cancer Res*. 2012;5(1&2):2-7 <https://bccr.tums.ac.ir/index.php/bccrj/article/view/150>
 22. Hamza, Hawro & Rasul, Kakil. (2018). The Epidemiology of Colorectal Cancer in Erbil. *Cancer Science & Research*. 1. 1-6. 10.33425/2639-8478.1007.
 23. Suliman MA, Zamzam ML, Omar AT, Fahmy NN (2020) Clinicopathological Profile of Colorectal Cancer Patients in Suez Canal University Hospitals-Egypt. *J Cancer Biol Res* 8(1): 1127.
 24. Mansour I, Zahrani IH, Abdul Aziz S. Colorectal cancers in Saudi Arabia. *Saudi Med journal*. 2002 ;23(3): 322-327.
 25. Al Dahhan, S. A., & Al Lami, F. H. (2018). Epidemiology of Colorectal Cancer in Iraq, 2002-2014. *The Gulf journal of oncology*, 1(26), 23–26.
 26. Bouvier AN, Trélarre B, Delafosse P, Grosclaude P, Jéhannin-Ligier K et al. Stade au diagnostic des cancers de sein du colon et du rectum. Registre des cancers du réseau Francim. 2018. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/cancer-du-sein/documents/rapport-synthese/stade-au-diagnostic-des-cancers-du-sein-du-colon-et-du-rectum-etude-realisee-a-partir-des-registres-des-cancers-du-reseau-francim>
 27. Li RD, Guan M, Zhou Z, Dong SX, Liu Q. The Role of circRNAs in the Diagnosis of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Nov 19; 8:766208. Doi: 10.3389/fmed.2021.766208. PMID: 34869475; PMCID: PMC8641696.

The Frequency of Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer Samples in Algeria



Bouchra Dahmani^{1*}, Lamia Boublenza¹, Dalale Behar¹, Belkacem Belatbi², Ikram Breik², Amel Benfoula², Nafissa Chabni^{3,4}, Hafida Hassaine¹

1. Department of Natural Sciences of Life, Earth and Universe, Faculty of Biology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

2. Department of Pathological Anatomy, Popular Hospital Establishment of Dr. Benzardjeb, Ain Tmouchent, Algeria.

3. Department of Epidemiology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

4. Department of Epidemiology, Dr. Tidjani Damerdji University Hospital, Tlemcen, Algeria.



Citation Dahmani B, Boublenza L, Behar D, Belatbi B, Breik B, Benfoula A, et al. The Frequency of Human Papillomaviruses and Epstein-Barr Virus in Colorectal Cancer Samples in Algeria. *Research in Molecular Medicine*. 2022; 10(1):1-8. <https://doi.org/10.32598/rmm.10.1.1236.1>

doi <https://doi.org/10.32598/rmm.10.1.1236.1>



Article Type:
Research Paper

Article info:
Received: 18 Jan 2022
Revised: 25 Jan 2022
Accepted: 10 Feb 2022

Keywords:
HPV human papillomavirus, Epstein-Barr virus, Colorectal cancer, Algeria, Polymerase chain reaction, PCR.

ABSTRACT

Background: Environmental factors may play a role in colon cancer. In this view, several studies investigated tumor samples for the presence of various viral DNA with conflicting results. The purpose of this study is to investigate the prevalence of Human papillomaviruses (HPVs) and Epstein-Barr virus (EBV) in patients with colorectal carcinomas.

Materials and Methods: In this study, we collected 74 tumorous paraffin-embedded tissues (Mean±SD age: 66.3±14.98) from the Pathology Department of a hospital in Ain Tmouchent and laboratories of pathological anatomy in western Algeria. DNA from each tissue was extracted and the presence of HPV and EBV was investigated using PCR.

Results: None of our samples were HPV or EBV positive, and we failed to find an obvious correlation between EBV and HPV infections and this type of cancer.

Conclusion: The results suggested that EBV and HPV infection is not common in patients with colorectal cancer in our population. However, the findings merit more investigations on a large number of cases.

* Corresponding Author:

Bouchra Dahmani, PhD.

Address: Department of Natural Sciences of Life, Earth and Universe, Faculty of Biology, University of Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algeria.

Phone: +98 (21) 3672338024

E-mail: bouchradah@yahoo.com

Introduction

Cancer is a major public health problem worldwide. It is one of the leading causes of death in several regions depending upon disparities among different people [1].

Colorectal cancer is the 3rd most common cancer, estimated at 1.9 million new cases in 2020 which accounts for approximately 10% of all cancer cases according to the World Health Organization GLOBOCAN database [2]. Colorectal cancer (CRC) is considered the 4th primary cause of cancer-related deaths in males and the 3rd cause of cancer-related mortality among females [2].

CRC is a tumor that occurs in the colon, the rectosigmoid junction, the rectum, and the anus. In the majority of cases, CRC develops on the pedunculated, much less in the non-pedunculated adenocarcinomas. In the metastatic processes, non-invasive cancer develops only in the mucosa, and afterward invasive cancer beyond the lamina propria of the mucosa [3].

Neoplastic progression can be influenced by different genetic and environmental factors, that is the objective of a meta-analysis performed by Johnson et al. Showing that the risk of developing CRC decreases due to various factors as follows: inflammatory bowel disease (RR=2.93 [1.79-4.81]); hereditary familial history (RR=1.80 [1.61-2.02]); body mass index (RR=1.10 [1.08-1.12]); smoking cigarettes (RR=1.06, [1.03-1.08]); and physical activity (RR=0.88 [0.86-0.91]) [4].

However, around 20% of all cancers are acknowledged to be caused by infectious agents including bacteria and viruses. A relatively small number of viruses including human papillomavirus (HPV), hepatitis B virus, hepatitis C virus, and Epstein-Barr virus (EBV) can cause several types of cancer such as Merkel cell, cervical cancer, Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, and nasopharyngeal carcinomas [5].

Recently, several studies have suggested that viruses such as human papillomavirus (HPV), JC, BK, and EBV may be related to CRC [6]. HPVs are nonenveloped, double-stranded DNA viruses that infect the basal layer of epithelial cells [6]. HPVs are divided into two types: low-risk and high-risk HPVs [7]. Persistent infection with high-risk HPVs can result in the development of intraepithelial neoplasia (pre-cancerous lesions) that can progress to invasive cancer including cervical, anal, penile, esophageal, and vaginal cancers [8].

The HPV genome consists of a circular double-stranded DNA molecule of approximately 8000 base pairs, with eight open reading frames, all of which are transcribed from the same DNA strand and in the same orientation. The genome is organized into three main regions [9] including the E region encoding six genes involved in multiple functions, including viral replication and cell transformation (E1, E2, E4, E5, E6, and E7), the L region encoding L1 and L2 capsid proteins that self-assemble into the virion [10] and long control region which contains activators and promoters of the sequences [10].

The integration of viral DNA into the cellular genome results in partial or total loss of the E2 gene, resulting in increased expression of the HPV E6 and E7 oncogenes. Overexpression of E6 and E7 oncoproteins leads to the degradation, respectively, of p53 and pRb, inducing HPV carcinogenesis. In addition, E6 causes the activation of telomerase, deregulating the pathways involved in cell proliferation, differentiation, immune recognition, and survival signaling. E7 increases genomic instability, resulting in the accumulation of chromosomal changes. This deregulation of the cell cycle, activation of telomerase, and induced genomic instability create a favorable environment for the neoplastic transformation of cells. It is known that these molecular processes lead to genomic instability and cell transformation, an indicator mechanism of HPV-induced colorectal carcinogenesis [11].

The EBV virion has a structure common to all herpesviruses. It is spherical, measuring between 120 and 200 nm in diameter with a 184-kbp long, double-stranded DNA genome that encodes more than 85 genes [12], including viral oncogenes such as six EBV-encoded nuclear antigens (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, and -LP) and latent membrane proteins (LMP1, -2A, and -2B), as well as various noncoding RNAs (EBERs and miRNAs) [12].

The viral particle attaches specifically to the cell surface through a high-affinity interaction between the gp350/220 of the viral envelope and the CD21 molecule present on the plasma membrane of B lymphocytes. The attachment of the virus to CD21 induces the initial signals for cell activation and endocytosis. The viral envelope fuses with the cell membrane and this penetration requires the interaction of the gp85-gp42 complex. EBV can use the following molecules as co-receptors human leukocyte antigen class II. The mechanism of infection for other cell types is different from that of B lymphocytes [13].

The EBV can replicate in two ways by infecting B cells (latent form) and by lytic production of the virion [14]. All EBV-associated cancers involve the virus's latent cycle. Four types of latent gene expression have been described [15].

The virion components are excessively amplified (up to 1000 times) in the nucleus, the lytic program blocks the cell cycle and cellular processes with the help of the transcription factors BZLF1 and BLIMP1, the latter being necessary for uncontrolled replication in epithelial cells, which may become neoplastic [14]. This study aimed to evaluate the presence of HPV and EBV in the CRC in the Algerian population.

Materials and Methods

The research materials consisted of paraffin sections of retrospectively chosen colorectal cancer tissue taken from histopathological specimens from 74 patients who were referred to the Pathology Department of the hospital of Ain Temouchent and the laboratories of pathological anatomy of western Algeria. From the patient's medical records we obtained data on the age, sex, and type of tumor. The study population is described in Table 1. A total of 74 samples were included in this study, 44 female and 30 male. The Mean±SD age was 66.3±14.98 years and the patients' age ranged between 25 and 98 years. Five sections of 10-20 µm of the paraffin-embedded samples were prepared with a stained slide to determine the tumor area by a pathologist.

DNA extraction

Genomic DNA was deparaffinized and extracted from paraffin-embedded tissue samples using Purigene Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with modifications to optimize DNA yield. Briefly, 900 µL of xylene was added to samples to remove the paraffin, followed by 900 µL of 100% ethanol. Samples were then incubated at 55°C in a lysis solution and proteinase K overnight, an incubation

step at 90° for one hour with a dose of proteinase k is added for complete lysis. After samples were completely lysed, a protein precipitation solution was added. The DNA pellet was washed with ethanol 70%, and the DNA sample was dissolved in 20 µL of DNA hydration solution and incubated at 65°C for 1 hour. To determine the purity of the sample wavelength of 280/260 was examined. The extracted DNA was stored at -20°C until use.

PCR methods

Specific PCR was carried out based on HPV L1 consensus primers MY09/MY11 (MY09: 5'-CGTC-CMARRGGAWACTGATC-3', and MY11: 5'-GC-MCAGGGWCATAAYAATGG 3') [16].

The PCR amplification was performed in a 25 µL reaction volume containing 2.5 µL of PCR buffer, 0.6 µL of forward and reverse primers, 0.5 µL of dNTP, 2.5 U/µL of Taq, 19.25 µL of H₂O, and 1 µL of each genomic DNA sample. The PCR program was performed as follows: pre-denaturation at 95°C for 15 minutes, denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 53°C for 45 seconds, extension at 72°C for 1 minutes, 40 cycles, and post-extension at 72°C for 5 minutes, 1 cycle. At the end of amplification, 1 µL of the PCR product was analyzed on 1.5% agarose gel. The resultant product was expected to be a 450-bp fragment. We chose to amplify the region of the EBV LMP1 gene with the following primers:

F:5' AATAGACAGCCCAGTTGAAA 3' R:5' GCAGTGCCATATCTGACGTG 3' [17],

Negative control samples containing water instead of DNA were always processed in a manner parallel to the patient's samples.

The PCR amplification was performed in a 25 µL reaction volume containing 2.5 µL of PCR buffer, 0.6 µL of forward and reverse primers, 0.5 µL of dNTP, 2.5 U of Taq, 19.25 µL of H₂O, and 1 µL of each genomic DNA sample. The PCR program was performed as

Table 1. Frequency distributions of selected variables in colorectal cancer cases (N=74)

Variables		No. (%)
Gender	Female	44(59.5)
	Male	30(40.5)
Age	>50	10(13.5)
	51-60	21(28.4)
	61-70	15(20.3)
	<70	28(37.8)
Site of tumor	Colon	58(78.4)
	Rectal	16(21.6)

follows: pre-denaturation at 94°C for 5 minutes, denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 1 minute, extension at 72°C for 3 minutes, 35 cycles, and post-extension at 72°C for 5 minutes, 1 cycle. At the end of amplification, 1 µL of the PCR product was analyzed on 2% agarose gel. The resultant product was expected to be a 509-bp fragment.

Statistical analysis

The data collected were cleaned and analyzed with SPSS version 25 software. $P < 0.05$ was used as the significance criterion.

Results

The DNA was efficiently extracted from the samples. All samples (74 colorectal adenocarcinomas) were negative for HPV DNA and EBV DNA.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the 1st study reporting the presence of HPV and EBV in human CRC in the Algerian population. CRC is a real public health problem, both in Algeria and throughout the world by its frequency and high mortality. More than a 3rd of new cases of CRC occur outside of industrialized countries. The evaluation of the epidemiological profile has shown that CRC in our region is the 3rd most incidence of cancer after breast and thyroid cancer among females (10.7/100,000 inhabitants) and after bladder and prostate cancer among males (14.3/100,000 inhabitants) [18].

A considerable number of studies are focused on recognizing novel genetic alterations included in CRC pathogenesis, the examinations have appeared that infectious diseases, specifically viral diseases, may also be considered as a primary basic reason involved in the formation of this cancer [19].

The data suggesting an impact of an HPV infection on the development of CRC appeared in 1990. The prevalence rates of HPV in CRC vary according to the available data, ranging from 0% [19-23] to 85% [20].

PCR is the most used technique for the detection of high-risk viral DNA in fresh or formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue [21].

In our study, HPV DNA positivity was not found in any of our cases with adenocarcinoma and adenoma. Probably the low number of samples in this study caused this

result which is in agreement with a study carried out in Turkey in 2011 [22]. Other studies carried out in Iran and Portugal respectively declare that HPV DNA was not identified in any of the normal, adenocarcinoma, or adenoma samples [23, 24]. According to the study of Taherian et al. [25], which is a meta-analysis of many research studies published between 1992-2020, detecting HPV in CRC in different regions of the world, the prevalence of the virus fluctuates from 0-83% with the mean value of 39.05%.

Our findings are in contrast with other studies in this field that have highlighted the presence of HPV in simple CRC. Studies using PCR from Saudi Arabi, Iran, and Syria revealed the presence of HPV in 0.8% [26], 1% [27], and 37%, respectively [21]. In addition, a study in Poland declare that HPV DNA was detected in 20% of cases [28].

The highest reported HPV positivity in CRC was detected in the USA (51%) [29], Argentina (74%) [30], Brazil (83%) [31], Lebanon (64%) [32], and Turkey (83%) [33]. EBV is a human herpes virus that infects more than 90% of the world's population [34]. It has been described to be associated with several human cancer diseases such as nasopharyngeal and gastric carcinomas and various lymphomas, such as Burkitt's lymphoma, NK/T lymphomas, and some Hodgkin's lymphomas [35]. When it comes to CRC, several studies have established a causative link between EBV and colorectal carcinogenesis [36, 37].

Accordingly, our present study in the Algerian population failed to detect the presence of EBV in human CRC samples. In parallel with our result, Boguszakova et al. [38] also failed to detect EBV DNA in the biopsy specimens from adenocarcinoma/adenomatous colorectal tissues. Similarly, Cho et al. reported no sign of EBER gene expression in colorectal tumor specimens, from 274 Korean patients [39]. A study carried out in Sudan showed no relationship between EBV and CRC tissues [34]. An Italian study also declares that any case of CRC samples is EBV positive [40]. In Iran, reports demonstrated the absence of a significant correlation between EBV and CRC development [12, 37].

In concordance with data obtained in the present study, some other studies found a correlation between EBV and human CRC. A study in Iran declared that EBV DNA was detected in only 1 out of 70 (1.4%) adenocarcinoma colorectal tissues while the rest were negative [41]. Karpinski et al. reported that 19% of the CRC cases from Poland were EBV-positive [42]. In Iraq, 20% of the

samples were EBV-positive [43]. A Chinese cohort of colorectal carcinomas was reported to be EBV-positive in 30% of the samples [44].

Significant differences were observed in the detection rate of EBV in Syria and Iran with 36% [45] and 38% [46] of the cases, respectively. The highest reported EBV-positivity in CRC was detected in Chile (46%) .

Conclusion

The results suggested that EBV and HPV infection is not common in patients with CRC in our population. The difference in the positivity rates, observed in the studies, can be explained by some factors, such as the different methods of HPV detection and the choice of the materials for analysis (fresh/paraffin). However, the findings merit more investigations on a large number of cases. A reliable and definite proof will provide new opportunities for the prevention, diagnosis, and therapy of colorectal cancer.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of **Abou Bekr Belkaid University** (Code: 174.FM.UABB.24).

Funding

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research as part of the PRFU project (D01N01UN130120190002).

Authors' contribution

Contribution to all experimental work, data, and statistical analysis, and writing the manuscript: Bouchra Dahmani; Data analysis and investigation, Writing—original draft, and , and Writing—review: Lamia Boublenza, Nafissa Chabni, and Hafida Hassaine; Data collection: Dalale Behar; Investigation: Belkacem Belatbi and Amel Benfoula; Conceptualization and Supervision: Ikram Breik; determined the tumor area of colorectal samples; revised the manuscript; helped to edit the manuscript, and all authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors appreciate Sari Hassoun, Kara Soulimane, and Ahmed Saim for sample selection and also thank the laboratory of pathological anatomy of Popular Hospital Establishment, Benaouda Benzardjeb for sample preparation.

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020; 70(3):145-64. [DOI:10.3322/caac.21601] [PMID]
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019; 144(8):1941-53. [DOI:10.1002/ijc.31937] [PMID]
- [3] Korniluk J, Wcisło G, Nurzyński P, Stec R, Bodnar L, Obrocka B. [Epidemiology of colorectal cancer (Spanish)]. *Współcz Onkol.* 2006; 10(3):136. [Link]
- [4] Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013; 24(6):1207-22. [DOI:10.1007/s10552-013-0201-5] [PMID] [PMCID]
- [5] Antonic V, Stojadinovic A, Kester KE, Weina PJ, Brücher BL, Protic M, et al. Significance of infectious agents in colorectal cancer development. *J Cancer.* 2013; 4(3):227-40. [DOI:10.7150/jca.5835] [PMID] [PMCID]
- [6] Heck DV, Yee CL, Howley PM, Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(10):4442-6. [DOI:10.1073/pnas.89.10.4442] [PMID] [PMCID]
- [7] Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004; 50(1-2):9-19. [PMID]
- [8] Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(8):550-60. [DOI:10.1038/nrc2886] [PMID]
- [9] Al Moustafa AE. E5 and E6/E7 of high-risk HPVs cooperate to enhance cancer progression through EMT initiation. *Cell Adh Migr.* 2015; 9(5):392-3. [DOI:10.1080/19336918.2015.1042197] [PMID] [PMCID]
- [10] Huijbregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* 1993; 13(2):775-84. [DOI:10.1128/MCB.13.2.775] [PMID] [PMCID]

- [11] Santos NC, Tocantins PD, Leão-Cordeiro JA, Atalides FS, Marques LD, Silva AM. The human papillomavirus in colorectal cancer. *J Med Sci.* 2022; 42(1):1-7. [DOI:10.4103/jmedsci.jmedsci_194_20]
- [12] Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol.* 2002; 33(6):608-14. [DOI:10.1053/hupa.2002.129786] [PMID]
- [13] Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(3):803-21. [DOI:10.1158/1078-0432.CCR-0670-3] [PMID]
- [14] Oleynikova NA, Danilova NV, Grimuta MO, Malkov PG. Epstein-Barr virus in the development of colorectal cancer (review). *Sovrem Tekhnologii Med.* 2021; 13(4):82-91. [DOI:10.17691/stm2021.13.4.09] [PMID] [PMCID]
- [15] Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol.* 2001;82(3):149-70. [DOI:10.1046/j.1365-2613.2001.iep0082-0149-x] [PMID] [PMCID]
- [16] Shah KV, Daniel RW, Simons JW, Vogelstein B. Investigation of colon cancers for human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction. *J Surg Oncol.* 1992; 51(1):5-7. [DOI:10.1002/jso.2930510104] [PMID]
- [17] Charef S, Jrad BB, Mahfouth W, Zakhama A, Kassab A, Driss N, et al. [Detection of EBV by PCR in fresh and paraffin embedded samples of cavum tumour (French)]. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 2006; 83(1-4):41-7. [PMID]
- [18] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6):394-424. [DOI:10.3322/caac.21492] [PMID]
- [19] Tavakolian S, Goudarzi H, Eslami G, Dayyani F, Kazeminezhad B, Faghihloo E. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in tumorous and adjacent tissues of colorectal cancer in Iran. *Gene Rep.* 2020; 20:100774. [DOI:10.1016/j.genrep.2020.100774]
- [20] Kirgan D, Manalo P, Hall M, McGregor B. Association of human papillomavirus and colon neoplasm. *Arch Surg.* 1990; 125(7):852-65. [DOI:10.1001/archsurg.1990.01410190060009] [PMID]
- [21] Ibragimova MK, Tsyganov MM, Litviakov NV. Human papillomavirus and colorectal cancer. *Med Oncol.* 2018; 35(11):140. [DOI:10.1007/s12032-018-1201-9] [PMID]
- [22] Gupta I, Al Farsi H, Jabeen A, Skenderi F, Al-Thawadi H, AlAhmad YM, et al. High-risk human papillomaviruses and Epstein-Barr virus in colorectal cancer and their association with clinicopathological status. *Pathogens.* 2020; 9(6):452. [DOI:10.3390/pathogens9060452] [PMID] [PMCID]
- [23] Fernandes Q, Gupta I, Vranic S, Al Moustafa AE. Human papillomaviruses and Epstein-Barr virus interactions in colorectal cancer: A brief review. *Pathogens.* 2020; 9(4):300. [DOI:10.3390/pathogens9040300] [PMID] [PMCID]
- [24] Yavuzer D, Karadayi N, Salepci T, Baloglu H, Dabak R, Bayramicli OU. Investigation of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas and adenomas. *Med Oncol.* 2011; 28(1):127-32. [DOI:10.1007/s12032-010-9416-4] [PMID]
- [25] Taherian H, Tafvizi F, Fard ZT, Abdirad A. Lack of association between human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Prz Gastroenterol.* 2014; 9(5):280-4. [DOI:10.5114/pg.2014.46163] [PMID] [PMCID]
- [26] Martins SF, Mariano V, Rodrigues M, Longatto-Filho A. Human papillomavirus (HPV) 16 infection is not detected in rectal carcinoma. *Infect Agent Cancer.* 2020; 15:17. [DOI:10.1186/s13027-020-00281-z] [PMID] [PMCID]
- [27] Gazzaz F, Mosli MH, Jawa H, Sibiany A. Detection of human papillomavirus infection by molecular tests and its relation to colonic polyps and colorectal cancer. *Saudi Med J.* 2016; 37(3):256-61. [DOI:10.15537/smj.2016.3.13514] [PMID] [PMCID]
- [28] Meshkat M, Tayyebi Meibodi N, Sepahi S, Fadaee N, Salehpour M, et al. The frequency of human papillomaviruses in colorectal cancer samples in Mashhad, northeastern Iran. *Turk J Med Sci.* 2014; 44(3):501-3. [DOI:10.3906/sag-1303-81] [PMID]
- [29] Jarzyński A, Zając P, Żebrowski R, Boguszewska A, Pol-Dacewicz M. Occurrence of BK virus and human papilloma virus in colorectal cancer. *Ann Agric Environ Med.* 2017; 24(3):440-5. [DOI:10.26444/aaem/74648] [PMID]
- [30] Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11):5428-34. [DOI:10.1128/JCM.43.11.5428-5434.2005] [PMID] [PMCID]
- [31] Pérez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: Detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Dis.* 2005; 7(5):492-5. [DOI:10.1111/j.1463-1318.2005.00774.x] [PMID]
- [32] Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2007; 33(5):569-74. [DOI:10.1016/j.ejso.2007.01.014] [PMID]
- [33] Nagi K, Gupta I, Jurdi N, Yasmeen A, Vranic S, Batist G, et al. Copresence of high-risk human papillomaviruses and Epstein-Barr virus in colorectal cancer: A tissue microarray and molecular study from Lebanon. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(15):8118. [DOI:10.3390/ijms22158118] [PMID] [PMCID]
- [34] Buyru N, Tezol A, Dalay N. Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6:115. [DOI:10.1186/1471-2407-6-115] [PMID] [PMCID]
- [35] Bedri S, Sultan AA, Alkhalaf M, Al Moustafa AE, Vranic S. Epstein-Barr virus (EBV) status in colorectal cancer: A mini review. *Hum Vaccin Immunother.* 2019; 15(3):603-10. [DOI:10.1080/21645515.2018.1543525] [PMID] [PMCID]
- [36] Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med.* 2002; 8(6):594-9. [DOI:10.1038/nm0602-594] [PMID]
- [37] Fernandes Q, Merhi M, Raza A, Inchakalody VP, Abdelouahab N, Zar Gul AR, et al. Role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of head and neck cancers and its potential as an immunotherapeutic target. *Front Oncol.* 2018; 8:257. [DOI:10.3389/fonc.2018.00257] [PMID] [PMCID]
- [38] Tafvizi F, Fard ZT, Assareh R. Epstein-Barr virus DNA in colorectal carcinoma in Iranian patients. *Pol J Pathol.* 2015; 66(2):154-60. [DOI:10.5114/pjpp.2015.53012] [PMID]

- [39] 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(4):303-8. [PMID]
- [40] 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(3):297-301. [DOI:10.1053/hupa.2001.22766] [PMID]
- [41] 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. [DOI:10.1186/1750-9378-9-18] [PMID] [PMCID]
- [42] 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. *Pol J Microbiol.* 2018; 67(1):73-9. [DOI:10.5604/01.3001.0011.6146] [PMID]
- [43] 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(4):653-9. [DOI:10.1007/s13277-011-0165-6] [PMID] [PMCID]
- [44] Habib M. The possible role of EBV in carcinogenesis of colorectal carcinoma. *J Fac Med Baghdad.* 2010; 52(1):172-4. [DOI:10.32007/jfacmedbagdad.5221016]
- [45] Song LB, Zhang X, Zhang CQ, Zhang Y, Pan ZZ, Liao WT, et al. Infection of Epstein-Barr virus in colorectal cancer in Chinese. *Ai Zheng.* 2006; 25(11):1356-60. [PMID]
- [46] Al-Antary N, Farghaly H, Aboukassim T, Yasmeen A, Akil N, Al Moustafa AE. Epstein-Barr virus and its association with fascin expression in colorectal cancers in the Syrian population: A tissue microarray study. *Hum Vaccin Immunother.* 2017; 13(7):1573-8. [DOI:10.1080/21645515.2017.1302046] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank
