

RESUME

Les cancers de la cavité buccale représentent environ 25 à 30% des cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS). Ils occupent la 8^{ème} place des cancers les plus fréquents chez les hommes et la 14^{ème} chez les femmes dans le monde. Le but de cette première étude a été focalisé sur la recherche des mutations de l'ADNmt et des sérotypes des VPH impactant dans les cancers de la cavité buccale au Sénégal. Quarante-cinq (45) patients atteints de cancers de la cavité buccale ont fait l'objet de cette étude. Pour chaque patient, un prélèvement de sang et une biopsie de la tumeur ont été obtenus. L'ADN total des patients a été extrait à partir des deux types de prélèvements. Pour la caractérisation moléculaire des cancers de la cavité buccale, deux gènes mitochondriaux (la *D-Loop* et le *MT-CYB*) ont été amplifiés et séquencés. Le gène *L1* a été amplifié pour la détection des sérotypes des VPH. Les analyses des séquences de la *D-Loop* ont révélé que 8 mutations avec une forte fréquence seraient impliquées dans l'évolution des tumeurs de la cavité buccale. Elles ont aussi indiqués que 91% des mutations sont homoplasmiques avec 79,54 et 20,45% de types transitions, transversions respectivement. Contrairement à la *D-Loop*, les mutations du *MT-CYB* sont en majorité hétéoplasmiques (74,23%). Parmi les 97 mutations retrouvées, 32 ont modifié les acides aminés de départ. Les analyses faites avec les différents logiciels de prédition ont permis de déceler 23 mutations considérées comme étant pathogéniques et 9 non pathogéniques. La mutation A15784G (18,18%) est fréquemment retrouvée dans la population. Nos résultats ont également montré l'absence de VPH sur les extraits d'ADN des patients atteints de cancer de la cavité buccale au Sénégal. Ces résultats pourraient à l'avenir fournir de nouveaux marqueurs pour le diagnostic clinique précoce et de nouvelles cibles pour la chimiothérapie.

Mots clés : CCB, VADS, gènes mitochondriaux, VPH

ABSTRACT

Oral cavity cancers (OCC) represent approximately 25 to 30% of cancers of the upper aerodigestive tract (UAT) i.e head and neck carcinomas. They are positioned at the 8th place of the most frequent cancers among men and the 14th among women worldwide. The aim of this first study was focused on the search for mtDNA mutations and HPV serotypes impacting on cancers of the oral cavity in Senegal. Forty-five (45) patients with OCC have been the subject of this study. For each patient, a blood sample and a biopsy of the tumor were obtained. The total DNA of the patients was extracted from two types of samples. For the molecular characterization of OCC, two mitochondrial genes (*D-Loop* and *MT-CYB*) were amplified and sequenced. The *L1* gene has been amplified for the detection of HPV serotypes. The *D-Loop* analyses revealed that 8 mutations with a high frequency would be involved in the evolution of tumors of the oral cavity. They also indicated that 91% of the mutations are homoplasmic with 79.54 and 20.45% of transitions, transversions respectively. Contrary to the *D-Loop*, *MT-CYB* mutations are predominantly heteroplasmic (74.23%). Of the 97 mutations found, 32 modified the original amino acid. Analyzes made with various prediction software allowed to detect 23 mutations considered as being pathogenic and 9 as being non-pathogenic. The A15784G mutation (18.18%) is frequently found in the population. Our results also showed the absence of HPV on the DNA extracts of patients with OCC in Senegal. These results could, in the future, supply new markers for an early clinical diagnosis and new targets for chemotherapy.

Keywords : OCC, UAT, Mitochondrial genes, HPV

LISTE DES ABREVIATIONS

µl :	Microlitre
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNmt :	ADN mitochondrial
Ala :	Alanine
Arg :	Arginine
Asn :	Asparagine
Asp :	Acide aspartique
ARN :	Acide Ribonucléique
ATP :	Adénosine Tri Phosphate
BET :	Bromure d'Ethydium
Blast :	Basic local alignment search tool
CCB :	Cancers de la cavité buccale
Cys :	Cystéine
CYT b :	<i>Cytochrome b</i>
D-Loop :	Displacement-Loop
dN :	Substitution non synonyme
dNTP :	Désoxynucléotide Triphosphate
dS :	Substitution synonyme
EBV :	Virus d'Epstein-Barr
EDTA :	Ethylènediaminetétraacétique
FIJ :	Face interne de la joue
Gln :	Glutamine
Glu :	Acide glutamique
Gly :	Glycine
His :	Histidine
HHV :	Human herpes virus
HPV :	Human papilloma virus
HPV-HR :	Human papilloma virus- high risk
Ile :	Isoleucine
L1 :	Late 1
Leu :	Leucine
Lys :	Lysine
Met :	Méthionine
MgCl₂ :	dichlorure de Magnésium
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OR :	Odd Ratio
ORL :	Oto-Rhino-Laryngologie
Pb :	Paire de bases
PBS :	Phosphate Buffered Salin
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Phe :	Phénylalanine
Pro :	Proline
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
rpm :	Rotations par minute
RRM :	Région rétromolaire
Ser :	Sérine
Taq :	<i>Thernus aquaticus</i>
Thr :	Thréonine
Trp :	Tryptophane
Tyr :	Tyrosine
Val :	Valine

INTRODUCTION

Les cancers de la cavité buccale, de l'oropharynx, du pharynx et du larynx sont communément appelés cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures (VADS). Plus spécifiquement, les cancers de la cavité buccale représentent 25 à 30% des cas de cancers des VADS dans le monde dont 90% des cas sont des carcinomes épidermoïdes (Jemal *et al.*, 2004). Les cancers de la cavité buccale occupent la 8^{ème} place des cancers les plus fréquents chez les hommes et la 14^{ème} chez les femmes dans le monde (OMS, 2005). Ils constituent donc un enjeu important de santé publique dans de nombreux pays. En France par exemple, 6000 nouveaux cas par an sont dénombrés, avec une forte prédominance masculine soit 70% des hommes (Simart, 2002). Au Sénégal, en l'absence des registres de cancers, il est difficile d'affirmer leur incidence. Mais contrairement à l'Occident, nous constatons que cette pathologie affecte de plus en plus les jeunes et les femmes, alors qu'elle était le plus souvent observée chez les hommes d'âge mûr alcoololo-tabagiques. Il apparaît donc que d'autres facteurs vitaux et/ou génétiques soient mêlés à sa survenue chez des patients non alcoololo-tabagiques.

Parmi les facteurs vitaux, l'association entre le papillomavirus humain (VPH) avec certains cancers des VADS a été suspectée dès 1983, suite à la détection d'antigènes vitaux (Syrjanen *et al.*, 1983). Les études qui ont suivi ont montré la présence d'ADN viral des VPH dans une proportion de cancers des VADS variant selon le type et la localisation du cancer (Syrjanen, 2005). Les carcinomes épidermoïdes de la région amygdalienne sont ceux dont l'association avec les HPV-HR est la plus étroite (Gillison, 2004 ; Syrjanen, 2004 ; Fakhry et Gillison, 2006). Ces HPV-HR sont ainsi retrouvés dans quasiment 100% des cancers du col utérin et dans environ 25% des cancers des VADS (St-Guily *et al.*, 2010). Toutefois, la question de savoir si, dans les carcinomes et les dysplasies des VADS, les génomes vitaux sont intégrés au génome cellulaire comme cela est le plus fréquemment le cas dans les cancers du col (Peitsaro *et al.*, 2002) ou restent sous forme épisomale, est discutée pour des raisons de techniques moléculaires principalement.

Sur le plan génétique, il a été mis en évidence que de nombreuses mutations étaient présentes au niveau de l'ADN mitochondriale (ADNmt) et ce pour de nombreux cancers notamment les carcinomes des VADS (Fliss *et al.*, 2000). Ces mutations sont le plus souvent localisées au niveau d'une région nommée « Loop » (boucle). Cependant, l'implication de ces mutations sur la cancérogenèse des carcinomes des VADS reste à définir.

Au Sénégal, nous n'avons pas trouvé d'études mettant en exergue la présence des HPV et /ou l'implication des mutations de l'ADNmt dans les cancers de la cavité buccale CCB. C'est dans ce sens que s'inscrit cette étude qui a pour but de connaître les mutations de l'ADNmt et les sérotypes

des HPV qui ont un pouvoir pathogène dans les cancers de la cavité buccale au Sénégal. Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

- identifier les facteurs de risque qui sont impliqués dans la survenue du carcinome buccal ;
- faire une caractérisation moléculaire des CCB ;
- rechercher les différents types de HPV impliqués dans les CCB ;

Le document est scindé en trois (3) principaux chapitres :

- dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique a été faite pour expliquer les principaux concepts et donner l'état des connaissances;
- dans le deuxième chapitre, la méthodologie utilisée a été détaillée ;
- dans le troisième chapitre, les résultats obtenus ont été analysés et discutés.

Enfin, le travail a été clôturé par une conclusion et des perspectives.

I. 1. CANCER DE LA CAVITE BUCCALE

I.1.1. GENERALITES

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par un ensemble de cellules indifférenciées qui, échappant au contrôle de l'organisme, se multiplient indéfiniment, envahissent les tissus voisins en les détruisant, et se répandent dans l'organisme en métastases.

Les tumeurs buccales naissent de l'épithélium de revêtement au niveau de la muqueuse de la cavité buccale. Les différentes structures anatomiques concernées sont : la langue et la base de langue, le plancher buccal (antérieur et latéral), les gencives maxillaires et mandibulaires, le palais et le voile du palais, les vestibules supérieurs et inférieurs, les faces internes de la joue et les lèvres muqueuses (Andrieu, 1987). Parmi ces cancers, ceux du plancher buccal et de la langue mobile sont les plus fréquents. Les cancers de la région rétro-molaire (RRM) et de la face interne des joues (FIJ) sont rares mais de mauvais pronostic quand ils sont détectés à des stades avancés. Sur le plan histologique, il s'agit, dans plus de 90 % des cas, de carcinomes épidermoïdes (Jemal *et al.*, 2004). Ces cancers surviennent 9 fois sur 10 chez des sujets alcoolo-tabagiques et très souvent au niveau ou à proximité des lésions précancéreuses (Gassama, 2000).

I.1.2. EPIDEMIOLOGIE

Les cancers de la cavité buccale (CCB) représentent 3% de l'ensemble des tumeurs malignes et 30% des cancers des voix aéro-digestives supérieures (VADS) dans le monde selon l'OMS (2005). Ces VADS sont indissociables des cancers oto-rhino-laryngologiques (ORL) (Szpirglas et Guilbert, 1996). Les cancers de la langue représentent 17% des cancers bucco pharyngés (Gassama, 2000). Ces CCB ont l'incidence, de loin la plus élevée dans le monde. Ils sont la cause de 3% des décès par cancer chez l'Homme dont 25% par le cancer de la langue (Leroux et Poucet, 1995). Le cancer buccal est fréquent chez les hommes, ce sont les quatrièmes cancers en fréquence après ceux de la prostate, des bronches, du colon et du rectum. Selon GLOBOCAN (2012), le cancer des lèvres et de la cavité buccale est le 15ème cancer le plus répandu en Afrique et le 7ème cancer en Afrique centrale. En 2012, environ 17 276 nouveaux cas de cancer des lèvres et de la cavité buccale ont été diagnostiqués. Le taux d'incidence standard en Afrique est de 2,6 pour 100 000 habitants, allant de 1,5 en Afrique occidentale à 4,0 en Afrique australe. Un total de 10 341 décès a été causé par le cancer des lèvres et de la cavité buccale et le taux de mortalité standardisé pour l'âge est de 1,6. Le taux de mortalité le plus élevé a été rapporté en Afrique de l'Est (2,2%) et en Afrique centrale (2,3%). Les deux tiers de cette pathologie sont supportés par les pays en développement, et pour plus de 30% par l'Inde seule. Les taux d'incidence les plus élevés sont observés au Pakistan, en

Inde et en France (Cancela et Curado 2008). Il a été constaté depuis 30 ans un rajeunissement et une féminisation de la population atteinte (Righini *et al.*, 2008). Au Sénégal, le profil épidémiologique est celui d'une femme relativement jeune (La tranche d'âge la plus représentée est celle des 45-54 ans) qui ne fume, ni ne boit et avec une hygiène bucco-dentaire souvent médiocre (Touré *et al.*, 2005).

I.1.3. FACTEURS DE RISQUE

Les principaux facteurs de risque environnementaux liés aux cancers de la cavité buccale sont la consommation de tabac et d'alcool. Ils sont à l'origine d'environ 80% des carcinomes observés (Licitra *et al.*, 2002 ; Gillison, 2007). D'autres facteurs sont aussi incriminés dans certains cas de CCB. Il s'agit entre autres : des facteurs diététiques, de la consommation de maté, de l'hygiène bucco-dentaire, des facteurs socio-économiques (Conway *et al.*, 2008), de l'infection par les VPH (principalement dans le cas des cancers de l'oropharynx) et de facteurs génétiques (IARC-WGECRH, 2007).

I.1.3.1. TABAC

Plus de 80 % des patients porteurs d'un cancer de la cavité buccale sont des fumeurs (Negri *et al.*, 1993). La cigarette contient plus de 4000 produits chimiques dont au moins 50 sont des cancérogènes avérés. Ce sont des irritants qui sont directement impliqués dans le processus de carcinogenèse. De plus, la dépendance créée par la nicotine, le rôle irritant des phénols ou de l'acroléine conduisent à l'augmentation du risque de développer un cancer (Gauzeran, 2007). L'addiction à la pipe ou au cigare est également un comportement à risque. La consommation de tabac, la chique de bétel (mélange de feuilles de bétel, chaux teinte, noix d'arec et tabac), ainsi que la prise de cannabis sont autant de facteurs de risque (ADF Cddmd, 2008). La consommation de la noix de bétel est liée à un risque accru de développer des leucoplasies et une fibrose orale sous-muqueuse, lesquelles constituent des lésions précancéreuses (Merchant *et al.*, 2000 ; Warnakulasuriya *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2007 ; Cancela, 2010).

I.1.3.2. ALCOOL

La prise modérée d'alcool (éthanol) a peu ou aucun effet sur le risque d'apparition d'un cancer de la cavité buccale chez un non-fumeur. C'est son premier métabolite, l'acétaldéhyde, qui contribuerait à l'augmentation du risque de développer un cancer des VADS (OMS, 2005 ; Gauzeran, 2007). Les données épidémiologiques indiquent une relation entre la consommation d'alcool et le cancer de la cavité orale car le risque de survenue de la maladie se voit multiplier de 2 à 6 en fonction de la quantité d'alcool consommée quotidiennement (ADF Cddmd, 2008).

I.1.3.3. INTERACTION ALCOOL-TABAC

L'association alcool-tabac a un effet synergique péjoratif (Slootweg et Eveson, 2005). Pour un même fumeur, le risque de cancers des VADS se multiplie par 13 selon la quantité d'alcool (plus

de 5 verres par jour) et la dose de tabac (plus de 20 cigarettes par jour) consommées par rapport à la consommation indépendante de tabac ou d'alcool dans les mêmes proportions (Castellsagué *et al.*, 2004).

I.1.3.4. FACTEURS NUTRITIONNELS

Le rôle de l'alimentation semble non négligeable dans la survenue des cancers de la cavité buccale (ADF Cddmd, 2008). Les carences martiales et vitaminiques notamment en vitamine C et A faciliteraient la survenue des cancers de la cavité buccale (OMS, 2005). Néanmoins, ces carences nutritionnelles mal connues représentent un facteur de risque minime par rapport au couple tabac/alcool. Une consommation élevée en fruits et légumes diminue le risque de cancer de la cavité buccale (La Vecchia *et al.*, 1997).

I.1.3.5. FACTEURS VIRAUX ET COMPORTEMENT SEXUEL

Le potentiel oncogène de certains virus (EBV, HPV, HHV...) a été démontré bien que leur rôle dans la carcinogénèse buccale soit encore mal déterminé. Les virus entraînent l'installation d'une inflammation chronique or, les lésions inflammatoires chroniques auraient un plus grand risque de survenue d'erreurs génétiques au cours des phases de réparation tissulaire, et par conséquent de devenir des lésions malignes (INC, 2010). Parmi les infections du VPH, les deux principaux types reconnus comme étant responsables des cancers de la cavité buccale et jusqu'à 90% des cancers des amygdales sont le HPV16 et le HPV18 (Johnson *et al.*, 2005 ; Boy *et al.*, 2006 ; Mayne *et al.*, 2009). Ils seraient responsables d'une mutation du gène de la protéine P53, régulateur du cycle cellulaire et maintenant l'intégrité du génome. Certains comportements sexuels comme la quantité de partenaires, l'âge précoce du premier rapport sexuel, la pratique de rapports buccaux-génitaux sont liés à des risques accrus d'infection par HPV et conséquemment des cancers (Gillison, 2007 ; Heck *et al.*, 2010). Une étude a confirmé que les comportements sexuels sont associés au risque de cancer dans des sites où le HPV constitue un facteur de risque (Heck *et al.*, 2010).

I.1.3.6. MAUVAISE HYGIENE BUCCODENTAIRE

La mauvaise hygiène bucco-dentaire, un état dentaire et parodontal dégradés et des infections chroniques de la cavité buccale sont habituellement retrouvés chez les patients alcoolo-tabagiques développant des cancers de la cavité buccale (INC, 2010). En effet, la flore buccale bactérienne très développée en cas de mauvaise hygiène bucco-dentaire facilite la dégradation de l'éthanol en acétaldéhyde et facilite le passage de cette substance cancérogène à travers une muqueuse buccale « malade ».

I.1.3.7. FACTEURS GENETIQUES

Des études ont montré que des personnes qui sont exposées à des produits cancérogènes ne développent pas tous les cancers des VADS, donc le risque de développer ces cancers dépendrait aussi d'autres facteurs qui seraient intrinsèques à l'individu et qui pourraient être liés aux antécédents

familiaux (Gillison, 2007). Récemment, la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence des anomalies géniques (L'anémie de Fanconi, La dyskératose congénitale, le xeroderma pigmentosum) fortement corrélées au développement de ces cancers (Gillison, 2007 ; Khan et Bisen, 2013).

I.1.3.8. AUTRES FACTEURS DE RISQUE

La consommation régulière d'épices fortes et de piment s'accompagne de modifications de la muqueuse buccale, se traduisant par des plages kératosiques et/ou érythémateuses. Ces lésions ont sans doute un potentiel de transformation maligne, mais il semble relativement faible (Samson *et al.*, 1999). Plusieurs études épidémiologiques (Winn *et al.*, 2001 ; D'Souza *et al.*, 2007 ; Guha *et al.*, 2007) sur l'utilisation des bains de bouche et cancer oral ont été publiées et deux (Winn *et al.*, 1991 ; Winn *et al.*, 2001) ont trouvé des associations de risque positives (Cole *et al.*, 2003 ; La Vecchia, 2009). La principale hypothèse est que l'utilisation quotidienne des bains de bouche contenant de l'alcool augmente le niveau d'acétaldéhyde dans la salive comme c'est le cas pour les boissons alcoolisées (Lachenmeier *et al.*, 2009).

I.2. PAPILLOMAVIRUS HUMAINS

I.2.1. CLASSIFICATION

Leur classification, basée sur le génotype et l'analyse phylogénique, permet de les différencier en fonction de leur tropisme (cutanés ou muqueux), de leur propriété biologique et de leur potentiel oncogénique (bas risque et haut risque) (Coursaget et Touzé, 2006). Parmi les HPV cutanés les plus fréquents figurent les HPV 1, 2, 3, 4 ou 10 responsables de verrues plantaires et palmaires. Les HPV 5 et 8 sont eux majoritairement retrouvés chez des patients atteints d'une génodermatose rare (l'épidermodysplasie verruciforme). Parmi les HPV muqueux les plus fréquents, il y a les HPV dits à bas risque oncogène (HPV-BR) dont le HPV 6 et 11 qui sont responsables de lésions ano-génitales bénignes tels que les condylomes acuminés ou verrues génitales et les HPV à haut risque oncogène (HPV-HR) dont les plus importants sont les HPV 16 et 18 qui sont associés aux lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (Monsonego, 2006).

I.2.2. ASSOCIATION DES TYPES D'HPV AVEC LE CANCER DE LA CAVITE BUCCALE

I.2.2.1. MECANISMES DE LA CARCINOGENESE

La cancérisation nécessite l'intégration de l'ADN viral des HPV-HR au génome de la cellule hôte ainsi que l'expression de gènes viraux spécifiques. L'intégration du génome des HPV dans celui de la cellule hôte est une étape cruciale, propre aux HPV-HR. Dans le cas de lésions évoluant vers un cancer, le génome d'HPV passe le plus souvent d'une forme épisomale à une forme linéaire intégrée dans l'ADN de la cellule épithéliale hôte (Monsonego, 2007). Le mode d'intégration du génome viral d'HPV est détaillé par Roncin *et al.* (2009).

I.2.2.2. ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Le rôle du virus HPV comme agent étiologique possible d'une sous-population de cancer des VADS a été évoqué pour la première fois en 1983 (Syrjanen *et al.*, 1983). Environ 25 % des cancers des VADS ne sont pas dus à des agents étiologiques bien reconnus comme l'alcool ou le tabac. De très nombreuses études épidémiologiques et expérimentales effectuées depuis plus de 20 ans permettent d'incriminer le virus HPV, même si le lien de causalité entre HPV-HR et cancer des VADS n'est pas aussi fortement corrélé qu'avec le cancer du col de l'utérus (Roncin *et al.*, 2009). Au niveau mondial, sur les 650 000 nouveaux cas annuels de cancer des VADS, environ 150 000 pourraient donc être imputés au virus HPV (Roncin *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter qu'en fonction des études réalisées, l'ADN de l'HPV est détecté dans des proportions allant de 10 à 100 % (Weinberger *et al.*, 2006).

I.3. MUTATIONS SOMATIQUES DU GENOME MITOCHONDRIAL DANS LES CCB

Les mutations somatiques affectant l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été fréquemment observées dans les cancers humains et proposées comme biomarqueurs oncologiques importants (Jakupciak *et al.*, 2005 ; Chatterjee *et al.*, 2006). Cependant, la signification biologique des mutations de l'ADNmt dans le cancer reste incertaine (Chatterjee *et al.*, 2006). Récemment, Larman *et al.* (2012) ont mis en évidence des mutations somatiques non-synonymes sans impact dans des échantillons de tissus tumoraux provenant de 226 personnes atteintes de 5 types de cancer, ce qui renforce la preuve que les mutations d'ADNmt pourraient conférer des avantages de croissance sélectifs tôt dans l'oncogenèse.