

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement
Structure de Recherche : Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire
Discipline : Biologie
Spécialité : Cancérologie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue le 24/11/23 par :

Mme Rajaa BENZEID

Etude de marqueurs moléculaires prédictifs de la rاديوريسistance du cancer du nasopharynx au Maroc

JURY

Youssef BAKRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat	Président/Rapporteur
Nadia DAKKA	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat	Rapporteuse/Examinatrice
Mohcine BENNANI MECHITA	PES, Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences et Techniques, Tanger	Rapporteur/Examineur
Mohammed EL MZIBRI	HDR, Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, Rabat	Examineur
Imane CHAOUI	HDR, Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, Rabat	Co-encadrante
Abdelkarim FILALI-MALTOUF	PES, Expert, Académie Hassan II des Sciences et Techniques de Rabat	Co-Directeur de thèse
Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat	Directrice de Thèse

Année Universitaire : 2023/2024

Faculté des Sciences, 4 Avenue Ibn Batouta, B.P. 1014. Rabat-Maroc

Tel. : +212 5 37 77 80 12 – Fax : + 212 5 37 77 42 61. <http://www.fsr.um5.ac.ma>

CENTRE D'ETUDES DOCTORALES - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

N° d'ordre : 3867

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement
Structure de Recherche : Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire
Discipline : Biologie
Spécialité : Cancérologie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue le 24/11/23 par :

Mme Rajaa BENZEID

Etude de marqueurs moléculaires prédictifs de la rاديوريسistance du cancer du nasopharynx au Maroc

JURY

Youssef BAKRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat	Président/Rapporteur
Nadia DAKKA	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat	Rapporteuse/Examinatrice
Mohcine BENNANI MECHITA	PES, Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences et Techniques, Tanger	Rapporteur/Examineur
Mohammed EL MZIBRI	HDR, Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, Rabat	Examineur
Imane CHAOUI	HDR, Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, Rabat	Co-encadrante
Abdelkarim FILALI-MALTOUF	PES, Expert, Académie Hassan II des Sciences et Techniques de Rabat	Co-Directeur de thèse
Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences de Rabat	Directrice de Thèse

Année Universitaire : 2023/2024

Faculté des Sciences, 4 Avenue Ibn Batouta, B.P. 1014. Rabat-Maroc

Tel. : +212 5 37 77 80 12 – Fax : + 212 5 37 77 42 61. <http://www.fsr.um5.ac.ma>

Avant-Propos

Cette étude a été réalisée au sein de L'Unité de Recherches Médicales et Biologiques (URMB) du Centre National de l'Energie, Des Sciences Et Techniques Nucléaires (CNESTEN), en collaboration avec l'Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohammed V de Rabat, l'Institut Pasteur du Maroc et le Centre Mohammed VI pour le traitement des cancers.

Ce travail a été dirigé par **Dr. CHAOUI Imane, Dr. EL MZIBRI Mohammed** et **Dr. ATTALEB Mohammed** au sein de l'URMB du CNESTEN et par **Pr. FILALI-MALTOUF Abdelkrim** pendant les trois premières années de 2017-2020 et de 2020-2023 par **Pr. BELKADI Bouchra** à la Faculté des Sciences de Rabat.

Ce travail s'insère dans le cadre d'une étude multicentrique, intitulée : « Evaluation de la corrélation pronostique de la TEP-SCAN, des biomarqueurs moléculaires viraux et des marqueurs prédictifs de radiorésistance dans la prise en charge du cancer du nasopharynx au Maroc », sous la direction du **Dr. KHYATTI Meriem**.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Mes précieux parents

Pour l'amour que vous m'avez toujours donné, vos encouragements et toute l'aide que vous m'avez apportée durant mes études. Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorde santé, longue vie et bonheur et faire en sorte que je vous sois serviteur à genou pour toujours et que je puisse vous combler à mon tour.

Mon mari chéri

Je t'ai connu au cours de ma première année de thèse, tu étais toujours près de moi et tu as su apporter le réconfort dont j'avais besoin. Merci pour ta patience, tes encouragements, ton soutien, ta gentillesse et ton amour. Grâce à toi, j'ai fait également la connaissance d'une famille formidable... Ma belle-famille adorée, vous m'avez accueilli et je sais que vous m'avez considérée comme votre propre fille dès le premier jour. Merci infiniment.

Mon petit cœur Alaa

Aucune dédicace, ne peut valoir pour exprimer toute ma tendresse et mon affection vis-à-vis de toi, mon petit cœur, car le fait de savoir que tu es là me donne davantage le courage et la volonté de mener à bien mes travaux.

Ma sœur et mes frères

Pour tous les sacrifices et l'aide qu'ils n'ont cessé de m'apporter tout au long de mes années d'études.

Ma meilleure amie Mimi

Nulle dédicace ne pourrait exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude pour tous les encouragements et soutiens que tu as consentis à mon égard.

Mes chers amis

Je remercie Mariam, Youssra, Jihane, Maroua, Houcine, Oussama, Younes pour les moments agréables et inoubliables que nous avons passés ensemble, pour votre aide, votre encouragement perpétuel, Pour vos précieux conseils.

Que Dieu vous apporte le bonheur, vous aide à réaliser tous vos vœux et vous offre un avenir plein de succès.

Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable de remercier et d'exprimer ma reconnaissance à **Mme SBABOU Leila**, directrice de l'équipe de microbiologie et de biologie moléculaire et l'ensemble des membres de l'EMBM.

Je témoigne ma reconnaissance et ma gratitude à mon encadrante **Mme BELKADI Bouchra**, Professeur de l'Enseignement supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat, Permettez-moi de vous remercier pour votre encadrement, enseignement, vos fructueuses directives et conseils qui ont contribué vivement au bon déroulement et à la réalisation de ce travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements à mon encadrant et mon cher **Mr FILALI-MALTOUF Abdelkarim**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat : Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe. Il me serait difficile d'exprimer en si peu de lignes toute la générosité que vous m'avez manifestée. Je suis à la fois touchée et reconnaissante pour tout ce que vous m'avez appris et apporté, aussi bien sur le plan professionnel que personnel et pour tous les efforts que vous avez fournis pour me permettre de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Merci pour la confiance que vous m'avez toujours témoignée, ainsi que pour votre immense aide pour mener à bien les objectifs ambitieux que ce projet comporte. Merci pour votre écoute et vos conseils prodigués.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude et inestimable respect à mon encadrante **Mme CHAOUI Imane**, docteur chercheur au sein de l'Unité de Biologie et Recherches Médicales au CNESTEN, qui m'a encouragé à faire une thèse et qui a cru en moi dès le début et m'avoir confié ce travail. Permettez-moi de vous remercier énormément pour votre patience, votre disponibilité, votre aide et surtout vos judicieux conseils professionnels et personnels, qui ont contribué à alimenter ma réflexion et à améliorer mon travail.

J'exprime mes remerciements les plus profonds au **Mr EL MZIBRI Mohammed**, le chef de division de l'Unité de Biologie et Recherches Médicales au CNESTEN pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. Je vous remercie pour votre soutien, vos directives et vos précieux conseils.

Je tiens à remercier **Mr Mohammed ATTALEB**, chef de l'Unité de Biologie et Recherches Médicales au CNESTEN. Permettez-moi de vous remercier pour vos multiples

encouragements, votre accueil enthousiaste et votre aide. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

Je voudrais également remercier **Mr BAKRI Youssef** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je remercie profondément **Mme DAKKA Nadia, Mr BENNANI MECHITA Mohcine** pour l'évaluation du présent travail et pour l'acceptation d'être membres de jury de cette thèse. Je vous remercie pour la discussion scientifique, vos remarques et suggestions.

Résumé

Le cancer du nasopharynx (NPC) est une maladie très agressive qui représente un défi majeur pour les cliniciens et les biologistes dans de nombreux domaines. Bien que relativement rare, le NPC est très fréquent dans les pays d'Afrique du Nord. Du fait de sa grande sensibilité aux radiations, la radiothérapie constitue la principale modalité de traitement du NPC. Néanmoins, la radiorésistance demeure un obstacle significatif dans la prise en charge de cette maladie.

Durant les dernières décennies, une grande avancée a été réalisée dans le domaine du développement des biomarqueurs liés au NPC, dans le but d'augmenter l'efficacité et l'efficience de la prise en charge de ce cancer. Dans cette perspective, la présente étude visait à déterminer l'association entre certaines altérations génétiques et la radiorésistance chez les patients atteints de NPC, ainsi qu'à mesurer la charge du virus Epstein-Barr (EBV), qui semble être corrélée à la survie et au pronostic du NPC, afin d'identifier des biomarqueurs moléculaires spécifiques pour une meilleure gestion du NPC.

Le génotypage et l'analyse statistique n'ont révélé aucune association significative entre les SNPs des gènes de réparation de l'ADN, des gènes de détoxification et la réponse à la radiothérapie ($p > 0,05$). Cela suggère que ces SNPs n'ont aucun impact sur le statut de radiorésistance/radiosensibilité des patients atteints du NPC. Par conséquent, ils ne peuvent pas être utilisés, à ce stade, comme biomarqueurs prédictifs de la réponse à la radiothérapie dans le NPC. Des études supplémentaires, sur un panel plus large, pourraient mieux démontrer l'interaction de ces polymorphismes et la réponse à la radiothérapie. La présente étude a également révélé une forte association entre la charge virale avant le traitement et les facteurs pronostiques classiques. De plus, nos résultats ont clairement démontré la valeur clinique de la charge virale après le traitement. Ceci suggère que la mesure de la charge virale peut être un biomarqueur pronostique utile dans la prise de décision clinique et pour l'amélioration de la prise en charge du NPC au Maroc.

Ces travaux ont été réalisés dans le but de contribuer à la sélection des biomarqueurs potentiels permettant d'élaborer un profil moléculaire de la tumeur, en vue d'améliorer la prise en charge du NPC au Maroc.

Mots clés : Cancer du nasopharynx, Biomarqueurs, Polymorphismes, Radiorésistance, Charge virale.

Abstract

Nasopharyngeal cancer (NPC) is a highly aggressive disease that represents a major challenge for clinicians and biologists in various fields. Although relatively rare, NPC is very common in North African countries. Due to its high sensitivity to radiation, radiotherapy is the primary treatment modality for NPC. However, radioresistance remains a significant obstacle in managing this disease.

In recent decades, significant progress has been made in the development of biomarkers related to NPC, aiming to increase the effectiveness and efficiency of managing this cancer. In this context, the present study aimed to determine the association between specific genetic alterations and radioresistance in NPC patients, as well as to measure the Epstein-Barr virus (EBV) load, which appears to be correlated with NPC survival and prognosis, in order to identify specific molecular biomarkers for better NPC management.

Genotyping and statistical analysis did not reveal any significant association between DNA repair gene SNPs, detoxification gene SNPs, and response to radiotherapy ($p>0.05$). This suggests that these SNPs have no impact on the radioresistance/radiosensitivity status of NPC patients. Therefore, at this stage, they cannot be used as predictive biomarkers for radiotherapy response in NPC. Further studies, with a broader panel, could better demonstrate the interaction of these polymorphisms and response to radiotherapy. The present study also revealed a strong association between viral load before treatment and classic prognostic factors. Additionally, our results clearly demonstrated the clinical value of viral load after treatment. This suggests that measuring viral load can be a useful prognostic biomarker in clinical decision-making and for improving NPC management in Morocco.

These works were carried out with the aim of contributing to the selection of potential biomarkers to develop a molecular profile of the tumor, with the goal of improving NPC management in Morocco.

Keywords: Nasopharyngeal Cancer, Biomarkers, Polymorphisms, Radioresistance, Viral Load.

Liste des publications

1. **Benzeid, R.**, Gihbid, A., Benchekroun, N., Tawfiq, N., Benider, A., Attaleb, M., Maltouf, A.F., EL Mzibri, M., Khyatti, M., & Chaoui, I. (2023). Recent advances in Nasopharyngeal cancer management: from diagnosis to theranostics. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine (Formerly Current Pharmacogenomics)*. 20(1):1-14.
2. **Benzeid, R.**, Gihbid, A., Tawfiq, N., Benchakroun, N., Bendahhou, K., Benider, A., Guensi, A., El Benna, N., Filali Maltouf, A., Attaleb, M., Chaoui, I., Khyatti, M., El Mzibri, M. (2023). Genetic Polymorphisms in ERCC1 Gene and Their Association with Response to Radiotherapy in Moroccan Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 24(1), 93.
3. **Benzeid, R.**, Gihbid, A., Tawfik, N., Benchakroun, N., Bendahhou, K., Benider, A., Guensi, A., El Benna, N., Filali Maltouf, A., El Mzibri, M., Attaleb, M., Khyatti, M., Chaoui, I. (2023). Association between single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and the efficacy of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma patients. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 27(1), 28-34.
4. **Benzeid, R.**, Gihbid, A., Benchekroun, N., Bendahhou, K., El Benna, N., Guensi, A., Benider, A., Tawfiq, N., Filali Maltouf, A., El Mzibri, M., Attaleb, M., Khyatti, M., Chaoui, I. (2022). *GSTP1* Ile105Val and *GPX1* Pro198Leu Polymorphisms and Their Association with Response to Radiotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *EJMO*. 6(1): 64-72.
5. Gihbid, A., **Benzeid, R.**, Faouzi, A., El Alami, I., Tawfiq, N., Benchakroun, N., ... & Khyatti, M. (2022). The Dynamic Change in Plasma Epstein–Barr Virus DNA Load over a Long-Term Follow-Up Period Predicts Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma. *Viruses*, 15(1), 66.
6. Gihbid, A., **Benzeid, R.**, Faouzi, A., Nourilil, J., Tawfiq, N., Benchakroun, N., ... & Khyatti, M. (2021). Circulating cell-free Epstein–Barr virus DNA levels and clinical features in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Infectious Agents and Cancer*, 16(1), 1-7.
7. Draft d'article qui est axé sur l'étude de l'expression des micro-ARNs cellulaires (miR324-3p, miR-21-3p, miR39-3p et miR-34c-5p) par RT qPCR et leur relation avec la réponse radiothérapeutique.

Liste des communications orales et affichées

➤ **Communications orales**

1. Benzeid R, Gihbid A, Benchekroun N, Bendahhou N, El Benna N, Guensi A, Benider A, Tawfiq N, Filali Maltouf A, Attaleb M, El Mzibri N, Khyatti M, Chaoui I. (2018). Study of the predictive molecular biomarkers of radioresistance of nasopharyngeal cancer in Morocco. Summer school, Alakhawayn university – Ifrane.
2. Benzeid R, Gihbid A, Benchekroun N, Bendahhou N, El Benna N, Guensi A, Benider A, Tawfiq N, Filali Maltouf A, Attaleb M, El Mzibri N, Khyatti M, Chaoui I. (2019). The association between SNPs in detoxification genes and radiotherapy outcomes in patients with nasopharyngeal carcinoma. Summer school, Alakhawayn university – Ifrane.

➤ **Communications affichées**

1. Benzeid R, Gihbid A, Benchekroun N, Bendahhou N, El Benna N, Guensi A, Benider A, Tawfiq N, Filali Maltouf A, Attaleb M, El Mzibri N, Khyatti M, Chaoui I. (2019). The association between Single Nucleotide Polymorphisms in detoxification genes and radioresistance in patients with nasopharyngeal carcinoma. First international congress of the Moroccan society of genomic and human genetics and the third edition of the school of immunogenetics theme 'bridging gaps between genomics and medicine in Africa. Faculté des Sciences – Agadir.
2. Benzeid R, Gihbid A, Benchekroun N, Bendahhou N, El Benna N, Guensi A, Benider A, Tawfiq N, Filali Maltouf A, Attaleb M, El Mzibri N, Khyatti M, Chaoui I. (2022). 'Polymorphisms in DNA repair genes and their association with response to radiotherapy in Nasopharyngeal carcinoma patients. Faculté de 1 ère Journée Scientifique de Biosciences et Biotechnologies. Université Mohammed VI des Sciences de la Santé (UM6SS) – Casablanca.

Liste des figures

Revue bibliographique :

Figure 1: Coupe sagittale médiane de la face montrant les rapports du nasopharynx.....	5
Figure 2: Epithélium cylindrique cilié haut du nasopharynx avec chorion riche en tissu lymphoïde	6
Figure 3 : Cancérogenèse du cancer du nasopharynx.....	8
Figure 4: Les mécanismes utilisés par l'EBV dans l'infection des cellules épithéliales et des cellules B	9
Figure 5: Cycle de vie du virus EBV dans les cellules du nasopharynx (Richardo et al., 2020)	10
Figure 6: Les voies de signalisations activées par l'EBV dans le NPC.....	12
Figure 7 : Les cinq voies de signalisation connues en aval de l'EGFR.....	15
Figure 8: Taux d'incidence du NPC dans le monde	18
Figure 9: Taux d'incidence du NPC en fonction du sexe.....	18
Figure 10: Procédure de traitement des différents stades I-IVA du NPC.....	23
Figure 11: Procédure de traitement en cas de récurrence et/ou métastase du NPC.....	24
Figure 12: Représentation schématisée des effets directs et indirects des irradiations sur l'ADN.....	26
Figure 13 : Les différents types de réponses cellulaires à la radiothérapie	30
Figure 14: Les différentes réponses aux dommages de l'ADN.....	31
Figure 15 : la voie de réparation BER.....	32
Figure 16: La voie de réparation NER	34
Figure 17: la protéine XRCC1.....	35
Figure 18: Participation de la protéine XRCC1 dans la voie BER.....	36
Figure 19 : XRCC3, localisation chromosomique, structure du gène et structure de la protéine.....	38
Figure 20: Rôle de la protéine XRCC3 et RAD51C dans la recombinaison méiotique.....	39
Figure 21: Structure de la protéine ERCC1.....	41
Figure 22: Rôle de la protéine ERCC1 dans la voie de réparation NER.....	43
Figure 23: Diagramme représentatif de l'expression du gène GPX1	47
Figure 24: La direction de transcription (A et B) et la structure du GPX1 (C)	47
Figure 25: Les mécanismes enzymatiques de GPX1 pour éliminer les superoxydes.....	48
Figure 26: Représentation schématisée de la voie de biogenèse de miRNA	52
Figure 27: Structure du précurseur pri-miARN.....	52
Figure 28: Mécanisme d'action des microARNs	53
Figure 29: la dérégulation des microARNs dans le cancer	54
Figure 30: Les microARNs impliqués dans le NPC	56
Figure 31: L'effet des microARNs sur la radioresistance dans le NPC	58

Liste des figures des articles

Article 1

Figure 1:	Regulation of NF-KB signaling pathway in normal nasopharyngeal epithelial cells.....	68
Figure 2:	The biological effects of radiation and the mechanism of radiation resistance.....	71
Figure 3:	Multiple signaling pathways involved in radiotherapy resistance of NPC.....	71

Article 3

Figure 1:	Kaplan-Meier analyses of progression free survival and overall survival correlated to Arg299Gln and Thr241Met single nucleotide polymorphisms in nasopharyngeal cancer patients.....	97
-----------	--	----

Article 5

Figure 1:	Mortality and overall survival of NPC patients according to their pre-treatment EBV DNA load levels.....	119
-----------	--	-----

Article 6

Figure 1:	The 4-years' survival outcomes of patients with NPC according to the EBV DNA load before and at the end of treatment.....	128
Figure 2:	The 4-years' survival outcomes of patients with NPC according to EBV DNA load 6 and 18 months after treatment.....	128
Figure 3:	(A) Overall survival, (B) loco-regional recurrence free survival, (C) distant metastasis free survival, (D) progression free survival are illustrated for the different subgroups of patients with NPC according to the dynamic change in plasmatic EBV DNA loads.....	129

Liste des tableaux

Revue bibliographique :

Tableau 1:	La classification TNM.....	36
Tableau 2:	Stade du cancer du nasopharynx.....	37
Tableau 3:	Liste des miARNs agissant en tant qu'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans le NPC.....	55
Tableau 4:	MicroARNs impliqués dans la radiorésistance du NPC.....	57

Article 2:

Tableau 1:	Primers for PCR amplification.....	79
Tableau 2:	Socio-Economic and Clinical Characteristics of Recruited NPC Patients.....	80
Tableau 3:	Distribution of C8092A and C118T Genotypes in NPC Cases.....	81
Tableau 4:	Association between ERCC1 SNPs and Clinical Stages	81
Tableau 5:	Association between ERCC1 Polymorphisms and Radiotherapy Response.....	81

Article 3:

Tableau 1:	Primer sequences used for of <i>XRCC1</i> and <i>XRCC3</i> single nucleotide polymorphism genotyping.....	89
Tableau 2:	Demographic and pathological characteristics of the nasopharyngeal carcinoma population study.....	90
Tableau 3:	Distribution of the <i>XRCC1</i> and <i>XRCC3</i> single nucleotide polymorphism genotypes and alleles in nasopharyngeal carcinoma patients	90
Tableau 4:	Association between <i>XRCC1</i> and <i>XRCC3</i> polymorphisms and clinical stages.....	91
Tableau 5:	Association between <i>XRCC1</i> and <i>XRCC3</i> polymorphisms and response to radiotherapy	91

Article 4:

Tableau 1:	Primers Characteristics	100
Tableau 2:	Socio-demographic, clinical and pathological characteristics of NPC patients.....	101
Tableau 3:	Genotypes distribution and allelic frequencies within NPC patient.....	101
Tableau 4:	Association between demographic, clinico-pathological data and <i>GPX1</i> Pro198Leu polymorphism.....	102
Tableau 5:	Association between demographic, clinico-pathological data and <i>GSTP1</i> Ile105Val polymorphism	102

Article 5:

Tableau 1:	Socio-economic and clinico-pathologic characteristics of patients recruited in the study	112
Tableau 2:	Distribution of plasma EBV DNA loads according to conventional prognostic factors	113

Article 6:

Tableau 1:	The prevalence of EBV DNA and EBV DNA levels in the plasma of patients with NPC at various time points	122
Tableau 2:	The 4-years' survival rates (OS and PFS) among age subgroups of NPC patients according to plasma EBV DNA load before and at the end of treatment.....	123
Tableau 3:	Comparisons of the 4-years' survival rates among subgroups of NPC patients defined by the combination of plasma pre-EBV DNA, TNM classification and UICC Stages	127
Tableau 4:	Multivariate Cox regression analyses for the studied survival endpoints according to the EBV DNA load.....	127

Liste des abréviations

AGO :	Argonaute
AJCC/UICC :	American Joint Committee on Cancer / l'Union internationale contre le cancer
BER:	Base Excision Repair
CCND1:	Cell cycle regulator cyclin D1
CIRC :	Centre International de Recherche sur le Cancer
CTH :	Chimiothérapie.
CTL :	Lymphocytes T cytotoxiques
DR:	Direct Repair
EA :	Early antigen.
EBER :	ARN de l'Epstein Barr virus.
EBNA :	Epstein Barr nuclear antigen.
EBV :	Epstein-Barr Virus
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA :	Early membran antigen.
<i>ERCC1</i> :	Excision repair crosscomplementing 1
FEN1 :	Flap Endonuclease 1
GPx1 :	Glutathionperoxydase
GSK3 β :	Glycogène synthase kinase3-beta
GSTP1 :	Glutathion S-transférases
HR :	HomologousRepair.
IRM :	Imagerie par résonnance magnétique.
JAK :	Janus kinases
kDa :	kilos dalton
LMP1 :	Latent membranprotein 1
LMP2 :	Latent membranprotein 2
LPD-1 :	Ligand de la PD-1.
miR :	MicroARN
MMR :	MisMatch Repair
mTOR :	Mammalian target of rapamycin
NER :	Nucleotide Excision Repair
NF-KB :	Nuclear factor
NFS :	Numération formule sanguine.
NPC :	Cancer du nasopharynx
PD-1 :	Programmed cell death protein 1
RCC :	Radio-chimiothérapieconcomitante.
RISC :	RNA-induced silencing complex
RT :	Radiothérapie.
SNPs :	Single nucleotide polymorphisms
STAT :	Signal transducer and activator of transcription
TDM :	Tomodensitométrie
TEP :	Tomographie par émission de positons
TLR3 :	Toll-like receptors
TNM :	Tumor-nodes-metastases
UCNT :	Carcinome indifférencié type nasopharyngé
VADS :	Voies aéro-digestives supérieures
VCA :	Virus capsidantigen
<i>XRCC 3</i> :	X-ray repair cross-complementing 3
<i>XRCC1</i> :	X-ray repair cross-complementing 1

SOMMAIRE

Avant-Propos.....	I
Dédicace.....	II
Remerciements.....	III
Résumé.....	V
Abstract.....	VI
Liste des publications.....	VII
Liste des communications orales et affichées.....	VIII
Liste des figures.....	IX
Liste des figures des articles.....	X
Liste des tableaux.....	XI
Liste des abréviations.....	XII
Introduction Générale.....	1
Revue Bibliographique.....	3
Chapitre I :	4
Cancer du nasopharynx	4
I. Rappel sur le nasopharynx.....	5
I.1. Anatomie du nasopharynx.....	5
I.2. Paroi du nasopharynx.....	6
I.3. Histologie du nasopharynx.....	6
I.4. Rôle du nasopharynx.....	7
II. Symptômes du cancer du nasopharynx	7
III. Cancérogenèse.....	7
III.1. Généralités.....	7
III.2. Cancérogenèse du cancer du nasopharynx	8
III.3. Cycle de vie du virus EBV dans les cellules du nasopharynx.....	9
III.4. Les caractéristiques du cycle de vie latent/lytique du EBV	10
III.5. Les voies de signalisation.....	11
IV. Facteurs de risque du cancer du nasopharynx	15
IV.1 Facteurs viraux	16
IV.2 Facteurs environnementaux.....	16
IV.3 Facteurs génétiques	17
V. Épidémiologie du cancer du nasopharynx.....	18
V.1. Dans le monde	18

V.2. Au Maroc.....	19
VI. Diagnostic du cancer du nasopharynx.....	19
VI.1. Bilan biologique.....	19
VI.2. Examens radiologiques.....	19
VI.3. Examen endoscopique et histopathologique.....	20
VII. Classification du cancer de nasopharynx.....	20
VII.1. Classification TNM.....	20
VII.2. Classification histologique.....	22
VIII. Traitement.....	23
VIII.1. Chirurgie.....	24
VIII.2. Chimiothérapie.....	25
VIII.3. Radiothérapie.....	25
VIII.4. Immunothérapie.....	26
Chapitre II : Les mécanismes de résistance des patients avec NPC à la radiothérapie.....	28
I. La radiorésistance et le cancer de nasopharynx.....	29
II. Les mécanismes de la radiorésistance du cancer de nasopharynx.....	29
II.1. Généralités.....	29
II.2. Rappels sur les mécanismes de réparation de l'ADN.....	30
1. La voie de réparation BER.....	31
2. La voie de réparation NER.....	33
II.3. Les altérations génétiques.....	34
1. Altérations des gènes de réparation de l'ADN.....	34
1.1. X-ray repair cross-complementing group 1 (<i>XRCC1</i>).....	35
A. Structure du gène.....	35
B. Structure et rôle de la protéine.....	35
C. Polymorphisme du gène <i>XRCC1</i> et radiorésistance.....	36
1.2 X-ray repair cross-complementing group 3 (<i>XRCC3</i>).....	38
A. Structure du gène.....	38
B. Structure et rôle de la protéine.....	38
C. Polymorphismes du gène <i>XRCC3</i> et radiorésistance.....	39
1.3. Excision repair cross-complementing group1 (<i>ERCC1</i>).....	40
A. Structure du gène.....	40
B. Structure et rôle de la protéine.....	40
C. Polymorphisme du gène <i>ERCC1</i> et radiorésistance.....	42

2. Altération des gènes de détoxification.....	44
2.1 Glutathione S-transferasesP1 (<i>GSTP1</i>)	44
A. Structure du gène.....	44
B. Structure et rôle de la protéine.....	44
C. Polymorphismes du gène <i>GSTP1</i> et la radiorésistance.....	45
2.2 Glutathion peroxydase 1(<i>GPX1</i>)	46
A. Structure du gène.....	46
B. Structure et rôle de la protéine.....	47
C. Polymorphismes du gène <i>GPX1</i> et la radiorésistance	48
3. Les MicroARNs et la radiorésistance.....	50
3.1. Généralités.....	50
3.2. Biogenèse des microARN	50
3.3. Mode d'action des microARNs.....	53
3.4. Les microARNs dans le NPC	54
3.5 Les microARNs et la radiorésistance	56
Matériel et Méthodes.....	59
I. Considérations éthiques	60
II. Population de l'étude	61
III. Conception de l'étude	61
IV. Approche méthodologique :.....	61
Résultats	63
Chapitre I : Cancer du nasopharynx.....	64
I. Les avancées récentes dans la prise en charge du NPC : De la phase diagnostique à la	
théranostique (revue)	65
Chapitre II : Etude des biomarqueurs de la radiorésistance dans le NPC	80
I. Polymorphismes génétiques du gène <i>ERCC1</i> et leur association avec la réponse à la	
radiothérapie chez les patients marocains atteints du NPC	81
II. L'association entre les polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN et l'efficacité de	
la radiothérapie chez les patients atteints du NPC	83
III. Corrélation entre les variations génétiques <i>GSTP1</i> Ile105Val et <i>GPX1</i> Pro198Leu et la	
réponse à la radiothérapie chez les patients atteints du NPC.....	99
Chapitre III : Mesure de la charge virale du virus epstein–barr chez les patients atteints du	
NPC.....	110
I. Les niveaux d'ADN du virus Epstein-Barr et leurs corrélations avec les caractéristiques	
cliniques chez les patients marocains atteints du NPC	111

II. L'analyse de l'évolution de la charge virale dans le plasma tout au long du suivi thérapeutique offre des perspectives de prédiction du pronostic dans le NPC.....	120
Discussion Générale	135
REFERENCES.....	154

Introduction Générale

Introduction Générale

Le cancer du nasopharynx (NPC) est une tumeur d'origine épithéliale qui présente un potentiel métastatique très élevé par rapport aux autres cancers de la sphère Oto-rhino-laryngique (ORL). Jusqu'à 80 % des patients atteints de NPC sont diagnostiqués à des stades avancés, ce qui est associé à l'échec thérapeutique et à un mauvais pronostic. Cela est principalement dû à sa profonde localisation ainsi qu'au fait qu'il est asymptomatique aux stades précoces.

Le NPC étant relativement sensible aux rayonnements ionisants, la radiothérapie constitue une pierre angulaire dans la prise en charge thérapeutique de ce cancer. Malgré que la radiothérapie permette d'obtenir un taux de contrôle locorégional du NPC relativement élevé, et qu'elle soit associée à un résultat positif pour les stades précoces, plus que 40 % des patients présentent une récurrence de la maladie ou des métastases à distance. Les taux de métastase à distance restent une cause majeure de décès pour les cas de NPC initialement non métastatiques, et en particulier pour les stades avancés avec métastases ganglionnaires ou au moins une atteinte parapharyngée. Par conséquent, la survie à long terme des patients demeure un défi majeur dans le traitement et la prise en charge de ce cancer.

La radiorésistance désigne la capacité des organismes à protéger, réparer et éliminer les dommages moléculaires, cellulaires et tissulaires causés par les rayonnements ionisants. La résistance à la radiothérapie peut être le résultat de différents événements génétiques et épigénétiques, telles que les mutations génétiques ou l'expression aberrante des gènes, la modification épigénétique des gènes, l'activation anormale de certaines voies de signalisation, l'altération du microenvironnement tumoral et la présence de polymorphismes dans certains gènes. Il est donc impératif d'explorer les mécanismes génétiques et épigénétiques impliqués dans la radiorésistance afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique du NPC.

Durant les dernières décennies, un intérêt particulier a été donné à l'étude des biomarqueurs moléculaires du NPC. Certains polymorphismes génétiques sont d'une grande importance dans l'évaluation de la réponse à la radiothérapie dans le NPC. Depuis 2002, plus de deux cents études publiées ont signalé la relation entre les polymorphismes et le pronostic du NPC chez les patients recevant une radiothérapie. Dans ce sens, un intérêt particulier a été donné aux polymorphismes des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et dans la détoxification, qui pourraient être associés à la réponse tumorale après une radiothérapie.

Le cancer du nasopharynx puise son originalité dans sa liaison stricte avec le virus d'Epstein-Barr (EBV). Cette liaison a été établie par la détection de l'ADN du virus EBV et de certains

antigènes dans les cellules cancéreuses. Plusieurs études ont démontré l'association entre l'ADN viral, le volume et l'extension tumorale chez les patients atteints du NPC. Cette association EBV-NPC a été mise à profit pour le diagnostic, le pronostic et le suivi des cas NPC en utilisant comme biomarqueur la mesure de la charge virale en ADN circulant du virus EBV dans le plasma des patients NPC.

L'implication de ces variations génétiques dans la prédisposition aux cancers ainsi que dans la prédiction de la réponse à la radiothérapie est un champ majeur d'investigation en vue d'une thérapie ciblée, pilier de la médecine personnalisée.

A ce jour, aucune étude n'a été réalisée au Maroc portant sur la corrélation entre ces variations génétiques et l'efficacité de la radiothérapie dans le NPC. La recherche de biomarqueurs prédictifs de la radiorésistance est en effet l'un des enjeux de la cancérologie. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de cette thèse qui consistent en l'identification des biomarqueurs qui permettent de prédire la réponse tumorale à la radiothérapie et identifier les patients ayant un grand risque de radiorésistance afin d'élaborer un profil moléculaire de la tumeur, orienter le clinicien dans la décision thérapeutique et par conséquent assurer une prise en charge plus efficace du NPC au Maroc.

Pour atteindre cet objectif, nous envisageons d'évaluer l'association possible entre les SNPs des gènes de réparation de l'ADN : le SNP Arg399Gln du gène *XRCC1* (rs25487), le SNP Thr241Met du gène *XRCC3* (rs861539), les SNPs C8092A (rs3212986) et C118T (rs11615) du gène *ERCC1* ; ainsi que les SNPs des gènes de détoxification : le SNP Ile105Val (rs1695) du gène *GSTP1*, le SNP Pro198Leu (rs1050450) du gène *GPX1* et leur lien avec la réponse à la radiothérapie chez une population marocaine atteinte de NPC recrutée au Centre Mohammed VI pour le Traitement des Cancers. D'autre part, nous étudierons l'association possible entre la charge d'ADN virale plasmatique avant le traitement, les facteurs pronostiques conventionnels et la survie des patients afin d'évaluer leur valeur clinique dans notre population d'étude. De plus, nous analyserons le changement dynamique de la charge d'ADN plasmatique du virus EBV avant le traitement, à la fin du traitement et à divers moments après le traitement (6, 18 et 24 mois après le traitement) et son importance clinique dans la prise en charge et le suivi thérapeutique du NPC.

Revue Bibliographique

Chapitre I :
Cancer du nasopharynx

I. Rappel sur le nasopharynx

Les voies aéro-digestives supérieures (VADS) sont constituées de plusieurs cavités : les cavités nasales, les cavités sinusiennes, la cavité buccale, le pharynx qui est constitué de trois segments (le nasopharynx, l'oropharynx et l'hypopharynx), le larynx qui est divisé en trois parties (la glotte, la sus-gllotte et la sous-gllotte), la trachée et l'œsophage (Syrjänen, 2021).

I.1. Anatomie du nasopharynx

Le nasopharynx appelé également rhinopharynx ou cavum constitue la partie supérieure du pharynx (Mankowski and Bordoni, 2020). C'est une cavité de forme cubique avec 3 axes ; un axe vertical (3 cm), un axe antéro-postérieur (2cm) et un axe transversal (4.5cm) ; avec une capacité approximative de 14cm³ (Legent et al.,1986). Le nasopharynx communique en avant, par les choanes, avec les cavités nasales, et grâce à une trompe d'eustache, il est relié aux oreilles (Scotté, 2002). Cette cavité est située sous la base du crâne, en arrière des fosses nasales et du voile du palais, en avant de l'axis et de l'apophyse basilaire de l'occipital (Putz, 2000 ; Legent et al., 2002). Il est constitué de parois musculo-aponévrotiques limitant une cavité impaire (Al Tabaa and Kania., 2017) (Figure 1).

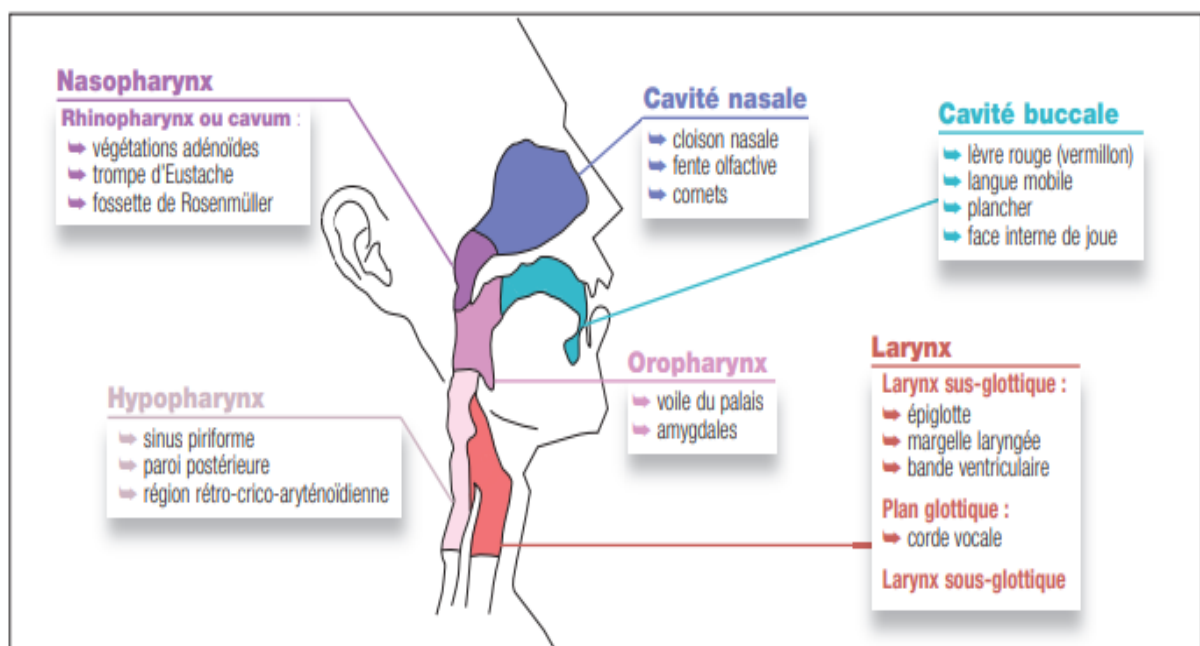


Figure 1: Coupe sagittale médiane de la face montrant les rapports du nasopharynx
(Blanchard et al., 2013).

I.2. Paroi du nasopharynx

Le nasopharynx comporte une paroi latérale qui est de type musculo-aponévrotique, une paroi antérieure qui est constituée par les choanes et la face postérieure du voile du palais, une paroi postéro-supérieure qui présente une formation lymphoïde (végétations adénoïdes) (Hendaoui., 2010). La localisation profonde de cette cavité aérienne permet d'expliquer en grande partie la symptomatologie des lésions cancéreuses du nasopharynx dite symptomatologie d'emprunt et rend le diagnostic tardif et difficile (Benyahia., 2021).

I.3. Histologie du nasopharynx

La paroi du nasopharynx est constituée de (Leeson., 1980 ; Bonfils and Chevalier., 2005) :

- Un fascia externe (petite lame de tissu conjonctif) séparant l'axe musculaire des espaces profonds de la face.
- Des muscles constricteurs supérieur et moyen construisant une gouttière recouverte par deux fascias.
- Un fascia interne (grosse lame de tissu conjonctif) séparant la muqueuse du plan musculaire.
- Une muqueuse bordée d'un épithélium variable ; cylindrique pseudo-stratifié cilié dans sa partie antéro-supérieure et pavimenteux stratifié dans sa partie postéro-inférieure et intermédiaire de transition. Le chorion est fait de tissu élastique et de glandes accessoires séreuses et mixtes (Figure2).

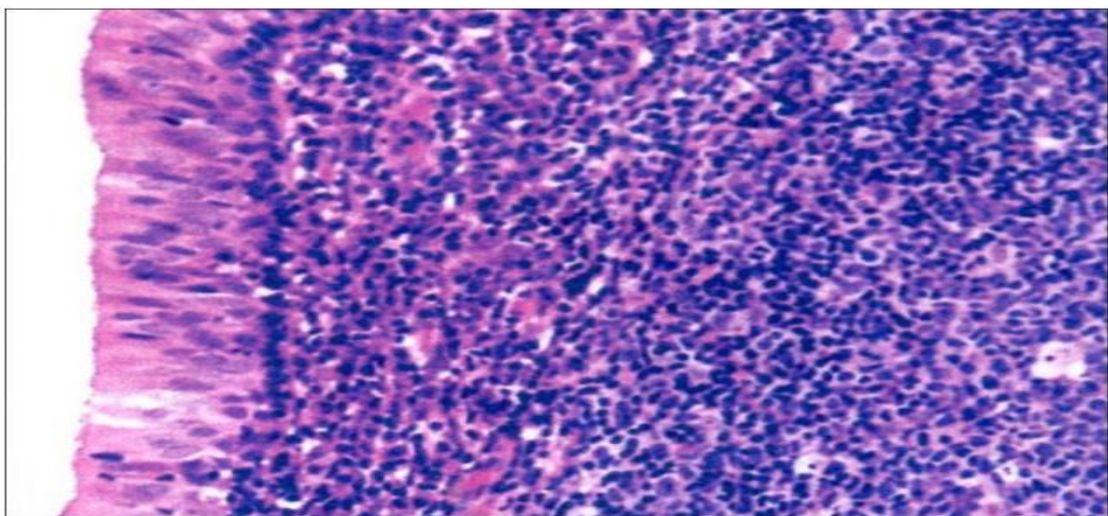


Figure 2: Epithélium cylindrique cilié haut du nasopharynx avec chorion riche en tissu lymphoïde (Stevens et al., 2006).

I.4. Rôle du nasopharynx

Le nasopharynx permet le passage de l'air entre les fosses nasales et le larynx. Il sert aussi de cavité de résonance pour la voix parlée ou chantée, puisqu'il est relié au tympan par la trompe d'Eustache, le nasopharynx permet d'aérer l'oreille moyenne (Berezin et al., 1985). Il a également un rôle dans la déglutition, grâce à l'action de ses muscles qui permet le transit des aliments ingérés de la bouche vers l'œsophage. Afin d'empêcher leur passage dans les voies aériennes, la luette et l'épiglotte vont respectivement fermer l'accès aux fosses nasales et au larynx (Leeson., 1980).

II. Symptômes du cancer du nasopharynx

Les patients atteints du cancer du nasopharynx (NPC) peuvent développer des symptômes généraux comme les maux de tête, fièvre, anémie et perte de poids (Niculet et al., 2022). Selon le stade et l'extension de la tumeur, les symptômes révélateurs du NPC peuvent se regrouper en (Ho, 1978 ; Boussen et al., 2005 ; Shah et al., 2022 ; Kobayashi et al., 2022) :

- ❖ Signes rhinologiques : obstruction nasale, épistaxis, voix nasonné et rhinorrhée mucosanglante (se voient dans 80% des cas diagnostiqués).
- ❖ Signes otologiques avec des signes de dysfonctionnement tubaire (bourdonnements, hypoacousie et autophonie et à un stade plus avancé l'otite séro-muqueuse)
- ❖ Signes neurologiques (diplopie, névralgie faciale, trismus, céphalées), ils sont présents dans 8 à 12% des cas.
- ❖ Adénopathies cervicales (une ou plusieurs adénopathies uni ou bilatérales) constituent le symptôme initial le plus commun des stades avancés de la maladie.

III. Cancérogenèse

III.1. Généralités

Dans les tissus sains, les cellules sont génétiquement similaires. Chaque cellule se développe et se différencie d'une manière contrôlée par son patrimoine génétique, qui a pour rôle, la régulation de la division cellulaire à une fréquence spécifique. Lors d'une transformation génétique due à des facteurs cancérigènes d'origine exogène ou endogène, le système de contrôle de division cellulaire se modifie et perd son équilibre, cette transformation néoplasique s'effectue en plusieurs étapes, y compris l'activation d'un proto-oncogène, l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur et le dysfonctionnement d'un point de contrôle du cycle cellulaire, qui va être à l'origine d'une prolifération anarchique et incontrôlée des

cellules altérées et transformées, menant à l'apparition de cellules cancéreuses, qui ont la capacité de détruire et d'envahir les tissus sains, c'est la cancérogenèse.

Toutes les cellules cancéreuses ont une origine clonale puisqu'elles sont produites à partir d'une cellule unique qui a connu une accumulation séquentielle de mutations. Les cellules subissent alors rapidement des mutations supplémentaires qui à la suite d'une sélection naturelle forment un clone mutant aboutissent à la génération d'une tumeur maligne.

III.2. Cancérogenèse du cancer du nasopharynx

Le NPC constitue un modèle intéressant pour la compréhension de l'association complexe entre les différents facteurs étiologiques (facteurs viraux, facteurs génétiques et facteurs environnementaux) dans la cancérogenèse. L'EBV (Epstein-Barr Virus) seul n'est pas suffisant pour produire ce cancer, les autres cofacteurs peuvent interagir avec le virus EBV pour jouer un rôle dans la cancérogenèse du NPC (Figure 3).

La cancérogenèse du NPC est actuellement mieux connue, en particulier au niveau moléculaire, une première étape dans le développement du NPC est l'infection précoce et latente du virus EBV dans de l'épithélium du nasopharynx (Niculet et al., 2022), cette étape constitue le déclencheur d'une cascade d'activation et d'inhibition de nombreuses protéines et voies de signalisation (Poh et al., 2016). Le virus agit en introduisant dans la cellule des gènes viraux induisant une prolifération cellulaire, ce qui rend ces cellules immortalisées, c'est-à-dire le programme de sénescence qui conduit à la mort cellulaire après un certain nombre de mitoses disparaît (Hsu and Glaser, 2000).

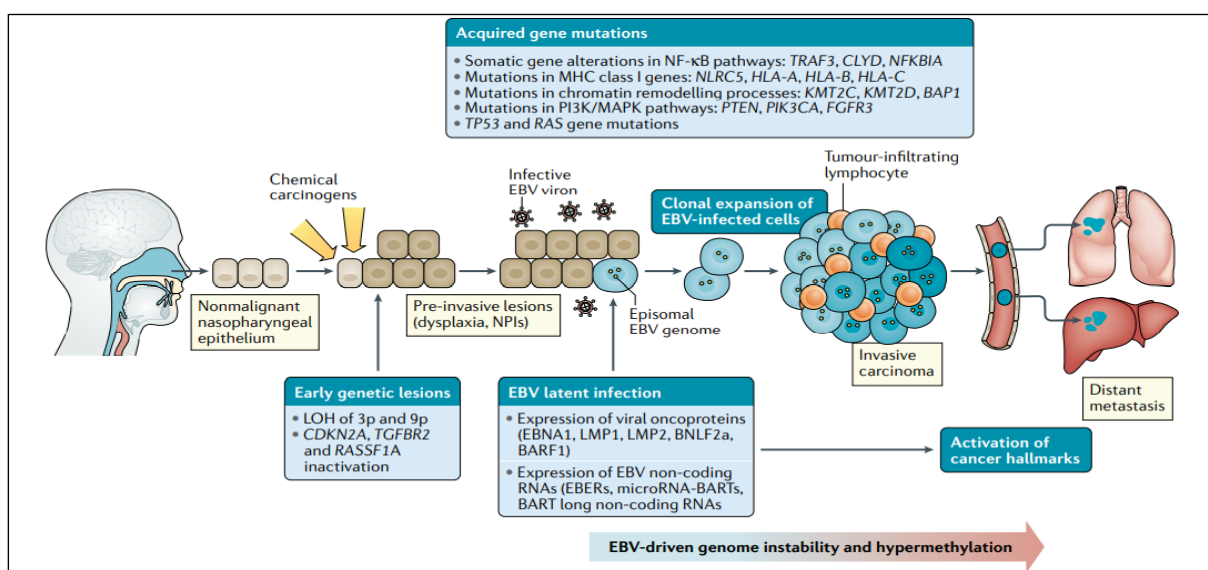


Figure 3 : Cancérogenèse du cancer du nasopharynx (Wong et al., 2021).

III.3. Cycle de vie du virus EBV dans les cellules du nasopharynx

Le cycle de vie du virus EBV dans les cellules épithéliales du nasopharynx commence par l'entrée du virus à l'intérieur des cellules par l'intermédiaire de ses glycoprotéines gB qui vont connaître les récepteurs neuropilin1 (NRP1) et Ephrin A2 dans les cellules épithéliales du nasopharynx (Wang et al., 2015).

L'EBV utilise également des glycoprotéines distinctes pour infecter les cellules B à l'aide du récepteur CD21 (Richardo et al., 2020) (Figure 4). L'entrée du virus provoque le transport du génome viral dans le noyau des cellules B, où le processus de réplication virale commence. Les produits du gène EBV activent le programme de croissance des cellules B (Latency III), entraînant une lympho-prolifération polyclonale B ; celle-ci est normalement contrôlée par un système immunitaire spécifique, en induisant une réponse robuste des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et en produisant des anticorps IgG spécifiques neutralisants (Figure 5) (Di, 2020).

Une fois dans la circulation, les cellules B mémoires précédemment activées peuvent continuer à subir une réplication lytique ou, si l'EBV arrête la plupart de ses gènes codant des protéines, il entre dans l'état de latence. Plus tard, lorsque les cellules re-circulées entre la muqueuse nasopharynx et les compartiments périphériques, les cellules B de la mémoire peuvent être activées, ce qui entraîne la réactivation virale et l'excrétion (Richardo et al., 2020).

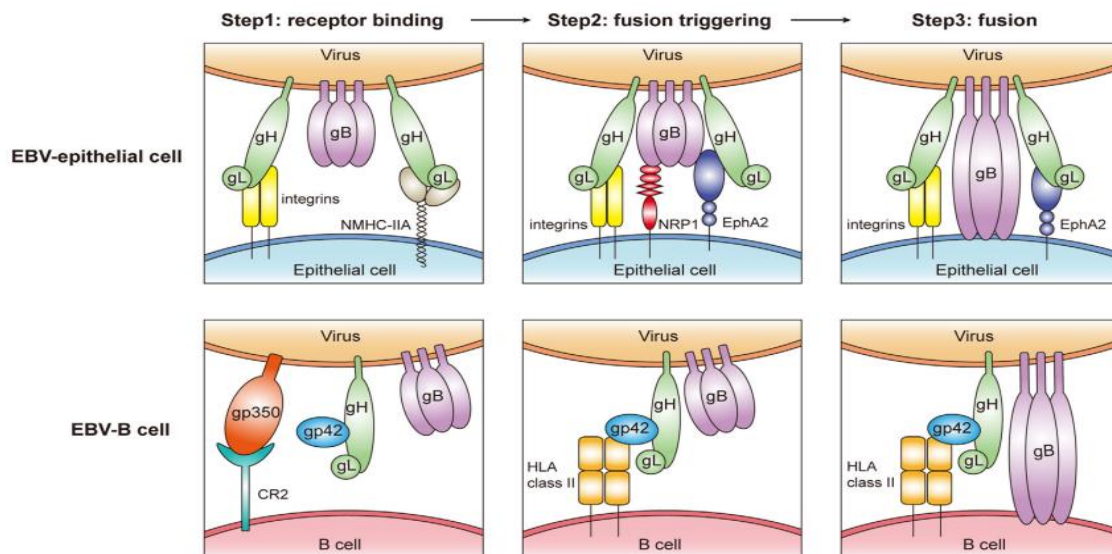


Figure 4: Les mécanismes utilisés par l'EBV dans l'infection des cellules épithéliales et des cellules B (Zhu et al., 2021).

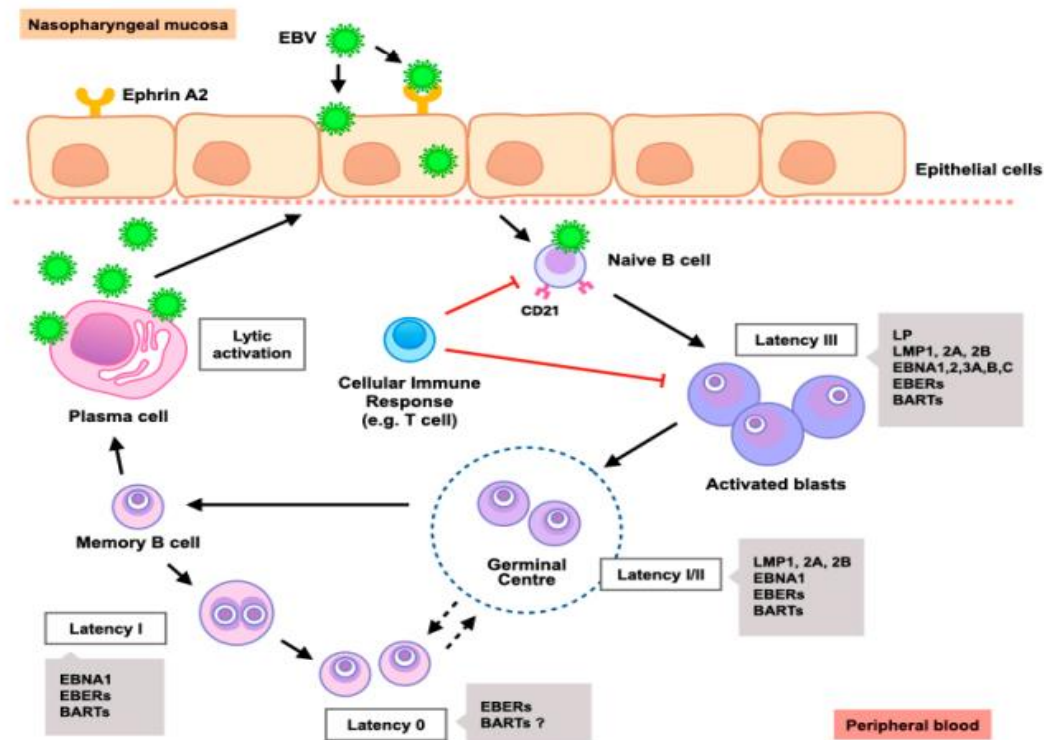


Figure 5: Cycle de vie du virus EBV dans les cellules du nasopharynx (Richardo et al., 2020).

III.4. Les caractéristiques du cycle de vie latent/lytique du EBV

Chez l'homme, le virus EBV peut établir deux modes de cycle de vie alternatifs, connus sous le nom de latent ou lytique (Bu et al., 2022), qui comprennent au moins cinq stades différents : infection lytique, latence III, latence II, latence I/0 et réactivation lytique). Au cours de ces différents stades, l'EBV établit généralement une infection latente dans les cellules B et une infection lytique dans les cellules épithéliales afin de produire des virions pour la transmission (Hutt-Fletcher, 2014). Dans les cellules cancéreuses, l'EBV se trouve dans la plupart du temps à l'état latent (Li et al., 2016). Pendant ce stade, seul un nombre limité de gènes viraux sont exprimés et le génome viral existe dans le noyau sous forme d'épisome (Li et al., 2016).

Les cellules cancéreuses du nasopharynx expriment les gènes et les miRNAs EBV caractéristiques des infections latentes telles que LMP1, LMP2A/B, EBNA1 et EBERs. Par conséquent, l'infection latente des cellules épithéliales par l'EBV doit être un événement clé de la cancérogenèse du NPC, car l'infection par l'EBV des cellules épithéliales est de nature lytique (Odumade et al., 2011). Des études ont suggéré que les altérations génétiques doivent déjà être présentes dans les cellules épithéliales nasopharyngées afin de permettre une infection latente ; l'inactivation du p16 et/ou l'activation de la cycline D1 ; qui sont des

mutations préexistantes ; préviennent l'arrêt de la croissance causée par l'infection primaire du virus EBV dans les cellules épithéliales et permettent une infection latente (Tsang et al., 2012).

Une fois l'infection latente survenue, les gènes de latence de type II, qui comprennent des protéines membranaires latentes (LMP1 et LMP2A/B), fragment de BamH 1 (BARF1), antigène nucléaire (EBNA1), ARN longs non codantes (BARTs), petits ARNs (EBER1 et EBER2) et microARNs (miR-BARTs), soutiennent la croissance et la progression des cellules épithéliales nasopharyngées pré-malignes (Zhu et al., 2021 ; Campion et al., 2021 ; Niculet et al., 2022). D'autres changements génomiques sont susceptibles de se produire pour stimuler l'expansion clonale de ces cellules conduisant au développement de NPC.

La réactivation du virus EBV est constituée de trois phases lytiques : phase précoce immédiate, phase précoce et phase tardive (Murata et al., 2014). Les gènes viraux (BZLF1, BRLF1) de la phase précoce immédiate sont d'abord transcrits afin de coder les trans-activateurs Zta et Rta, suivis par l'expression des premiers gènes nécessaires à la réplication du génome viral.

Une fois la réplication est établie, les gènes tardifs sont exprimés pour produire des protéines structurales du virus (les antigènes de la capside, les protéines membranaires) suivis de l'encapsulation du génome viral et de la production de virions matures. Ce mode de cycle viral (lytique) contribue également au développement et au maintien des tumeurs malignes (Li et al., 2016). Les gènes latents et lytiques sont tous les deux impliqués dans la transformation de l'épithélium nasopharyngé à une tumeur maligne (Niculet et al., 2022).

III.5. Les voies de signalisation

Il est évident que les oncoprotéines d'EBV agissent sur plusieurs voies de signalisation intracellulaire, y compris les voies Wnt/ β catenin, JAK/STAT, PI3k/Akt/mTOR, EGFR, MAPK et NF- κ B, pour favoriser la survie des tumeurs et la métastase, conduisant finalement à un mauvais pronostic de NPC (Richardo et al., 2020). Les principales voies impliquées dans la cancérogenèse de NPC sont résumées dans la partie suivante (Figure 6).

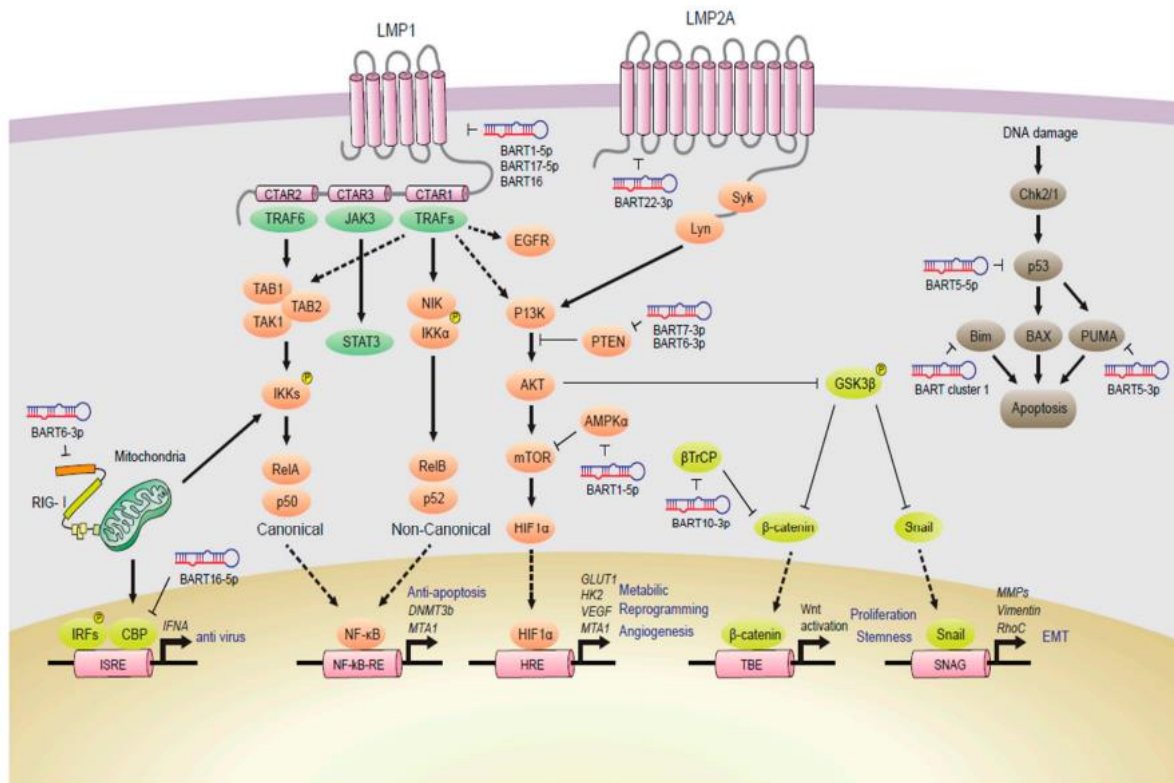


Figure 6: Les voies de signalisations activées par l'EBV dans le NPC (Richardo et al., 2020).

1. La voie de signalisation Wnt/β-Catenin

La voie de signalisation Wnt/b-catenin joue un rôle important dans le développement et la progression du NPC (Wang et al., 2017). L'oncoprotéine virale LMP2A induit le MTA1, qui stimule la voie Wnt en aval, comme la phosphorylation du glycogène synthase kinase3-beta (GSK3β) et la translocation nucléaire de β-catenin (Richardo et al., 2020). Cette dernière est un facteur central dans la voie de signalisation Wnt, elle va favoriser la survie du NPC par plusieurs mécanismes, en induisant la transcription des gènes cibles, qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la métastase et transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Wang et al., 2017). Certaines études ont trouvé qu'il y avait une expression significativement plus élevée de β-caténine dans le NPC avec métastase ganglionnaire que dans le NPC sans métastase ganglionnaire (Xu et al., 2013), et en activant plusieurs signaux en aval telles que le c-myc et la cycline D1, elle augmente également l'expression de l'interleukine 8 et diminue l'expression du gène *RASSF1A*. Ce dernier est essentiel pour la stabilisation des microtubules lors de la mitose et son absence aboutit à une aneuploïdie cellulaire et facilite la carcinogenèse (Chou et al., 2008).

2. La voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est responsable de la transmission des informations extracellulaires de la membrane cellulaire au noyau pour déclencher la transcription de l'ADN. En plus, elle est un médiateur crucial de diverses fonctions physiologiques importantes, y compris la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, l'apoptose et la métastase (Luo et al., 2021).

Cette voie est composée de JAK (Janus kinases), de facteur de transcription cytoplasmique STAT (signal transducer and activator of transcription), et des récepteurs cellulaires. Lorsque les cytokines se lient aux récepteurs cellulaires, le JAK devient phosphorylé et par la suite phosphoryle la protéine STAT. La Phospho-STAT est ensuite transférée dans le noyau et régule la réponse immunitaire (Chen et al., 2001). Dans la famille STAT, STAT3 et STAT5 sont les plus exprimées dans le NPC (Zhu et al., 2021).

L'oncoprotéine LMP1 déclenche la voie de signalisation JAK-STAT via son domaine d'activation carboxyl-terminal 3 (LMP1-CTAR3), qui active ensuite le JAK3 et favorise sa phosphorylation, entraînant une translocation nucléaire (Richardo et al., 2020). STAT3 se lie également au promoteur cyclin D1, ce qui améliore sa transcription (Xu Y., 2013).

De plus, STAT3 est également impliqué dans l'angiogenèse et la régulation de l'infection latente EBV, contribuant aux caractéristiques très agressives du NPC. STAT3, un activateur transcriptionnel direct du VEGF. En outre, l'activation par LMP1- de la voie JAK/STAT est rapide, ce qui laisse supposer qu'elle peut procéder à l'activation NF- κ B et JNK et prédisposer la cellule à ces signaux ultérieurs (Zhu et al., 2021).

3. La voie de signalisation NF-KB

La protéine NF-KB (Nuclear factor) est un régulateur central de la modulation de la prolifération cellulaire et la régulation de la réponse inflammatoire. La NF- κ B est régulée par des IKBs, qui sont phosphorylés par des IKB kinases (IKKs). La phosphorylation et la dégradation subséquente des IKBs permettent à NF-KB de se transférer au noyau et régule la transcription de divers gènes impliqués dans l'inflammation, l'immunité, les réponses de stress (Richardo et al., 2020).

L'activation constitutive de la voie de signalisation NF-KB a été observée dans les tissus des patients atteints du NPC, ainsi que cette activation est associée à un pronostic défavorable (Yi et al., 2018). Il a été signalé que la dérégulation de la voie NF-KB par des mutations

somatiques et la surexpression de l'oncoprotéine LMP1 sont mutuellement exclusives dans le développement du NPC (Richardo et al., 2020).

La LMP1 active la voie NF-KB par le recrutement et l'activation de TRAFs, TRADD, EGFR. La LMP1 augmente la phosphorylation d'IKB puis augmente la translocation nucléaire de NF-KB pour activer les gènes cibles. L'effet de l'infection par EBV dans les cellules NPC semble pencher vers la régulation de l'activité NF-KB plutôt que l'expression de protéines de signalisation NF-KB. La phosphorylation IKB α par IKK β est induite par l'activation LMP1 par voie mTORC1, avec une modulation supplémentaire de la glycolyse aérobie par transcription Glut-1 (Richardo et al., 2020).

En plus, Il a été démontré que la LMP1 induit l'interaction entre la transcriptase inverse de télomérase (hTERT) et p65, provoquant l'activation de la télomérase et l'immortalisation des cellules (Zhu et al., 2021).

4. La voie de signalisation PI3K-AkT- mTOR :

La voie de signalisation intracellulaire PI3K-AKT-mTOR constitue un intérêt majeur dans l'étude de l'oncogenèse (Yu et al., 2022) et joue un rôle crucial dans l'association entre le NPC et l'infection par le virus EBV. Ce dernier active la voie de signalisation PI3K-AKT induisant la pathogénicité par plusieurs mécanismes, y compris la régulation de l'apoptose, la croissance et du cycle cellulaire, l'instabilité génomique ainsi que la dynamique du cytosquelette (Zhu et al., 2021).

Les deux oncoprotéines LMP1 et LMP2A activent la voie PI3K/AKT et conduisent à la dégradation du p53 et l'expression du c-myc, menant à un carcinome nasopharyngé indifférencié fortement métastatique (Zhou et al., 2018). La LMP1 stimule la voie PI3K-AKT, assurant l'induction et le maintien des propriétés des cellules souches cancéreuses CD44 positives. PI3K-AKT et LMP1 créent une boucle de rétroaction positive pour réguler le CSC induit par LMP1 dans le NPC (Yang et al., 2016 ; Zhang et al., 2017). La mTOR (mammalian target of rapamycin) joue un rôle important en aval de la voie PI3K-AKT. Il provoque la phosphorylation et l'activation de ses effecteurs tels que la protéine ribosomale S6 kinase (P70S6K) et le facteur d'initiation eucaryote 4E (4EBP1). Il a été démontré que les LMP1, p-P70S6K et p-4EBP1 sont surexprimés dans le NPC, mais ils ont été associés avec un mauvais pronostic (Chen et al., 2010). Le LMP2A améliore également les propriétés migratoires et invasives et dans NPC grâce à l'activation de la voie AKT (Zhang et al., 2019).

5. La voie de signalisation EGFR-MAPK

Plusieurs études ont démontré le potentiel de l'oncoprotéine LMP1 sur l'expression du récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) qui est un récepteur de facteur de croissance dont sa dérégulation est souvent associée à la transformation des cellules épithéliales en cellules tumorales (Ma et al., 2003).

Les deux domaines du C terminal de la protéine LMP1 (CTAR1 et CTAR2) peuvent activer les différents membres de la famille NF- κ B, les complexes p53/p53 et Bcl-3, et met en place l'EGFR. La LMP1 améliore également la phosphorylation et la translocation nucléaire de l'EGFR (Peng et al., 2021), qui est cruciale dans la prolifération cellulaire et la différenciation.

Actuellement, les voies de signalisation connues en aval de l'EGFR suivent cinq cascades, y compris PI3K-AKT-mTOR, PKC, Jak-STAT et la voie RAS-RAF-MEK-MAPK-ERK. (Figure 7) (Peng et al., 2021). Cette dernière, connue sous le nom de la voie MAPK, transmet le signal d'un récepteur de la surface cellulaire au noyau par l'activité de phosphorylation de nombreuses protéines kinases. La voie MAPK est dérégulée dans les cellules NPC où la protéine LMP1 est surexprimée. Le LMP1-CTAR1 active également l'EGFR et l'ERK par la protéine kinase C delta, qui favorise la motilité des cellules NPC et leur caractère invasif par l'activation de la voie ERK-MAPK. (Richardo et al., 2020).

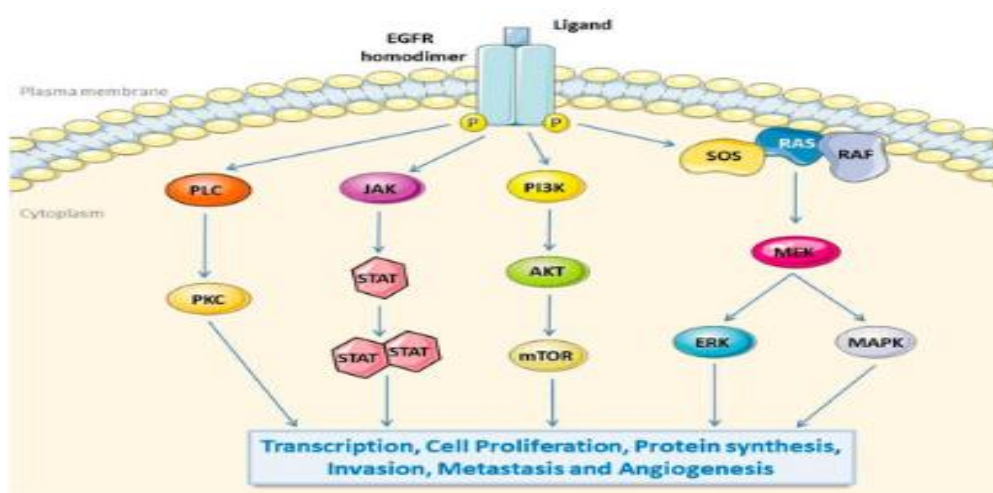


Figure 7 : Les cinq voies de signalisation connues en aval de l'EGFR (Peng et al., 2021)

IV. Facteurs de risque du cancer du nasopharynx

Le NPC est un cancer multifactoriel. Les informations actuellement disponibles suggèrent l'interaction complexe de trois facteurs dans la survenue de ce type de cancer : facteurs viraux, facteurs génétiques et cancérigènes environnementaux (Bei et al., 2016).

IV.1 Facteurs viraux

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) fait partie de la famille des Herpesviridae. Plus précisément, il appartient au genre Lymphocryptovirus. Il est caractérisé par sa capacité à établir une infection persistante dans l'organisme de l'hôte. L'EBV est l'un des huit herpès virus humains, infecte plus de 95% de personnes à travers le monde (Taylor and Steven, 2016).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'EBV est classé comme cancérigène du groupe I (Painting, 2012). Plusieurs études ont bien démontré le rôle de ce virus comme étant un facteur de risque considérable favorisant la genèse du NPC (Dhouib et al., 2009). La relation entre le développement du NPC et l'EBV est signée par une sérologie anti-EBV élevée (ce qui se traduit par une augmentation d'anticorps anti-EBV de type IgA anti-EA et anti-VCA et la mise en évidence du génome viral dans les noyaux des cellules tumorales avec un rôle oncogène de la protéine latente de membrane LMP-1 (Chaaben et al., 2014). L'ADN viral est détecté dans près de 100% des cas dans les carcinomes épidermoïdes non kératinisants (Taylor and Steven, 2016).

IV.2 Facteurs environnementaux

Dans l'environnement, plusieurs agents ont été associés au risque de développement du NPC. Ces agents environnementaux sont liés principalement à une nutrition peu variée et au mode de vie traditionnel (consommation des aliments de conservation traditionnelle).

En effet, la consommation des produits traditionnels riches en nitrosamines volatiles, tels que les poissons séchés et salés est un facteur de risque prouvé d'après les données épidémiologiques et expérimentales des études sur la population chinoise (Tang et al., 2012).

Le métabolite cancérigène actif de ces nitrosamines peut provoquer des dommages à l'ADN et une inflammation chronique dans la muqueuse du nasopharynx des individus génétiquement sensibles. La consommation de substances génotoxiques pendant l'enfance peut entraîner l'accumulation de lésions génétiques aberrantes en provoquant le processus tumoral et le développement du NPC à un jeune âge, Ainsi que la présence du virus EBV dans les cellules augmente le risque du NPC (Tsao et al., 2014).

Dans les populations asiatiques, l'utilisation de certaines plantes médicinales traditionnelles a également été signalée comme un facteur de risque très élevé du NPC, en induisant l'expression de l'antigène lytique du virus EBV (Tsao et al., 2014).

Cependant, le risque du développement du NPC est également associé à d'autres aliments conservés, tels que les viandes, les œufs, les fruits et les légumes (Tang et al., 2012).

En Afrique du nord, l'analyse des facteurs de risques a montré que certains types de produits alimentaires sont incriminés, certaines préparations de viande salée (el khlii=viande séchée) et les graisses conservées à température ambiante (le beurre rance), et les piments séchés (laharissa), en vue d'une consommation directe ou ajoutés lors de la cuisine typique de la région, font courir un plus grand risque de développement du NPC (Bendjemana et al., 2011).

IV.3 Facteurs génétiques

Plusieurs altérations génétiques et épigénétiques ont été détectées, essentiellement au niveau des gènes suppresseurs de tumeur. Les plus fréquentes se produisent au niveau des chromosomes 3, 9, 11, 13, 14 et 16.

De nombreuses études ont révélé l'implication du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans le développement du NPC. Les gènes HLA (Human Leukocyte Antigen) exercent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative puisqu'ils codent pour les molécules CMH impliquées dans la présentation des peptides antigéniques tels que les peptides viraux aux lymphocytes T effecteurs (Chang et al., 2021).

La présence de certains SNPs dans le gène *HLA* (rs3869062, rs2860580, rs2894207 et rs28421666) a été significativement associée à une augmentation du risque de survenue du NPC (Emanuel et al., 2021).

Il existe également d'autres facteurs génétiques à part la région CMH, des études cas-témoins sur le gène *CCND1* (cell cycle regulator cyclin D1) codant pour le régulateur cycline D1 du cycle cellulaire et le gène *TLR3* (Toll-like receptors) ont mis en évidence des polymorphismes qui peuvent être des marqueurs de susceptibilité du NPC (He et al., 2007 ; Shih et al., 2012).

La plupart des agents carcinogènes subissent une activation par des protéines d'oxydation de phase I, et une désintoxication par des protéines de phase II. Il a été démontré que les SNPs dans les gènes de détoxification permettent le développement du NPC. En plus, plusieurs études ont reporté le rôle des SNPs au niveau des gènes de réparation de l'ADN dans le développement du NPC.

V. Épidémiologie du cancer du nasopharynx

V.1. Dans le monde

Le cancer du nasopharynx est responsable d'un taux de mortalité élevé dans le monde. Il occupe une place particulière dans l'ensemble des cancers des voies aérodigestives supérieures vu sa répartition géographique particulière caractérisée par différents niveaux d'incidence (Figure8). Selon les chiffres du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 2020, le NPC a enregistré un total de 133 354 nouveaux cas et 80 008 décès à travers le monde. L'incidence du NPC est 2 à 3 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes (2.2 chez les hommes vs 0.82 chez les femmes par 100 000) (Figure 9) (Globocan, 2020).

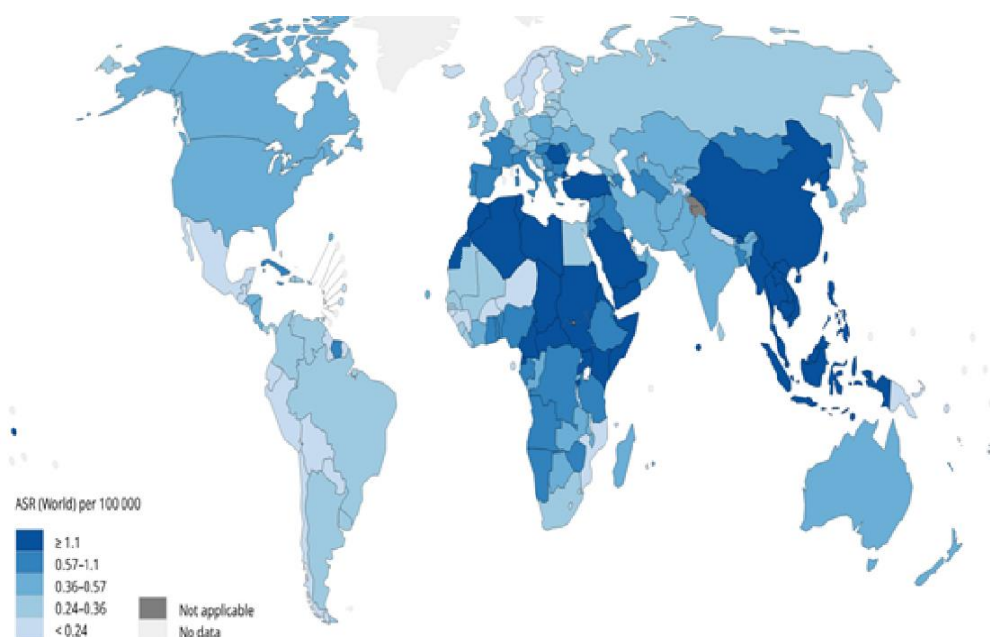


Figure 8: Taux d'incidence du NPC dans le monde (GLOBOCCAN, 2020).

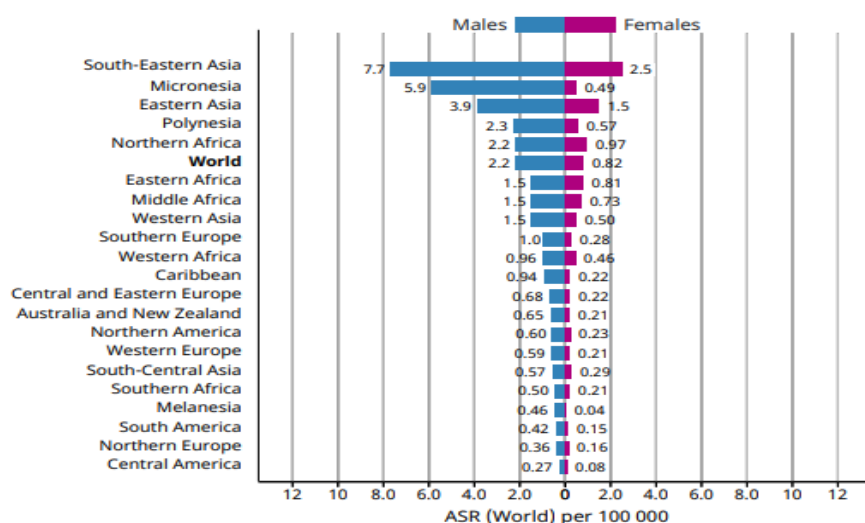


Figure 9: Taux d'incidence du NPC dans le monde en fonction du sexe (GLOBOCCAN, 2020).

V.2. Au Maroc

Au Maroc, comme c'est le cas des autres pays du Maghreb, l'incidence du NPC est élevée (Nawaz et al., 2015). Selon les dernières statistiques réalisées dans le registre des cancers du Grand Casablanca 2008-2012, le NPC représente 1.8 % de l'ensemble des cas de cancers enregistrés, 433 nouveaux cas pendant la période de 2008 et 2012 ont été dénombrés. En termes d'incidence, le NPC est présent dans 2.2 pour 100 000 habitants (1.5 chez les femmes et 2.8 chez les hommes)¹⁸. Concernant les classes d'âge, les effectifs les plus grands étaient enregistrés pour les patients allant de 50 à 54 ans et de 45 à 49 ans de sexe masculin, et pour les patients allant de 35 à 39 ans et de 40 à 44 ans de sexe féminin (Registre des cancers de la région du Grand Casablanca 2018).

VI. Diagnostic du cancer du nasopharynx

À des stades précoces, le NPC peut facilement échapper au diagnostic et la plupart des patients restent non diagnostiqués jusqu'à ce qu'ils atteignent des stades avancés de la maladie.

VI.1. Bilan biologique

Les examens biologiques de base qui comprennent l'hémogramme complet, les tests de fonction rénale et hépatique, les marqueurs tumoraux (CYFRA 21) et la sérologie EBV (incluant surtout IgA/VCA, IgG/VCA et IgA/EA) peuvent être réalisées comme un examen initial (Shah, 2022).

VI.2. Examens radiologiques

- ❖ **TDM (Tomodensitométrie) :** La tomodensitométrie est la modalité de choix en ce qui concerne l'invasion osseuse et l'extension intracrânienne. Cependant, l'exposition au rayonnement et sa valeur limitée en termes d'extension des tissus mous et de métastases nodales font de l'IRM la modalité préférée (Tang et al., 2021).
- ❖ **IRM (Imagerie par résonance magnétique) :** L'IRM est la modalité majeure pour évaluer l'extension de la tumeur dans la musculature et la métastase nodale. Elle est également plus performante pour la visualisation de la masse tumorale avec invasion locale et ne constitue aucune menace d'exposition au rayonnement (King, 2022).
- ❖ **TEP (Tomographie par émission de positons) :** C'est la principale modalité pour évaluer la rémission et la récurrence. L'acquisition TEP-TDM peut augmenter l'étendue de la métastase à distance car il s'agit d'une acquisition du corps entier (Meng et al., 2022).

VI.3. Examen endoscopique et histopathologique

La nasopharyngoscopie est l'examen de choix pour voir le nasopharynx, elle se fait à l'aide d'un nasopharyngoscope. Elle permet de préciser le point de départ de la tumeur, son volume, son aspect et surtout de réaliser une biopsie dirigée. Cette modalité permet un bilan d'extension tumoral précis, et surtout de pratiquer des biopsies. Mais, l'examen devient gênant si la tumeur est trop grande (Shah., 2022).

VII. Classification du cancer de nasopharynx

VII.1. Classification TNM

En fonction du bilan clinique et des examens radiologiques, la tumeur est classée. Il existe plusieurs systèmes de classification, mais le plus utilisé dans le monde est la classification TNM (tumor-nodes-metastases), établie par AJCC/UICC (American Joint Committee on Cancer / l'Union internationale contre le cancer) qui a subi plusieurs modifications depuis 1997 (Boussen et al., 2005). En 2016, l'UICC a proposé la 8^{ème} version avec une actualisation de la classification du NPC et qui a une valeur d'orientation thérapeutique ainsi que pronostique (Tableau 1) (Li et al., 2021 ; Guo et al., 2019).

Tableau 1: La classification TNM (8^{ème} version)

Classification tumorale (T)	
Tx	La tumeur primaire ne peut être évaluée
T0	Aucune tumeur identifiée, atteinte d'un ou de plusieurs ganglions cervicaux par EBV
T1	Tumeur confinée au nasopharynx, oropharynx ou des fosses nasales sans extension parapharyngée.
T2	Tumeur avec extension parapharyngée, infiltration du muscle ptérygoidien médial, du muscle ptérygoidien latéral et des muscles prévertébraux
T3	Tumeur avec envahissement des structures osseuses de la base du crâne, des vertèbres cervicales, des apophyses ptérygoides et/ou des sinus paranasaux
T4	Extension intracrânienne et/ou des nerfs crâniens, de l'hypopharynx, de l'orbite, de la glande parotide et/ou une infiltration au-delà de la surface externe du muscle ptérygoidien latéral
Classification des adénopathies (N)	
Nx	Les adénopathies régionales ne peuvent pas être évaluées
N0	Pas d'adénopathies régionales métastatiques
N1	Adénopathies métastatiques cervicales unilatérales et/ou Adénopathies uni ou bilatérales rétropharyngées, Toutes ≤ 6 cm au-dessus du bord inférieur du cartilage cricoïde
N2	Adénopathies métastatiques cervicales bilatérales ≤ 6 cm, au-dessus du bord inférieur du cartilage cricoïde
N3	Adénopathies métastatiques cervicales > 6 cm et/ou extension au-dessous du bord inférieur du cartilage cricoïde (Les adénopathies médianes sont considérées comme ipsilatérales.)
Classification des métastases (M)	
M0	Absence de métastases
M1	Présence de métastases à distance

Tableau 2: Stadification du cancer du nasopharynx

STADE	
I	T1N0M0
II	T2 N0-1 M0, T1 N1 M0
II	T3 N0-2 M0, T0-2 N2 M0
IVA	T4 ou N3 M0

VII.2. Classification histologique

Les cancers du nasopharynx englobent différents types histologiques, ils ont fait l'objet de nombreuses classifications mais actuellement la plus utilisée est celle de l'OMS. Cette dernière subdivise les cancers du nasopharynx en trois différentes entités clinico-histologiques ayant des degrés de différenciation des cellules malignes et des propriétés invasives distinctes (Stelow et al., 2017 ; Unsal et al., 2019 ; Jiromaru et al., 2022) :

- Carcinome épidermoïde kératinisé : ce type de carcinome nasopharyngé est tout à fait comparable à ceux retrouvés au niveau des VADS (Beyene et al., 2021). Il est caractérisé par une différenciation malpighienne avec la présence de ponts intracellulaires et des dépôts de kératine (Boia et al., 2013). Ce type histologique est extrêmement rare dans les régions endémiques (< 5 à 10 %), mais il comprend la grande majorité des NPC dans les régions non endémiques (Wei et al., 2011).
- Carcinome épidermoïde non kératinisé : ce type histologique est fortement associé à l'infection par le virus EBV. Dans les régions endémiques, les carcinomes épidermoïdes non kératinisant sont considérés comme le type histologique prédominant, représentant environ 95 % des cas (Argirion et al., 2020), ils sont divisés en deux sous-types :
- Carcinome épidermoïde non kératinisé différencié : ce type histologique représente 15 à 20% des NPC. Il est caractérisé par des cellules tumorales avec un arrangement stratifié non syncytial et des cellules néoplasiques avec des contours réguliers et nets en aspect pavimenteux et une absence de la production de kératine (Boia et al., 2013).
- Carcinome épidermoïde non kératinisé indifférencié (UCNT) : ce type de carcinome représente la grande majorité des NPC survenant dans les régions endémiques de la maladie. Il est lié à l'infection par le virus EBV (Bennis et al., 2022). Les UCNTs présentent la particularité d'avoir un aspect histologique spécifique, les cellules tumorales ont des noyaux de grande taille renfermant 1 ou 2 gros nucléoles et avec des limites indistinctes, la tumeur présente un aspect syncytial indifférencié et se caractérise par une absence de kératine. Ce type histologique peut être diagnostiqué par la détection sur coupes de marqueurs épithéliaux et de marqueurs viraux de l'EBV, tel que l'antigène LMP1 par immunohistochimie, ou bien les ARN EBER (Epstein–Barr encodingregion) par hybridation *in situ* (Bennis et al., 2022).

Les UCNT sont essentiellement radiosensibles, très rarement accessibles à un traitement chirurgical (Kaitouni et al., 2023).

- Carcinomes épidermoïdes basaloïdes : considérés comme un sous-type agressif, ce type de tumeur est extrêmement rare, avec environ six cas signalés dans la littérature (Geng et al., 2021).

VIII. Traitement

L'agressivité du cancer du nasopharynx varie en fonction de différents paramètres (sous-type histologique, stade, statut mutationnel), donc la modalité du traitement doit être adaptée en fonction de ces différents paramètres (Figures 10 et 11) (Bossi et al., 2021).

La radiothérapie est la pierre angulaire du traitement du NPC, surtout en cas des lésions locorégionales, vu la radiosensibilité de la forme épidermoïde non kératinisée. La chirurgie est limitée aux procédures de récupération dans les récurrences, tandis que la chimiothérapie concomitante associée à la radiothérapie est préférée pour traiter les formes évoluées (Shah., 2022).

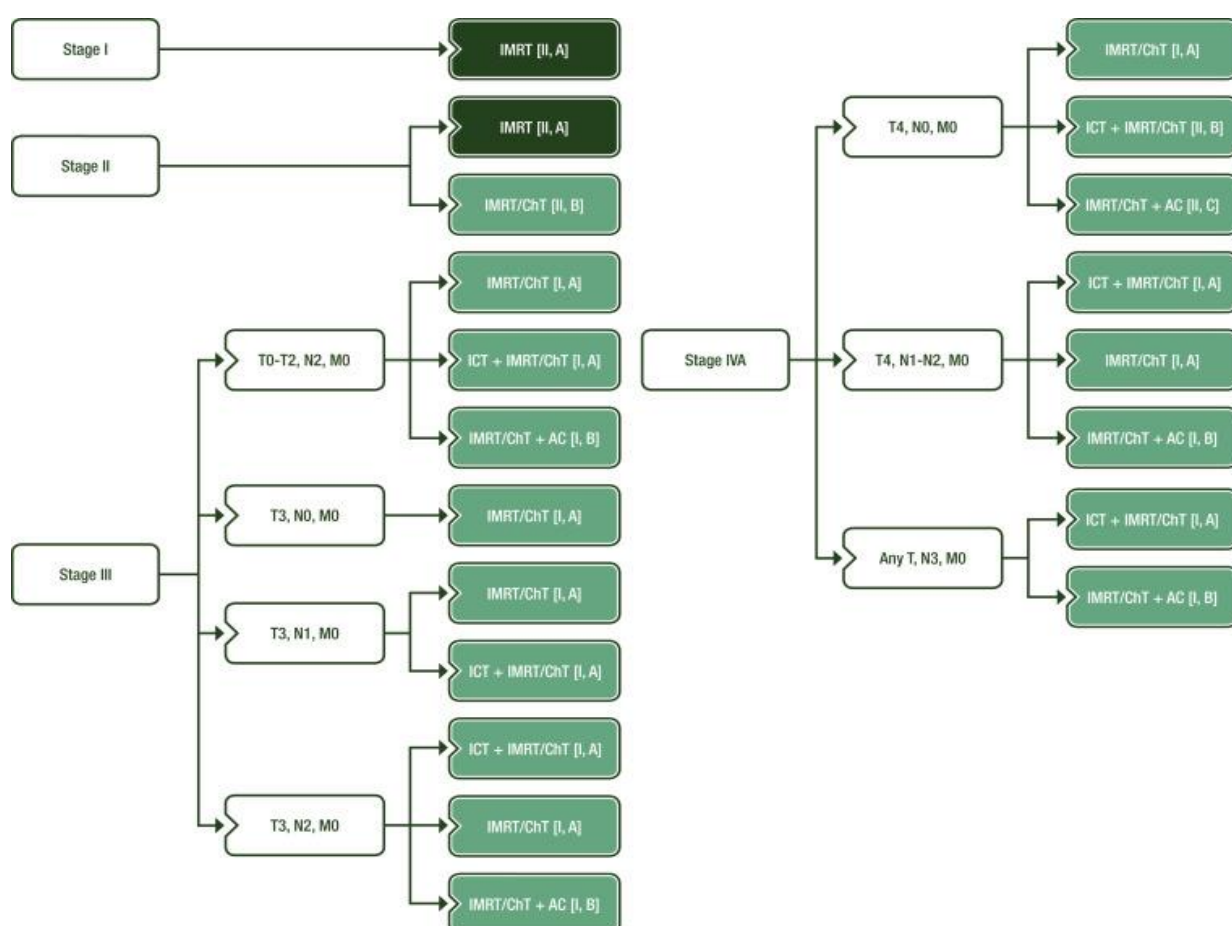


Figure 10: Procédure de traitement des différents stades I-IVA du NPC. (Bossi et al., 2021).

AC, adjuvant chemotherapy; ChT, chemotherapy; ICT, induction chemotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy;

T, tumour, N, node, M, metastasis; NPC, nasopharyngeal cancer;

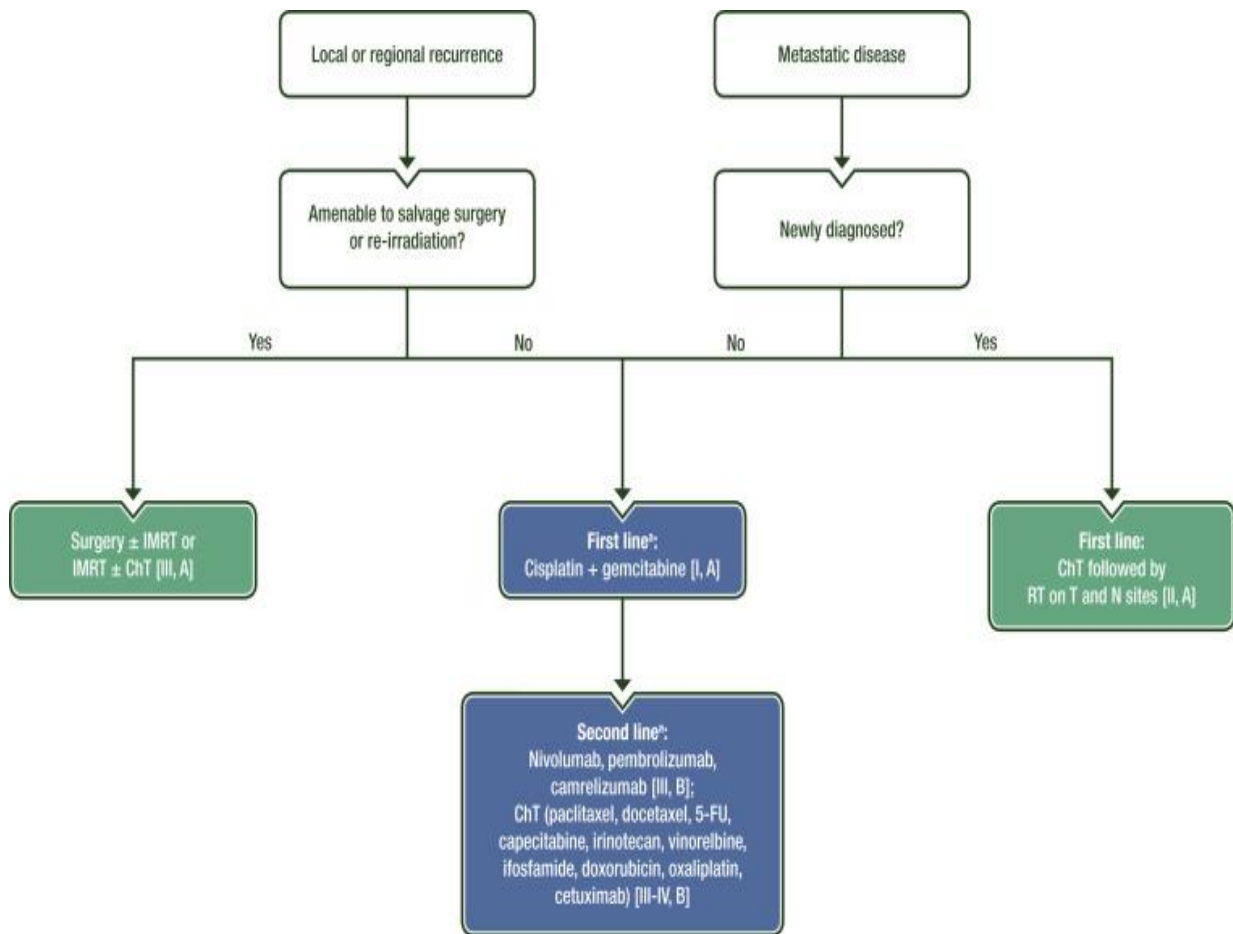


Figure 11: Procédure de traitement en cas de récurrence et/ou de métastase du NPC

(Bossi et al., 2021).

5-FU, 5-fluorouracil; ChT, chemotherapy; IMRT, intensity-modulated radiotherapy; N, node; NPC, nasopharyngeal cancer; RT, radiotherapy; T, tumour. a Consider RT [III, B] or surgery [IV, C] on metastatic sites

VIII.1. Chirurgie

La place de l'intervention chirurgicale dans la procédure du traitement du NPC est très réduite, puisqu'il est difficile d'atteindre les tumeurs présentes dans le nasopharynx, en plus de leur proximité avec la base de crâne qui donne une exposition limitée du champ opératoire. La place de l'intervention chirurgicale se limite à un complément thérapeutique en cas de régression ganglionnaire incomplète trois à quatre mois après la fin de la radiothérapie et après avoir vérifié l'absence de métastases à distance et le non atteinte du nasopharynx (Rivera et al., 2005 ; Liu et al., 2017 ; Hay et al., 2019).

VIII.2. Chimiothérapie

Dans les stades locorégionaux avancés du NPC non métastatiques, la radio-chimiothérapie concomitante est la principale modalité du traitement. Le malade répond mieux avec la chimiothérapie d'induction, et la thérapie concomitante est importante pour la diminution de la masse tumorale. L'agent le plus utilisé comme ligne initiale d'intervention chimiothérapeutique est la cisplatine à une dose de 100 mg toutes les trois semaines (Adoga et al. 2018).

La chimiothérapie palliative est utilisée pour traiter les métastases à distance. Les agents de choix sont le cisplatine et le 5-fluoro-uracile. Toutefois, le taux de survie médian ne dépasse pas un an (Blanchard et al. 2018).

VIII.3. Radiothérapie

La plupart des formes du NPC sont radiosensibles et la radiothérapie (RT) reste le traitement de référence de la maladie. La dose des radiations ionisantes délivrées par la radiothérapie a un effet direct sur l'ADN (également sur les lipides, les glucides et les protéines) et un effet indirect, par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) provenant de la radiolyse de l'eau (Lomax et al., 2013 ; Roos et al. 2013 ; Kim et al., 2019). Les dommages au niveau de l'ADN se traduisent par des modifications de base, des cassures simple-brin, des cassures double-brin et des pontages inter- ou intra-brin (Figure 12). En termes du nombre de cassures et de l'altération des mécanismes de réparation de ces cassures, les radiations ionisantes détruisent les cellules tumorales (apoptose, nécrose, autophagie et catastrophe mitotique) (Ardaillou, 2008).

La radiothérapie est la pierre angulaire du traitement des formes non métastatiques du NPC. La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité « RCMI ou IMRT » a permis l'amélioration de la distribution de la dose au niveau des volumes cibles et une meilleure protection des organes à risques par rapport aux autres modalités de radiothérapies (la radiothérapie conformationnelle bidimensionnelle (2D) et tridimensionnelle (3D)). Elle est indiquée également en cas de ré-irradiation en cas de récurrence locale (Bossi et al., 2021).

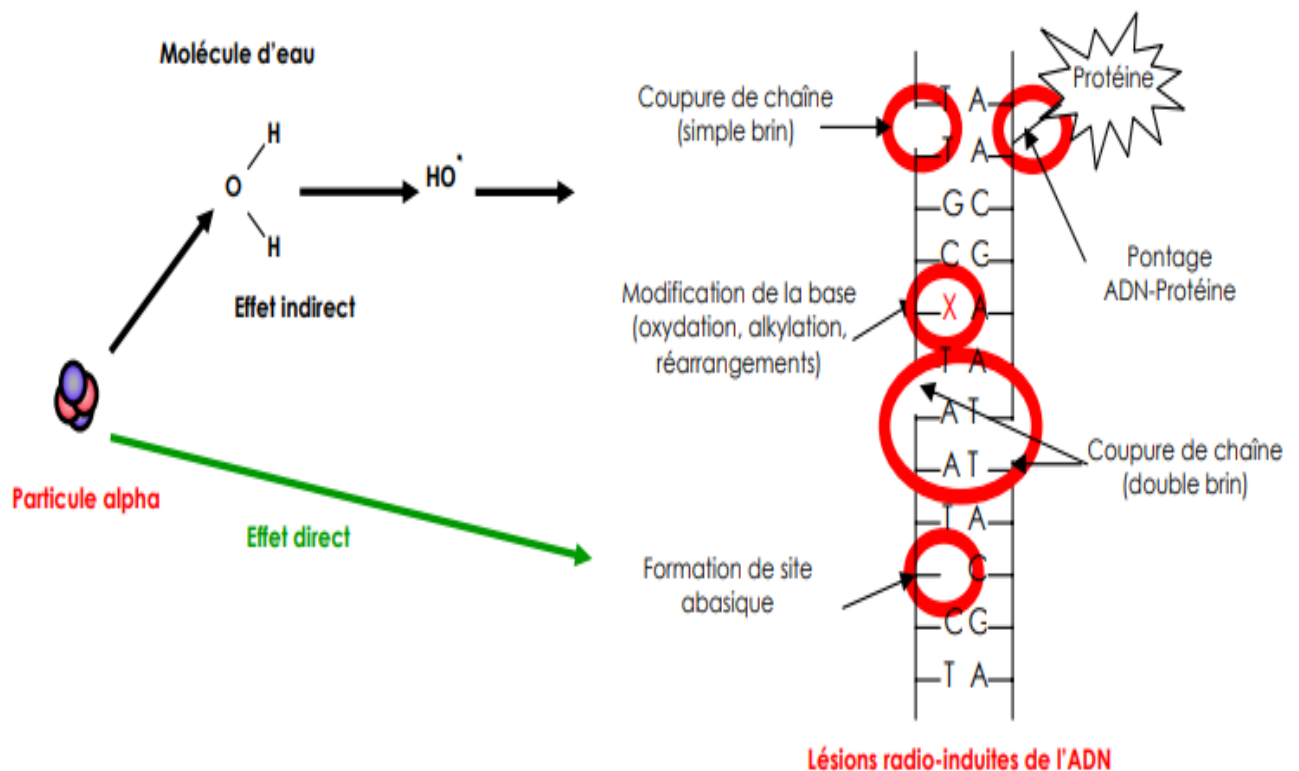


Figure 12: Représentation schématique des effets directs et indirects des irradiations sur l'ADN

VIII.4. Immunothérapie

Au cours des dernières années, l'immunothérapie a gagné une place importante parmi les différentes modalités du traitement du NPC. En raison du profil biologique particulier et du système immunitaire général de ce cancer (Xu et al., 2022). En relançant et en préservant le cycle immunitaire et en rétablissant la réponse immunitaire antitumorale normale, cette nouvelle approche peut contrôler et éliminer les cellules tumorales (Wang et al., 2022).

Il existe plusieurs stratégies pour augmenter l'immunité des patients atteints du NPC, parmi ces stratégies il y a l'utilisation des inhibiteurs du point de contrôle immunitaires ; qui est un protocole adopté pour traiter la récurrence et la métastase du NPC en Chine ; La protéine PD-1 (programmed cell death protein 1) est une protéine qui est exprimée sur les lymphocytes T activées et sert de récepteur du ligand PDL1 (programmed death-ligand 1) qui se trouve dans certaines cellules tumorales. Ce complexe joue rôle de régulateur négatif du système immunitaire en empêchant la réponse des lymphocytes T anti-tumorales. Par conséquent, Les cellules tumorales ne sont donc plus reconnues par le système immunitaire et peuvent continuer à se développer (Han et al., 2020).

Par l'utilisation des inhibiteurs de PD-1/PD-L1, l'immunothérapie empêche la liaison entre PD1 et PD-L1 et stimule ainsi le fonctionnement du système immunitaire. L'utilisation de ces anticorps donne des bons résultats dans le traitement du NPC, en raison du nombre élevé de lymphocytes intra-tumoraux infiltrant le tissu tumoral et la forte expression du ligant PD-L1 (69 %) dans le NPC liés à l'infection par le virus EBV (Johnson and Ma, 2021). Il a été démontré que le nivolumab, le pembrolizumab et le camrelizumab sont fiables et actifs en monothérapie pour traiter les cas récurrents et métastatiques du NPC (Bossi et al., 2021).

Dans une étude, ils ont trouvé que l'utilisation du camrelizumab (anticorps anti-PD-1) en monothérapie a montré une réponse globale de 34 %, alors qu'en association avec la gemcitabine et le cisplatine, elle est passée à 91 % (Fang et al., 2018 ; Sun et al., 2019).

Chapitre II :
Les mécanismes de résistance des patients
avec NPC à la radiothérapie

I. La radiorésistance et le cancer de nasopharynx

Parmi les principaux problèmes rencontrés par les cliniciens après un traitement de radiothérapie, nous citons : la fibrose radio-induite, la toxicité et l'émergence de cellules tumorales radio-résistantes. Malgré l'utilisation des techniques modernes de radiothérapie, la radiorésistance des cellules tumorales provoque une récurrence locale et des métastases à distance chez certains patients, ce qui contribue à l'échec du traitement (Yuan et al., 2016 ; Li et al., 2017 ; Ouellette et al., 2022).

En outre, la réponse à la radiothérapie est très variable en raison des différences individuelles, la variabilité du patrimoine génétique des cellules tumorales, une définition inadéquate de la cible et une durée de traitement globale plus longue que prévue (Kong and Lu, 2016). Une meilleure compréhension des facteurs et des mécanismes de la radiorésistance des patients avec NPC et la caractérisation des altérations moléculaires présentes au sein des cellules tumorales est importante, en vue d'une conception adéquate de stratégies thérapeutiques et d'une amélioration du pronostic.

II. Les mécanismes de la radiorésistance du cancer de nasopharynx

II.1. Généralités

La radiorésistance est un processus biologique complexe, les recherches récentes indiquent que les rayonnements ionisants peuvent activer de nombreuses voies de signalisation cellulaire qui entraînent l'induction de la sénescence, de l'apoptose, de l'autophagie (la mort ou la survie des cellules), et/ou l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (figure 13) (Schmukler et al., 2013 ; Santivasi et al. 2014 ; Chitikova et al., 2014 ; Havaki et al., 2015 ; Nguyen et al., 2018 ; De Ruyscher et al., 2019 ; Chen et al., 2019 ; Richardo et al., 2020).

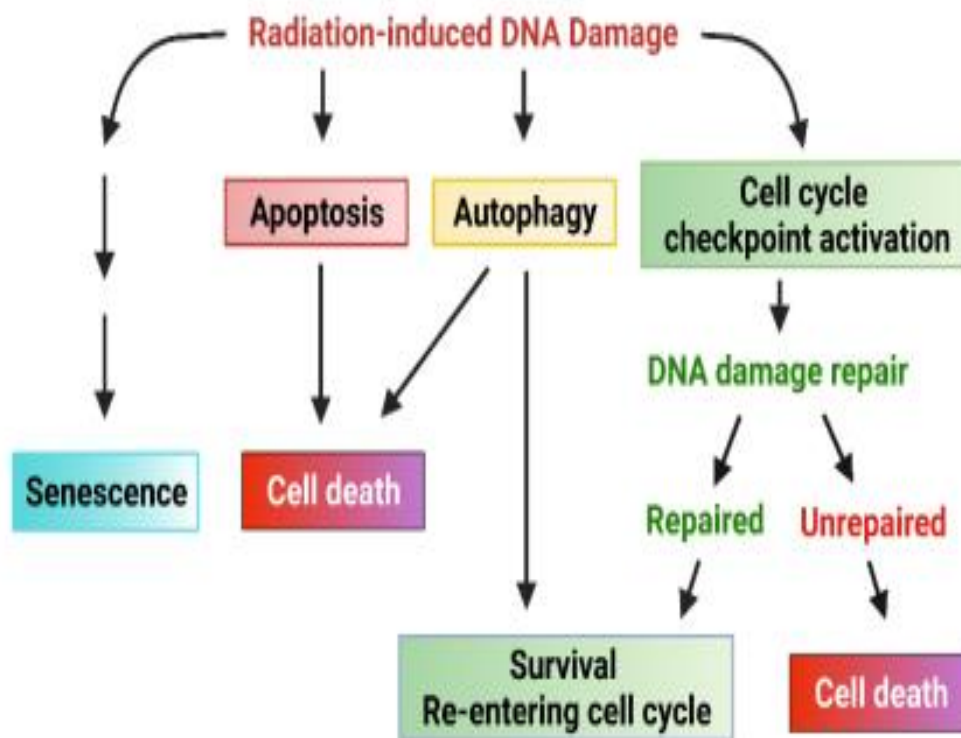


Figure 13 : Les différents types de réponses cellulaires à la radiothérapie.

Dans ce dernier cas, les cellules subissent un arrêt du cycle cellulaire pour réparer les dommages à ADN monocaténaire ou bicaténaire avec des mécanismes appropriés et revenir ensuite au cycle cellulaire si les dommages sont réparés. En conséquence, les voies de signalisation préservées en réponse à la radiothérapie sont généralement impliquées dans la promotion de la réparation de l'ADN et l'inhibition de l'induction de l'apoptose (Raleigh et al., 2013 ; Santivasi et al., 2014 ; Havaki et al., 2015 ; Richardo et al., 2020 ; Zhu et al., 2021).

Ces voies de signalisation peuvent minimiser la cytotoxicité induite par le rayonnement sur les cellules tumorales et, par la suite, reprogrammer biochimiquement ces cellules pour qu'elles deviennent radio-résistantes (Ouellette et al., 2022).

En outre des études ont montré que la radiorésistance est le résultat d'un ensemble d'événements génétiques et épigénétiques, affectant certains gènes impliqués dans la détoxification xénobiotique et de la réparation de l'ADN (Ouellette et al., 2022).

II.2. Rappels sur les mécanismes de réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN est mise en œuvre via une grande variété de mécanismes de réponse afin de réparer spécifiquement chaque type de lésion de l'ADN. Les principaux mécanismes de réparation sont : la réparation directe (DR, Direct Repair), la réparation des mésappariements

causés par le processus de réplication (MMR, Mis Match Repair), la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue ou non homologue (HR, Homologous Repair), la réparation par excision et échange de base (BER, Base Excision Repair), et la réparation par excision et échange de nucléotides (NER, Nucleotide Excision Repair) (Figure 14).

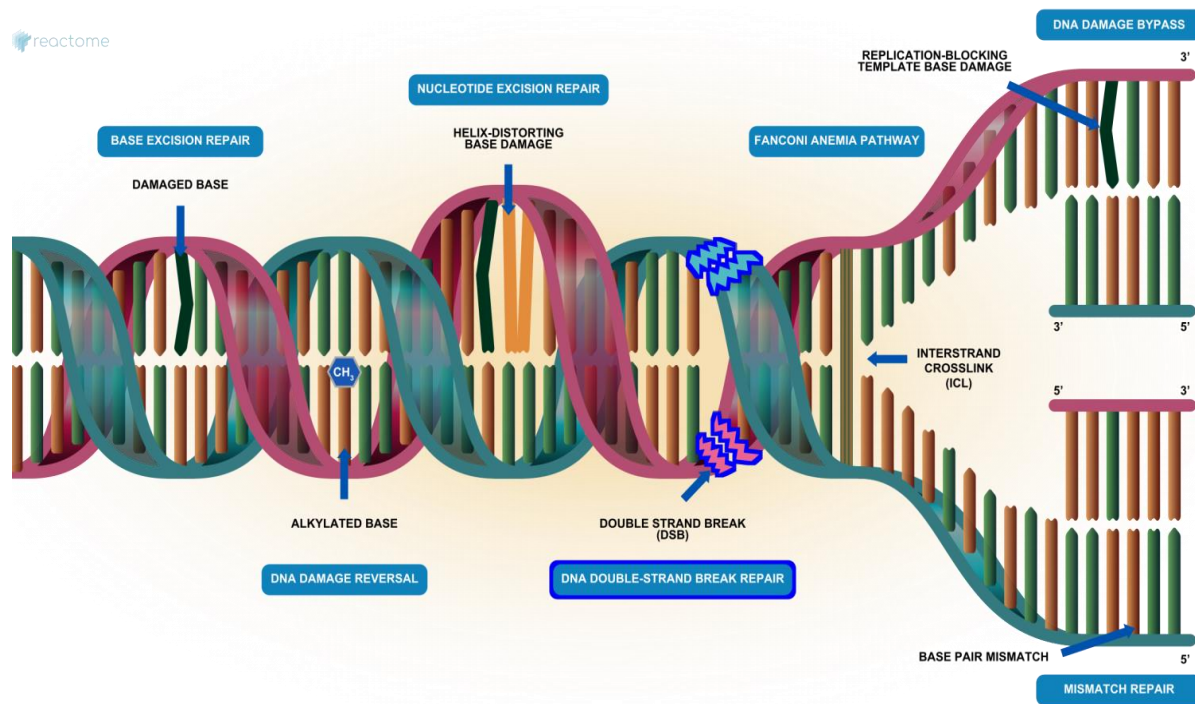


Figure 14: Les différentes réponses aux dommages de l'ADN.

<https://reactome.org>

1. La voie de réparation BER

Ce système de réparation est principalement conservé à la réparation des dommages simple brin de l'ADN (SSB) (Figure 15) (Tian et al., 2015). C'est un processus multienzymatique de réparation qui contient cinq enzymes principales : N-glycosylases, AP-endonucléase, flap endonucléase, ADN polymérase et ligase ; qui prend en charge les modifications de bases (Ambekar et al, 2017).

La première étape du BER est la reconnaissance des lésions de l'ADN, qui est effectuée par les ADN glycosylases (Tian et al., 2015). Selon le type de base, une glycosylase spécifique coupe la liaison N-glycosidique entre la base nucléotidique et le ribose, laissant le squelette phosphate de l'ADN intact mais créant des sites apuriques ou apyrimidiques (AP). Ces sites AP sont des

substrats pour les AP endonucléases qui hydrolysent la liaison phosphodiester et génèrent ainsi une coupure simple brin qui cause un gap mononucléotidique dans l'ADN (Alhmoud et al., 2020). L'ADN polymérase comble le gap de l'ADN en ajoutant les nucléotides adéquats et le mécanisme de réparation complète la forme hélicoïdale de l'ADN, qui est maintenue après avoir scellé la coupure par une ADN ligase (Robertson et al., 2009).

Ce processus comprend deux types différents de voies qui sont : Long Patch Repair (quand la majeure partie des nucléotides sont réparés) et Short Patch Repair (Quand un nucléotide unique est réparé) (Ambekar et al, 2017). Dans cette dernière voie, l'ADN polymérase Bêta substitue la base excisée et supprime le résidu terminal du pentose abasique à l'aide de son activité lyase. Après, le complexe XRCC1 Ligase III joint la base récemment substituée et le reste du brin d'ADN. L'association entre les polymérases Pol β , Pol δ et le facteur nucléaire PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est obligatoire dans cette voie afin de réparer un patch de 2 à 10 bases, en utilisant le brin complémentaire non endommagé comme matrice, ce qui produit un chevauchement nommé flap qui devra être supprimé à l'aide d'une Flap Endonuclease 1 (FEN1). Enfin, une ligase I doit restaurer la continuité de l'ADN (Spirio et al., 1993 ; Lindahl et al., 1999 ; Robertson et al., 2009).

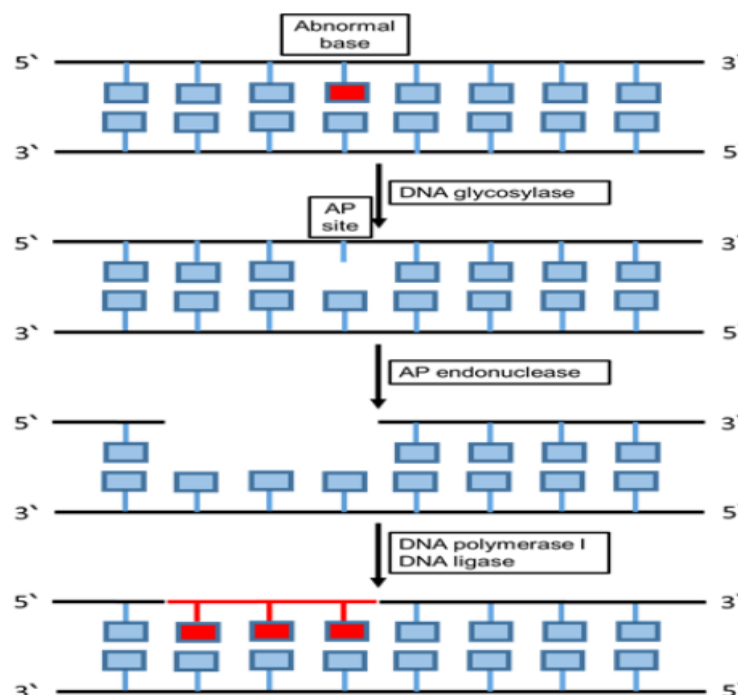


Figure 15 : la voie de réparation BER.

2. La voie de réparation NER

Ce système permet la réparation de tous types de dommage encombrants (Figure 16) ; sont les dommages qui déforment l'ADN et qui bloquent le fonctionnement des ADN et/ou les ARN polymérases (Petruseva et al., 2014). NER comprend deux branches principales : Le premier c'est la réparation couplée à la transcription (transcription-coupled NER ou TCNER), qui agit uniquement si la transcription d'un gène est endommagée. La deuxième est la réparation du génome global (global genome NER ou GGNER), qui est un processus lent agissant à n'importe quel endroit du génome et à n'importe quel moment (Tian et al., 2015). GGNER reconnaît les dommages sur l'ensemble du génome directement par l'intermédiaire du XPC-hRAD23B qui lie tout ADN altéré avec une affinité d'autant plus grande que le dommage provoque une distorsion importante de la double hélice d'ADN, tandis que la TCNER est activée uniquement si les dommages bloquent le fonctionnement de l'ARN polymérase II ; les protéines Cockayne Syndrome A et B (CSA et CSB) sont indispensables pour une efficacité optimale de cette branche (Budden et al., 2016).

Dans ces deux branches, il existe des processus communs. Deux protéines XPD et XPB assurent le maintien de l'ouverture de la double hélice, ce qui rend la lésion accessible aux facteurs NER et recrute le complexe XPA-RPA et l'endonucléase XPG. La reconnaissance du dommage est assurée par XPA, RPA se lie à l'ADN simple brin non endommagé et XPG incise le brin endommagé en 3' de la lésion. Ensuite, ERCC1-XPF réalise la coupure de l'ADN endommagé à la jonction mono- et bicaténaire du côté 5 par rapport à la lésion et élimine un fragment de 24 à 32 bases. Les polymérases répliquatives et les ligases ainsi que certains facteurs associés sont alors nécessaires pour resynthétiser le fragment éliminé et restaurer la continuité de l'ADN (Ogi et al., 2010 ; Alhmoud et al., 2020 ; Sadoughi et al., 2021).

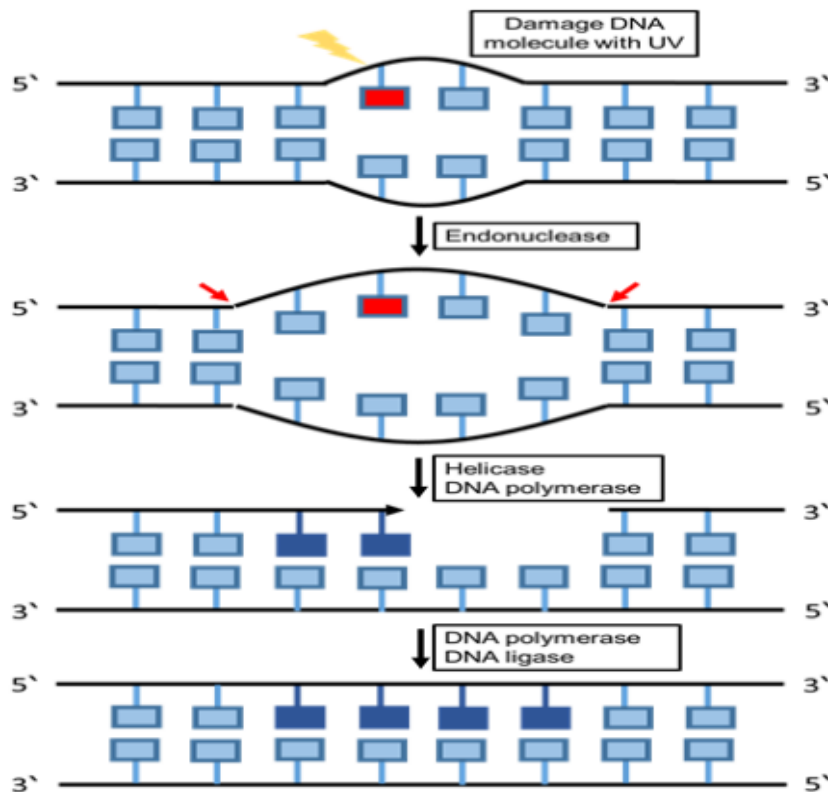


Figure 16: La voie de réparation NER.

II.3. Les altérations génétiques

1. Altérations des gènes de réparation de l'ADN

La sensibilité des cellules tumorales aux effets cytotoxiques de la radiothérapie est limitée par la présence de systèmes efficaces de réparation de l'ADN (Dai et al., 2020). Étant donné que les voies de réparation de l'ADN, NER et BER, sont principalement utilisées pour réparer les lésions de l'ADN, une augmentation de leur efficacité est corrélée à une résistance accrue à la radiothérapie.

Au sein de ces complexes, la radiorésistance est associée à la présence de certains SNPs, principalement au niveau du gène *ERCC1* (excision repair cross-complementing 1), du gène *XRCC1* (X-ray repair cross-complementing 1) et du gène *XRCC3* (X-ray repair cross-complementing 3).

1.1. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1)

A. Structure du gène

Le gène X-ray repair cross-complementing 1 humain (*XRCC1*) est localisé sur le bras long du chromosome 19 en position 19q13.2, et qui s'étend sur environ 37 163 bases, il est composé de 17 exons et 16 introns (Kaur et al., 2020). Le *XRCC1* a été le premier gène détecté qui affecte la sensibilité des cellules tumorales aux rayonnements ionisants (Liu et al., 2021). Le gène est transcrit en un ARN messager (ARNm) de 2102 pb puis traduit en protéine XRCC1 (Sterpone et al., 2010).

B. Structure et rôle de la protéine

C'est une protéine comprenant 633 acides aminés de 70 kilos dalton (kDa), elle comporte plusieurs domaines structuraux et fonctionnels ; (i) un domaine amino-terminal (NTD) ; (ii) une région de liaison contenant un site K1776, un motif de type RIR, et un signal de localisation nucléaire (NLS) ; (iii) un domaine central BRCT (BRCT1) ; (iv) une région de liaison contenant trois grappes de sites de phosphorylation CK2 et (v) un domaine BRCT C-terminal (BRCT2) (figure 17) (Caldecott, 2019).

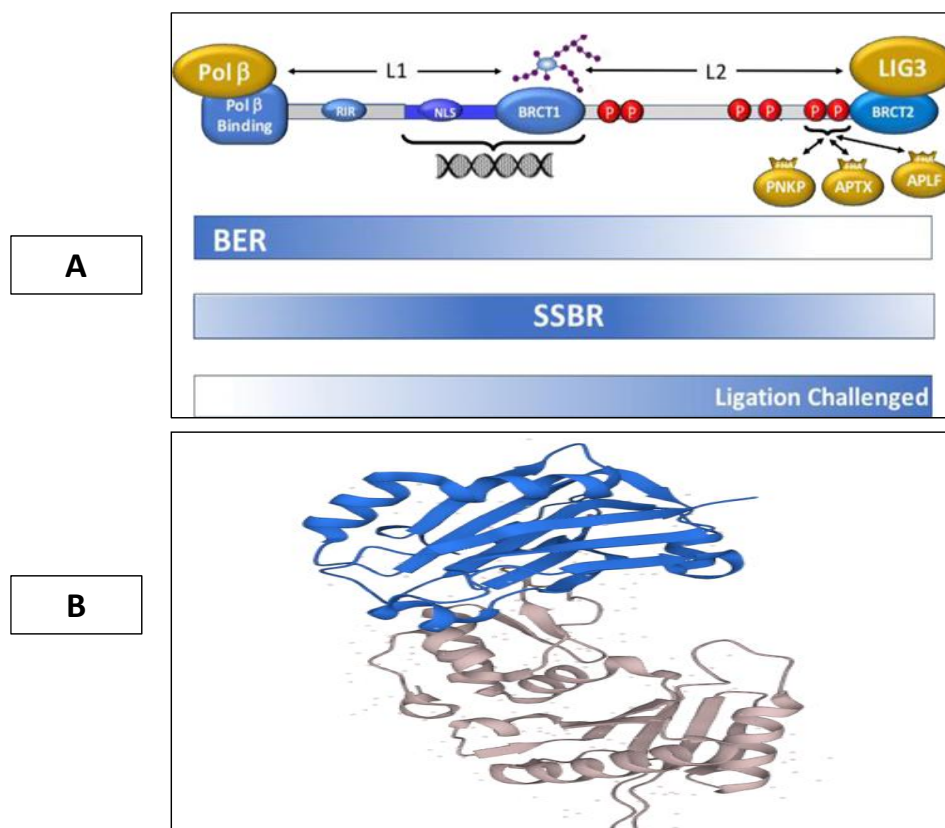


Figure 17: la protéine XRCC1 : A : Les différents domaines et interactions de la protéine XRCC1 ; B : Structure en 3D de la protéine XRCC1(London, 2020).

Ces domaines lui permettent d'organiser les différentes étapes du système BER par recrutement et stimulation de différents facteurs de réparation (reconnaissance et réparation des cassures simple-brin et les dommages de bases) (Figure 18) (Wood et al., 2001).

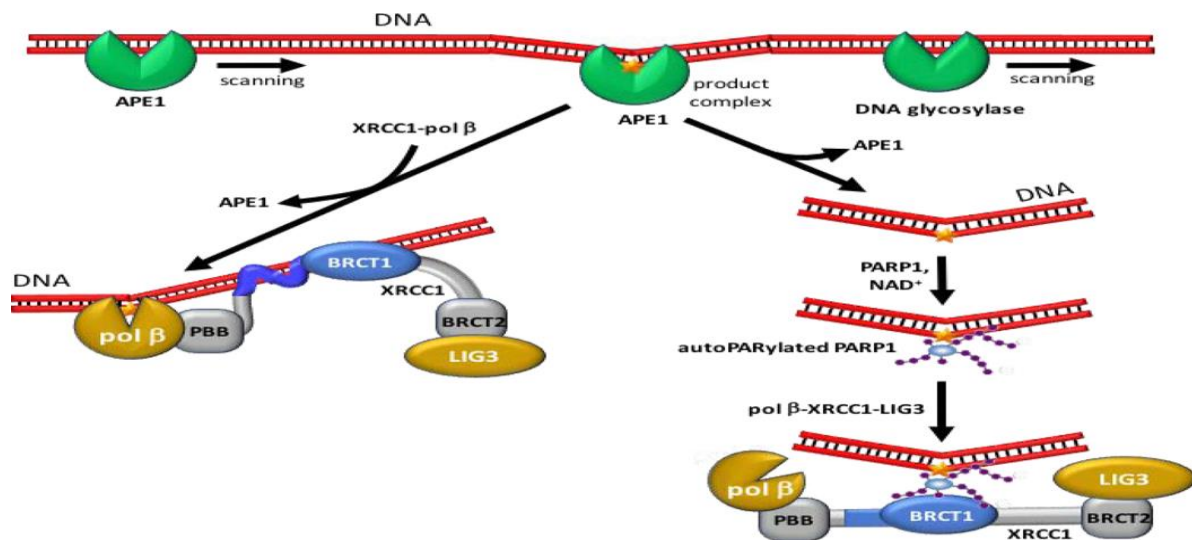


Figure 18: Participation de la protéine XRCC1 dans la voie BER (London, 2020).

C. Polymorphisme du gène *XRCC1* et radiorésistance

Les SNPs des gènes de réparation de l'ADN peuvent modifier l'expression et l'activité du gène comme ils peuvent affecter la réponse au traitement du cancer et, en conséquence, la survie. Nombreuses recherches se sont intéressées à l'analyse des SNPs dans le gène *XRCC1*, qui sont de l'ordre de 300 SNPs, validés et signalés dans la base de données dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)(Yang et al., 2022).

En effet, les polymorphismes du gène *XRCC1* sont étroitement liés à la carcinogenèse et à la réponse aux traitements de divers cancers. Parmi les SNPs les plus étudiés, trois principaux polymorphismes fonctionnels : Arg194Trp (rs1799782), Arg280His (rs25489) et Arg399Gln (rs25487) ont été identifiés, qui peuvent affecter la capacité de réparation de l'ADN en modifiant les interactions entre XRCC1 et d'autres protéines impliquées dans le système de réparation BER et par la suite le développement d'un cancer (Liu et al., 2021).

L'association entre les SNPs et l'expression de la protéine XRCC1 a été signalée dans plusieurs cancers, notamment, le cancer de la thyroïde (Liu and Xue, 2020), le cancer du poumon (Zhou et al., 2021), le cancer du sein (Zhao et al., 2022), et le cancer du nasopharynx (Mohtasham et al., 2023).

Parmi les polymorphismes génétiques responsables au développement du NPC, le SNP Arg399Gln (rs25487) est le plus répertorié (Lin et al., 2018), situé dans le domaine BRCT1, qui est essentiel pour le recrutement de XRCC1 par PARP1 en cas de lésion de l'ADN (Hu et al., 2001). Il s'agit d'une substitution de la guanine (G) en adénine (A) dans le codon 399 au niveau de l'exon 10, ce qui conduit à un changement de l'acide aminé Arginine (Arg) en Glutamine (Gln) (Singh et al., 2016 ; Chen et al., 2017 ; Gupta et al., 2021). Cette substitution entraîne la perte de caractéristique de structure secondaire, telle que l'hélice A, qui est essentielle dans la correction des interactions protéine-protéine dans le domaine BRCT1, compromettant ainsi la réparation des dommages (Jin et al., 2014).

Les études de corrélation entre le cancer du nasopharynx et la réponse à la radiothérapie ont démontré l'association du SNP *XRCC1* Arg399Gln (combiné au tabagisme intensif) avec un mauvais pronostic chez les patients traités par radiothérapie (Jin et al., 2014 ; Liu et al., 2021). Les patients portant d'allèle Gln/Gln étaient plus sensibles à la radiothérapie, ce qui fait de ce génotype un marqueur prédictif convaincant pour la réponse au traitement du NPC à des stades localement avancés (Zhai et al., 2016). De plus, l'allèle 399Gln du gène *XRCC1* peut également altérer directement l'expression de l'ARNm (Zipprich et al., 2010). L'allèle Arg/Arg a également été identifié comme un facteur prédictif du risque de développement d'une pneumonite et/ou une radiodermite aiguë lors du traitement par IRM (Du et al., 2018).

Par ailleurs, Certains auteurs ont établi une association entre le SNP Arg399Gln et la réponse à la radiothérapie chez les patients atteints du cancer du sein. Ils ont démontré que le nombre d'allèles variant dans les génotypes du *XRCC1* Arg399Gln était corrélé à des retards prolongés du cycle cellulaire après l'exposition aux rayonnements ionisants. Cela a conduit à une hypersensibilité aux rayonnements ionisants chez les femmes atteintes d'un cancer du sein (Hu et al., 2002).

Lors de l'évaluation de la corrélation entre le polymorphisme *XRCC1*Arg399Gln et les résultats cliniques chez les patients atteints du cancer colorectal traités par chimiothérapie, 66 % des patients qui n'ont pas répondu au traitement par 5-FU/oxaliplatine étaient porteurs d'un génotype Gln/Gln ou Gln/Arg. Cela suggère le rôle du polymorphisme *XRCC1* dans l'altération de la voie BER et donc, conduire à une chimiorésistance (Sadoughi et al., 2021).

Toutefois, d'autres études sur une population asiatique atteinte du NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) ont trouvé que le SNP *XRCC1* Arg399Gln peut changer l'activité de réparation de l'ADN et affecter la sensibilité des cellules tumorales aux médicaments à base de platine (Zhang et al., 2020).

1.2 X-ray repair cross-complementing group 3 (XRCC3)

A. Structure du gène

Le gène *XRCC3* est situé sur le bras long du chromosome 14 (14q32.3). Ce gène mesure 18 kb et comprend 10 exons (Avadanei et al., 2018). L'analyse de la séquence de ce gène a montré une homologie significative avec le gène *Rad51* (Figure 19) (Liu et al., 1998). *XRCC3* est un gène impliqué dans le système de réparation par excision de nucléotides (NER) (Avadanei et al., 2018). Il code pour une enzyme qui participe dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Kaur et al., 2020).

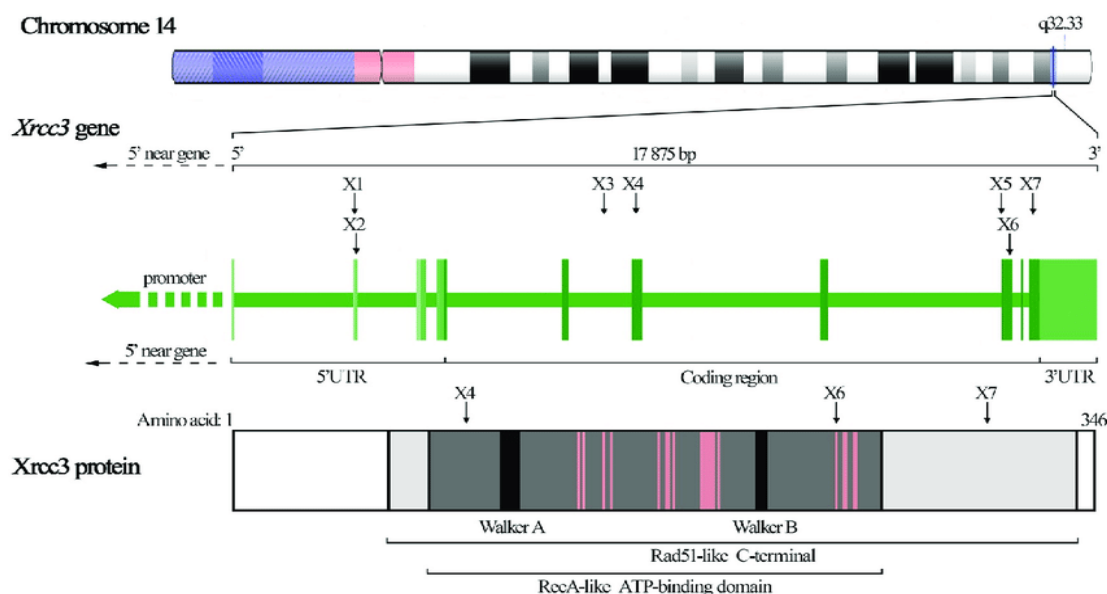


Figure 19: *XRCC3*, localisation chromosomique, structure du gène et structure de la protéine.

B. Structure et rôle de la protéine

La protéine *XRCC3* est une protéine de 346 acides aminés, mesurent 37 kDa (Avadanei et al., 2018). C'est l'un des membres de la famille large des protéines liées à Rad51 (Hu et al., 2022). Cette enzyme est essentielle pour maintenir la stabilité génétique (Ozoran et al., 2022).

Dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, elle intervient à la fois dans les mécanismes de réparation de la recombinaison croisée et homologue, représentant un composant clé de cette voie, car elle est une homologue de la protéine RAD51 avec laquelle elle interagit (Figure 20) (Avadanei et al., 2018). *XRCC3* contient des motifs ATPase constitués de Walker A et B qui interviennent dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Par ailleurs, il est connu que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP jouent des rôles importants au niveau de l'interaction *XRCC3*-RAD51 (Yamada et al., 2004), cette interaction facilite la synthèse d'un

filament de nucléoprotéines, qui représente le vecteur primordial à la fois pour la recombinaison homologue et hétérologue (Avadanei et al., 2018).

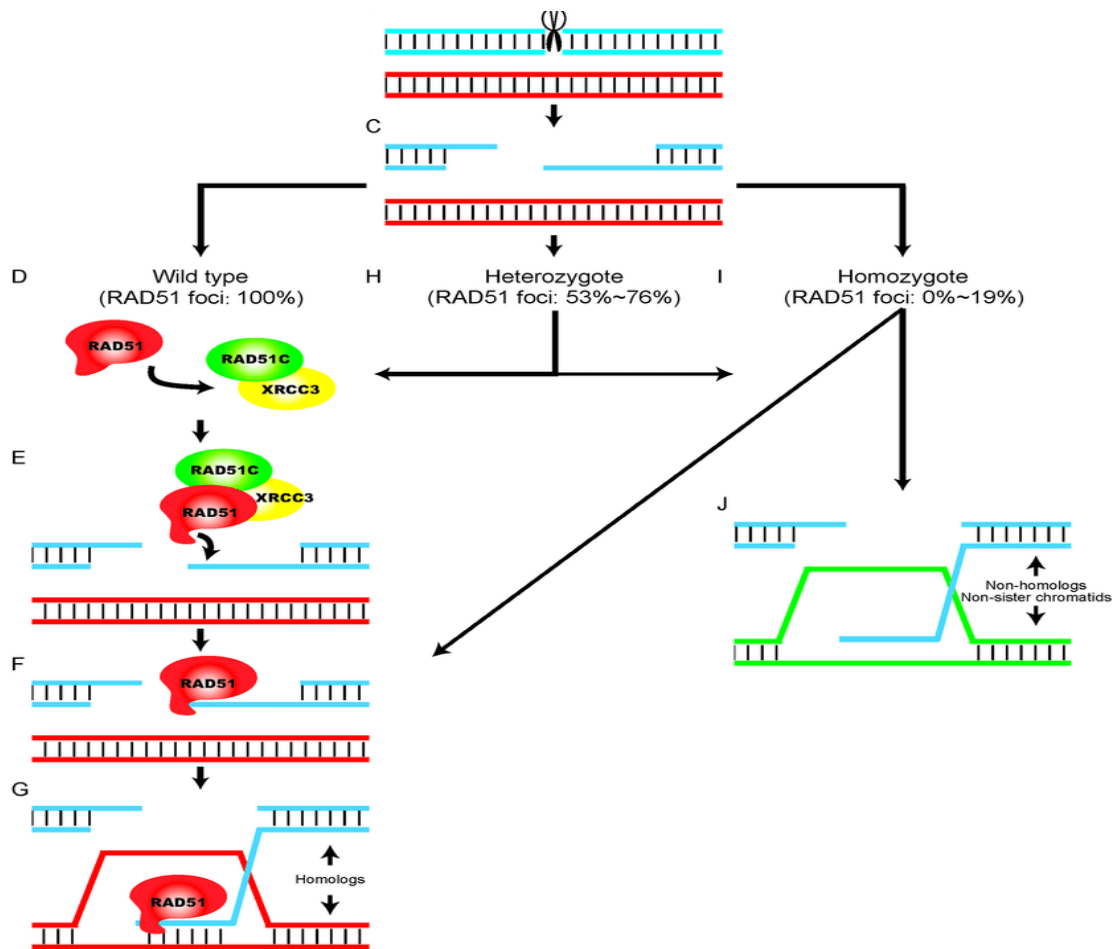


Figure 20: Rôle de la protéine XRCC3 et RAD51C dans la recombinaison méiotique.

C. Polymorphismes du gène XRCC3 et radiorésistance

Les polymorphismes du gène *XRCC3* peuvent être liés aux risques du développement du cancer et à la réponse aux différents traitements (Kutlin et al., 2020 ; Siak et al., 2021). Selon la base de données NCBI, *XRCC3* comprend 111 SNPs. Le polymorphisme *XRCC3* Thr241Met est intensivement lié au risque du développement du NPC (Cui et al., 2016), et il est très étudié dans les recherches de l'association avec la réponse à la radiothérapie (Cheuk et al., 2014 ; Kaur et al., 2020). Il est caractérisé par une substitution de la cytosine (C) par la thymine (T) au niveau du codon 241 de l'exon 7 à la position 18067 (rs861539) (Jacobsen et al., 2004 ; He et al., 2018).

Contrairement aux autres polymorphismes du gène *XRCC3*, le polymorphisme non synonyme *XRCC3*Thr241Met conduit à un changement d'un acide aminé polaire (thréonine) par un acide aminé non polaire (méthionine), ce qui peut affecter considérablement le fonctionnement de la

protéine produite. Pour cette raison, ce polymorphisme a été largement étudié dans de nombreuses tumeurs malignes, y compris le cancer de la vessie (Zhu et al., 2012), le cancer de la tête et du cou (Yin et al., 2012), le cancer des ovaires (Cheng et al., 2012), le cancer colorectal (Zhao et al., 2012), et le cancer du nasopharynx (Cui et al., 2016) et des associations significatives ont été démontrées dans certains cas.

En outre, les polymorphismes *XRCC3* jouent un rôle important dans le traitement des gliomes. Dans la pratique actuelle, le témozolomide est l'agent chimio-thérapeutique de choix pour les gliomes de haut grade. Récemment, une étude a démontré que le polymorphisme *XRCC3*Thr241Met contribue à la résistance au témozolomide dans les cellules du glioblastome en favorisant la réparation des ruptures à double brin (Tan et al., 2022).

Dans une étude, l'allèle Thr du *XRCC3* Thr241Met présentait des DFS (disease free survival) et DSS (disease-specific survival) significativement meilleurs que l'allèle Met chez des patients atteints du LSCC (laryngeal squamous cell carcinoma) traités par radiothérapie (Rajabi-Moghaddam and Abbaszadeh, 2022).

Certaines études ont montré que le polymorphisme *XRCC3* Thr241Met est associé à une radiosensibilité très élevée chez des patients atteints du HNSCC (Farnebo et al., 2011). L'hétérozygote Thr241Met est lié à des niveaux relativement élevés de métastases locales du cancer de sein (Krupa et al. 2009).

1.3. Excision repair cross-complementing group1 (*ERCC1*)

A. Structure du gène

Le gène *ERCC1* est localisé sur le bras long du chromosome 19 (19q13.32), il est composé de 10 exons. *ERCC1* appartient à la famille des gènes de réparation et joue un rôle crucial dans la voie de réparation NER (Ren and Ly, 2016).

B. Structure et rôle de la protéine

La protéine *ERCC1* est une enzyme très conservée, composée de 297 acides aminés avec un poids moléculaire de 33 kDa (Koutsoukos et al. 2020). Elle comporte deux domaines : un domaine central conservé dépourvu de l'activité nucléase et un domaine C-terminal (Figure 21) (Li et al., 1994). Sur le plan fonctionnel, la protéine *ERCC1* interagit avec le Xeroderma Pigmentosum du groupe F (XPF) à travers leurs domaines C-terminal et forme un complexe protéique hétérodimérique avec une activité endonucléase (Koutsoukos et al. 2020). Le complexe *ERCC1*-XPF est l'un des composants clés de la voie de réparation NER, il est

capable d'identifier et d'éliminer les adduits d'ADN (Figure 22). Il catalyse le clivage en 5' de l'ADN endommagé libérant un fragment de 24 à 32 bases. Le domaine central semble être responsable de l'interaction avec XPA, cette interaction est requise pour le recrutement du complexe ERCC1-XPF (Li et al., 1994 ; Orelli et al. 2010 ; Koutsoukos et al. 2020). Plusieurs études indiquent que ce complexe fonctionne dans d'autres voies de réparation de l'ADN (réparation des SSBs,DSBs et ICL) grâce à ses propriétés uniques d'incision catalytique (Faridounnia et al., 2018).

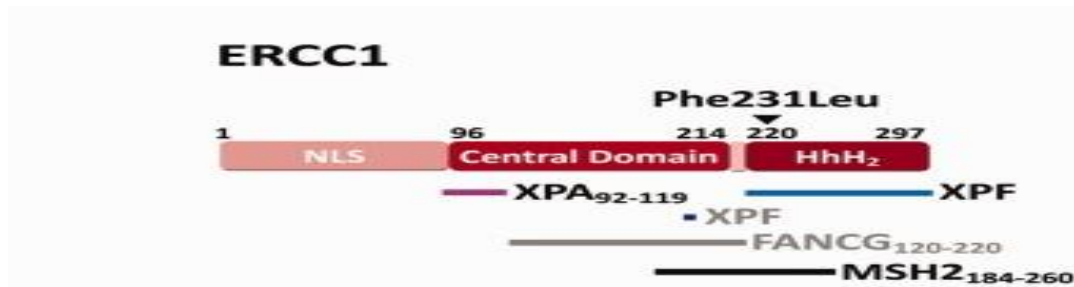


Figure 21: Structure de la protéine ERCC1(McNeil and Melton, 2012).

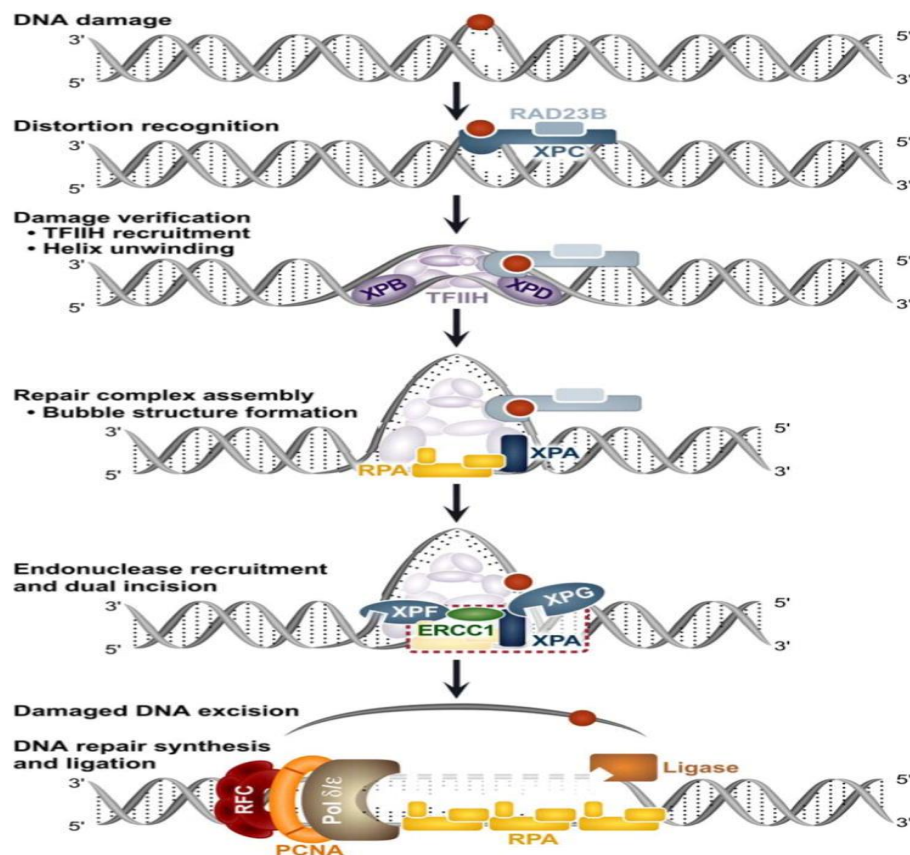


Figure 22: Rôle de la protéine ERCC1 dans la voie de réparation NER (Croteau et al., 2008).

C. Polymorphisme du gène *ERCC1* et radiorésistance

Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse des polymorphismes du gène *ERCC1*, qui sont représentés essentiellement par des SNPs. Plus de 109 SNPs sont répertoriés et validés dans la liste de données dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Certaines sont des mutations faux-sens, provoquant un changement d'acide aminé, mais la plupart sont des mutations silencieuses sans aucun changement dans la séquence d'acide aminé (Yu et al. 1997). Ces SNPs sont présentes dans plusieurs types de cancers y compris le NPC, de plus, ils ont une influence sur la réponse aux différents types de traitement (Chen et al. 2013 ; Jin et al., 2014).

Parmi les polymorphismes les plus étudiés, il y a le SNP *ERCC1* C8092A (rs3212986) ; qui est une substitution d'une cytosine (C) par une adénine (A) au niveau du codon 118, localisée sur la région non traduite 3' du gène *ERCC1* (Shen et al., 1998), impliqué dans la répression translationnelle de l'ARNm et affectant ainsi sa stabilité (Zhou et al., 2004 ; Jin et al., 2014).

L'association entre les SNPs du gène *ERCC1* comme Cys8092Ala et le pronostic a été analysée dans divers types de cancers traités par chimiothérapie, les résultats étaient discordants. Dans le NSCLC, plusieurs études génétiques ont démontré que le polymorphisme Cys8092Ala peut être un facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie à base de platine (Grenda et al. 2020). Aussi, Zhou et al ont trouvé que la durée de survie médiane était de 22.3 mois chez les patients ayant le génotype C/C, alors qu'elle est de 13.4 mois chez les patients ayant le génotype C/A ou A/A, suggérant que la présence de l'allèle A est associée à un mauvais pronostic (Zhou et al., 2004).

Par ailleurs, le polymorphisme *ERCC1* C8092A semble être associé à un meilleur pronostic dans les carcinomes spinocellulaires pharyngo-laryngés (Hirakawa et al., 2020). Ce polymorphisme pourrait être un marqueur potentiel utile chez les patients NPC métastatiques/récurrents traités par chimiothérapie à base de cisplatine (Jin et al., 2014 ; Rajabi-Moghaddam, 2022). Certaines études ont trouvé que les patients porteurs des génotypes CC et CA ont bien répondu à la chimiothérapie comparativement à ceux qui portent le génotype AA (Tejasvi et al., 2020).

Plusieurs études ont démontré que certains polymorphismes du gène *ERCC1* pourraient être associés à la radiorésistance chez les patients avec NPC (Liu et al., 2014). Toutefois, les études sur les relations possibles entre le polymorphisme Cys8092Ala et la réponse à la radiothérapie chez les patients avec NPC sont limitées. Dans une analyse rétrospective incluant 75 patients atteints de NPC, l'association entre le SNP *ERCC1* Cys8092Ala et la réponse à la radiothérapie

a été évaluée ; les patients NPC porteurs du génotype *ERCC1* 8092 Ala/Ala ont un mauvais pronostic par rapport à ceux avec le génotype *ERCC1* 8092 A/C ou *ERCC1* 8092 Cys/Cys (Jin et al., 2014).

Un autre polymorphisme, *ERCC1*C118T (rs11615) est situé dans le codon 118 de l'exon 4 entraîne un changement de cytosine (C) en thymine (T) (Tejasvi et al., 2020). Ce polymorphisme semble avoir une signification fonctionnelle, mais pas entièrement comprise. En effet, la substitution du C en T peut influencer l'expression du gène *ERCC1* (Yu et al., 1997). Cette mutation silencieuse code dans les deux cas pour l'acide aminé asparagine. Cependant, le nucléotide de thymine diminue jusqu'à 50% l'utilisation du codon et la transcription du gène, réduisant ainsi la traduction et changeant la conformation de la protéine d'*ERCC1* dans le système NER (Yu et al., 2000).

Plusieurs études ont établi un lien entre ce polymorphisme et le traitement par chimiothérapie à base de sels de platine dans plusieurs cancers, notamment, le cancer ovarien, gastro-intestinal, pulmonaire et nasopharyngée (Park et al., 2003 ; Isla, et al., 2004 ; Kang et al., 2006).

Dans une étude visant à évaluer l'effet du polymorphisme *ERCC1* 118 C/T sur la réponse à la chimiothérapie à base de cisplatine chez les patients atteints de carcinome malpighien de la cavité orale, les résultats ont montré que ce SNP a un impact important sur la réponse au traitement ; les patients porteurs des génotypes CC et CT ont donné une bonne réponse au traitement par rapport à ceux avec le génotype TT (Tejasvi et al., 2020).

Par ailleurs, le SNP *ERCC1* 118 C/T peut jouer un rôle important dans la prédiction de la sensibilité à la radiothérapie et du pronostic du NSCLC. En effet, les patients porteurs de l'allèle C ont un taux de survie plus élevé par rapport à ceux porteurs de l'allèle T (30,9 vs. 16,2 mois ; $P=0,003$) (Jiang et al., 2021). Ces résultats ont été confirmés par Du et son équipe, démontrant une association significative entre les génotypes *ERCC1* C118T et les résultats de la radiothérapie chez les patients atteints de cancer du poumon (Du et al., 2018) et du cancer de l'œsophage (Warnecke-Eberz et al., 2009). Un intérêt particulier a été accordé au rôle du SNP *ERCC1* C118T comme marqueur de réponse à la radiothérapie chez des patients espagnols atteints de cancer de la tête et du cou, élargissant la gamme d'application de ce SNP pour prédire le stade clinique ainsi que la réponse à la radiothérapie. Dans le NPC, le polymorphisme *ERCC1* C118T peut être un indicateur de bon pronostic chez les patients NPC avec EBV négatifs et traités par radiothérapie (Siak et al., 2021).

2. Altération des gènes de détoxification

Les systèmes antioxydants se mettent en place pour protéger les cellules contre les attaques des ROS (espèces réactives de l'oxygène) générées à la suite d'un stress oxydant après radiothérapie. Parmi ces systèmes de défense, figurent des protéines comme la glutathion peroxydase sélénium-dépendante (GPX1) et les glutathion S-transférases (GSTP1). Les polymorphismes au niveau des gènes codant pour ces protéines de détoxification peuvent servir comme biomarqueurs moléculaires prédictifs du statut de radiosensibilité et de radorésistance chez les patients avec NPC (Tang et al. 2018).

2.1 Glutathione S-transferasesP1 (*GSTP1*)

A. Structure du gène

Le gène *GSTP1* est polymorphe, il est localisé sur le chromosome 11 en position q13.2, il est constitué de 7 exons et 6 introns avec une taille de 3 kb. Ce gène code pour des protéines variantes de GSTP1 active de 210 acides aminés (Daniel, 1993).

B. Structure et rôle de la protéine

Les enzymes glutathion S-transférases sont divisés en 3 familles : les GST kappa, GST microsomales et les GST cytosoliques, ces dernières sont composées de 7 classes ; alpha (GSTA), mu (GSTM), omega (GSTO), pi (GSTP), theta (GSTT) and zeta (GSTZ) (Nebert and Vasiliou, 2004). Deux isoformes de la classe pi ont été décrits : GST P2 et GST P1. Les GSTs comprennent deux sites de fixation ; site G (spécifique du GSH) et site H (spécifique au substrat). Les GSTPs possèdent un troisième site non spécifique (transporteur des molécules hydrophobes ou régulateur qui supprime certaines activités enzymatiques) (Mohabatkar et al., 2021 ; Van Bladeren, 2000).

Les GST sont des protéines de biotransformation de phase II qui jouent un rôle essentiel dans la détoxification des cancérogènes, des médicaments, et des ROS, en catalysant la conjugaison de glutathion réduit (GSH) et entraînant généralement une détoxification d'un grand nombre de substrats électrophiles hydrophobes endogènes et exogènes (Prysyazhnyuk et al., 2021). Les GSMs catalysent l'attaque nucléophile de l'atome de soufre du GSH sur un composé électrophile pour donner des conjugués X-SG. Cette réaction est la première étape de la formation des acides mercapturiques qui sont des composés N'acétylés dérivés de composés électrophiles. Cette voie permet la détoxification des composés chimiques en les rendant plus hydrophiles (Habig et al., 1974).

La protéine GSTP1 joue un rôle important dans la susceptibilité du NPC, elle a été également associée à la réponse des patients NPC après une radiothérapie.

C. Polymorphismes du gène GSTP1 et la radiorésistance

Deux sites polymorphes dans la séquence du gène *GSTP1* ont été identifiés, il y a le polymorphisme *GSTP1* Ile105Val (rs1695) ; un polymorphisme non fonctionnel en position 314 de l'exon 5 permettant la substitution de l'adénine (A) en guanine (G) ; qui en résulte un changement de l'acide aminé isoleucine (Ile) en valine (Val) dans la position 105 (Saadat, 2017). Le deuxième polymorphisme est caractérisé par une transition de C en T au niveau du nucléotide 341 entraînant le remplacement de l'alanine par le valine (Ala114 Val) dans l'exon 6 (Sharma et al., 2014).

Ainsi, le locus humain *GSTP1* comprend quatre allèles différents : *GSTP1**A (type sauvage Ile 105 Ala114), *GSTP1**B (Val105- Ala114), *GSTP1**C (Val105 -Val114) et *GSTP1**D (Ile105 -Val114) (Ali-Osman et al., 1997 ; Alexandrie et al., 2002).

La protéine *GSTP1* est considérée comme ayant un rôle dans le développement du cancer et la résistance aux différentes modalités de traitement, en raison de sa surexpression dans la majeure partie des lignées cellulaires tumorales humaines et sa forte prévalence dans les tumeurs chimio et radio-résistantes.

Il a été démontré que le SNP *GSTP1* Ile105Val (rs1695) diminue l'activité enzymatique de la protéine *GSTP1* (Ma et al., 2017), la forme Val105 de la protéine *GSTP1* peut être 2 à 3 fois moins stable que la forme canonique Ile105, par conséquent, elle peut être associée à un niveau plus élevé d'adduits d'ADN (Junfeng, 2011). Il existe plusieurs preuves qui soutiennent le rôle du *GSTP1* Ile105Val dans la prédisposition aux différents types cancers. Dans une étude menée sur une population chinoise, ils ont démontré que ce polymorphisme peut augmenter le risque de cancer du poumon. De plus, dans d'autres travaux, le SNP Ile105Val est associé à la susceptibilité au carcinome spinocellulaire pulmonaire, au carcinome hépatocellulaire et aux cancers colorectal et gastrique (Cui et al., 2020). Il a été signalé que ce polymorphisme pourrait être impliqué également dans le développement du NPC (Farhat et al., 2021).

En plus de son rôle dans le développement du cancer, le SNP Ile105Val a été évalué également comme biomarqueur potentiel de la réponse au traitement dans différents types de cancers. Il a été démontré que l'efficacité catalytique du thiotépa ; un médicament chimiothérapeutique ; était 2 fois plus faible pour les patients atteints du cancer de sein porteurs de l'allèle Val105 par rapport à ceux porteurs de l'allèle Ile105. Ce qui laisse penser que les patients ayant l'allèle

Val105 peuvent réagir différemment à la chimiothérapie en raison d'une activité altérée dans l'élimination enzymatique des agents thérapeutiques, ce qui en résulte une différence de survie (Sweeney et al., 2000).

Dans une étude d'association entre la réponse au traitement et le polymorphisme *GSTP1* Ile105Val chez des patients NSCLC traités par chimiothérapie ; il a été démontré que les génotypes AG et GG ont été associés à une meilleure réponse à la chimiothérapie par rapport au génotype AA (Zhao and Chen, 2015).

Récemment, dans une étude qui a visait à explorer l'influence de ce polymorphisme sur la sensibilité à la leucémie myéloïde chronique (LMC) et à la réponse à l'imatinib. Ils ont démontré que ce polymorphisme n'est pas associé au risque de LMC, mais il influence la réponse des patients traités par l'imatinib (Kaltoum et al., 2021).

L'association entre le polymorphisme *GSTP1* Ile105Val et la réponse aux traitements a été également évalué chez une population HNSCC traités par chimioradiothérapie. L'analyse a démontré que les patients ayant le génotype *GSTP1* Val105Val avaient 3,87 fois plus de chances de présenter une progression de la maladie que ceux ayant le génotype Ile105Ile ou Ile105Val ($p < 0.01$), concluant que le polymorphisme *GSTT1* Ile105Val modifie la réponse des patients HNSCC traités par chimioradiothérapie (Pincinato et al., 2019).

2.2 Glutathion peroxydase 1(*GPX1*)

A. Structure du gène

Le *GPx1* est un gène polymorphe localisé dans le bras court (p) du chromosome 3 en position 3p21 (Arsova-Saradinovska et al., 2009) avec une taille de 1178 pb et contenant deux exons (Zhao et al., 2022) (Figure 23). Il a cinq variantes de transcription, et sa direction de transcription est négative (Figure 24) (Brigelius-Flohé and Flohé, 2020). Ce gène contient une répétition tri-nucléotidique GCG en phase dans la région codante, et trois allèles avec 4, 5 ou 6 répétitions ont été trouvés dans la population humaine (Fang et al., 2018). La protéine codée par ce gène appartient à la famille des glutathions peroxydases.

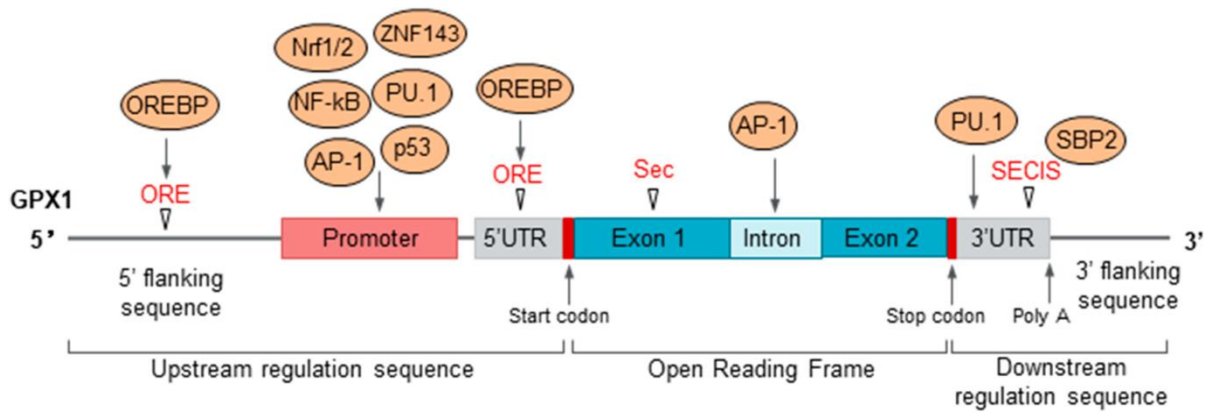


Figure 23: Diagramme représentatif de l'expression du gène *GPX1* (Zhao et al., 2022).

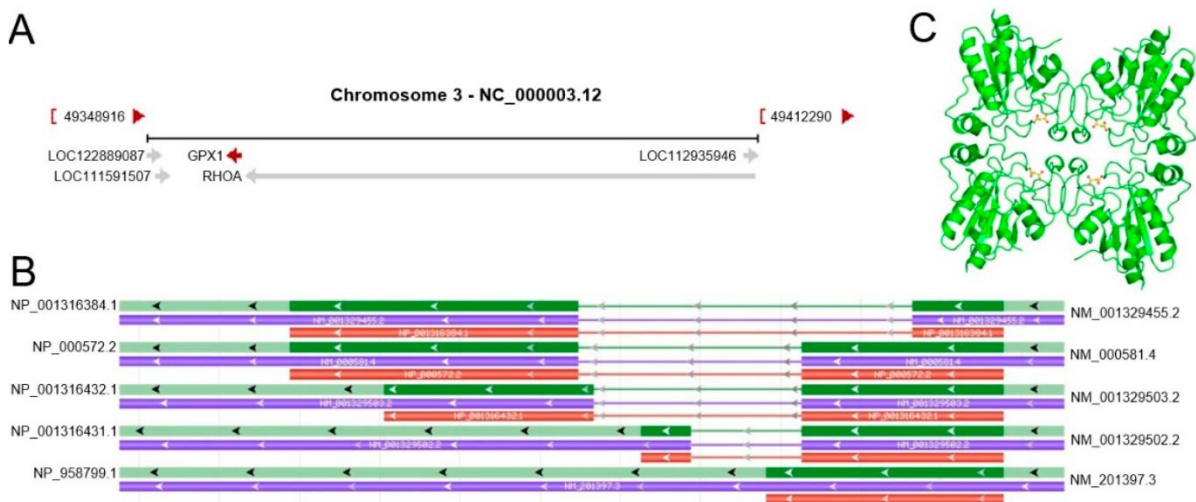


Figure 24: La direction de transcription (A et B) et la structure du GPX1 (C) (Zhao et al., 2022).

B. Structure et rôle de la protéine

La glutathion peroxydase est le nom général d'une famille d'isoenzymes qui catalysent la réduction de H_2O_2 ou d'hydroperoxydes organiques en eau ou en alcools correspondants en utilisant du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GS-SG + 2H_2O$) (Margis et al., 2008).

La forme cytosolique de la glutathion peroxydase 1 (GPX1) appartient à une famille de peroxydases sélénium dépendantes qui comprend le cytosolique (GPX2), le plasma (GPX3) et la phospholipide hydroperoxidase (GPX4) (Arsova-Sarafinovska et al., 2009). La protéine GPX1 est la glutathion peroxydase la plus abondante et s'exprime de manière omniprésente (Brigelius-Flohé and Flohé, 2020), elle est un homo-tétramère composé de quatre sous-unités

identiques d'un poids moléculaire de 22 à 23 kDa. Chaque monomère contient environ 208 acides aminés (Zhao et al., 2022) (Figure 24).

Cette sélénoprotéine contient la sélénocystéine (acide aminé rare) sur son site actif. Cet acide aminé est codé par le codon UGA, qui signale normalement la fin de la traduction. La GPX1 est une enzyme antioxydante essentielle impliquée dans la prévention de l'accumulation nocive de peroxyde d'hydrogène intracellulaire. Elle peut également réduire les hydroperoxydes lipidiques et d'autres hydroperoxydes solubles après leur libération des lipides membranaires, ainsi que les hydroperoxydes de phospholipide-monoacylglycérol (Figure 25) (Hubert et al., 1996).

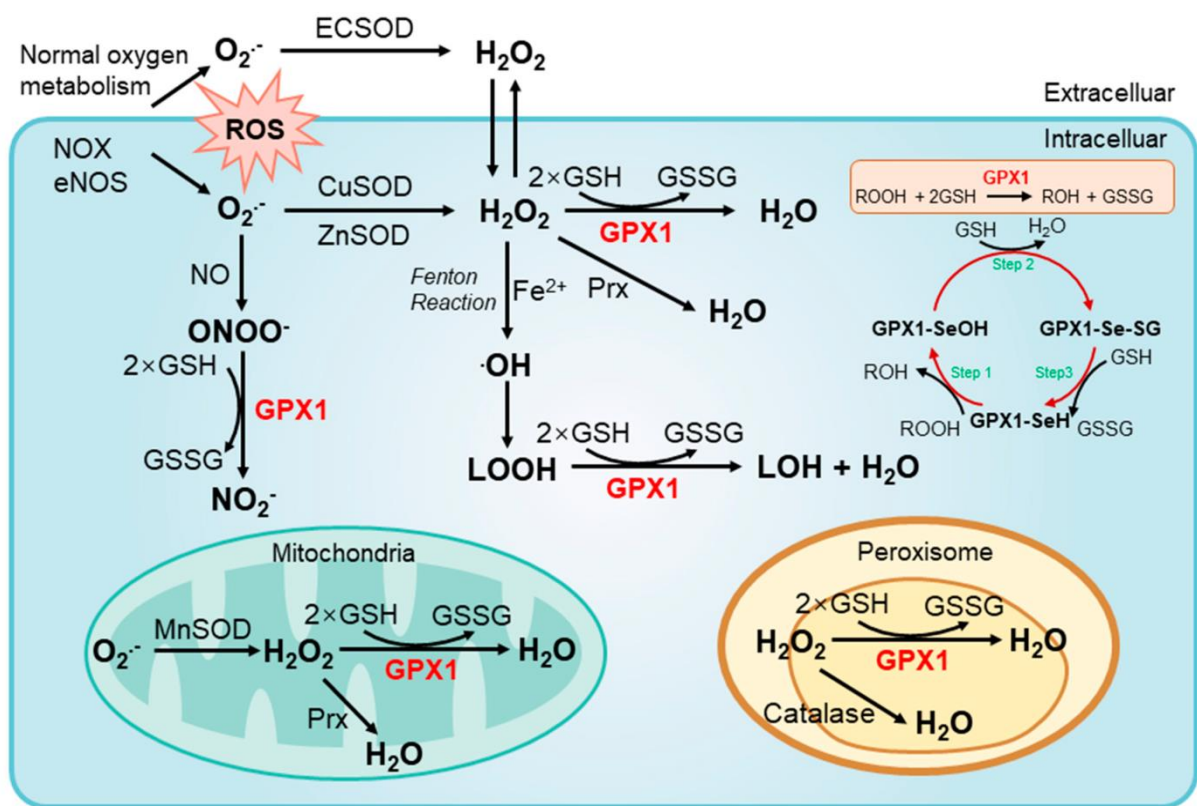


Figure 25: Les mécanismes enzymatiques de GPX1 pour éliminer les superoxydes (Zhao et al., 2022).

C. Polymorphismes du gène GPX1 et la radiorésistance

Les SNPs des gènes de détoxification peuvent modifier l'expression et l'activité du gène comme ils peuvent affecter la réponse du cancer au traitement. Plusieurs études se sont intéressées à l'analyse des SNPs du gène *GPX1*, ce dernier comprend 38 SNPs ; la plupart de ces SNPs se situent dans les régions 5' et 3' (Foster et al., 2006). Parmi les polymorphismes qui modifient la

région codante pour la protéine, il y a deux SNPs majeurs du gène *GPX1* qui sont fréquemment étudiés en raison de leur prévalence et de leurs altérations résultantes dans la séquence d'acides aminés du GPX1. Le premier polymorphisme implique un nombre variable de répétitions trinuécléotidiques GCG au niveau de l'exon 1 du gène *GPX1*. Le deuxième polymorphisme (rs1050450) se trouve dans l'exon 2 et qui entraîne un changement de l'acide aminé proline (Pro) en leucine (Leu) à la position 198 (Pro198Leu) en raison de la substitution de T (CTC) par un C (CCC), près de la région C terminale. Le SNP Pro198Leu diminue l'activité enzymatique de glutathion peroxydase dans les cellules, ce qui peut encore augmenter les dommages oxydatifs (Lee et al., 2006).

En outre, la relation entre le polymorphisme Pro198Leu et le risque de cancer a été évaluée et des résultats divergents ont été obtenus. Certaines études ont indiqué une association significative du polymorphisme Pro198Leu avec le cancer du sein (Ravn-Haren et al., 2006), le cancer du poumon (Lee et al., 2006), le cancer de la vessie (Cao et al., 2014) et NPC (Wang et al., 2017). Mais dans d'autres études, ce polymorphisme n'était pas associé au cancer du sein (Cox et al., 2004) et au cancer de la prostate (Men et al., 2014).

Une expression incontrôlée de la protéine GPX1 dans la tumeur peut éliminer les ROS, affaiblir l'apoptose, et induire la résistance aux différentes modalités de traitements, favorisant ainsi la survie des cellules cancéreuses (Zhao et al., 2022). L'expression du GPX1 est significativement augmentée dans les cellules résistantes isolées de patients atteints de lymphome présentant une chimiorésistance clinique au méthotrexate et à l'étoposide (Schulz et al. 2012).

Un nombre limité d'études ont évalué la relation entre le polymorphisme fonctionnel *GPX1* Pro198Leu et la réponse au traitement, Ce polymorphisme peut jouer un rôle important dans les fonctions cognitives de la thérapie pré-adjuvante et la survie des patients atteints du cancer du sein et pourrait prédire la progression du cancer du larynx. En 2018, Nikic et al. ont signalé que le polymorphisme *GPX1* n'était pas associé à la survie globale des patients atteints d'un cancer de la vessie métastatique traités par chimiothérapie au cisplatine dans la population serbe (Nikic et al., 2018).

Certaines études ont indiqué une association significative de polymorphisme Pro198Leu avec la réponse au traitement, où ils ont remarqué que les patients porteurs de l'allèle leu ont un meilleur pronostic après le traitement du cancer (Zhao et al., 2005).

3. Les MicroARNs et la radiorésistance

3.1. Généralités

Les microARNs ou également nommés miARNs ou miRs, ce sont des ARNs simple brin qui constituent une grande classe de petits ARN régulateurs non-codants, avec une longueur comprise entre 19 et 25 nucléotides. Les miARNs ne codent pour aucune protéine par ce qu'ils ne comprennent généralement ni un codon d'initiation, ni un codon stop. Depuis longtemps, même s'ils constituent une grande partie du génome humain, ces petits ARN étaient considérés comme un sous-produit non fonctionnel de la transcription. Mais actuellement, ils représentent une découverte très importante dans le domaine de la régulation de l'expression des gènes.

A l'aide de plusieurs mécanismes, ces petits ARN peuvent intervenir dans différentes étapes ; depuis la transcription des ARN et leur maturation jusqu'à la traduction des ARNm en protéines. Chez l'être humain, il y a plus de 2600 miARNs qui peuvent cibler potentiellement près de 30 % des ARNm.

En effet, plusieurs recherches sur les miARNs ont confirmé leur importance dans une multitude de fonctions cellulaires, les miARNs jouent des rôles majeurs dans pratiquement toutes les voies biologiques chez les mammifères et autres organismes multicellulaires. Ainsi une mauvaise régulation de leur fonctionnement peut causer plusieurs maladies, y compris le cancer. En plus, les miRNAs influencent de nombreux processus liés au cancer tel que la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la migration et le métabolisme. Ils peuvent également être utilisés comme biomarqueurs potentiels prédictifs de la réponse au traitement, ce qui est d'une grande importance pour la décision de la technique thérapeutique adéquate. Des études ont révélé que les miRNAs sont présents de façon stable dans presque tous les liquides biologiques, y compris le sérum. L'utilisation des miRNAs sériques dans le diagnostic du cancer permet non seulement un diagnostic pratique, mais aussi non invasif.

3.2. Biogenèse des microARN

La synthèse des miARNs s'écoule de la transcription des régions intra-géniques ou intergéniques par l'ARN polymérase II à la production des régulateurs fonctionnels finaux après des étapes successives de maturation (Figure 26) (Wang et al., 2019). Les différents acteurs impliqués dans la biogenèse des miRNAs sont divisés en deux groupes d'enzymes, y compris les processeurs qui sont exclusifs pour la biosynthèse des miARNs ; intégrés par des endonucléases d'ARN qui clivent les précurseurs des miARNs dans le noyau (Drosha) et le

cytoplasme (Dicer) ; et les effecteurs qui sont composés de la famille Argonaute (AGO) et toutes les protéines responsables de l'effet régulateur post-transcriptionnel sur les cibles d'ARNm (complexe RISC) (Costa et al., 2012), ainsi que le système de transport qui est responsable de l'exportation des précurseurs des miARNs du noyau vers le cytoplasme, tel que l'Exportin-5 (Zeng and Cullen, 2004).

Les miARN sont synthétisés presque exclusivement par l'ARN polymérase II sous la forme de longs précurseurs de centaines de nucléotides appelés miR primaires ou pri-miR (Figure 27). Ce dernier est modifié par l'ajout d'une coiffe en 5' et d'une queue poly (A) en 3' (Tan et al., 2015). Le pri-miR se replie et adopte des structures secondaires en tige-boucle, puis il sera clivé, au noyau, par le processeur DROSHA ainsi que de son cofacteur DGCR8. Cette étape de maturation va produire une molécule de 60 à 70 nucléotides appelée un miR précurseur ou pré-miR (Wang et al., 2019).

Les précurseurs ont un rôle crucial dans l'identification de la tige-boucle qui doit poursuivre la voie de maturation des miRs. Pour cela, plusieurs caractéristiques seront prises en compte, tel que la longueur de la tige qui devra être comprise entre 35 et 36 paires de bases et qu'elle soit principalement exempte de mésappariements. Les régions adjacentes à la tige devront être simple brin. En plus, 4 motifs différents sont nécessaires dans cette étape de maturation, y compris un UG à la base de la tige, un GHG contenant un mésappariement central en position 8 de la tige, un UGU apical et finalement un motif CNNC flanquant la tige. Le processeur clivera la tige aux positions des nucléotides 11 et 13 (Yao et al., 2019 ; Gebert and MacRae, 2019).

Une fois les pré-miARN générés, ils sont exportés vers le cytoplasme par un complexe exportin 5 couplé à Ran GTP où il y sera ultimement clivé par DICER. Cette transformation consiste à retirer la boucle terminale, ce qui donne un duplex miARN mature (O'Brien et al., 2018). Après la séparation des brins, le miARN double brin mature, également connu sous le nom de brin guide, est incorporé dans un complexe RISC (RNA-induced silencing complex) à l'aide des protéines chaperons HSP90/HSC70 (Heat Shock Protein 90/Heat Shock Cognate 71 kDa protein)), tout le brin passager (miRNA*) est généralement dégradé. Le RISC est le complexe effecteur de la voie de miRNA et comprend le miRNA, les protéines d'argonaute (Argonaute 1 à Argonaute 4) et d'autres protéines. Le brin mature est important pour la reconnaissance des cibles et pour l'incorporation d'ARNm cibles spécifiques dans le RISC (Costa et al., 2012). Chaque miRNA peut potentiellement cibler de nombreux gènes (environ 500 en moyenne), et

environ 60 % des ARNm ont au moins une séquence conservée évolutivement qui est censée être ciblée par les miRNAs (Wang et al., 2019).

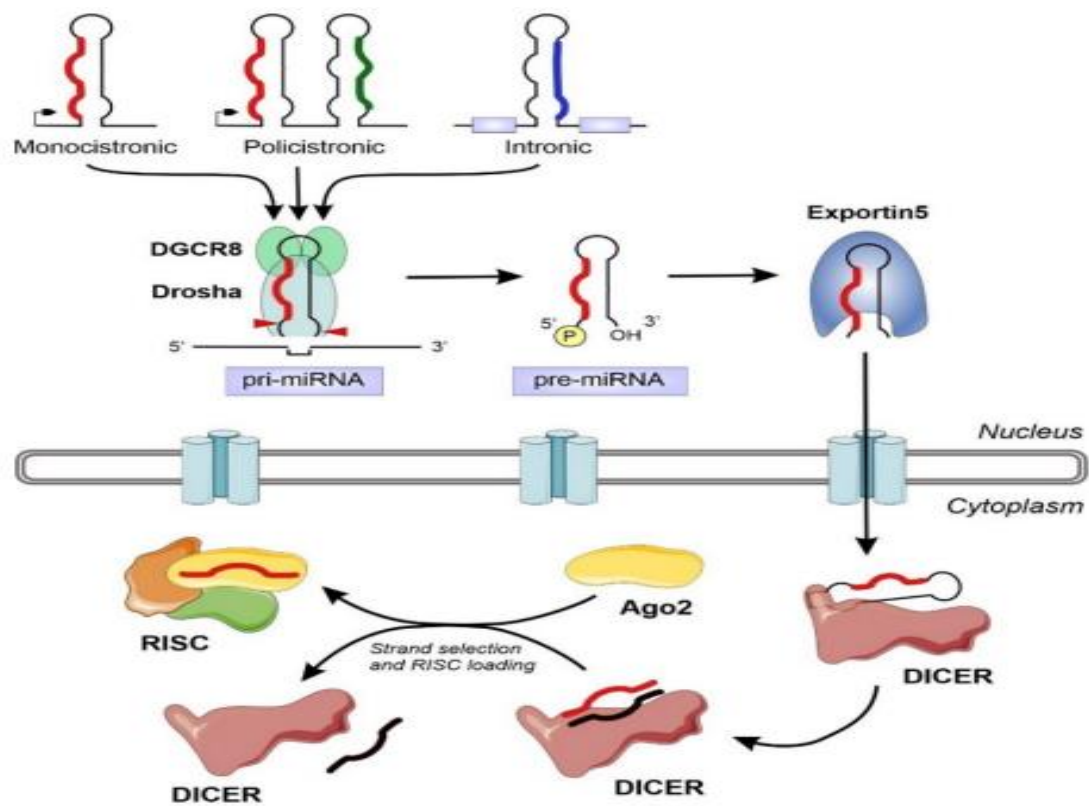


Figure 26: Représentation schématique de la voie de biogenèse de miRNA (Leitão and Enguita, 2022).

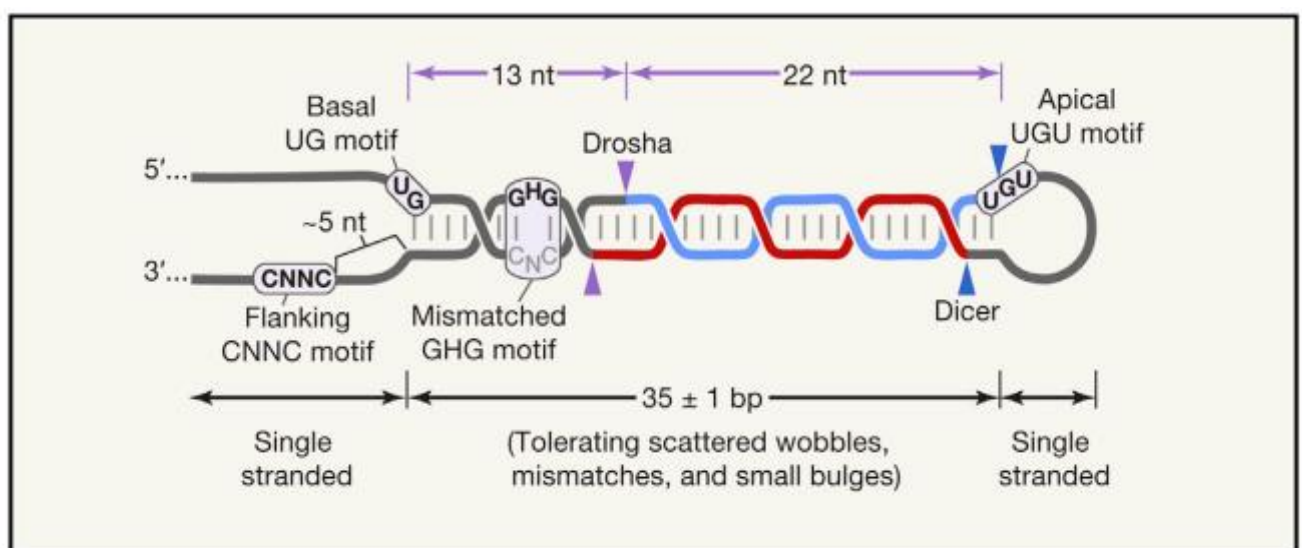


Figure 27: Structure du précurseur pri-miARN.

Une nomenclature a été créée pour répertorier ces miARNs, souvent fondée sur des règles établies par des organismes de référence tels que miRBase, une base de données centrale dédiée aux miARNs (Griffiths et al., 2006). Chaque identifiant comprend l'espèce dans laquelle le microARN a été retrouvé (hsa pour Homo sapiens ou mmu pour la souris p.ex.), suivi des termes miR pour les miARNs mature et mir pour les pré-miARNs, un numéro identifiant le miARN (attribué chronologiquement dans l'ordre de leur découverte), et pour les miARNs matures le bras 3p ou 5p du pre-miARN dont il est issu. Par exemple, hsa-miR-142-5p correspond au brin 5' du pré-miARN humain 142, et hsa-miR-142-3p correspond au miARN mature issu du bras 3p du précurseur hsa-mir-142 (Budak et al., 2016).

3.3. Mode d'action des microARNs

Les microARNs sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires et moléculaires essentielles, y compris le contrôle de l'expression des protéines cellulaires. En plus, elles ont une capacité de contrôler environ 70% des ARNm cibles. Elles peuvent se lier aux régions 3' non traduites (3'UTR) ou 5'UTR (dans des cas rares) des ARNm cibles conduisant ainsi à une régulation négative de la traduction (Figure 28) (Chitikova et al., 2014). Le complexe microARN-ARNm (miARN-ARNm) inhibe la traduction de l'ARNm cible ou altère sa stabilité (Gwizdek et al., 2004).

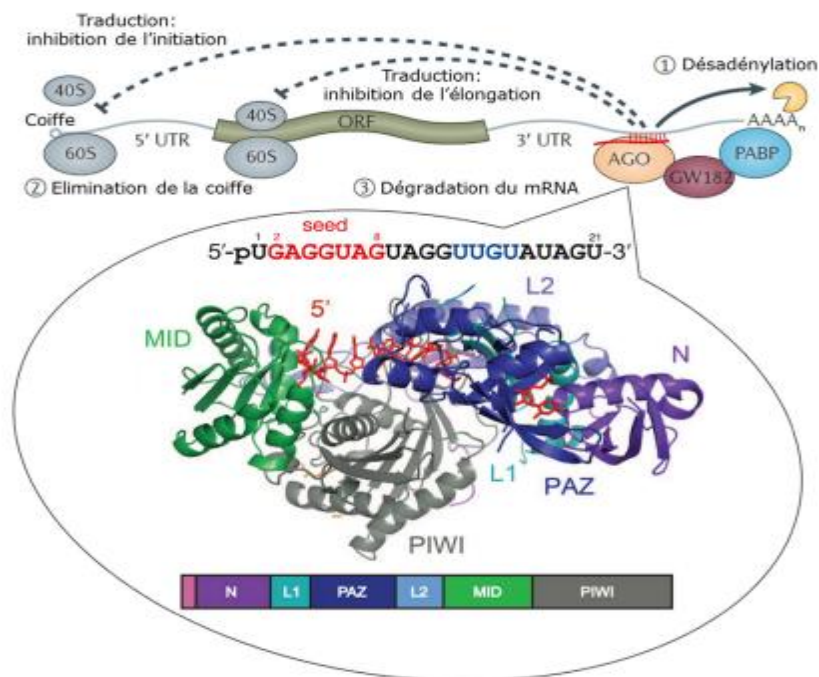


Figure 28: Mécanisme d'action des microARNs (Zendjabil et al., 2017)

3.4. Les microARNs dans le NPC

La voie de synthèse des microARNs peut se déréguler à plusieurs niveaux, ce qui va agir sur la qualité et la quantité (une diminution ou une augmentation) des microARNs dans la cellule. Cette dérégulation peut être d'ordre génétique, épigénétique ou transcriptionnelle (Figure 29).

Les études antérieures ont démontré la relation existante entre les microARN et les processus biologiques du cancer (Hayes et al., 2014). Les microARNs jouent un rôle important dans le processus de tumorigènes, elles peuvent agir comme oncogènes ou suppresseurs de tumeurs, régulateur de la prolifération cellulaire, de la migration, de l'invasion et de la métastase (Jeanteur, 2010). (Tableau 3)

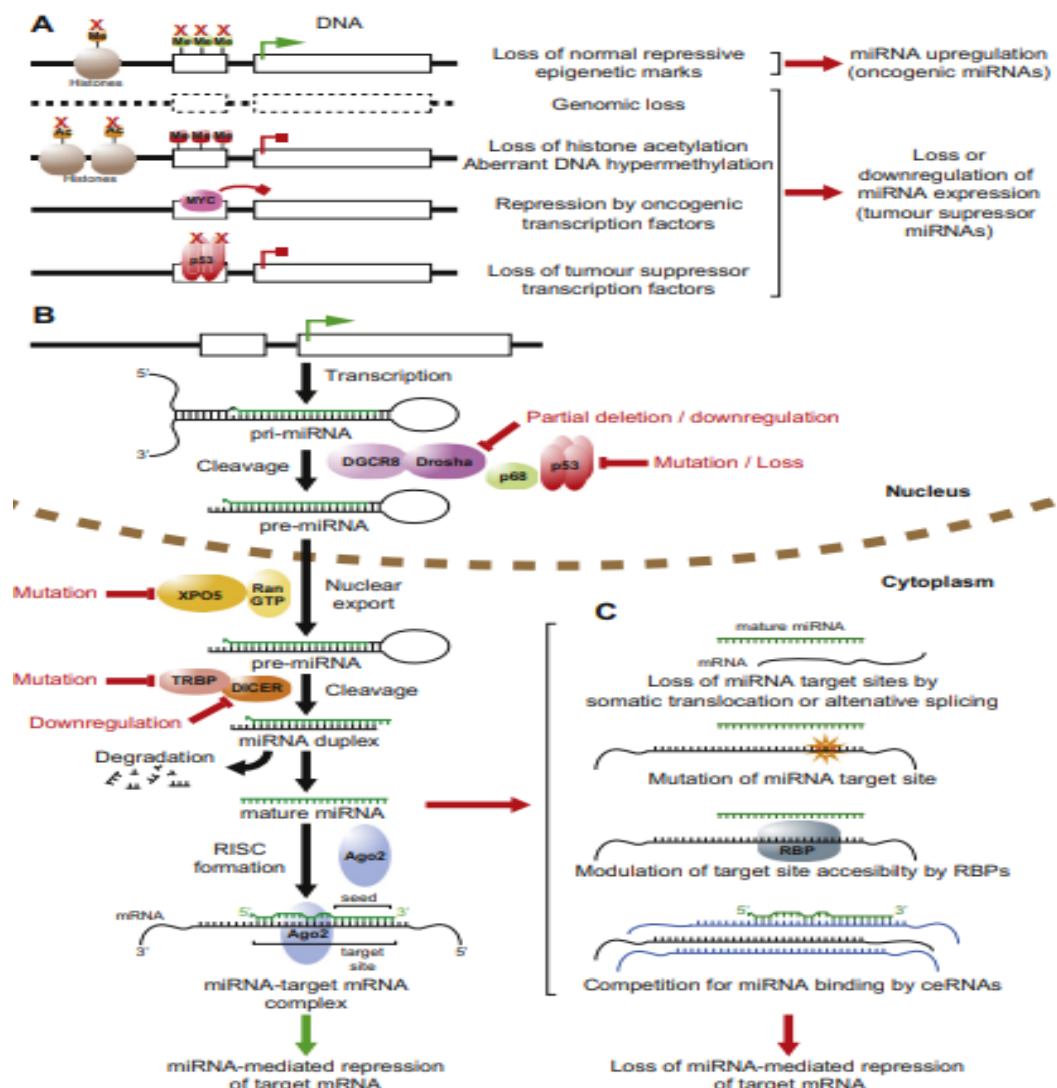


Figure 29: Dérégulation des microARNs dans le cancer (Jansson and Lund, 2012)

A : Dérégulation de la transcription du gène de miRNA dans le cancer par des mécanismes génétiques, épigénétiques et transcriptionnels. Flèche verte : transcription active / flèche rouge : transcription bloquée / croix rouges : perte de gène, de mécanisme épigénétique ou de facteur de transcription / Me : méthylation/ Ac : acétylation.
 B:La biogenèse / les étapes couramment dérégulées dans le cancer indiquées en rouge.
 C:Mécanismes qui permet aux ARNm d'échapper à la régulation par les miRNAs dans le cancer.
 RBP : RNA binding protein / ceRNAs représenté en bleu.

Tableau 3. Liste des miARNs agissant en tant qu'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans le NPC (Lao and Le., 2020)

MicroARN/ gènes suppresseurs de tumeurs	MicroARN/ oncogènes
hsa-miR-9	hsa-miR-10a
hsa-miR-16	hsa-miR-10b
hsa-miR-26	hsa-miR-17
hsa-miR-29c	hsa-miR-18a
hsa-miR-30a	hsa-miR-20a
hsa-miR-34b	hsa-miR-21
hsa-miR-449a	hsa-miR-30a
hsa-miR-34c	hsa-miR-93
hsa-miR-98	hsa-miR-141
hsa-miR-101	hsa-miR-144
hsa-miR-124	hsa-miR-149
hsa-miR-138	hsa-miR-155
hsa-miR-142	hsa-miR-205
hsa-miR-200b	hsa-miR-214
hsa-miR-204	hsa-miR-378

Les miRNAs peuvent servir comme biomarqueurs potentiels pour divers types de cancers, y compris le NPC. Jusqu'à présent, plusieurs signatures de miRNAs peuvent servir pour le diagnostic et le pronostic du NPC (Figure 30) (Zou et al., 2020).

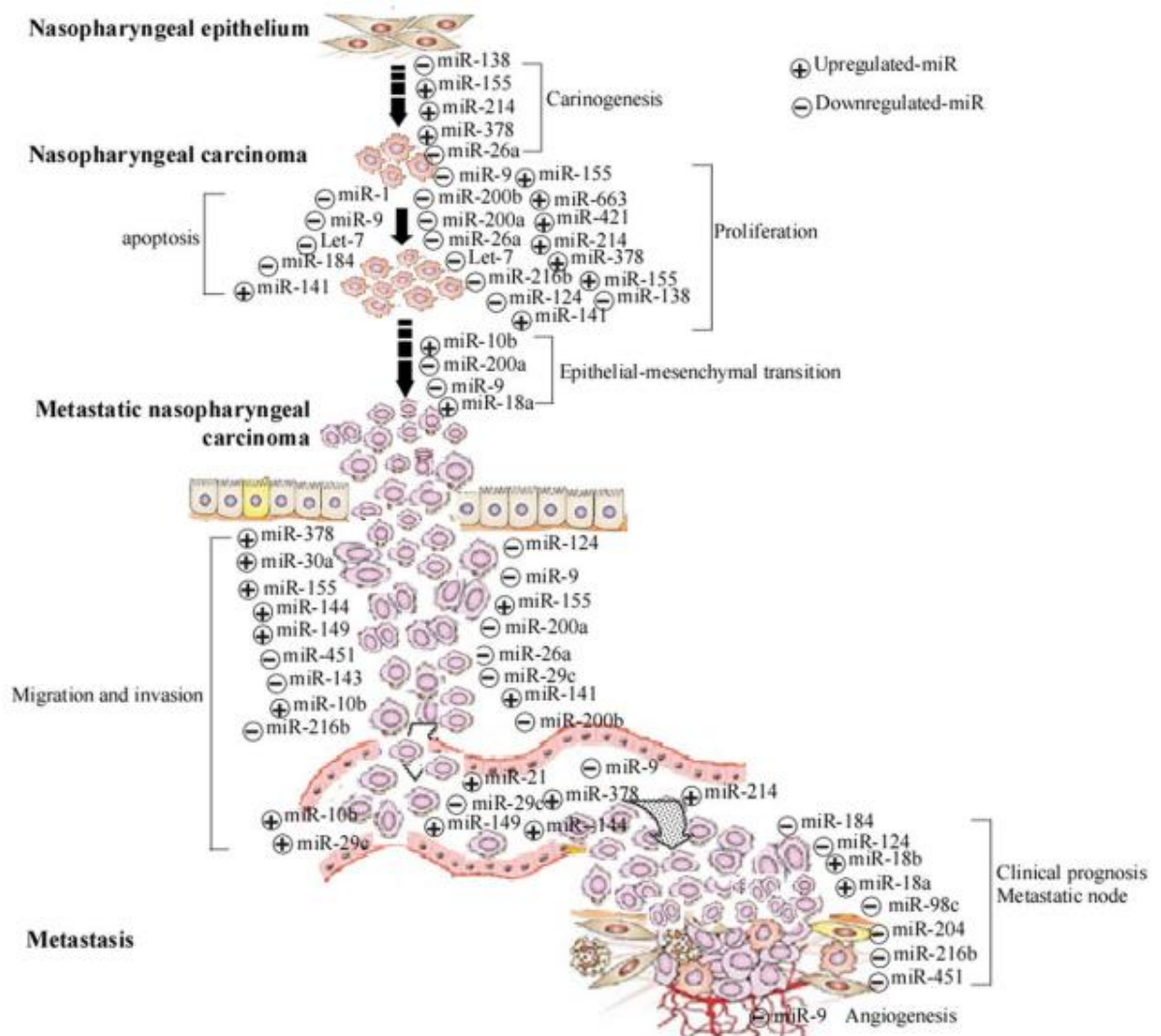


Figure 30: Les microARNs impliqués dans le NPC (Tan et al., 2015).

Les miARNs sont impliqués dans la carcinogenèse de l'épithélium du nasopharynx, l'apoptose des cellules NPC, la prolifération, la transition épithéliale-mésenchymateuse, la migration et l'invasion. Certains miARNs sont associés au pronostic clinique.

3.5 Les microARNs et la radiorésistance

Les microARNs ont été documentés comme étant impliqués dans le processus de résistance au traitement dans différents types de cancers, tels que le cancer du poumon, cancer du sein et le NPC (Figure 31). Ils agissent sur la radiosensibilité des cellules tumorales en ciblant certains gènes ou voies de signalisation (Spence et al., 2016). (Tableau 4)

Tableau 4 : MicroARNs impliqués dans la radiorésistance du NPC

miRNA	Expression	Cibles	Fonction
miR-19b-3p	Augmentation	Bcl-2, Bax, Capase3, c-Capase3, TNFAIP3(A20)/ NF-κB	Apoptose cellulaire ↓
miR-125b	Augmentation	p-p65, γ-H2AX TNFAIP3 (A20)/ NF-κB	Apoptose cellulaire ↓
miR-21	Augmentation	Bcl-2, Bax, PTEN/AKT	Survie cellulaire ↑, Apoptose cellulaire ↓
miR-205	Augmentation	Bcl-2, Bax, snail, PTEN/AKT	Survie cellulaire ↑, Apoptose cellulaire ↓
EBV-miR-BART8-3p, BART5-5p, BART7-3p, BART9-3p, BART14- 3p	Augmentation	γ-H2AX, ATM	DDR↑, Apoptose cellulaire ↓
miR-23a	Diminution	γH2AX, IL-8 / Stat3	DDR↓, Cycle cellulaire ↓, Apoptose cellulaire ↑
miR-203	Diminution	γH2AX, IL-8 / Stat3	DDR↓, Cycle cellulaire ↓, Apoptose cellulaire ↑
miR-20a-5p	Augmentation	γH2AX, Rab27B, NPAS2	Survie cellulaire ↑, Apoptose cellulaire ↓
miR-193a-3p	Augmentation	SRSF2	Cycle cellulaire ↓
miR-24	Diminution	SP1	DDR↓
miR-26a	Diminution	CDK4, CDK6, EZH2	Cycle cellulaire ↓
miR-135a	Diminution	IL-17	inflammation↓, Apoptose cellulaire ↑
miR-143	Diminution	capase3, PARP, γH2AX	DDR↓

Parmi les microARNs qui régulent la radiosensibilité et peuvent être un biomarqueur potentiel pour prédire la radiorésistance chez les patients avec NPC, il y a le miRNA-324-3p ; qui est significativement sous exprimé dans les cellules radiorésistances CNE-2 par rapport aux cellules parentales en agissant sur la voie de signalisation WNT2B (Li et al., 2013).

Contrairement au miR-185-3p peut augmenter la radiorésistance des cellules NPC et affecter le processus EMT en ciblant la région codante du Wnt2B et activant la voie de signalisation WNT2B/β-caténine (Li et al., 2014). La surexpression du miR-19b-3p entraîne une diminution de la sensibilité à l'irradiation en activant la voie de signalisation TNFAIP3/NF-Kb (Huang et al., 2016). Les miR-125b, miR-205, miR-222, miR-20a-5p, miR-206 et miR-504 sont aussi des microRNAs conférant à la radiorésistance (Zhan and Fan, 2020).

Qu et al ont trouvé que le miR 203 supprime la viabilité et sensibilise les cellules NPC à l'irradiation. Cette étude permet de suggérer que le miR 24 régule la sensibilité des cellules tumorales en ciblant la protéine de spécificité 1 (SP1) et en régulant directement Jab1/CSN5, ils ont remarqué également que les niveaux de miR-24 sont significativement réduits en cas de récurrence (Qu et al., 2015). Parmi les microRNAs qui contribuent à la radiosensibilité des cellules tumorales chez les patients avec NPC, il y a miR-23a, miR-24 et miR-495 (Jia-Quan et al., 2015).

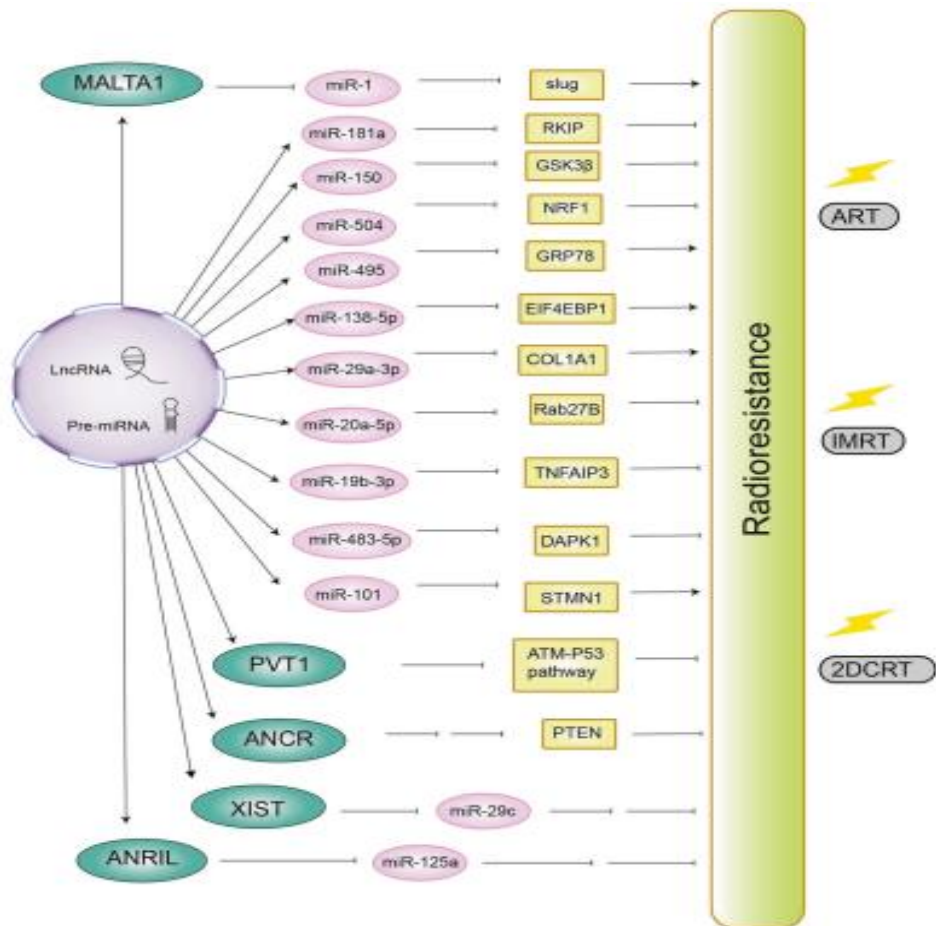


Figure 31: L'effet des microARNs sur la radiorésistance dans le NPC.

Matériel et Méthodes

I. Considérations éthiques

Le protocole de l'étude a été soumis au Comité d'Ethique de l'Hôpital Ibn Rochd de Casablanca. Tous les patients inclus dans l'étude ont été informés d'une manière claire de l'objectif du travail et ils ont reçu un résumé de l'étude (orale ou écrite). La participation à cette étude a eu lieu après signature du consentement éclairé. Aussi, chaque participant a été libre de quitter l'étude à n'importe quel moment.

Toutes les informations collectées dans le cadre du présent projet ont été rendues anonymes et non identifiables pour l'utilisateur. Les informations transmises n'ont notamment pas permis l'identification directe du patient, conformément aux exigences de la loi informatique et des libertés du 6 janvier 1978 modifiée par la loi du 6 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel.

Pour la réalisation des travaux de recherche, les équipes ayant pris part au projet se sont engagées à adopter une démarche d'assurance qualité-traçabilité, en totale conformité avec la législation nationale et internationale en vigueur en matière de santé publique et de protection des données personnelles, notamment, sans que cela soit limitatif :

- La déclaration d'Helsinki adoptée par l'association médicale mondiale en juin 1964, en l'état de ses derniers amendements réalisés par l'assemblée générale de l'association médicale mondiale
- L'ensemble des règles, normes, « Bonnes Pratiques Cliniques » et/ou toutes autres normes équivalentes communément admises (telles que, notamment, les normes ISO 15189, 14155 et 13612), ainsi que toute recommandation émise par les autorités de Santé, applicables à l'activité des différentes équipes et de leurs laboratoires
- L'ensemble des normes, règlements, directives (telles que transposées localement, sous réserve d'un niveau d'exigences similaire à celui de la directive initiale) relatives à la protection des données personnelles, applicables en l'espèce compte tenu de la nature des travaux confiés aux équipes de chercheurs dans le cadre du Document de Mission, en ce incluse, la réglementation dite « Informatique et Libertés ».

Les équipes se sont engagées par ailleurs à conserver en archive toute la documentation, relative à l'information et/ou à la non opposition des patients, afin de pouvoir en donner la preuve le cas échéant.

En ce qui concerne l'utilisation des échantillons, les équipes se sont engagées par ailleurs à utiliser les échantillons dans le cadre des activités de recherche décrites dans le présent projet : (i) soient utilisés aux seules fins décrites dans le présent projet ; (ii) ne soient pas cédés à une tierce partie dans quelque but que ce soit. Aussi, à compter de la réception des échantillons, les laboratoires de recherche reconnaissent être seuls responsables de leur conservation, utilisation et, le cas échéant, destruction, dans le respect de la réglementation applicable.

II. Population de l'étude

Cette étude a été réalisée sur les prélèvements sanguins provenant de 142 patients atteints du NPC (confirmés histologiquement), ils ont été recrutés au niveau du Centre Mohammed IV pour le Traitement du Cancer de Casablanca, de janvier 2016 à décembre 2018. Les patients provenaient principalement du Grand Casablanca.

III. Conception de l'étude

Lors du recrutement, tous les patients ont subi un examen préalable au traitement. Une imagerie par résonance magnétique (IRM) du cou et du nasopharynx. Ainsi qu'une tomographie par émission de positrons – tomodensitométrie (TEP-TDM) ont été réalisées chez les patients avant le début du traitement. Tous les patients ont été classés selon la septième édition du système de l'Union Internationale Contre le Cancer / Comité Conjoint Américain sur le Cancer en utilisant les résultats de l'IRM et du TEP/TDM.

Une entrevue a été menée avec tous les participants afin de recueillir des informations socio-économiques telles que : l'âge, le sexe, les antécédents familiaux de cancer, les habitudes tabagiques, la consommation d'alcool et l'environnement de l'enfance. Les informations cliniques, y compris le type histologique et le stade clinique, ont été extraites des dossiers médicaux des patients. Les patients inclus dans cette étude ont été traités par radiothérapie, conformément aux directives de pratique hospitalière. Des prélèvements de sang périphérique ont été effectués chez les patients avant et après le traitement.

IV. Approche méthodologique :

A. Etude de l'association entre les SNPs et la radiorésistance

1) Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait des noyaux de leucocytes en utilisant la méthode d'extraction d'ADN classique (phénol chloroforme). La concentration de l'ADN extrait a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Nanodrop, Thermofisher, États-Unis). Ensuite, la qualité de

l'ADN a été vérifiée par PCR d'un fragment du gène de la β -globine en utilisant les amorces PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3') et GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'), générant un produit d'amplification de 265 pb.

Cette étape est commune à tous les articles correspondant à l'étude de l'association des polymorphismes avec la radiorésistance chez les patients atteints du NPC.

2) Etude des SNPs

Le génotypage des SNPs des différents gènes a été évalué par PCR conventionnelle à l'aide d'amorces spécifiques à chaque SNP suivi d'un séquençage par la technique de Sanger. Le protocole expérimental est bien détaillé dans les articles correspondants (Article 2, Article 3 et Article 4). Le statut de radio-résistance/radio-sensibilité était attribué en fonction de l'évolution clinique des patients traités par radiothérapie. En effet, les patients guéris après la période de suivi de six mois étaient considérés comme radiosensibles. En revanche, le statut de radiorésistance était attribué aux patients ayant rechuté ou développé une récurrence au cours des six premiers mois suivant le traitement par radiothérapie.

3) Analyse statistique

L'étude de l'association entre les SNPs et les stades cliniques/la réponse à la radiothérapie a été évaluée par le test du χ^2 en utilisant le logiciel SPSS version 23 (les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives).

B. La mesure de la charge virale

Un volume de 200 μ l de plasma des patients recrutés a été utilisé pour extraire l'ADN à l'aide du kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, France). Les niveaux circulants d'ADN d'EBV ont été mesurés par réaction de polymérase quantitative en temps réel (q-PCR) et exprimés en Unités Internationales par millilitre (UI/ml). La réaction de q-PCR a été réalisée en utilisant le kit RealStar® EBV PCR 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Allemagne) sur le système de détection de séquence ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Le protocole expérimental est bien détaillé dans les articles 5 et 6.

Résultats

Chapitre I : Cancer du nasopharynx

I. Les avancées récentes dans la prise en charge du NPC : De la phase diagnostique à la théranostique (revue)

Le cancer du nasopharynx (NPC) est une tumeur maligne d'origine épithéliale, il constitue une entité spéciale parmi les autres cancers de la sphère ORL par son profil épidémiologique et ses particularités thérapeutiques et évolutives. En raison de sa profonde localisation et son caractère asymptomatique aux stades précoces, les patients atteints du NPC sont diagnostiqués à des stades avancés, ce qui est associé à un mauvais pronostic, qui est surtout dominé par le risque de survenue de métastase à distance contrairement aux autres cancers ORL.

Du fait de sa radiosensibilité et de l'impossibilité d'obtenir une résection carcinologique satisfaisante des tumeurs proches de la base du crâne, le traitement local standard du NPC repose sur la radiothérapie, qui permet un meilleur contrôle locorégional de la maladie.

Malgré une radiosensibilité importante, la radiorésistance entrave le succès du traitement et peut provoquer une récurrence locale et des métastases distantes chez les patients atteints de NPC.

Dans cette revue, nous avons discuté les nouvelles méthodologies de diagnostic et de traitement utilisées dans la prise en charge du NPC, en se basant sur la littérature récente. De plus, nous avons expliqué les mécanismes moléculaires de la radiorésistance des cellules tumorales, en soulignant l'effet de certains polymorphismes des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et de détoxification des xénobiotiques sur la réponse tumorale à la radiothérapie ainsi que leurs rôles de biomarqueurs moléculaires prédictifs de la radiorésistance.

Également, nous avons souligné l'impact de la dérégulation de l'expression de certains microARNs cellulaires et viraux sur la cancérogenèse et la sensibilité des cellules tumorales à la radiothérapie. Ces biomarqueurs moléculaires pourraient prédire la réponse tumorale à la radiothérapie et identifier les patients ayant un grand risque de radiorésistance. Afin d'élaborer un profil moléculaire de la tumeur, orienter le clinicien dans la décision thérapeutique et par conséquent assurer une prise en charge plus efficace du NPC.

REVIEW ARTICLE

Recent Advances in Nasopharyngeal Cancer Management: From Diagnosis to Theranostics

Rajaa Benzeid^{1,2}, Amina Ghibid³, Nadia Bencheikroun⁴, Nezha Tawfiq⁴, Abdellatif Benider⁴, Mohammed Attaleb¹, Abdelkarim Filali Maltouf², Mohammed EL Mzibri¹, Meriem Khyatti³ and Imane Chaoui^{1,*}

¹Department of Life Sciences, National Centre for Nuclear Energy, Science and Technology, Rabat, Morocco;

²Department of Molecular Biology, Mohammed V University, Rabat, Morocco; ³Department of Virology, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco; ⁴Department of Radiotherapy, Mohammed VI Center for Treatment of Cancer, Ibn Rochd Hospital Center, Casablanca, Morocco

ARTICLE HISTORY

Received: August 31, 2022

Revised: November 04, 2022

Accepted: November 23, 2022

DOI:

10.2174/1875692120666230213111629

Abstract: Nasopharyngeal cancer (NPC) is one of the most common head and neck cancers. NPC differs significantly from other cancers in its etiology, epidemiology, clinical behavior, and treatment. Being highly radiosensitive, the standard treatment for NPC is radiotherapy. However, radioresistance hampers the success of treatment and may cause local recurrence and distant metastases in NPC patients. In this review, we discuss the updated protocols for NPC diagnosis and treatment based on recent literature with an emphasis on the mechanisms of radioresistance at the molecular level with a special focus on genetic and epigenetic events, affecting genes involved in xenobiotic detoxification and DNA repair. We also highlight the importance of some cellular and Epstein Barr viral miRNAs targeting specific DNA repair factors and consequently promoting NPC radioresistance. These molecular markers may serve as promising tools for diagnosis, prognosis, and radioresistance prediction to guide theranostics of patients with NPC in the future.

Keywords: Nasopharyngeal, cancer, radioresistance, detoxification, DNA reparation, theranostics.

1. INTRODUCTION

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant epithelial neoplasm arising from the nasopharyngeal mucosal lining and is often observed at the fossa of Rosenmuller in the nasopharynx [1, 2]. NPC differs from other head and neck cancers because of its specific multifactorial etiology, geographical distribution, and high sensitivity to induction chemotherapy (IC) and radiotherapy (RT) [3, 4]. Worldwide, epidemiological studies have shown a distinct geographic distribution of NPC. Overall, the annual NPC incidence is under 1/100 000 inhabitants, and 129 000 new cases were registered worldwide in 2018. According to the International Agency for Research on Cancer (IARC),

a high incidence (25-80 per 100 000) of NPC is reported in Southeast Asia, especially in South China, Taiwan, Vietnam, and the Philippines. Intermediate (3-8 per 100 000) incidence is reported across many parts of the world, including North Africa, Saudi Arabia, the Caribbean, and the Eskimo population from Alaska and Greenland [5, 6]. This remarkable geographical distribution of NPC prompted multiple studies that investigated risk factors associated with NPC. The major risk factor for NPC development is Epstein-Barr virus (EBV) infection. However, other risk factors that significantly contribute to the development of NPC, including diet, environmental factors, and genetic susceptibilities, have also been reported [4, 7].

Currently, the pathology of NPC is well-studied and characterized. World Health Organization has classified NPC into several subtypes: keratinizing squamous, non-keratinizing, and basaloid squamous. Moreover, the non-keratinizing nasopharyngeal subtype can be further classified into differentiated and

*Address correspondence to this author at the Department of Life Sciences, National Centre for Nuclear Energy, Science and Technology, Rabat, Morocco; Tél: +212.537.71.27.51/Fax: +212 (0) 37 71 18 46; E-mail: im_chaoui@yahoo.fr

undifferentiated tumors [7]. The keratinizing subtype is present in endemic areas like Southern China and accounts for less than 20% of cases worldwide, whereas the non-keratinizing subtype is prevalent worldwide and represents more than 95% of NPC cases in high-incidence areas [8]. Based on the most recent literature, the current review focuses on updated protocols for NPC diagnosis and treatment as well as the mechanisms of radioresistance at the molecular level.

2. NASOPHARYNGEAL CARCINOMA AND ALTERED CELL SIGNALING PATHWAYS

Evidence has shown that the unique lymphoepithelial-like histology of NPC implies the contribution of distinct signaling pathways that get dysregulated during NPC carcinogenesis. The key inflammatory signaling pathways, NF- κ B and JAK-STAT, are constitutively activated in NPC. Nuclear accumulation of abundant NF- κ B and STAT3 signaling molecules was consistently observed in EBV-positive NPC cell lines, in patient-derived xenografts, and in early-stage NPC.

Notably, NF- κ B signaling is tightly regulated by inhibitory proteins, such as I κ B α and A20 (encoded by the TNFAIP3, a tumor suppressor gene) in normal nasopharyngeal epithelial cells. In NPC, these proteins can be mutated, resulting in the loss of NF- κ B signaling control [9]. Moreover, the EBV-encoded Q-promoter Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1 (Qp-EBNA1) can be upregulated by NF- κ B, while EBNA1 protein expression has been shown to downregulate NF- κ B activation by inhibiting IKK α / β phosphorylation (Fig. 1) [10]. Additionally, the PI-3K/MAPK and Hedgehog signaling pathways are also predominantly modified in NPC. However, the role of Hedgehog and other signaling pathways implicated in driving the induction of stem cell properties in NPC remains uninvestigated [8].

3. DIAGNOSIS AND TREATMENT OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

3.1. Diagnosis and Staging of NPC using TNM Classification

Owing to its deep anatomic location, the diagnosis of NPC is mainly based on clinical investigations initiated by symptoms and signs. NPC diagnosis is often made at advanced clinical stages: stages III and/or IV [11]. NPC confirmation relies on endoscopic examination and histological analysis, representing the most important techniques used worldwide [12]. An accurate staging system is very crucial to stratify NPC patients for treatment. Currently, NPC stratification is based on the tumor-node-metastasis (TNM) staging system elaborated by the International Union against Cancer/American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC). This anatomy-based staging system is

being continuously updated, and in the latest edition (the 8th edition, 2016), the stage groups, primary and nodal diseases' classification were further fine-tuned [13]. Moreover, the TNM staging system is not only used in NPC diagnosis but also to evaluate therapeutic effects and predict prognosis. Interestingly, the 8th version of the TNM system allowed a better understanding of tumor biology and a more accurate prediction of the prognosis of NPC patients than the 7th edition in the IMRT era [14]. However, this system has several limitations and was reported to be insufficient for NPC prognosis [15].

Accordingly, an endeavor was made to evaluate other clinical factors and molecular biomarkers in NPC prognosis for better management of NPC. One recent study proposed a nomogram combining clinicopathological variables and pre-treatment plasma EBV DNA load, which led to a more accurate prognostic prediction of NPC. Moreover, other biomarkers such as DNA methylation and some microRNAs (miRNAs) expression have shown high prognostic values and relevance in the potential clinical management of this malignancy [16].

3.2. Molecular Imaging and NPC Diagnosis

During the last decade, molecular imaging had witnessed a great evolution at both conceptual and methodological levels using new molecular approaches and developed technologies. In NPC, modern imaging plays an important role in cancer management for cancer staging, target delineation, and guiding treatment delivery. Magnetic resonance imaging (MRI), computerized tomography (CT), and positron emission tomography (PET) with 2-deoxy-2-fluorine-18-fluoro-D-glucose (18FDG-PET) combined with CT are the most common imaging techniques employed in NPC diagnosis [17, 18]. Currently, MRI and 18FDG-PET/CT are regarded as the mainstay techniques and are performed as a routine procedure for diagnosing, staging, recurrence, and follow-up of NPC patients [19, 20]. PET-computed tomography (PET/CT) using fluorine-18 fudeoxyglucose (18F-FDG) is a widely used tool for the diagnosis and management of nasopharyngeal carcinoma (NPC) as it allows NPC staging assessment as well as prediction of clinical outcomes. This tool provides high spatial resolution and semi-quantitative parameters [21, 22]. PET/CT is highly recommended to be incorporated into the standard clinical assessment of patients with NPC. It has been proven to be highly valuable for the imaging and management of patients with NPC with strengths in N and M staging as well as treatment guidance. MRI is recognized as the preferred imaging modality in the assessment and staging of NPC, because of its superior soft tissue contrast, ability to detect perineural tumour spread, parapharyngeal space, bone marrow involve-

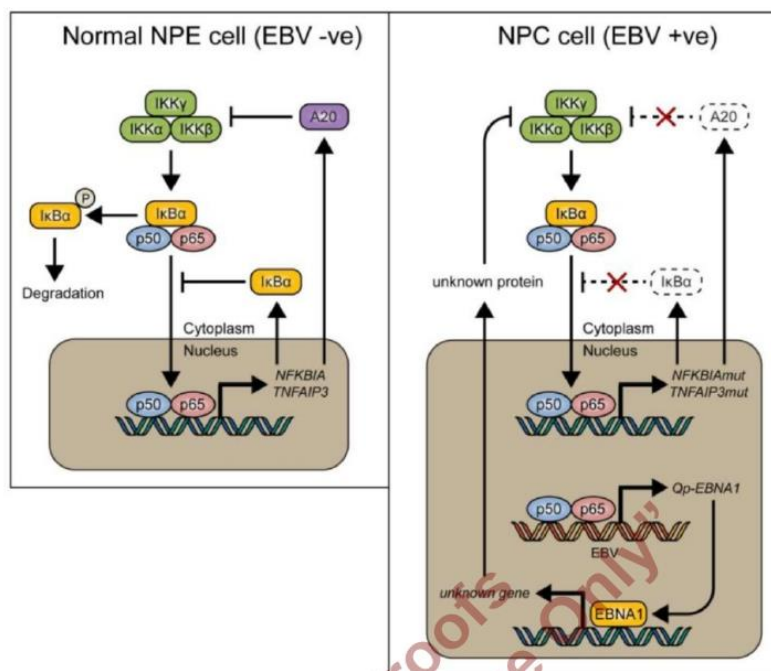


Fig. (1). Regulation of NF-κB signaling pathway in normal nasopharyngeal epithelial cells (left), nasopharyngeal carcinoma (right) [10]. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

ment, and its ability to show the involvement of adjacent structures [23]. Also, It has been reported that PET/MRI has similar or even higher diagnostic accuracy than PET/CT in patients with NPC [24]. However Novel quantitative techniques such as the use of radiomics may provide valuable prognostic information [22].

3.3. NPC Treatment

All NPC treatments have faced the challenge of dealing with a tumor arising in a deep localization and often going undetected until the development of lymph node metastasis. Early attempts at surgery were ineffective [5]. RT with or without chemotherapy is the primary treatment modality for NPC, and RT is still the main and most effective treatment of NPC [25]. However, concurrent chemoradiotherapy (CRT) is widely recommended as the standard of care for NPC treatment and has shown compellingly attractive outcomes in NPC patients [26]. A treatment algorithm for local and locoregional NPC was proposed by Bossi *et al.* based on Clinical Practice Guidelines produced by the European Society for Medical Oncology (ESMO) in partnership with EURACAN, the European Reference Network for rare adult solid cancers [27]. Stage I disease is treated by RT alone, whereas patients with stage II benefit from CRT. Stage III and IVA diseases

are also treated by CRT. Distant metastasis is the major cause of treatment failure and death. Therefore, intensification of the systemic treatment is required for stage III-IVA non-keratinising NPC. Adjuvant Chemotherapy (AC) is generally difficult to complete, with only 60% of patients completing the planned treatment cycles and half of the patients requiring a dose reduction. Likewise, the Clinical Practice Guidelines in Oncology recommend RT alone for patients with early-stage NPC. For patients with locoregionally advanced NPC, the panel advised the concurrent CRT with additional chemotherapy (either before or after CRT). For the 2018 update, the panel recommended the inclusion of pembrolizumab for patients with previously treated, PD-L1-positive recurrent or metastatic NPC [28].

3.3.1. Radiotherapy

It is commonly accepted that NPC is highly sensitive to ionizing radiation. RT plays a pivotal role in the management of head and neck cancers. The photon-based RT techniques have undergone profound evolutionary improvement over the past decades. Hence, the conventional two-dimensional RT used initially for NPC treatment was replaced by three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT) and, more recently, by intensity-modulated radiotherapy (IMRT). The recent advancements in disease control and survival of NPC patients can be partly attributable to IMRT. Re-

sultantly, the survival rate and locoregional control of the patients have shown improvement, and the associated toxicity (drug or therapy-induced) has decreased due to efficient control of dosimetric properties [29, 30].

Currently, IMRT is the most popular technique for NPC treatment and has contributed to an absolute improvement in 5-year locoregional control of 7.7% compared with conventional 2D-RT [31]. In a meta-analysis conducted on 3570 NPC patients, the use of IMRT was observed to significantly reduce the toxicity effects and improve the 5-year locoregional control (odds ratio 1.94; 95% CI: 1.53-2.46) and overall survival (1.51; 95% CI: 1.23-1.87) as compared to 2D- or 3D-RT [32]. Along with IMRT, proton, or carbon ion radiotherapy (CIT) has improved the therapeutic ratio for NPC patients. This approach destroys tumor cells more effectively with a minimal exit dose resulting in the sparing/preserving of more normal tissues adjacent to cancer cells [33].

Intensity-modulated proton therapy (IMPT) is a technique similar to IMRT, but the sophisticated mode of proton therapy enables to target superficially located head and neck cancers as well as large neck volumes while significantly reducing integral doses; conferring thereby dosimetric advantages in NPC compared with IMRT, with less radiation to adjacent organs such as the larynx, salivary glands, and esophagus [34]. Moreover, scientific evidence has revealed that the toxicity of IMPT is lower compared to IMRT [35]. Lewis *et al.* (2016) compared NPC treatment with IMPT and IMRT and indicated that the radiation dose to normal structures was reduced, 2-years locoregional control was 100%, and 2-years (overall survival (OS)) was 88.9%. In this study, the dosimetric advantages conferred by IMPT were more prominent compared to IMRT in considered tests IMRT [35]. Head and neck carcinoma RT is particularly challenging due to the complexity of the shape of the anatomical structures, which also changes during the 7 weeks of treatment. Therefore, the development of a new image and dose-guided adaptive RT (ART) strategy is crucial. Indeed, there is accumulating evidence that adaptive radiotherapy can reduce toxicity and improve tumor control. Interestingly, adaptive radiotherapy may be divided into two categories: anatomy-adapted (A-ART) and response-adapted ART (R-ART). Anatomy-adapted ART aims to re-plan patients taking into account structural and spatial changes occurring over treatment. In contrast, response-adapted ART relies on re-planning patients based on response to treatment. Of note, R-ART has been extensively investigated (prospective studies), as it may improve the therapeutic ratio in a disease site whose normal tissue structures are intrinsically entangled with the targets for irradiation [36].

3.3.2. Chemotherapy

Believably, NPC is radiosensitive and is also sensitive to various chemotherapeutic agents. The chemotherapy combined with standard RT treatment benefits non-metastatic NPC patients (stages III/IV) as it decreases the risk of distant recurrence by eradication of micro-metastasis. Moreover, chemo-agents (radio-sensitizers) act in synergy with radiation; and local disease control is improved through a reduction of tumor volume before irradiation [37]. Even RT is considered the main curative treatment for early-stage NPC; concomitant chemotherapy is widely used for the locoregionally advanced stage. In fact, 70% of NPC cases with locally-advanced disease or regional lymph node metastasis are asymptomatic at an early stage and are prone to lymph node metastasis, and therefore definitive concurrent CRT is recommended as the standard of care [26]. Presently, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recommends the combination of CRT with AC or CI, followed by CRT as level 2A evidence; concurrent CRT as level 2B evidence is limited to NPC stages II-IVA [38]. Unfortunately, the main problem faced by clinicians is the very poor tolerance to chemotherapy after RT. Although the combination of CRT and AC has considerable toxicity, poor tolerance, and limited benefit, it is still recommended by NCCN guidelines for loco-regionally advanced NPC [39].

3.3.3. Immunotherapy

Nasopharyngeal carcinoma exhibits restricted EBV antigens expression, which are potential therapeutic targets for immune modulation. Interestingly, early-phase clinical studies have proven the efficacy and safety of three anti-PD-1 immune checkpoint inhibitors in recurrent or metastatic NPC [40, 41].

3.4. Conventional Markers for NPC Diagnosis

Plenty of conventional markers are widely used to diagnose NPC (i) EBV proteins as serological markers and NPC methylation biomarkers for NPC diagnostics (ii) EBV ctDNA and miRNA markers for NPC diagnosis and prognosis (iii) EBV biomarkers for NPC staging and post-treatment surveillance. Many Biomarkers have been identified for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy, Feng and colleagues found that dysregulation of 14-3-3 σ , Maspin, GRP78, and Mn-SOD may be involved in the radioresistance of NPC [42]. Qu *et al.* have suggested miR-205 and PTEN as potential predictive biomarkers for radiosensitivity of NPC and may serve as targets to achieve successful radiotherapy in NPC [43]. Li *et al.* found that hsa-miR-1281 and hsa-miR-6732-3p in serum might serve as potential biomarkers for predicting the radiosensitivity of NPC [44].

4. NASOPHARYNGEAL CARCINOMA AND RADIORESISTANCE

In radiation oncology, NPC is considered the focus of hot research. NPC is highly sensitive to RT. However, although technological advances have improved the prognosis of NPC, radioresistance could induce local recurrence and distant metastasis in some patients after treatment by radiation [45]. In this case, NPC cells exhibit radiation resistance and may contribute to treatment failure and tumor relapse [46]. Besides, the response to RT is highly variable due to individual differences and variability in the genetic background of tumor cells. Although radioresistance is proven to cause recurrence; other factors namely inadequate target definition and longer than planned overall treatment time could also lead to this outcome. Proliferation and apoptosis of NPC cells in response to irradiation (IR) are determinants of NPC radiosensitivity, which is important for clinical purposes, especially for patient outcomes. A better understanding of the mechanism underlying the radioresistance of NPC may improve survival and facilitate the design of effective therapeutic strategies. Radio resistance is a complex biological process associated with abnormal DNA damage response, apoptosis, autophagy, gene mutations, cell cycle checkpoint, and dysregulated signaling pathways, which may hamper the success of RT [47]. The direct effect of radiation and the indirect effect of free radicals generated by ionization lead to DNA injury. The damage induced by RT in cancer cells can be direct DNA damage or indirect induction of reactive oxygen species (ROS). Hence, the main mechanism associated with the radioresistance of NPC might be the increased potential of defense against ROS. Moreover, DNA double-strand breaks that can lead to chromosomal aberrations may result from both a direct effect of irradiation on DNA and from the generation of ROS by radiolysis of water [48]. The ROS-induced apoptosis may therefore be either direct or indirect. An increased level of ROS beyond a tolerable limit in tumor cells then leads to the initiation of apoptosis. Moreover, ROS are highly genotoxic and cause a set of DNA lesions that are difficult to repair and lead directly to apoptosis [49]. Other targets of radiation, such as cell organelles and membranes, can be functionally and structurally impaired and thus might contribute to cell cycle arrest and cell death [50]. At the molecular level, radioresistance is mainly due to some genetic and epigenetic events (Fig. 2) [51]. In the present review, we particularly focused on genetic changes mainly SNPs in xenobiotic detoxification and DNA repair genes that might be used as biomarkers to predict prognosis especially radiosensitivity vs radioresistance status in patients with NPC [51].

Apart from SNPs, multiple signaling pathways are involved in radiotherapy resistance of NPC such as Wnt/ β -catenin, NF- κ B, Notch, AKT, Hedgehog... (Fig. 3) [52]. Also, it was reported that Cancer Stem Cell (CSC) play a role in the radiotherapy resistance of NPC as they confer higher radioresistance compared to the mass of tumor cells and possess specific molecular properties protecting them from radiation-induced damage. Moreover, multiple genes can interact with signaling pathways to regulate radiosensitivity and their encoded proteins can act as good potential biomarkers. Also, some cellular and EBV miRNAs can target specific DNA repair factors, thereby promoting NPC radioresistance.

4.1. Alteration of Detoxification Genes and NPC Resistance

Although several genes are reported to be involved in cell detoxification and xenobiotic elimination, two genes: (Pi-class glutathione S-transferase (*GSTP1*)) and (glutathione peroxidase1 (*GPX1*)) are extensively studied, and their association with cancer development and resistance is well documented. *GSTP1* is a member of the Glutathione S-transferases (GSTs) superfamily that catalyzes the detoxification of reactive electrophilic compounds and plays a critical role in maintaining cell integrity and protecting DNA from genotoxic and cell-damaging molecules [53].

Based on biochemical characteristics, GSTs are categorized into four major classes: α , μ , θ , and π . GSTs α , μ , and θ classes are encoded by different genes. In contrast, GST π enzymes are encoded by a single gene, *GSTP1*, which is prominently reported to be expressed in human epithelial tissues [54]. In the *GSTP1* gene, two genetic variants, namely Ile105Val (rs1695) and Ala114Val (rs1138272), have been shown to confer altered catalytic activity of the protein. *GSTP1* Ile105Val mutant has been associated with a heightened risk of bladder and testicular cancers [55]. Similarly, Chen *et al.* reported associations between Ile105Val and the risk of lung cancer development in some ethnic populations [56]. Al-Eitan *et al.* suggested that the interaction between rs1695 polymorphism of *GSTP1* and the deletion of the *GSTM1* entire gene may influence both the development and progression of breast cancer among Jordanian women [57]. Although the *GSTP1* Ala114Val variant was poorly studied, available data demonstrated an association between this variant and lung cancer development [58]. The *GSTP1* TT genotype (rs1138272) may be related to the susceptibility to all cancers in the Asian and African populations and, specifically, colorectal and head and neck cancers, whereas the CT genotype was found to be associated with an increased risk of lung cancer in Caucasian populations [59]. Although inconclusive, these results suggest the involvement of

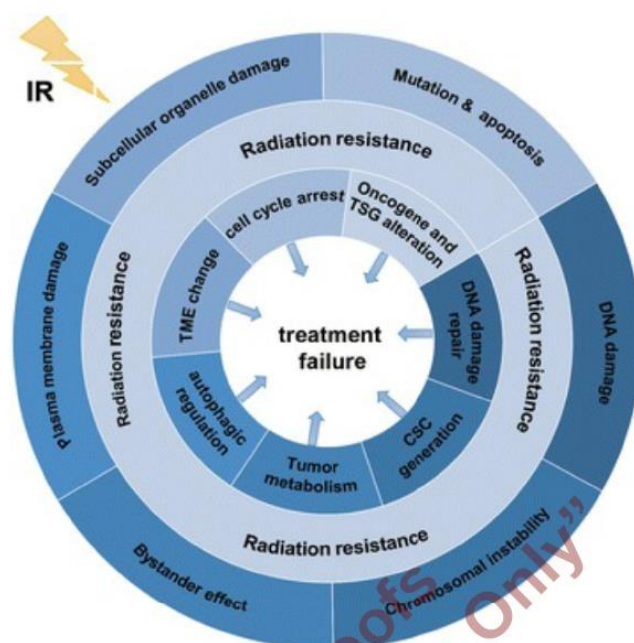


Fig. (2). The biological effects of radiation and the mechanism of radiation resistance. The outer ring indicates the biological effects of IR under normal conditions. The abnormal alterations of these effects will further induce the occurrence of radiation resistance. The inner ring indicates the mechanism of radiation resistance and the biological changes in the occurrence of radioresistance. These abnormal changes are the important reasons for treatment failure of cancer patients [51]. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

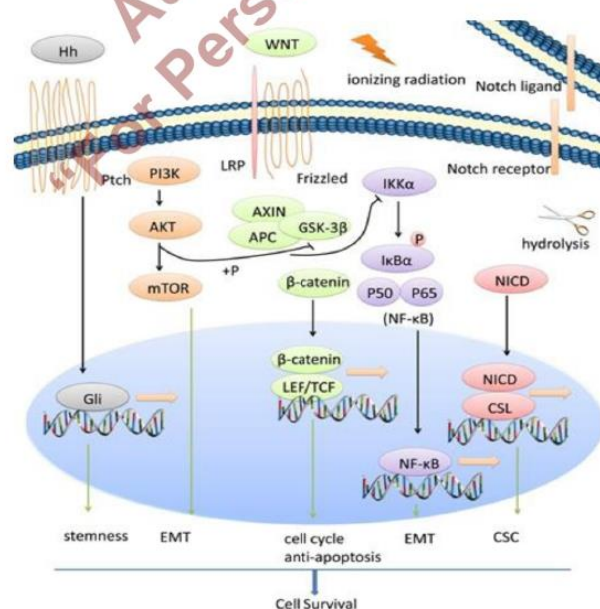


Fig. (3). Multiple signaling pathways involved in radiotherapy resistance of NPC. CSCs, EMT process, and radiotherapy resistance of NPC are regulated by a network of signaling pathways such as Wnt/β-catenin, NF-κB, Notch, AKT, Hedgehog [52]. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

rs113827 single nucleotide polymorphism (SNP) in the development and progression of various cancers and could be a potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. GSTP1 polymorphisms were also evaluated as potential biomarkers of responses to various therapies in breast cancer [60, 61], bladder cancer [62], and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cancer [63]. A significant association between GSTP1 Ile105Val polymorphisms and treatment response was reported.

GPx1 (EC 1.11.1.9) is a selenium-dependent enzyme, which plays an important role in antioxidant defense. GPx1 might protect cells and their environment from oxidative stress [64, 65]. In the *GPX1* gene, particular interest was given to the rs1050450C>T polymorphism close to the C-terminus of the protein, resulting in a Proline (Pro) to Leucine (Leu) amino acid substitution at codon 198 (Pro198Leu) [66]. Several studies have reported that the presence of Leucine at position 198 affects the binding of selenium, a key element for GPx1 function, to the enzyme resulting in a decrease in the enzymatic activity [67, 68]. GPx1 Pro198Leu reportedly influences the risk of developing BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms [69]. Worldwide, a large number of studies have been conducted to establish an association between Pro198Leu polymorphism and cancer risk. The studies indicated the absence of any GPx1 Pro198Leu polymorphism involvement in cancer development, including laryngeal [70] and bladder cancers [71]. The functional polymorphism of GPx1 Pro198Leu may play an important role in pre-adjuvant therapy cognitive functions in breast cancer survival and has been reported to potentially predict the progression of laryngeal cancer [70]. To the best of our knowledge, a limited number of studies evaluated GPx1 Pro198Leu polymorphism as a prognosis biomarker. Nikic *et al.* assessed the prognosis value of this SNP and found no association between GPx1 Pro198Leu polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer treated with cisplatin-chemotherapy [72].

4.2. Reparation Genes' Alteration and NPC Resistance

DNA repair pathways play a crucial role in maintaining genetic stability and preventing cancer development, though they represent a potential mechanism of resistance to DNA-damaging RT [73]. The role of SNPs in DNA repair genes is well-understood. The X-ray repair cross-complementing gene 1 (*XRCC1*) was the first gene reported to modulate cell sensitivity to ionizing radiation affecting the repair activity of DNA. SNPs occur in the *XRCC1* gene in malignant tumors, making them potential biomarkers for the prediction of radiosensitivity of malignant and normal tissues. In the *XRCC1* gene, the most common SNPs are Arg194Trp

(exon 6), Arg280His (exon 9), and Arg399Gln (exon 10) [74, 75]. The association of these genes with cancer development, including NPC, is widely reported and documented [76]. Several studies reported the relationship between SNPs in *XRCC1* and patients' outcomes after radiotherapy and chemotherapy. Jin *et al.* demonstrated that *XRCC1* Arg399Gln significantly impacts the clinical outcomes of platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer [77]. In NPC, it was reported that the *XRCC1* Arg399Gln allele, in combination with heavy smoking, was significantly associated with poorer prognosis in patients treated with RT, suggesting that effective DNA repair reduces the likelihood of tumor response to RT [78]. Also, Zhai *et al.* (2016) found that patients with *XRCC1* codon 399 Gln/Gln alleles were more susceptible to complete remission making this genotype a compelling predictive marker for the outcome of locally-advanced NPC [79]. *XRCC1* codon 399 Arg/Arg allele was also reported to be a potential risk predictor factor of developing pneumonitis and acute radiation dermatitis during IMRT [80]. The X-ray repair cross-complementing group 3 (*XRCC3*) is located on the 14q32.33 chromosome and encodes for a member of the RecA/Rad51-related protein family involved in homologous recombination to maintain chromosome stability and repair DNA damage [81]. Several studies have shown that *XRCC3* is a highly suspected candidate gene for cancer susceptibility [82, 83]. Of note, the *XRCC3* Thr241Met (18607C/T, rs861539) polymorphism in exon 7 was found associated with oral cancer [84], osteosarcoma risk cancer [85], childhood lymphoblastic leukemia [86], and differentiated thyroid carcinoma development and progression [87]. The contribution of *XRCC3* genotypes to individual NPC susceptibility was also investigated, and results indicated that the T allele of *XRCC3* (rs861539) interacts with the smoking habit in increasing NPC risk and thus could be considered as a molecular marker for early detection of NPC [87, 88]. Interestingly, the 241Met allele registered an increase of over 33-fold local relapse risk of HNSCC, over 12-fold earliness of relapse, and over 3-fold earliness of death, making this polymorphism a useful marker of prognosis in HNSCC [89]. Furthermore, Farnébo *et al.* observed that wild-type individuals for *XRCC3* T241M with HNSCC demonstrated an earlier age of onset [90]. Moreover, *XRCC1* can interact with the *XRCC3* variant to significantly increase susceptibility to cancer [87]. These markers may add value for exploring the insight pathogenesis and may affect the risk and survival of HNSCC, making these variants a target to develop novel therapeutic strategies for cancer [90].

Excision repair cross-complementation group 1 (*ERCC1*) protein is reported to facilitate DNA repair of double-strand breaks induced by RT [91]. The over-

expression of ERCC1 has been shown to significantly correlate with resistance to RT alone or CRT in many tumor types [92]. In NPC, two ERCC1 SNPs, namely rs11615 (C118T) and rs3212986 (Cys8092Ala) were reported to be associated with altered platinum-based chemotherapy and radiation sensitivity of cancer cells. ERCC Cys8092Ala polymorphism has been found as an independent predictor of response to RT for NPC, but might be a useful potential marker in metastatic/recurrent NPC patients treated with cisplatin-based chemotherapy [78]. The rs11615 SNP was found to be associated with drug resistance and modulate response to chemotherapy in various types of cancers [93]. This was established in a meta-analysis conducted by Dai *et al.* (2019) who showed a clear association between ERCC1 rs11615 polymorphism and pancreatic cancer [94]. In contrast, no association was found between ERCC1 rs11615 polymorphism and response rate, and disease progression in metastatic and recurrent NPC patients [89].

4.3. Viral miRNA Expression and Radioresistance

In NPC, EBV infection play a central role in cancer progression, monitoring of patients, prognosis, and therapeutic interventions. Some EBV-encoded miRNAs promote migration and proliferation and inhibit apoptosis of NPC cells [95]. The BamHI fragment H rightward reading frame 1 (BHRF1) gene encodes three miRNAs precursors (EBV-miR-BHRF1-3) that generate four mature miRNAs, whereas the BamHI fragment A rightward transcript (BART) region contains 22 miRNAs precursors (EBV-miR-BART1-22) that produce 44 mature miRNAs [96]. Studies have shown that EBV-encoded miRNAs promoted migration and cell proliferation and inhibited apoptosis of NPC cells [46, 95]. Moreover, most EBV miRNAs modulate cell radio-sensitivity *via* targeting specific DNA repair factors [97]. In a cell, DNA repair is regulated by ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) signaling pathways [98]. ATM and ATR are down-regulated in EBV-positive nasopharyngeal epithelial cells and primary NPC samples, and IR-induced ATM/ATR kinase activity is significantly reduced [99, 100].

4.4. Cell microRNAs and Radioresistance

In NPC, miRNAs play a vital role in cancer development, progression, and metastasis. miRNAs interfere in many signaling pathways and thereby influence cellular responses to specific therapy; including RT. Chen *et al.* found that miR-7 plays an important role in the radioresistance of NPC cells [101]. MiR-205 determines the radioresistance of NPC by targeting PTEN [43], while miRNA-324-3p contributes to the radioresistance of NPC by regulating the wingless-type

MMTV integration site family, member 2B (WNT2B) signaling pathway [102]. Xu *et al.* (2015) have demonstrated that combined low miR-185-3p and miR-324-3p may predict low response to RT/CRT and poor overall survival and recurrence-free survival and modulate cancer cell growth and apoptosis by targeting SMAD7 [103], whereas miR-483-5p decreases the radio-sensitivity of NPC cells by targeting *DAPK1* gene [104].

4.5. Nasopharyngeal Carcinoma-related Exosomes and Radioresistance

Exosomes are membrane microvesicles released by cancer cells that contain pathogenic components, such as proteins, miRNAs, and long non-coding RNAs. Exosomes play differential roles in tumor-host crosstalk and modulate the immune response, angiogenesis, cell proliferation, cell-to-cell communication, and tumor invasion. It is thought that tumor-derived exosomes may contribute to tumor microenvironment remodeling and release cytokines and other bioactive components that act on surface receptors of endothelial cells, thereby leading to angiogenesis and promoting tumor migration [105].

Nasopharyngeal carcinoma-related exosomes (NPC-Exo) contribute to tumor cell proliferation, angiopoiesis, and immune tolerance through the remodeling of the tumor microenvironment. NPC-Exo may also induce epithelial-mesenchymal transition, thereby promoting tumor metastasis and chemo radioresistance. Recent data indicate that radiation-derived exosomes increase tumor burden and promote radioresistance. Besides, radiation can change the contents of exosomes, which allows exosomes to serve as novel biomarkers for diagnosis and target therapies of NPC as well as a prognostic and predictive biomarker to monitor radiation responses [106].

4.6. Other Markers of Prognosis and Radioresistance in NPC

Several other genes associated with radioresistance in NPC were identified, including CCL5, STAT1- α , STAT2, GP96, GDF15, Twist1 and RPA3, and were therefore considered as potential biomarkers for predicting NPC response to RT [107, 108]. Qu *et al.* demonstrated that high Replication Protein A3 (RPA3) expression contributed to the radioresistance of NPC. This suggests that RPA3 could be a potential biomarker for prognosis and radiosensitivity prediction for patients with NPC [43]. On the other hand, Zhang *et al.* showed that Twist1 involved in many cell biological processes was associated with NPC malignancy and could induce NPC radioresistance *in vitro* and *in vivo* by promoting the accumulation of DNA damage repair and inhibiting the apoptosis of NPC cells [108].

4.7. Treatment of Radioresistance NPC

Radiotherapy is used as first-line nasopharyngeal carcinoma treatment and provides different responses (radioresistant or radiosensitive). Indeed, many studies investigated the molecular basis of radioresistance. Lipocalin-2 (LCN2), is associated with radioresistance and recurrence in NPC and may facilitate the development of a radioresistant phenotype through interaction with HIF-1A. Hence, LCN2 is a promising target for predicting and overcoming radioresistance in NPC [109]. Non-invasive biomarkers such as Non-coding RNAs (ncRNAs), microRNAs (miRNAs), and long non-coding RNAs (lncRNAs), may play important roles in regulating chemo- and radiation resistance in NPC by controlling the cell cycle, proliferation, apoptosis, and DNA damage repair, as well as other signaling pathways [110]. Proteomics is widely used in NPC for searching biomarkers and comparing differentially expressed proteins [111]. However, studies on follow-up outcome are required.

CONCLUSION

Worldwide, several studies and clinical data show unanimity in characterizing NPC as radiosensitive cancer, but clinicians face the problem with a large number of radiation-resistant cases, which hinder the efficient management of NPC. Efforts are underway to elucidate the mechanisms underlying NPC radioresistance, especially genetic and epigenetic changes in radiation-induced responses. In Morocco, many studies were conducted on NPC epidemiology, clinical characterization, and viral etiology. However, limited data are available about the genetic and epigenetic modifications within NPC cases to establish an association with NPC tumorigenesis, progression, and radioresistance. It is suggested to further assess the mutational status of some genes involved in DNA reparation and cell detoxification as the first step of a large study on genetic and epigenetic analysis of NPC. These studies may offer an opportunity to identify biomarkers that could be used for early diagnosis, efficient prognostic, or as therapeutic targets, and might be of great interest for NPC personalized treatment as part of the target therapy strategy set up in Morocco during the last year. Overall, the current review has highlighted the role of several genes and markers in cancer progression and has enlightened professionals about various facets of nasopharyngeal cancers.

LIST OF ABBREVIATIONS

3D-CRT	= Three-dimensional Conformal Radiotherapy
AC	= Adjuvant Chemotherapy
ATM	= Ataxia Telangiectasia Mutated
CIT	= Carbon Ion Radiotherapy

CRT	= Chemoradiotherapy
CSC	= Cancer Stem Cell
CT	= Computerized Tomography
EBV	= Epstein-Barr Virus
ERCC1	= Excision Repair Cross-Complementation Group 1
ESMO	= European Society for Medical Oncology
GSTs	= Glutathione S-transferases
HNSCC	= Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
IARC	= International Agency for Research on Cancer
IC	= Induction Chemotherapy
IMPT	= Intensity-modulated Proton Therapy
IMRT	= Intensity-modulated Radiotherapy
IR	= Irradiation
LCN2	= Lipocalin-2
lncRNAs	= long non-coding RNAs
miRNAs	= microRNAs
MRI	= Magnetic Resonance Imaging
NCCN	= National Comprehensive Cancer Network
ncRNAs	= Non-coding RNAs
NPC	= Nasopharyngeal Cancer
NPC-Exo	= Nasopharyngeal Carcinoma-Related Exosomes
OS	= Overall Survival
PET	= Positron Emission Tomography
ROS	= Reactive Oxygen Species
RPA3	= Replication Protein A3
RT	= Radiotherapy
SNP	= Single Nucleotide Polymorphism
TNM	= Tumor-Node-Metastasis
XRCC3	= X-ray Repair Cross-Complementing Group 3

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

This study is a part of project 201932 supported by the Institut de Recherche sur le Cancer (IRC - www.irc.ma).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Springer Nature, MDPI, and Ivyspring International publishers for making figures available for reuse without permission. The authorship of Fig. (1) is attributed to MDPI published in Cancers (Basel) journal by Verhoeven RJA *et al.*,

2018. The authorship of Fig. (2) is attributed to Springer Nature published in *Exp Clin Cancer Res* and authored by Tang L et al, 2018. The authorship of Fig. (3) is attributed to Ivyspring International publisher published in the journal of cancer and authored by Zhan Y and Fan S, 2020.

REFERENCES

- [1] Pan XX, Liu YJ, Yang W, Chen YF, Tang WB, Li CR. Histological subtype remains a prognostic factor for survival in nasopharyngeal carcinoma patients. *Laryngoscope* 2020; 130(3): E83-8. <http://dx.doi.org/10.1002/lary.28099> PMID: 31188486
- [2] Lim SW, Kamalden TMIT. Radiation-induced sarcoma post radiotherapy treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Health Sci Res* 2021; 11: 111-3.
- [3] Aksoy A, Elkiran E, Harputluoglu H, Dagli A, Isikdogan A, Urakci Z. Is excision repair cross-complementation Group1 expression a biological marker in nasopharynx carcinoma? *J Cancer Res Ther* 2019; 15(3): 550-5. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.206865> PMID: 31169219
- [4] Chen YP, Chan ATC, Le QT, Blanchard P, Sun Y, Ma J. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2019; 394(10192): 64-80. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30956-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30956-0) PMID: 31178151
- [5] Rickinson AB, Lo KW. Nasopharyngeal Carcinoma: A History. *Nasopharyngeal Carcinoma: From etiology to practice*. Academic Press 2019; pp. 1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814936-2.00001-8>
- [6] 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. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492> PMID: 30207593
- [7] Wang HY, Chang YL, To KF, et al. A new prognostic histopathologic classification of nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* 2016; 35(1): 41. <http://dx.doi.org/10.1186/s40880-016-0103-5> PMID: 27146632
- [8] Tabuchi K, Nakayama M, Nishimura B, Hayashi K, Hara A. Early detection of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Otolaryngol* 2011; 2011: 1-6. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/638058> PMID: 21716698
- [9] Verhoeven R, Tong S, Zong J, et al. NF-κB Signaling Regulates Epstein-Barr Virus BamHI-Q-Driven EBNA1 Expression. *Cancers* 2018; 10(4): 119. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers10040119> PMID: 29659505
- [10] Verhoeven RJA, Tong S, Zhang G, et al. NF-κB signaling regulates expression of epstein-barr virus bart micromas and long noncoding rnas in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 2016; 90(14): 6475-88. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00613-16> PMID: 27147748
- [11] Huang SH, Chen ZJ, O'Sullivan B. Nasopharyngeal carcinoma—clinical aspects. In: *Nasopharyngeal Carcinoma*. Academic Press 2019; pp. 359-68. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814936-2.00017-1>
- [12] Chen ZT, Liang ZG, Zhu XD. A review: proteomics in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Mol Sci* 2015; 16(12): 15497-530. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160715497> PMID: 26184160
- [13] Zanoni DK, Patel SG, Shah JP. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging of head and neck cancer: rationale and implications. *Curr Oncol Rep* 2019; 21(6): 52.
- [14] Ouyang PY, Xiao Y, You KY, et al. Validation and comparison of the 7th and 8th edition of AJCC staging systems for non-metastatic nasopharyngeal carcinoma, and proposed staging systems from Hong Kong, Guangzhou, and Guangxi. *Oral Oncol* 2017; 72: 65-72.
- [15] Duan W, Xiong B, Tian T, Zou X, He Z, Zhang L. Radiomics in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Med Insights Oncol* 2022; 16. <http://dx.doi.org/10.1177/11795549221079186> PMID: 35237090
- [16] Tang LQ, Li CF, Li J, et al. Establishment and validation of prognostic nomograms for endemic nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108(1): djv291. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djv291> PMID: 26467665
- [17] Liu GY, Lv X, Wu YS, et al. Effect of induction chemotherapy with cisplatin, fluorouracil, with or without taxane on locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a retrospective, propensity score-matched analysis. *Cancer Commun* 2018; 38(1): 21. <http://dx.doi.org/10.1186/s40880-018-0283-2> PMID: 29764487
- [18] Xu C, Zhang LH, Chen YP, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in stage II nasopharyngeal carcinoma: a systematic review and meta-analysis of 2138 patients. *J Cancer* 2017; 8(2): 287-97. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.17317> PMID: 28243333
- [19] Huang L, Hu C, Chao H, et al. Drug-resistant endothelial cells facilitate progression, EMT and chemoresistance in nasopharyngeal carcinoma via exosomes. *Cell Signal* 2019; 63: 109385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109385> PMID: 31394194
- [20] Al Tamimi A, Zaheer S, Ng D, Osmany S. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of metastatic nasopharyngeal cancer with emphasis on the distribution of bone metastases. *World J Nucl Med* 2017; 16(3): 192-6. <http://dx.doi.org/10.4103/1450-1147.207273> PMID: 28670176
- [21] Feng Q, Liang J, Wang L, Ge X, Ding Z, Wu H. A diagnosis model in nasopharyngeal carcinoma based on PET/MRI radiomics and semiquantitative parameters. *BMC Med Imaging* 2022; 22(1): 150. <http://dx.doi.org/10.1186/s12880-022-00883-6> PMID: 36038819
- [22] Xie C, Vardhanabhuti V. PET/CT: Nasopharyngeal cancers. *PET Clin* 2022; 17(2): 285-96.
- [23] Goh J, Lim K. Imaging of nasopharyngeal carcinoma. *Ann Acad Med Singap* 2009; 38(9): 809-16. <http://dx.doi.org/10.47102/annals-acadmedsg.V38N9p809> PMID: 19816641
- [24] Cheng Y, Bai L, Shang J, et al. Preliminary clinical results for PET/MR compared with PET/CT in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2020; 43(1): 177-87. PMID: 31746412
- [25] Liu Z, Chen Y, Su Y, Hu X, Peng X. Nasopharyngeal carcinoma: clinical achievements and considerations among treatment options. *Front Oncol* 2021; 11: 635737. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.635737> PMID: 34912697
- [26] Liang Z, Zhu X, Li L, et al. Concurrent chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy compared with concurrent chemoradiotherapy alone for the treatment of locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a retrospective controlled study. *Curr Oncol* 2014; 21(3): 408-17. <http://dx.doi.org/10.3747/co.21.1777> PMID: 24940100

- [27] Bossi P, Chan AT, Licitra L, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol* 2021; 32(4): 452-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.annonc.2020.12.007> PMID: 33358989
- [28] Zong J, Xu H, Chen B, *et al.* Maintenance chemotherapy using S-1 following definitive chemoradiotherapy in patients with N3 nasopharyngeal carcinoma. *Radiat Oncol* 2019; 14(1): 182. <http://dx.doi.org/10.1186/s13014-019-1387-9> PMID: 31640719
- [29] Pow EHN, Kwong DLW, McMillan AS, *et al.* Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: Initial report on a randomized controlled clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66(4): 981-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.06.013> PMID: 17145528
- [30] Co J, Mejia MB, Dizon JM. Evidence on effectiveness of intensity-modulated radiotherapy *versus* 2-dimensional radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: Meta-analysis and a systematic review of the literature. *Head Neck* 2016; 38(S1): E2130-42. <http://dx.doi.org/10.1002/hed.23977> PMID: 25546181
- [31] Peng G, Wang T, Yang K, *et al.* A prospective, randomized study comparing outcomes and toxicities of intensity-modulated radiotherapy vs. conventional two-dimensional radiotherapy for the treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol* 2012; 104(3): 286-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2012.08.013> PMID: 22995588
- [32] Zhang B, Mo Z, Du W, Wang Y, Liu L, Wei Y. Intensity-modulated radiation therapy *versus* 2D-RT or 3D-CRT for the treatment of nasopharyngeal carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2015; 51(11): 1041-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.08.005> PMID: 26296274
- [33] Ebner DK, Kamada T. The emerging role of carbon-ion radiotherapy. *Front Oncol* 2016; 6: 140. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2016.00140> PMID: 27376030
- [34] Moreno AC, Frank SJ, Garden AS, *et al.* Intensity modulated proton therapy (IMPT) - The future of IMRT for head and neck cancer. *Oral Oncol* 2019; 88: 66-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.11.015> PMID: 30616799
- [35] Lewis GD, Holliday EB, Kocak-Uzel E, *et al.* Intensity-modulated proton therapy for nasopharyngeal carcinoma: Decreased radiation dose to normal structures and encouraging clinical outcomes. *Head Neck* 2016; 38(S1): E1886-95. <http://dx.doi.org/10.1002/hed.24341> PMID: 26705956
- [36] Morgan HE, Sher DJ. Adaptive radiotherapy for head and neck cancer. *Cancers Head Neck* 2020; 5(1): 1-16. <http://dx.doi.org/10.1186/s41199-019-0046-z> PMID: 31938572
- [37] Paiar F, Di Cataldo V, Zei G, *et al.* Role of chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rev* 2012; 6(1): 1. <http://dx.doi.org/10.4081/oncol.2012.e1> PMID: 25992199
- [38] Colevas AD, Yom SS, Pfister DG, *et al.* NCCN guidelines insights: head and neck cancers, version 1.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 2018; 16(5): 479-90. <http://dx.doi.org/10.6004/jnccn.2018.0026> PMID: 29752322
- [39] Bhattacharyya T, Babu G, Kainickal CT. Current role of chemotherapy in nonmetastatic nasopharyngeal cancer. *J Oncol* 2018; 2018
- [40] Prabhash K, Gairola M, Babu G, *et al.* Indian clinical practice consensus guidelines for the management of nasopharyngeal cancer. *Indian J Cancer* 2020; 57(5)(Suppl.): 9. <http://dx.doi.org/10.4103/0019-509X.278974> PMID: 32167065
- [41] Chow JCH, Ngan RKC, Cheung KM, Cho WCS. Immunotherapeutic approaches in nasopharyngeal carcinoma. *Expert Opin Biol Ther* 2019; 19(11): 1165-72. <http://dx.doi.org/10.1080/14712598.2019.1650910> PMID: 31361154
- [42] Feng XP, Yi H, Li MY, *et al.* Identification of biomarkers for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics. *Cancer Res* 2010; 70(9): 3450-62. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4099> PMID: 20406978
- [43] Qu C, Liang Z, Huang J, *et al.* MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle* 2012; 11(4): 785-96. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.11.4.19228> PMID: 22374676
- [44] Li K, Zhu X, Li L, *et al.* Identification of non-invasive biomarkers for predicting the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma from serum microRNAs. *Sci Rep* 2020; 10(1): 5161. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-61958-4> PMID: 32198434
- [45] Li LN, Xiao T, Yi HM, *et al.* MiR-125b increases nasopharyngeal carcinoma radioresistance by targeting A20/NF- κ B signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2017; 16(10): 2094-106. <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0385> PMID: 28698199
- [46] Luftig M. Heavy LIFTing: tumor promotion and radioresistance in NPC. *J Clin Invest* 2013; 123(12): 4999-5001. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI73416> PMID: 24270417
- [47] Czarny P, Pawlowska E, Bialkowska-Warzecha J, Kaami-ranta K, Blasiak J. Autophagy in DNA damage response. *Int J Mol Sci* 2015; 16(2): 2641-62. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16022641> PMID: 25625517
- [48] Ameziane-El-Hassani R, Boufraqueh M, Lagente-Chevallier O, *et al.* Role of H₂O₂ in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells. *Cancer Res* 2010; 70(10): 4123-32. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4336> PMID: 20424115
- [49] Davalli P, Marverti G, Lauriola A, D'Arca D. Targeting oxidatively induced DNA damage response in cancer: opportunities for novel cancer therapies. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 1-21. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2389523> PMID: 29770165
- [50] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337> PMID: 17562483
- [51] Tang L, Wei F, Wu Y, *et al.* Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37(1): 87. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-018-0758-7> PMID: 29688867
- [52] Zhan Y, Fan S. Multiple mechanisms involving in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 2020; 11(14): 4193-204. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.39354> PMID: 32368302
- [53] Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer

- and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 2018; 7(1): 8.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3> PMID: 29362397
- [54] Bocedi A, Noce A, Marrone G, *et al.* Glutathione transferase p1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution. *Nutrients* 2019; 11(8): 1741.
<http://dx.doi.org/10.3390/nu11081741> PMID: 31357662
- [55] Harries L, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997; 18(4): 641-4.
<http://dx.doi.org/10.1093/carcin/18.4.641> PMID: 9111193
- [56] Chen X, Liang L, Hu X, Chen Y. Glutathione S-transferase P1 gene Ile105Val polymorphism might be associated with lung cancer risk in the Chinese Han population. *Tumour Biol* 2012; 33(6): 1973-81.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0457-5> PMID: 22797821
- [57] AL-Eitan LN, Rababa'h DM, Alghamdi MA, Khasawneh RH. Association of GSTM1, GSTT1 And GSTP1 polymorphisms with breast cancer among jordanian women. *OncoTargets Ther* 2019; 12: 7757-65.
<http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S207255> PMID: 31571925
- [58] Huang S, Wu F, Luo M, *et al.* The glutathione S-transferase P1 341C>T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 28 case-control studies. *PLoS One* 2013; 8(2): e56722.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056722> PMID: 23437223
- [59] Ding F, Li JP, Zhang Y, Qi GH, Song ZC, Yu YH. Comprehensive analysis of the association between the rs1138272 polymorphism of the gstp1 gene and cancer susceptibility. *Front Physiol* 2019; 9: 1897.
<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01897> PMID: 30740061
- [60] Ge J, Tian AX, Wang QS, *et al.* The GSTP1 105Val allele increases breast cancer risk and aggressiveness but enhances response to cyclophosphamide chemotherapy in North China. *PLoS One* 2013; 8(6): e67589.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067589> PMID: 23826324
- [61] Tulsyan S, Chaturvedi P, Agarwal G, *et al.* Pharmacogenetic influence of GST polymorphisms on anthracycline-based chemotherapy responses and toxicity in breast cancer patients: a multi-analytical approach. *Mol Diagn Ther* 2013; 17(6): 371-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s40291-013-0045-4> PMID: 23812950
- [62] Deng X, Yang X, Cheng Y, *et al.* GSTP1 and GSTO1 single nucleotide polymorphisms and the response of bladder cancer patients to intravesical chemotherapy. *Sci Rep* 2015; 5(1): 14000.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep14000>
- [63] Pincinato EC, Costa EFD, Lopes-Aguiar L, *et al.* GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms in outcomes of head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cisplatin chemoradiation. *Sci Rep* 2019; 9(1): 9312.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45808-6> PMID: 31249357
- [64] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1): 1-40.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009> PMID: 16430879
- [65] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1): 9-19.
<http://dx.doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613> PMID: 23268465
- [66] Lee CH, Lee KY, Choe KH, *et al.* (Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer). *J Prev Med Public Health* 2006; 39(2): 130-4.
 PMID: 16615267
- [67] Paz-y-Miño C, Muñoz MJ, López-Cortés A, *et al.* Frequency of polymorphisms pro198Leu in GPX-1 gene and ile58Thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. *Oncol Res* 2009; 18(8): 395-400.
<http://dx.doi.org/10.3727/096504010X12644422320780> PMID: 20441054
- [68] Kucukgergin C, Sanli O, Amasyali AS, Tefik T, Seckin S. Genetic variants of MnSOD and GPX1 and susceptibility to bladder cancer in a Turkish population. *Med Oncol* 2012; 29(3): 1928-34.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12032-011-0057-z> PMID: 21904836
- [69] Trifa AP, Bănescu C, Dima D, *et al.* Among a panel of polymorphisms in genes related to oxidative stress, CAT -262 C>T, GPX1 Pro198Leu and GSTP1 Ile105Val influence the risk of developing BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology* 2016; 21(9): 520-5.
<http://dx.doi.org/10.1080/10245332.2016.1163889> PMID: 27077777
- [70] Coskun C, Verim A, Farooqi AA, *et al.* Are there possible associations between MnSOD and GPx1 gene variants for laryngeal cancer risk or disease progression? *Cell Mol Biol* 2016; 62(5): 25-30.
 PMID: 27188866
- [71] Hadami K, Ameziame El Hassani R, Ameer A, *et al.* Association between GPX1 Pro189Leu polymorphism and the occurrence of bladder cancer in Morocco. *Cell Mol Biol* 2016; 62(14): 38-43.
<http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2016.62.14.6> PMID: 28145855
- [72] Nikic P, Dragicevic D, Savic-Radojevic A, *et al.* Association between GPX1 and SOD2 genetic polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer: a single-center study in Serbia. *J BUON* 2018; 23(4): 1130-5.
 PMID: 30358222
- [73] Yan J, Wang X, Tao H, Deng Z, Yang W, Lin F. Meta-Analysis of the Relationship between XRCC1-Arg399Gln and Arg280His Polymorphisms and the Risk of Prostate Cancer. *Sci Rep* 2015; 5(1): 1-9.
- [74] Singh SA, Ghosh SK. Polymorphisms of XRCC1 and XRCC2 DNA repair genes and interaction with environmental factors influence the risk of nasopharyngeal carcinoma in northeast India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17(6): 2811-9.
 PMID: 27356695
- [75] Chen H, Wu M, Li G, Hua L, Chen S, Huang H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphism and acute radiation reaction in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Medicine* 2017; 96(44): e8202.
<http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000008202> PMID: 29095251
- [76] Lin J, Ye Q, Wang Y, Wang Y, Zeng Y. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Medicine* 2018; 97(32): e11852.

- <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000011852> PMID: 30095663
- [77] Jin ZY, Zhao XT, Zhang LN, Wang Y, Yue WT, Xu SF. Effects of polymorphisms in the XRCC1, XRCC3, and XPG genes on clinical outcomes of platinum-based chemotherapy for treatment of non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* 2014; 13(3): 7617-25. a <http://dx.doi.org/10.4238/2014.March.31.13> PMID: 24737519
- [78] Jin H, Xie X, Wang H, *et al.* ERCC1 Cys8092Ala and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms predict progression-free survival after curative radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* 2014; 9(7): e101256. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101256> PMID: 25025378
- [79] Zhai XM, Hu QC, Gu K, Wang JP, Zhang JN, Wu YW. Significance of XRCC1 Codon399 polymorphisms in Chinese patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with radiation therapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 2016; 12(1): e125-32. <http://dx.doi.org/10.1111/ajco.12117> PMID: 23910235
- [80] Du L, Yu W, Huang X, *et al.* GSTP1 Ile105Val polymorphism might be associated with the risk of radiation pneumonitis among lung cancer patients in Chinese population: A prospective study. *J Cancer* 2018; 9(4): 726-35. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.20643> PMID: 29556330
- [81] Tian X, Tian Y, Ma P, *et al.* Association between the XRCC3 C241T polymorphism and lung cancer risk in the Asian population. *Tumour Biol* 2013; 34(5): 2589-97. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-0806-z> PMID: 23749486
- [82] Han S, Zhang HT, Wang Z, *et al.* DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(10): 1136-44. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201681> PMID: 16791138
- [83] Mao CF, Qian WY, Wu JZ, Sun DW, Tang JH. Association between the XRCC3 Thr241Met polymorphism and breast cancer risk: an updated meta-analysis of 36 case-control studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(16): 6613-8. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.16.6613> PMID: 25169497
- [84] Fan J, Liu W, Zhang M, Xing C. A literature review and systematic meta-analysis on XRCC3 Thr241Met polymorphism associating with susceptibility of oral cancer. *Oncol Lett* 2019; 18(3): 3265-73. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2019.10609> PMID: 31452804
- [85] Dong Z, Wang Y, Wang G. Association of X-ray cross-complementing group 3 Thr241Met gene polymorphism with osteosarcoma risk and its development and prognosis. *J Cancer Res Ther* 2018; 14(7)(Suppl.): 1178. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.199435> PMID: 30539867
- [86] Pei JS, Chang WS, Hsu PC, *et al.* The contribution of XRCC3 genotypes to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Manag Res* 2018; 10: 5677-84. <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S178411> PMID: 30532590
- [87] Yan L, Li Q, Li X, Ji H, Zhang L. Association studies between XRCC1, XRCC2, XRCC3 polymorphisms and differentiated thyroid carcinoma. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38(3): 1075-84. <http://dx.doi.org/10.1159/000443058> PMID: 26938431
- [88] Kayani MA, Khan S, Baig RM, Mahjabeen I. Association of RAD 51 135 G/C, 172 G/T and XRCC3 Thr241Met gene polymorphisms with increased risk of head and neck cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 15(23): 10457-62. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.23.10457> PMID: 25556492
- [89] Stur E, Agostini LP, Garcia FM, *et al.* Prognostic significance of head and neck squamous cell carcinoma repair gene polymorphism. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 12446-54. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.October.16.11> PMID: 26505394
- [90] Famebo L, Stjernström A, Fredrikson M, Ansell A, Garvin S, Thunell LK. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. *DNA Repair* 2015; 31: 64-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.05.003> PMID: 26001739
- [91] de Almeida VH, de Melo AC, Meira DD, *et al.* Radiotherapy modulates expression of EGFR, ERCC1 and p53 in cervical cancer. *Braz J Med Biol Res* 2018; 51(1): e6822. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20176822> PMID: 29160417
- [92] Mehra R, Zhu F, Yang DH, *et al.* Quantification of excision repair cross-complementing group 1 and survival in p16-negative squamous cell head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2013; 19(23): 6633-43. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0152> PMID: 24088734
- [93] Rao D, Mallick AB, Augustine T, *et al.* Excision repair cross-complementing group-1 (ERCC1) induction kinetics and polymorphism are markers of inferior outcome in patients with colorectal cancer treated with oxaliplatin. *Oncotarget* 2019; 10(53): 5510-22. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.27140> PMID: 31565185
- [94] Dai P, Li J, Li W, *et al.* Genetic polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98(32): e16541. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000016541> PMID: 31393355
- [95] Cai L-M, Lyu X-M, Luo W-R, *et al.* EBV-miR-BART7-3p promotes the EMT and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 2015; 34(17): 2156-66. <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2014.341> PMID: 25347742
- [96] Fan C, Tang Y, Wang J, *et al.* The emerging role of Epstein-Barr virus encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 2018; 9(16): 2852-64. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.25460> PMID: 30123354
- [97] Wang S, Pan Y, Zhang R, *et al.* Hsa-miR-24-3p increases nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting both the 3'UTR and 5'UTR of Jab1/CSN5. *Oncogene* 2016; 35(47): 6096-108. <http://dx.doi.org/10.1038/ncr.2016.147> PMID: 27157611
- [98] Zhang Y, Zheng L, Huang J, *et al.* MiR-124 radiosensitizes human colorectal cancer cells by targeting PRRX1. *PLoS One* 2014; 9(4): e93917. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093917> PMID: 24705396
- [99] Lung RWM, Hau PM, Yu KHO, *et al.* EBV-encoded miRNAs target ATM-mediated response in nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 2018; 244(4): 394-407. <http://dx.doi.org/10.1002/path.5018> PMID: 29230817
- [100] Wu Q, Han T, Sheng X, Zhang N, Wang P. Downregulation of EB virus miR-BART4 inhibits proliferation and aggressiveness while promoting radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2018; 108: 741-51.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.146> PMID: 30248542
- [101] Chen ZX, Sun AM, Chen Y, *et al.* (Effects of radiosensitivity and X-ray dose on miR-7 expression in nasopharyngeal carcinoma). *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2010; 30(8): 1810-1812, 1816. PMID: 20813671
- [102] Tan G, Tang X, Tang F. The role of microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol* 2015; 36(1): 69-79. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-014-2847-3> PMID: 25427638
- [103] Xu J, Ai Q, Cao H, Liu Q. MiR-185-3p and miR-324-3p predict radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma and modulate cancer cell growth and apoptosis by targeting SMAD7. *Med Sci Monit* 2015; 21: 2828-36. <http://dx.doi.org/10.12659/MSM.895660> PMID: 26390174
- [104] Tian Y, Yan M, Zheng J, *et al.* miR-483-5p decreases the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting DAPK1. *Lab Invest* 2019; 99(5): 602-11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-018-0169-6> PMID: 30664712
- [105] Duan B, Shi S, Yue H, *et al.* Exosomal miR-17-5p promotes angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma via targeting BAMBI. *J Cancer* 2019; 10(26): 6681-92. <http://dx.doi.org/10.7150/jca.30757> PMID: 31777597
- [106] Ni J, Bucci J, Malouf D, Knox M, Graham P, Li Y. Exosomes in Cancer Radioresistance. *Front Oncol* 2019; 9: 869. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2019.00869> PMID: 31555599
- [107] Guo Y, Zhu XD, Qu S, *et al.* Identification of genes involved in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by integrating gene ontology and protein-protein interaction networks. *Int J Oncol* 2012; 40(1): 85-92. PMID: 21874234
- [108] Zhang L, Su B, Sun W, *et al.* Twist1 promotes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(49): 81332-40. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.12875> PMID: 27793033
- [109] Zhang MX, Wang L, Zeng L, Tu ZW. LCN2 is a potential biomarker for radioresistance and recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Front Oncol* 2021; 10: 605777. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.605777> PMID: 33604288
- [110] Xiao J, He X. Involvement of non-coding RNAs in chemo- and radioresistance of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Manag Res* 2021; 13: 8781-94. <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S336265> PMID: 34849030
- [111] Zhang G, Zhang K, Li C, *et al.* Serum proteomics identify potential biomarkers for nasopharyngeal carcinoma sensitivity to radiotherapy. *Biosci Rep* 2019; 39(5): BSR20190027. <http://dx.doi.org/10.1042/BSR20190027> PMID: 31040200

DISCLAIMER: The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.

Chapitre II : Etude des biomarqueurs de la rاديوريسistance dans le NPC

I. Polymorphismes génétiques du gène *ERCC1* et leur association avec la réponse à la radiothérapie chez les patients marocains atteints du NPC.

Le cancer du nasopharynx (NPC) est une tumeur d'origine épithéliale qui se développe dans les cellules de la cavité supérieure du pharynx. Il a une répartition géographique très déséquilibrée, cette répartition géographique particulière du NPC représente une des caractéristiques de ce cancer. Le NPC est fréquent en Asie et en Afrique du nord avec une incidence de 65 866 nouveaux cas dans les zones de forte endémie (Asie de l'Est et Asie du Sud-Est) et de 3 525 nouveaux cas dans les pays d'Afrique du nord. Au Maroc, comme c'est le cas des autres pays nord africains, l'incidence du NPC est élevée (3–8 par 100,000 habitants).

En raison de la profonde localisation du nasopharynx, la majorité des patients atteints du NPC sont diagnostiqués à des stades localement avancés. Le NPC est l'un des cancers les plus sensibles aux rayonnements ionisants. En effet, la majorité des patients sont traités par radiothérapie, qui est largement considérée comme l'approche de traitement de référence.

En fait, les principaux problèmes rencontrés par les cliniciens après un traitement de radiothérapie sont la fibrose radio-induite, la toxicité et l'émergence de cellules tumorales radio-résistantes. En effet, et malgré que les techniques modernes de radiothérapie contribuent fortement au contrôle du NPC localisé, la survie des patients à long terme reste un obstacle majeur dans le traitement et la prise en charge de cette maladie.

À l'échelle moléculaire, la radiorésistance est la conséquence de nombreux changements génétiques et épigénétiques. Plusieurs études ont indiqué que la radiorésistance est due à certaines variations génétiques qui touchent des gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN. Les polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN peuvent altérer la fonction et l'efficacité du processus de réparation de l'ADN, permettant d'activer davantage le processus de réparation des lésions radio-induites et contribuer à la radiorésistance du cancer.

Nombreuses études ont démontré l'association entre les polymorphismes du gène *ERCC1* (excision repair cross complementing group 1) et la réponse au traitement. Parmi les différents polymorphismes du gène *ERCC1*, il y a les polymorphismes C8092A (rs3212986) et C118T (rs11615) qui peuvent être utiles comme biomarqueurs pour la prédiction de la réponse aux traitements.

De ce fait, l'identification de biomarqueurs moléculaires permettant de prédire la réponse tumorale à la radiothérapie est cruciale dans la rationalisation du traitement du NPC. Dans cette optique, la présente étude visait à évaluer la présence des polymorphismes C8092A (rs3212986) et de C118T (rs11615) SNP chez les patients marocains atteints du NPC et déterminer leur association avec la résistance au traitement par radiothérapie.

Chez un total de 95 patients avec NPC, la recherche des SNPs a été réalisée par PCR conventionnelle et séquençage. Les résultats ont montré que pour le polymorphisme *ERCC1* C8092A, les génotypes CC et CA ont été trouvés dans 51,6 % et 45,3 % des cas, respectivement, tandis que le génotype homozygote AA n'a été identifié que chez 3,1 % des cas. Pour le polymorphisme *ERCC1* C118T, le génotype CT hétérozygote a été identifié dans 49,5% des cas. Les génotypes homozygotes CC et TT ont été détectés dans 17,9% et 32,6% respectivement des cas de NPC. Il convient de noter qu'aucune association significative n'a été observée entre le polymorphisme *ERCC1* C8092A et la réponse à la radiothérapie ($p=0,81$). De même, il n'y avait pas d'association entre la réponse à la radiothérapie et la distribution allélique ($p=0,56$). Aussi, aucune corrélation n'a été observée ni avec les génotypes ($p=0,07$) ni avec les allèles ($p=0,09$) du polymorphisme *ERCC1* C118T et la réponse à la radiothérapie.

Les résultats de notre étude n'ont montré aucune association entre les polymorphismes du gène *ERCC1* et la réponse à la radiothérapie. La taille de la population de cette étude est relativement petite, ce qui peut réduire le pouvoir statistique pour détecter ces associations. Par conséquent, d'autres études avec une population plus grande devraient confirmer nos constatations.

RESEARCH ARTICLE

Editorial Process: Submission:05/08/2022 Acceptance:01/12/2023

Genetic Polymorphisms in *ERCC1* Gene and Their Association with Response to Radiotherapy in Moroccan Patients with Nasopharyngeal Carcinoma

Rajaa Benzeid^{1,2}, Amina Ghibid³, Nezha Tawfiq⁴, Nadia Benchakroun⁴, Karima Bendahhou⁴, Abdellatif Benider⁴, Amal Guensi⁵, Naima El Benna⁶, Abdelkarim Filali Maltouf², Mohammed Attaleb¹, Imane Chaoui¹, Meriem Khyatti³, Mohammed El Mzibri^{1*}

Abstract

Objective: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a severe malignant disease. Despite its low frequency, NPC is very common in North African population. Radiotherapy is the standard therapeutic treatment of NPC. However, radioresistance hampers the success of treatment. At the molecular scale, radioresistance is due to genetic variations involved in DNA repair pathways in NPC patients. Several studies reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in excision repair cross complementing group 1 (*ERCC1*) could be associated with radioresistance. In this optic, the present study aimed to evaluate the association between DNA repair gene polymorphisms *ERCC1* C8092A and *ERCC1* C118T and radiotherapy response of patients with NPC. **Methods:** A total of 95 patients with confirmed NPC were recruited at the Mohammed VI Center for Cancer Treatment, Casablanca - Morocco between 2016 and 2018. Two single nucleotide polymorphisms in *ERCC1* gene were genotyped. Multiple analysis software was used to assess the correlation between these SNPs and radio-therapeutic response. **Results:** Sequencing of *ERCC1* C8092A polymorphism revealed that CC and CA genotypes were found in 51.6% and 45.3% of cases, respectively, whereas the homozygote AA genotype was reported in only 3.1% of cases. For *ERCC1* C118T polymorphism, the heterozygote CT genotype was identified in 49.5% of cases. Homozygotes genotypes CC and TT were detected in 17.9% and 32.6% respectively of NPC cases. Of note, no significant association was found between the *ERCC1* C8092A polymorphism and response to radiation therapy ($p=0.81$). Similarly, there was no significant association between the response to radiotherapy and allelic distribution ($p=0.56$). Likewise, no correlation was observed neither with genotypes ($p=0.07$) nor with alleles ($p=0.09$) of *ERCC1* C118T polymorphism and response to radiation therapy. **Conclusion:** Our results clearly showed that *ERCC1* C8092A and *ERCC1* C118T polymorphisms were not associated with response to radiotherapy in Moroccan NPC patients. Large studies are warranted to confirm the role of these SNPs in therapeutic response of NPC patients.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma- *ERCC1* C8092A- *ERCC1* C118T- radioresistance- Morocco

Asian Pac J Cancer Prev, 24 (1), 93-99

Introduction

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a unique squamous-cell tumor arising from the epithelial cell lining of the nasopharynx (Guo et al., 2019). This malignancy is a common type of cancer in Southeast Asia and a leading cause of death (Lee et al., 2019). Morocco, as other North African countries, has an intermediate incidence of NPC (3–8 per 100,000 inhabitants) and the majority of NPC patients are diagnosed at an advanced stage

due to its deep anatomy (Renaud et al., 2020). Given its exquisitely sensitivity to radiation, NPC is mainly treated with radiotherapy, which is largely reported as the gold standard treatment approach (Chua et al., 2019). Moreover, concordant reports suggest that patients diagnosed at an early stage of the disease had a complete remission (Luftig., 2013).

Actually, the main problems faced by clinicians after radiotherapy treatment are the radiation-induced fibrosis, toxicity and the emergence of radio-resistant tumor cells.

¹Biology and Medical Research Unit, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco. ²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Rabat, Morocco. ³Laboratory of Viral Oncology, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco. ⁴Mohammed VI Center for Cancer Treatment, Ibn Rochd University Hospital, Casablanca, Morocco. ⁵Nuclear Medicine Department, Ibn Rochd University Hospital, Hassan II University, Casablanca, Morocco. ⁶Department of Radiology, Ibn Rochd University Hospital, Hopital 20 Août, Casablanca, Morocco. *For Correspondence: mzibri@yahoo.com

Indeed, and despite the excellent control with modern radiotherapy techniques, some NPC patients have partial remission and develop local recurrence and distant metastasis, which hampers the treatment success (Yuan et al., 2016).

Currently, many studies are underway to investigate the biological mechanisms involved in carcinogenesis and how they affect radiation response. Of note, these genetic alterations can impact tumor sensitivity to radiotherapy (Riou et al., 2019). Scientific evidences have shown that radiotherapy induce DNA damage in tumor by breaking single-strand (SSBs) and double-strand (DSBs) DNA and also carries damage on nucleotides before their incorporation in DNA strands (He et al., 2018). Hence, many DNA-repair pathways are used to repair DNA damages and to maintain cell and tissue homeostasis, including base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) (Klinakis et al., 2020). In contrast, these DNA-repair pathways represent a potential mechanism of cancer resistance to radiation induced DNA damages and radiotherapy (Ferreira and Dutreix., 2019). Extensive studies have shown that radio-resistance is the consequence of some single nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting genes involved in DNA reparation (Hirakawa et al., 2020), paving the way for new investigations highlighting novel genetic biomarkers that could be used as efficient prognostic tools or as therapeutic targets.

NER is the predominant DNA damage repair pathway and the excision repair cross complementing group 1 (*ERCC1*) gene plays a key role in NER pathway to recognize DNA damage in the initial repair stage and to ensure an efficient DNA repair (Obiedat et al., 2018). Many investigations have highlighted the association between SNPs of *ERCC1* gene and platinum-based therapy efficacy in ovarian, colorectal and gastric cancers and have shown the interest to use this biomarker to predict clinical outcomes of platinum-based chemotherapy (Abyarghamsari et al., 2019).

Among the different *ERCC1* polymorphisms, many studies indicated that C8092A (rs3212986) and C118T (rs11615) SNPs may be useful as effective biomarkers for clinical outcomes prediction and for targeted therapy approach for better management of various cancers (Chen et al., 2017).

ERCC1 C8092A (rs3212986) SNP is a substitution of cytosine by adenine, located on the 3' untranslated region of the *ERCC1* gene (Shen et al., 1998) involved in the translational repression of *ERCC1* mRNA (Jin et al., 2014) and affecting *ERCC1* mRNA stability (Zhou et al., 2004). *ERCC1* rs3212986 polymorphism was reported to predict fair survival outcome in Japanese patients with

pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma (Hirakawa et al., 2020), it was also suggested as a potential biomarker to predict smoking related lung cancer (Yu et al., 2018).

C118T (rs11615) SNP in the *ERCC1* gene, located at exon 4 and lead to AAC/AAT change at position 118 (Ding et al., 2015). Interestingly, C118T SNP is associated with differential mRNA levels (Park et al., 2003) and higher levels of the enzyme's expression could decrease the response to the chemotherapy regimens containing platinum drugs (Wamecke-Eberz et al., 2009). In this field, many studies have been conducted on the evaluation of the effect of polymorphism of *ERCC1* in carcinogenesis and response to chemotherapy regimens and have reported that this polymorphism is a useful marker to predict response to chemotherapy and survival in subjects living with osteosarcoma (Biaison et al., 2012), colorectal (Yin et al., 2011) and gastric (Abyarghamsari et al., 2019) cancers.

In this context, growing interest is given to evaluate the association between *ERCC1* SNPs and radio-resistance and how they can influence individual variations to radiotherapy response. Thus, the present study was planned to assess the presence of C8092A (rs3212986) and C118T (rs11615) SNPs in Moroccan patients with NPC and to determine their association with resistance to radiotherapy treatment.

Material and Methods

Study population

Ninety-five NPC patients were diagnosed and recruited between 2016 and 2018 at Mohammed VI Center for Cancer Treatment, Casablanca, Morocco. Patients were mainly from Casablanca and neighboring regions. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd University Hospital, Casablanca - Morocco and written informed consent was obtained from each recruited patient.

Genotyping Conditions

Genomic DNA was prepared from peripheral blood leucocytes using phenol chloroform method and quantified utilizing NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). *ERCC1* C8092A and C118T SNPs screening was carried out by PCR amplification and DNA sequencing. For PCR amplification, primers flanking the regions containing *ERCC1* C8092A and C118T SNPs are reported in Table 1.

PCR amplification was performed in a total volume of 25µl, containing 1X PCR buffer, 0.2µM of each dNTP, 0.2mM of each primer, 0.5U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 100ng of genomic DNA. Amplification mixtures were first denatured at 94°C for

Table 1. Primers for PCR Amplification

Gene/ SNP	Primer sense	Primer sequence	Tm °C	Fragment length (Bp)
ERCC1 C118T	For	5'-AGGAGGGCCCTGTGGTTATC-3'	48	265
	Rev	5'-AGGCTTCTCATAGAAC-3'		
ERCC1 C8092A	For	5'-AGTCTCTGGGGAGGGATTCT-3'	56	204
	Rev	5'-ACAGTGCCCCAAGAGGAGAT-3'		

7 min. Then, 40 cycles of PCR were performed with denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at the corresponding T_m for 30 s and primer extension at 72°C for 30 s. At the end of the last cycle, the mixtures were incubated at 72°C for 7 min. For every reaction, a negative control, in which DNA template was omitted from the amplification mixture, was included. After amplification, PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels followed by staining with ethidium bromide (10 mg/ml).

PCR products were purified using ExoSAP-IT® clean up system (USB, USA) to eliminate unincorporated primers and dNTPs. Direct sequencing was performed on an ABI 3130XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), using the same primers that served for PCR and BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), according to manufacturer's protocol. Briefly, sequencing reactions were performed in a final volume of 10 µl, containing 200 ng of purified PCR product, 1 µl of 2.5X Big Dye ready reaction mix and 10 pmol of the specific primer. The sequencing mixtures were incubated at 95°C for 1 min and 25 cycles were performed as: denaturation at 95°C for 10 s, primer annealing at 50°C for 5 s and extension at 60°C for 4 min. Sequencing products were finally purified using sephadex G-50 gel-exclusion chromatography (GE Healthcare Life Sciences) to eliminate the excess of unincorporated labeled ddNTPs. Obtained sequences were analyzed using BioEdit Sequence Alignment Editor and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Data and statistical analyses

Radioresistant/ radiosensitive status was attributed based on the clinical evolution of patients treated with radiotherapy. Indeed, cured cases after the follow up period of six months were considered radiosensitive. In contrast, radio-resistance status was attributed to NPC cases that relapsed, developed local or distant disease within the first six months following the radiotherapy treatment.

All statistical analyses were carried out using SPSS for Windows, version 22 (SPSS Inc, Chicago) to detect the association between the genotyping results and the response to radiotherapy. p values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Characteristics of the study Population

Characteristics and clinico-pathological parameters of the 95 studied NPC patients are summarized in Table 2. The mean age of patients was 44.1 with extreme ages of 12 and 82 years old. Among patients, 60% (57/95) were males and 40% (38/95) were females, with a sex ratio of 1.57. Most of them have not a consanguineous marriage (90.6%) or familial antecedents of any type of cancer (78.9%). Overall, 46.3% of cases had a rural childhood habitat; most of them were not smokers (70.5%) and not alcohol consumers (93.8%).

Histologically, the majority of NPC patients showed

non-keratinizing undifferentiated tumors (93.7%). Clinical stages of NPC were classified according to the Union for International Cancer Control /American Joint Committee on Cancer (UICC/AJCC) TNM (tumor-node-metastasis) staging system, version 7. Accordingly, 81.1% (77/95) of patients with NPC were diagnosed at advanced stages (III and IV) and 18.9% (18/95) at an earlier disease stage (I and II).

ERCC1 polymorphisms in population study

Successful amplification and sequencing targeting ERCC1 polymorphisms (C8092A and C118T) was obtained for all 95 NPC patients and results of genotypic and allelic frequencies distribution are reported in Table 3. For C8092A SNP, genotypes CC and CA prevail and were found in 51.6% (49/95) and 45.3% (43/95) of cases, respectively, whereas the homozygote AA genotype was found in only 3.1% of cases (3/95). Accordingly, analysis of allelic frequency showed that C8092 allele found in 74.2% of cases was predominant whereas allele A8092 was found in only 25.8% of cases.

For C118T SNP, the heterozygote CT genotype prevails and was reported in 49.5% (47/95) of NPC cases.

Table 2. Socio-Economic and Clinical Characteristics of Recruited NPC Patients

Variables	N	%
Gender		
Male	57	60
Female	38	40
Age		
≤ 30 years	23	24.2
> 30 years	72	75.8
Consanguinity		
No	86	90.6
Yes	9	9.4
Familial antecedent		
No	75	78.9
Yes	20	21.1
Childhood habitat		
Rural	44	46.3
Urban	51	53.7
Smoking status		
Smokers	28	29.4
Non Smokers	67	70.6
Alcohol consumption		
Drinkers	6	6.2
Non drinkers	89	93.8
Clinical stages		
Stage I and II	18	18.9
Stage III and IV	77	81.1
Histological type		
Keratinizing tumors	1	1.1
Non-keratinizing tumors	5	5.2
Non-keratinizing undifferentiated tumors	89	93.7

Table 3. Distribution of C8092A and C118T Genotypes in NPC Cases

SNPs		C8092A		C118T		
N (%)		N	%	N	%	
Genotypes	C/C	49	51.6	C/C	17	17.9
	C/A	43	45.3	C/T	47	49.5
	A/A	3	3.1	T/T	31	32.6
Alleles	C	141	74.2	C	81	42.4
	A	49	25.8	T	109	57.6

Homozygotes genotypes CC and TT were reported in 17.9% (17/95) and 32.6% (31/95) of cases, respectively. Analysis of allelic frequency showed that C allele was present in 42.4% of cases and T allele in 57.6% of cases.

Correlation between ERCC1 polymorphisms distribution and clinico-pathological parameters of NPC patients

The distribution of ERCC1 SNPs C8092A and C118T genotypes in the 95 NPC cases according to clinical stages of NPC is reported in Table 4. For C8092A SNP, C/C genotype prevails in early carcinoma stages (stages I and II) and was detected in 66.7% of patients, C/A genotype was detected in only 33.3% of NPC patients, with an absence of A/A genotype. In advanced stages of NPC (stages III and IV), C/C, C/A and A/A genotypes were detected in 48.1%, 48% and 3.9% of patients, respectively. Statistical analysis did not show any significant association between ERCC1 C8092A SNP and NPC clinical stages ($p=0.202$). Similarly, in terms of alleles distribution, no significant association was obtained between C/A alleles and NPC clinical stages ($p=0.161$).

Regarding ERCC1 C118T SNP, no significant difference was found between clinical stage and genotype

distribution ($p=0.994$) and allele frequencies ($p=0.740$). CC, CT and TT genotypes as well as C and T alleles were found with same frequencies in early and advanced stages.

Correlation between ERCC1 Polymorphisms distribution and clinical evolution of NPC patients

Among the 95 studied patients, 63 were treated with radiotherapy and clinical evolution was available for only 61 of them; 2 patients were treated in the private sector and their outcomes were not available.

Table 5 sets out the association between ERCC1 SNPs C8092A and C118T genotypes and response to radiotherapy. For ERCC1 C8092A polymorphism, homozygous CC and heterozygous CA genotypes prevail in both radio-resistant and radiosensitive cases. In the same way, C and A alleles were reported globally with the same frequencies in radio-resistant and radio-sensitive cases. Statistical analyses showed no significant association between the radio-resistance status and, C8092A genotypes ($p=0.81$) and allelic frequencies ($p=0.56$).

For C118T SNP, CT genotype prevails in radio-resistant cases (60.4%, 32/53) and TT in radiosensitive cases (62.5%, 5/8). A borderline significance was obtained

Table 4. Association between ERCC1 SNPs and Clinical Stages

Clinical stages	N	C8092A						
		Genotypes			Alleles			
		CC (%)	CA (%)	AA (%)	p	C(%)	A(%)	p
Stage I and II	18	12 (66.7)	6 (33.3)	0 (0)		30 (83.3)	6 (16.7)	
Stage III and IV	77	37 (48.1)	37(48)	3 (3.9)	0.202	111 (72.1)	43 (27.9)	0.161
		C118T						
		CC (%)	CT(%)	TT(%)	p	C(%)	T(%)	p
Stage I and II	18	3 (16.7)	9 (50)	6 (33.3)		15 (41.7)	21(58.3)	
Stage III and IV	77	14 (18.2)	38 (49.3)	25 (32.5)	0.994	66 (42.9)	88 (57.1)	0.74

Table 5. Association between ERCC1 Polymorphisms and Radiotherapy Response

Clinical outcome	N	Genotypes				Alleles		
		C8092A						
		CC (%)	CA (%)	AA (%)	p	C (%)	A (%)	p
Radiosensitive	53	25 (47.1)	27 (51)	1 (1.9)	0.81	77 (72.6)	29 (27.4)	0.56
Radioreistant	8	4 (50)	4 (50)	0		12 (75)	4 (25)	
		C118T			p			p
		CC (%)	CT (%)	TT (%)		C (%)	T (%)	
Radiosensitive	53	9 (17)	32 (60.4)	12 (22.6)	0.07	50 (47.2)	56 (52.8)	0.091
Radio-resistant	8	1 (12.5)	2 (25)	5 (62.5)		4 (25)	12 (75)	

between *ERCC1* C118T polymorphism genotypes and radio-resistance status ($p=0.07$). Similarly, a borderline association was found between radio-resistance status and allelic frequency ($p=0.091$), as T allele prevails in radiosensitive cases.

Discussion

Worldwide, due to a significant difference between patients, the efficacy of radiotherapy is the main challenge that physicians encounter when treating NPC patients (Yeh et al., 2021). Within this frame, the identification of biomarkers that can predict radiation sensitivity and/or clinical outcomes will enable NPC patients to benefit from a personalized therapy. Many studies in the last few decades have reported that SNPs in DNA repair genes could be correlated with radiotherapy response in a variety of cancers, including non-small cell lung cancer (NSCLC) (Jiang et al., 2021), rectal cancer (Qin et al., 2015), breast cancer (Lee et al., 2020), head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) (Jin et al., 2014) and NPC (Borchiellini et al., 2017).

In the present study, the interest was particularly given to *ERCC1* C8092A (rs321986) and *ERCC1* C118T (rs11615), which have been shown to be contributing factors in the development of NPC (Yang et al., 2009). Our findings revealed that both *ERCC1* SNPs are not significantly associated with NPC clinical stages as they were found in both early and advanced stages. Our results are consistent with previous research conducted on 267 NPC patients and 304 cancer-free controls in the Southwest Chinese population, indicating that the single nucleotide polymorphism *ERCC1* C8092A is not associated with clinical stage. Moreover, Yang et al. have reported that *ERCC1* C8092A genotypic frequencies in early stages of NPC were not significantly different from those in advanced stages ($P > 0.05$) (Yang et al., 2009). Furthermore, Yang et al. reported that *ERCC1* C8092A genotypic frequencies in early stages of NPC were not significantly different from those in advanced stages ($P > 0.05$) (Yang et al., 2009).

The role of *ERCC1*, as a key element of the NER pathway, in DNA damage recognition and repair has been largely explored along with response to chemotherapy but, to the best of our knowledge, its association with radio-resistance in NPC is poorly studied. Molecular exploration showed that *ERCC1* C8092A SNP was found in both radio-resistant and radiosensitive cases. Statistical analysis showed no significant association between the radio-resistance status and, *ERCC1* C8092A genotypes ($p=0.81$) and allelic frequencies ($p=0.56$). These results are in agreement with a previously study conducted by Du et al., 2018 highlighting that *ERCC1* C8092A SNP was not correlated with the radio-therapeutic response in Chinese lung cancer patients treated with intensity modulated radiation therapy.

Similarly, no significant association was observed between *ERCC1* C8092A SNP and response to chemotherapy treatment. In a meta-analysis, including 2097 patients with NSCLC who received platinum-based chemotherapy, the correlation between *ERCC1* C8092A

polymorphism and response to treatment did not show any significant association (Yin et al., 2011). Consistent with these findings, another meta-analysis including 44 published studies reporting no significant association between *ERCC1* C8092A polymorphism and response to platinum-based chemotherapies in 5944 NSCLC patients, further supports our results, (Huang et al., 2014). Chen et al identified *ERCC1* C8092A genotype as an independent predictor of poor progression free survival (PFS) (HR, 1.63; 95% CI, 1.08- 2.61; P , 5.047) in 101 NPC patients treated with cisplatin-based chemotherapy (Chen et al., 2013). In addition, Jin et al. found that *ERCC1* C8092A polymorphism was correlated with PFS in 75 nasopharyngeal carcinoma patients who received either radiotherapy alone or chemo-radiotherapy (Jin et al., 2014).

Interestingly, a recent study showed that patients with HNSCC exhibiting the *ERCC1* 8092 (C/A+A/A) genotype, treated with chemo-radiotherapy (CRT), had significantly poorer survival rate than those with *ERCC1* 8092 C/C genotype, highlighting the opportunity of using this SNP as an independent predictor of CRT response and patients survival outcomes (Hirakawa et al., 2020).

Of particular interest, a borderline association was found between *ERCC1* C118T SNP and radio-resistance status among Moroccan NPC patients. Worldwide, the association between *ERCC1* C118T SNP and chemo-and/or radio-therapy outcome is well documented and discussed in different cancers. In this field, Jiang et al. have shown that this SNP can play an important role in the prediction of radiotherapy sensitivity and prognosis of NSCLC (Jiang et al., 2021). Indeed, NSCLC patients carrying the C allele (CC or CT genotypes) had a significantly better survival compared to those bearing the T allele (TT genotype) (30.9 vs. 16.2 months; $P=0.003$). These results were confronted by finding of Du et al. reporting a significant association between *ERCC1* C118T genotypes and radiotherapy outcomes in lung (Du et al., 2018) and esophageal cancer patients (Warnecke-Eberz et al., 2009). Of particular interest, Carles et al., have highlighted the role of *ERCC1* C118T SNP as a marker for response to radiotherapy in Spanish patients with Stage I to II head-and-neck cancer, widening the range of application of this SNP to predict clinical stage as well as radio-therapeutic status. Conversely, Wang et al., by following 176 patients of NSCLC treated with radio-chemotherapy, didn't observe any significant relation between *ERCC1* C118T SNP and treatment outcomes.

In the same way, several studies have shown that the *ERCC1* C118T SNP is a valuable biomarker for responses to chemotherapeutic drugs, particularly cisplatin, with a high predictive value for platinum-based chemotherapy in patients with late-stage bladder cancer (Xu et al., 2016), ovarian malignancies (Vella et al., 2011), and patients at advanced NSCLC (Dong et al., 2012; Wei et al., 2011). In the present study, the borderline significance observed between radio-resistance status and, SNP genotypes and allelic frequencies may be mainly due to the low sample size and the restricted number of studied SNPs in *ERCC1* gene.

To the best of our knowledge, this is the first study
Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 24 97

investigating the role of DNA excision repair gene *ERCC1* polymorphisms in patients with NPC and results are very informative: (1) *ERCC1* C8092A and *ERCC1* C118T genotypes were found in both early and advanced disease stages, with no significant difference; (2) *ERCC1* C8092A SNP was not found to be significantly associated with radio-resistance status; (3) Borderline significances were obtained between radio-resistance status and, *ERCC1* C118T genotypes ($p=0.07$) and allelic frequencies, which need to be confirmed on a larger sample size to get conclusive results.

The main limitations of the study are the relatively small sample size and lack of additional patient's information that could be of interest for more explorations. Moreover, the follow-up period of most patients did not exceed three years, which is not enough to estimate appropriately clinical evolutions, patients' outcomes and PFS.

Author Contribution Statement

Concept: M.A., M.E.M., M.K.; Design: M.A., M.E.M., N.T., N.B.; Supervision: I.C., M.K.; Material: R.B., A.Gi., I.C.; Data collection &/or processing: A.Gi., A.Gu., A.B., K.B., N.E.B.; Analysis and/or interpretation: R.B., M.A.; Literature search: R.B., M.A.; Writing: R.B., I.C., M.E.M.; Critical review: A.F.M., M.A.; M.K

Acknowledgements

The authors are grateful to Mohammed VI Center for Cancer Treatment staff for patients' recruitment, blood collection and patients' follow up.

Funding statement

This study was funded by the Institut de Recherche sur le Cancer (IRC) Ref: 201932.

Scientific Body approval

The present study is part of a student thesis and was approved by the doctoral committee of Mohammed V University.

Ethical approval

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Morocco on November, 2017.

Availability of data (if apply to your research)

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. The datasets used and/or analyzed during the current study will be made available from the corresponding author on request.

Conflict of interest

None declared.

References

Abyarghamsari M, Hosseini Shirazi F, Tavakoli-Ardakani

- M, et al (2019). Study of the Relationship between *ERCC1* Polymorphisms and Response to Platinum-based Chemotherapy in Iranian Patients with Colorectal and Gastric Cancers. *Iran J Pharm Res*, **18**, 2163-71.
- Abyarghamsari M, Shirazi FH, Tavakoli-Ardakani M, et al (2019). Study of the relationship between *ercc1* polymorphisms and response to platinum-based chemotherapy in Iranian patients with colorectal and gastric cancers. *IJPR*, **18**, 2163.
- Biason P, Hattinger CM, Innocenti F, et al (2012). Nucleotide excision repair gene variants and association with survival in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Pharmacogenomics J*, **12**, 476-83.
- Borchiellini D, Etienne-Grimaldi MC, Bensadoun RJ, et al (2017). Candidate apoptotic and DNA repair gene approach confirms involvement of *ERCC1*, *ERCC5*, *TP53* and *MDM2* in radiation-induced toxicity in head and neck cancer. *Oral Oncol*, **67**, 70-6.
- Carles J, Monzo M, Amat M, et al (2006). Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **66**, 1022-30.
- Chen C, Wang F, Wang Z, et al (2013). Polymorphisms in *ERCC1* C8092A predict progression-free survival in metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma treated with cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, **72**, 315-22.
- Chen J, Sun N, Hu G, et al (2017). Association of *ERCC1* Polymorphisms with the Risk of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **27**, 267-75.
- Chua ML, Sun Y, Supiot S (2019). Advances in nasopharyngeal carcinoma-"West meets East". *Br J Radiol*, **92**, 20199004.
- Ding YW, Gao X, Ye DX, et al (2015). Association of *ERCC1* polymorphisms (rs3212986 and rs11615) with the risk of head and neck carcinomas based on case-control studies. *Clin Transl Oncol*, **17**, 710-9.
- Dong J, Hu Z, Shu Y, et al (2012). Potentially functional polymorphisms in DNA repair genes and non-small-cell lung cancer survival: a pathway-based analysis. *Mol Carcinog*, **51**, 546-52.
- Du L, Yu W, Dai X, et al (2018). Association of DNA repair gene polymorphisms with the risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients. *Oncotarget*, **9**, 958-68.
- Ferreira S, Dutreix M (2019) DNA repair inhibitors to enhance radiotherapy: Progresses and limitations. *Cancer Radiother*, **23**, 883-90.
- Guo R, Mao YP, Tang LL, et al (2019). The evolution of nasopharyngeal carcinoma staging. *Br J Radiol*, **92**, 20190244.
- He Y, Jing Y, Wei F, et al (2018). Long non-coding RNA PVT1 predicts poor prognosis and induces radioresistance by regulating DNA repair and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*, **9**, 235.
- Hirakawa H, Ikegami T, Azechi S, et al (2020). *ERCC1* C8092A polymorphism predicts fair survival outcome in Japanese patients with pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **277**, 601-10.
- Huang D, Zhou Y (2014). Nucleotide excision repair gene polymorphisms and prognosis of non-small cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: A meta-analysis based on 44 studies. *Biomed Rep*, **2**, 452-62.
- Jiang C, Guo Y, Li Y, et al (2021). The association between the *ERCC1/2* polymorphisms and radiotherapy efficacy in 87 patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, **13**, 3126-36.
- Jin H, Xie X, Wang H, et al (2014). *ERCC1* Cys8092Ala and *XRCC1* Arg399Gln polymorphisms predict progression-

- free survival after curative radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, **9**, e101256.
- Klinakis A, Karagiannis D, Rampias T (2020). Targeting DNA repair in cancer: current state and novel approaches. *Cell Mol Life Sci*, **77**, 677-703.
- Lee E, Eum SY, Slifer SH, et al (2020). Association Between Polymorphisms in DNA Damage Repair Genes and Radiation Therapy-Induced Early Adverse Skin Reactions in a Breast Cancer Population : A Polygenic Risk Score Approach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **106**, 948-57.
- Lee HM, Okuda KS, González FE, Patel V (2019). Current Perspectives on Nasopharyngeal Carcinoma. *Adv Exp Med Biol*, **1164**, 11-34.
- Luftig M (2013). Heavy LIFTing: tumor promotion and radioresistance in NPC. *J Clin Invest*, **123**, 4999-5001.
- Obiedat H, Alrabadi N, Sultan E, Al Shatti M, Zihlif M (2018). The effect of ERCC1 and ERCC2 gene polymorphisms on response to cisplatin based therapy in osteosarcoma patients. *BMC Med Genet*, **19**, 112.
- Park DJ, Zhang W, Stoecklacher J, et al (2003). ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, **1**, 162-6.
- Qin CJ, Song XM, Chen ZH, et al (2015). XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. *Oncotarget*, **6**, 32193-204.
- Renaud S, Lefebvre A, Mordon S, Morales O, Delhem N (2020). Novel Therapies Boosting T Cell Immunity in Epstein Barr Virus-Associated Nasopharyngeal Carcinoma. *Int J Mol Sci*, **21**, 4292.
- Riou O, Bourcier C, Brengues M, et al (2019). Outils pour la prédiction de la réponse tumorale et des tissus sains en oncologie radiothérapie [Predictive assays for responses of tumors and normal tissues in radiation oncology]. *Cancer Radiother*, **23**, 666-673.
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*, **58**, 604-8.
- Vella N, Aiello M, Russo AE, et al (2011). 'Genetic profiling' and ovarian cancer therapy (review). *Mol Med Rep*, **4**, 771-7.
- Wang C, Nie H, Li Y, et al (2016). The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. *Sci Rep*, **6**, 26526.
- Warnecke-Eberz U, Vallböhmer D, Alakus H, et al (2009). ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg*, **13**, 1411-21.
- Wei SZ, Zhan P, Shi MQ, et al (2011). Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Med Oncol*, **28**, 315-21.
- Xu ZC, Cai HZ, Li X, et al (2016). ERCC1 C118T polymorphism has predictive value for platinum-based chemotherapy in patients with late-stage bladder cancer. *Genet Mol Res*, **15**.
- Yang ZH, Dai Q, Kong XL, Yang WL, Zhang L (2009). Association of ERCC1 polymorphisms and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog*, **48**, 196-201.
- Yeh, SA, Hwang TZ, Wang CC, et al (2021). Outcomes of patients with nasopharyngeal carcinoma treated with intensity-modulated radiotherapy. *J Radiat Res*, **62**, 438-47.
- Yin M, Liao Z, Huang YJ, et al (2011). Polymorphisms of homologous recombination genes and clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. *PLoS One*, **6**, e20055.
- Yu T, Xue P, Cui S, et al (2018). Rs3212986 polymorphism, a possible biomarker to predict smoking-related lung cancer, alters DNA repair capacity via regulating ERCC1 expression. *Cancer Med*, **7**, 6317-30.
- Yuan L, Yi HM, Yi H, et al (2016). Reduced RKIP enhances nasopharyngeal carcinoma radioresistance by increasing ERK and AKT activity. *Oncotarget*, **7**, 11463-77.
- Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, et al (2004). Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*, **10**, 4939-43.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

L'association entre les polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN et l'efficacité de la radiothérapie chez les patients atteints du NPC

Le cancer du nasopharynx (NPC) constitue un grand problème de santé publique. Il est très répandu dans les pays d'Afrique du Nord. C'est un cancer qui est connu par son mauvais pronostic. De plus, la majorité des patients présentent des stades localement avancés ou des métastases à distance (80 %).

La radiothérapie est une modalité indispensable dans les stratégies thérapeutiques mises en œuvre pour traiter de nombreux cancers incluant le cancer du nasopharynx. Par son effet direct ou indirect sur l'ADN nucléaire, la radiothérapie permet la destruction des cellules tumorales. Cependant, la radiorésistance est l'une des causes majeures d'échec thérapeutique engendrant des rechutes et des métastases à distance.

Au cours de ces dernières décennies, plusieurs études ont montré que la radiosensibilité des cellules tumorales est sous un contrôle génétique. En effet, un grand nombre d'études ont montré que les altérations génétiques et épigénétiques induisent des changements au niveau des protéines de réparation de l'ADN conduisant ainsi à une réduction de la radiosensibilité des patients atteints du NPC face aux rayonnements ionisants, ce qui peut induire une radiorésistance.

De nombreux polymorphismes génétiques au niveau des gènes de réparation de l'ADN se sont avérés être non seulement associés au risque de survenue du cancer du nasopharynx, mais également impliqués dans la réponse à la radiothérapie. Les deux polymorphismes *XRCC1* Arg399Gln (rs25487) et *XRCC3* Thr241Met (rs861539) sont étroitement liés aux réponses des patients avec NPC à la radiothérapie.

De ce fait, ce présent travail consistera à évaluer la présence des polymorphismes des gènes de réparation de l'ADN *XRCC1* Arg399Gln (rs25487) et *XRCC3* Thr241Met (rs861539) dans une population de 102 patients atteints du NPC recrutés au centre Mohammed VI pour le traitement des cancers, et à étudier l'association entre ces polymorphismes et la réponse des patients à la radiothérapie.

Les résultats ont révélé que les génotypes et les allèles des deux polymorphismes nucléotidiques n'ont aucune association significative avec les stades cliniques (pour *XRCC1* Arg399Gln p (génotype) = 0,559; p (allèle) = 0,440) et (pour *XRCC3* Thr241Met p (génotype) = 0,638; p (allèle) = 0,567). De plus, l'association entre la réponse à la radiothérapie, les génotypes et les

allèles n'était pas statistiquement significative (pour *XRCC1* Arg399Gln p (génotype) = 0,583; p (allèle) = 0,459) et (pour *XRCC3* Thr241Met p (génotype) = 0,660; p (allèle) = 0,590).

La présente étude suggère que les polymorphismes *XRCC1* Arg399Gln et *XRCC3* Thr241Met n'ont aucun impact sur la réponse radiothérapeutique chez les patients NPC marocains. Cependant, des études sur une grande population sont nécessaires pour confirmer nos résultats.

Introduction: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes are mainly correlated with the response to radiotherapy in nasopharyngeal cancer (NPC). In NPC patients, previous research has studied the association between X-ray repair cross-complementing group 1 and 3 (XRCC1 and XRCC3) polymorphisms and radio-therapeutic response. The objective of our study was to test the association between XRCC1 Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met polymorphisms and the response to radiotherapy in the NPC Moroccan population.

Material and methods: A total of 100 patients with NPC were genotyped for polymorphisms in XRCC1 and XRCC3 genes.

Results: The results revealed that the genotypes and alleles of both SNPs did not show any significant association with clinical stages (for XRCC1 Arg399Gln: p [genotype] = 0.559; p [allele] = 0.440) and (for XRCC3 Thr241Met: p [genotype] = 0.638; p [allele] = 0.567). Moreover, in the study of the association between the polymorphisms and radiotherapy, the response to radiation therapy between genotypes and alleles was not statistically significant (for XRCC1 Arg399Gln p [genotype] = 0.583; p [allele] = 0.459) and (for XRCC3 Thr241Met p [genotype] = 0.660; p [allele] = 0.590).

Conclusions: The present study suggests that XRCC1 Arg399Gln polymorphism does not have any impact on the radio-therapeutic response in Moroccan NPC patients whereas XRCC3 Thr241Met polymorphism may act as a prognostic indicator for NPC patients treated with radiotherapy. However, studies with a larger sample are needed to confirm our results.

Key words: NPC, radioresistance, SNPs, radiotherapy, polymorphisms.

Contemp Oncol (Pozn) 2023; 27 (1): 28–34
DOI: <https://doi.org/10.5114/wo.2023.127307>

Association between single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and the efficacy of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma patients

Rajaa Benzeid^{1,2}, Amin Gihbid³, Nezha Tawfik⁴, Nadia Benchakroun⁴, Karima Bendahhou⁴, Abdellatif Benider⁴, Amal Guensi⁴, Naima El Benna⁴, Abdelkarim Filali Maltouf², Mohammed El Mzibri¹, Mohammed Attaleb¹, Meriem Khyatti³, Imane Chaoui¹

¹Biology and Medical Research Unit, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco

²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Rabat, Morocco

³Laboratory of Viral Oncology, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

⁴Mohammed VI Centre for Cancer Treatment, Ibn Rochd University Hospital, Casablanca, Morocco

Introduction

According to global cancer statistics, nasopharyngeal cancer (NPC) is a rare disease, but it poses a great health problem in some regions, including Southeast Asia, Africa, and the Arctic [1]. In Morocco, the annual incidence of NPC is estimated at 1.8%; the majority of patients are diagnosed with locally advanced disease or distant metastasis (80%), and more than 90% of metastatic cases die [2].

Worldwide, the deep anatomic localization of NPC and its late diagnosis limit therapeutic approaches, and radiotherapy is still the main and the most effective treatment of NPC [3]. Scientific evidence has shown that radiotherapy destroys tumour cells by acting directly on the DNA (direct effect), and indirectly by free radicals generated by ionization leading to DNA base lesion (indirect effect) [4]. This DNA injury eventually impacts cell proliferation and changes the cell cycle, inducing cellular apoptosis or activating death pathways [5].

The most important challenge is to overcome radioresistance, considered as the main cause of local recurrence and distant metastasis [6]. In the last decade, research into the molecular basis of radiation response in tumours has improved our understanding of radioresistance, and data clearly shows that radioresistance is mainly due to genetic variations involved in DNA repair pathways. As response to radiotherapy, tumour cells activate a series of complex reactions to survive [7].

Overall, four principal DNA repair pathways occur in cancer cells: mismatch repair, double strand base (DSB) repair, nucleotide excision repair, and base excision repair (BER), being the central DNA repair mechanism to maintain the genome integrity [8]. In this system, two genes, X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) and 3 (XRCC3), play a key role in DNA repair and are considered as important factors in damage signalling and recovery [9].

XRCC1 gene located on 19q13.2, comprising 17 exons and 16 introns, encodes a DNA repair protein that plays a key role in BER pathway by repairing DNA single-strand breaks [10–12]. XRCC1 was the first gene reported to impact cell sensitivity to ionization radiation [13]. The XRCC3 gene located on 14q32.3,

Table 1. Primer sequences used for of XRCC1 and XRCC3 single nucleotide polymorphism genotyping

SNP		Primer sequence	Tm (°C)	Amplicon size (Bp)
XRCC1 Arg399Gln	F	5'-GATCACACCTAACTGGCATCTTC-3'	54	265
	R	5'-CTGGGACCACCTGTGTTC-3'		
XRCC3 Thr241Met	F	5'-GGTCGAGTGACAGTCCAAAC-3'	58	449
	R	5'-AGCAACGGCTGAGGGTCTT-3'		

SNP – single nucleotide polymorphisms

covering 10 exons and 9 introns, encodes for the enzyme that participates in DNA DSB repair [10, 11]. Several studies have reported an association between genetic modification of *XRCC1* and *XRCC3* and the response to radiotherapy in various cancers, including rectal cancer, cervical cancer, breast cancer, and lung cancer [14–19]. In NPC, growing attention has been paid to the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in DNA repair genes and the response to radiotherapy. In this field, many studies have reported that SNPs in *XRCC1* and *XRCC3* may act as potential biomarkers for predicting radiosensitivity.

Despite the growing number of studies investigating the predictive role of these SNPs in NPC radiotherapy, the results are still controversial. Recently, Gong *et al.* highlighted the need of more genetic association studies related to radiation-based treatment to support the interest of considering XRCC SNPs as prognostic factors for patients receiving radiotherapy-related treatment [20]. Nonetheless, we performed this study to evaluate the association between XRCC1 Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met SNPs in Moroccan patients with NPC and responses to radiotherapy, to assess their usefulness as prognostic biomarkers of NPC radiotherapy.

Material and methods

Study population and sampling

A total of 100 NPC patient were recruited at Mohammed VI Center for Cancer Therapy in Casablanca between January 2016 and December 2018. Peripheral blood specimens were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid. In this study, all recruited patients were initially scheduled to be treated with radiotherapy. All patients agreed to complete a questionnaire to provide information regarding, age, sex, smoking status, childhood habits, consanguinity, and personal and familial cancer history. Information regarding clinical and pathological status was recovered from their respective medical records. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd University Hospital, Casablanca, Morocco, and each recruited patient signed a written informed consent form.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from leukocyte nuclei using a phenol chloroform DNA extraction method [21]. The concentration of the extracted DNA was quantified using a UV spectrophotometer (Nanodrop, Thermofisher, USA). Then the quality of DNA was checked by polymerase chain reaction (PCR) amplification of a fragment of the β -globin gene using the primers PC04 (5'-CAACTTCATCCA CGT TCACC-3')

and GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'), generating an amplification product of 265 bp.

Single nucleotide polymorphism genotyping

The genotyping of the 2 polymorphic sites in DNA repair genes (XRCC1 Arg399Gln [rs25487] and XRCC3 Thr241Met [rs861539]) was assessed by conventional PCR using loci-specific primers, as reported in Table 1.

Polymerase chain reaction amplification was performed in a total volume of 25 μ l containing 200 pM of each dNTP, 200 pM of each primer, 0.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), and 100 ng of genomic DNA in 1X PCR buffer. Each PCR reaction consisted of DNA denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, and primer annealing for 30 seconds at specific temperature and DNA extension for 30 seconds at 72°C. A final extension at 72°C for 7 min was performed for all amplification mixtures. Polymerase chain reaction products were size separated by 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light.

For SNP genotyping, PCR products were purified using an ExoSAP-IT® kit (Applied Biosystems, USA) to eliminate the primers and the remaining unincorporated dNTPs, and then were subjected to DNA sequencing reaction. Sequencing reactions were performed in a final volume of 10 μ l, containing 200 ng of purified PCR product, 1 μ l of Big Dye3.1 ready reaction mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), and 10 pmol of the specific primer (the same used for PCR amplification). The sequencing mixtures were incubated at 95°C for 1 min and 25 cycles were performed as follows: denaturation at 95°C for 10 s, primer annealing at 50°C for 5 s, and extension at 60°C for 4 min. Sequencing products were finally purified using Sephadex G-50 gel-exclusion chromatography (GE Healthcare Life Sciences) to eliminate the excess of unincorporated labelled dNTPs. Direct sequencing of amplified DNA was performed by capillary electrophoresis on an ABI 3130XL DNA analyser (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). The sequencing products were analysed using a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and BioEdit Sequence Alignment Editor to make this analysis complete.

Statistical analysis

The correlation between XRCC1 Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met SNPs and clinical stages/response to radiotherapy were evaluated by the χ^2 test using SPSS software version 23 (*p*-values < 0.05 were considered as statistically significant). Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method and compared by a log-rank test

Table 2. Demographic and pathological characteristics of the nasopharyngeal carcinoma population study

Parameters	N = 100
Gender	
Male	63
Female	37
Age	
≤ 30 years	18
> 30 years	82
Smoking status	
Smokers	31
Non-smokers	69
Childhood habitat	
Rural	56
Urban	44
Consanguinity	
No	92
Yes	8
Familial antecedent	
No	75
Yes	25
Alcohol consumption	
Drinkers	8
Non-drinkers	92
Clinical stages	
Stage I and II	14
Stage III and IV	86
Histological type	
Keratinising tumour	0
Non-keratinising tumour	5
Non-keratinising undifferentiated tumour	93
Others	2

using Graph Pad Prism software version 9 (p -values < 0.05 were considered as statistically significant).

Funding

This study was funded by Institut de Recherche sur le Cancer (grant number 201932).

Financial support for publication of the article was provided by Institut de Recherche sur le Cancer, <http://www.irc.ma>.

Ethical approval

All procedures were performed in accordance with the ethical standards of the Ethics Committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Morocco of November 2017 and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

Informed consent

Informed consent was obtained from all participants included in the study.

Results

Demographic and clinicopathological characteristics

Demographic and clinicopathological characteristics of the 100 recruited patients are summarized in Table 2. In this cohort, males comprised 63% and females comprised 37%, with a male:female sex ratio of 1.70. Overall, 82% of cases were over 30 years old, and 56% had a rural childhood habitat. Most patients had no consanguinity (92%), no familial cancer history (75%), were not cigarette smokers (69%), and were not alcohol consumers (92%). Clinicopathological characteristics of tumour specimens showed that most cases were diagnosed at advanced stages III and IV (86%). Non-keratinising undifferentiated tumour was the most prevalent histological type and was reported in 93% of cases.

The distribution of the different XRCC1/3 single nucleotide polymorphism genotypes

The distribution of the different XRCC1/3 SNPs genotypes and alleles in NPC cases is summarized in Table 3. For XRCC1 Arg399Gln SNP, the heterozygous genotype GA, was reported in 27% of cases, whereas the homozygous genotypes GG and AA were identified in 60% and 13%, respectively. Accordingly, the G allele prevails and was reported in 73.5% of cases. The A allele was reported in only 26.5% of cases.

For XRCC3 Thr241Met SNP, the heterozygous genotype CT prevailed and was reported in 51% of cases. The homozygous genotypes CC and TT were reported in 36% and 13% of cases, respectively. Allelic distribution showed a predominance of C allele, reported in 61.5% of cases, T allele being identified in only 38.5% of cases.

Table 3. Distribution of the XRCC1 and XRCC3 single nucleotide polymorphism genotypes and alleles in nasopharyngeal carcinoma patients

Genotypes	XRCC1 Arg399Gln		Genotypes	XRCC3 Thr241Met	
	n	%		n	%
G/G	60	60	C/C	36	36
G/A	27	27	C/T	51	51
A/A	13	13	T/T	13	13
Alleles			Alleles		
G	147	73.5	C	123	61.5
A	53	26.5	T	77	38.5

Table 4. Association between *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms and clinical stages

Clinical stages	n	Genotypes				Alleles		
		XRCC1 Arg399Gln						
		GG (%)	GA (%)	AA (%)	p	G (%)	A (%)	p
Stage I and II	14	8 (57.1)	3 (21.4)	3 (21.4)	0.559	19 (67.9)	9 (32.1)	0.440
Stage III and IV	86	52 (60.5)	24 (27.9)	10 (11.6)		128 (74.4)	44 (25.6)	
		XRCC3 Thr241Met						
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	p
Stage I and II	14	3 (21.5)	10 (71.4)	1 (7.1)	0.638	16 (57.1)	12 (42.9)	0.567
Stage III and IV	86	33 (38.4)	41 (47.7)	12 (13.9)		107 (62.2)	65 (37.8)	

Table 5. Association between *XRCC1* and *XRCC3* polymorphisms and response to radiotherapy

Clinical outcome	n	Genotypes				Alleles		
		XRCC1 Arg399Gln						
		GG (%)	GA (%)	AA (%)	p	G (%)	A (%)	p
Radiosensitive	59	37 (62.7)	15 (25.4)	7 (11.9)	0.583	89 (75.4)	29 (24.6)	0.459
Radio-resistant	9	7 (77.8)	1 (11.1)	1 (11.1)		15 (83.3)	3 (16.7)	
		XRCC3 Thr241Met						
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	p
Radiosensitive	59	20 (33.9)	31 (52.5)	8 (13.6)	0.660	71 (60.2)	47 (39.8)	0.590
Radio-resistant	9	4 (44.4)	4 (44.4)	1 (11.1)		12 (66.7)	6 (33.3)	

Correlation between *XRCC1* Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met single nucleotide polymorphisms and clinical stages

In this study, correlation between *XRCC1* Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met SNPs and clinical stages was also evaluated, and the results are reported in Table 4. Genotypic and allelic distributions of *XRCC1* Arg399Gln SNP showed no significant association with clinical stages, with $p = 0.559$ and $p = 0.440$, respectively. Likewise, NPC clinical stages were not significantly associated with *XRCC3* Thr241Met SNP genotypes ($p = 0.638$) or with corresponding alleles ($p = 0.567$).

Association between *XRCC1* Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met single nucleotide polymorphisms and response to radiotherapy

Among the 100 recruited NPC cases, only 68 underwent radiotherapy, and clinical follow-up revealed that 59 were sensitive to ionizing radiation and showed a positive response to radiotherapy (86.8%), whereas 9 patients exhibited radio-resistance status (13.2%) associated with relapsed, local, or distant disease cases. In this study we also investigated the association between *XRCC1* Arg399Gln and *XRCC3* Thr241Met SNPs and response to radiotherapy. For both SNPs, statistical analysis showed no significant association between genotypic and allelic distributions and response to radiotherapy ($p > 0.05$) (Table 5).

The evaluation of Arg299Gln and Thr241Met single nucleotide polymorphisms as prognosis survival biomarkers in nasopharyngeal carcinoma

To evaluate whether the Arg299Gln and Thr241Met SNPs has an impact on patients' clinical outcomes (progression-

free survival – PFS, and overall survival – OS) Kaplan-Meier analyses were performed, and the results are reported in Figure 1. Interestingly, patients with CT genotype of Thr241Met SNPs had significantly longer OS ($p = 0.04 < 0.05$) than those with CC and TT genotypes. However, no statically significant association was detected between Thr241Met genotypes and PFS, or between Arg399Gln genotypes and PFS and OS (p -values > 0.05) (Fig. 1).

Discussion

Radiation therapy is the mainstay primary therapeutic treatment for patients with nasopharyngeal carcinoma. However, despite relevant scientific and technological advances, radio-resistance remains the main problem faced by clinicians in NPC management and the major cause of local recurrence and distant metastasis [22]. The sensitivity of cancer cells to radiotherapy can be strongly influenced by genetic modifications affecting specific genes, including *XRCC1* and *XRCC3*, which are involved in DNA repair processes [7].

In the present study, our interest was focused on evaluation of the association between NPC radioresistance and *XRCC1* Arg399Gln (rs25487) and *XRCC3* Thr241Met (rs861539) polymorphisms, reported as important factors in the radiotherapy outcomes in several cancers [23].

In this study, no significant relationship was obtained between *XRCC1* Arg399Gln polymorphism and NPC patients' clinicopathological characteristics. Arg399Gln was reported as the most common and important variation of the *XRCC1* gene. However, its association with cancer development is controversial. *XRCC1* Arg399Gln was reported to be associated with the incidence risk of cervical cancer [5], with lung cancer risk, and with breast cancer

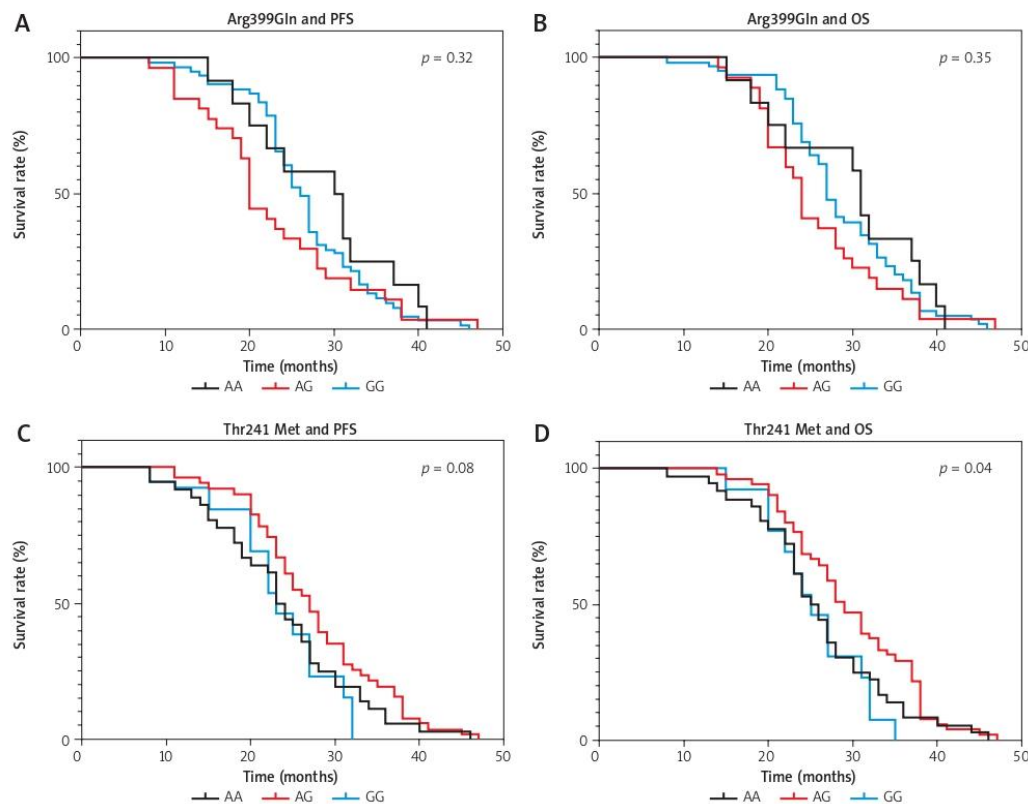


Fig. 1. Kaplan-Meier analyses of progression free survival and overall survival correlated to Arg299Gln and Thr241Met single nucleotide polymorphisms in nasopharyngeal cancer patients

risk in African Americans [24]. likewise, in an updated meta-analysis, it was shown that the XRCC1 Arg399Gln polymorphism is a potential predictor for susceptibility to NPC, especially for Asians [25].

In the current study, XRCC3 Thr241Met polymorphism did not reveal any association with clinical stage of NPC cases. Narter *et al.* previously showed that XRCC3 TT genotype and T allele exerted protective effects against bladder cancer development in a Greek population [26]. In other cancers the results are controversial. Krupa *et al.* reported no significant association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and clinical parameters of colorectal cancer cases [27]. However, a strong relationship between XRCC3 Thr241Met polymorphism and oral squamous cell carcinoma (OSCC) stages has been reported in the Brazilian population, suggesting that this SNP may contribute to the development of OSCC, metastases, and more advanced stages in these lesions [28].

During the last decades, few studies have been conducted to investigate the association between XRCC1/3 polymorphisms and NPC radio-resistance. For instance, no significant association was observed between the XRCC1 Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met polymorphisms and the response to radiotherapy ($p > 0.05$) in our study. In 2006, Andreassen *et al.* reported no significant association between XRCC1

Arg399Gln and XRCC3 Thr241Met polymorphisms and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis [29].

Evaluation of the association between XRCC1 Arg399Gln polymorphism and radiotherapy outcomes in 60 Chinese patients with locally advanced NPC treated with radiation therapy showed that XRCC1 399 Gln/Gln allele correlated with a higher medium-term tumour regression ratio after radiotherapy for primary nasopharyngeal neoplasm and metastatic lymph nodes ($> 80\%$ vs. $40\text{--}60\%$, $p < 0.01$), suggesting that this SNP is good for prognosis and patients with XRCC1 Codon399 Gln/Gln allele were more likely to obtain complete remission of tumour (100% vs. 76% and 67% , $p > 0.05$) [30].

The association between XRCC1 Arg399Gln polymorphism and radio-therapeutic response was confronted by several studies in breast cancer [31], head and neck squamous cell carcinoma [32], prostate cancer [33], and non-small cell lung cancer [34].

Interestingly, many studies have addressed the association between XRCC1 399 SNP and radiation side effects. In this field, Chen *et al.* found that NPC patients with XRCC1 codon 399 Arg/Arg have a higher risk of developing acute radiation dermatitis. Indeed, XRCC1 Arg399Gln polymorphism in NPC suggests that this SNP is an important predictive factor in the risk of acute radiation dermatitis during

IMRT [35]. XRCC1 399 SNP was also reported, in combination with smoking, to predict poor PFS in 75 consecutive NPC patients treated with curative radiotherapy [36].

The presence of significant association between XRCC3 241 SNP and radiotherapy outcomes corroborates with previous results on radiotherapy-treated lung cancer patients [37]. Interestingly, Burri *et al.* reported that XRCC3 had a significant association with the development of late radiation injury in 135 consecutive patients with clinically localized prostate cancer treated with radiotherapy [38].

The association between XRCC3 241 SNP and chemotherapy was also investigated. Shen *et al.* reported no significant association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and clinical outcomes of NSCLC patients treated with platinum-based chemotherapy [39]. However, in a meta-analysis including 14 eligible studies, the predictive value of XRCC3 Thr241Met polymorphism on response and OS of patients with NSCLC was evaluated on 2828 patients, and a significant association was found between the variant XRCC3 241Met and response to platinum-based chemotherapy, while there was no statically significant association between this polymorphism and OS [40].

The XRCC3 Thr241Met variant is a non-conservative substitution and does not affect protein-protein interactions [41]. However, the XRCC1 Arg399Gln mutation leads to conformational changes in the XRCC1 protein, which reduces its affinity for the multi-component DNA repair protein complex [42]. Hence, these mutations may have an impact on protein activity and consequently may be associated with radio resistance status in NPC. Nasopharyngeal carcinoma radio resistance could also be the result of other mechanisms including the presence of cancer stem cells, genetic mutations, some epigenetics events, abnormal activation of certain signalling pathways, and/or alteration of the tumour microenvironment.

Conclusions

XRCC1 Arg399Gln (rs25487) polymorphism is a frequent event in NPC patients, but it is not associated with cancer severity and is not involved in tumour radio resistance. The study suggests that XRCC3 Thr241Met (rs861539) can be associated with different OS in NPC patients treated with radiotherapy. Additionally, other genetic and epigenetic alterations must be investigated to explain the mechanisms associated with NPC resistance for better management of this complicated disease.

Acknowledgments

We are grateful to Mohammed VI Centre for Cancer Treatment staff for patient recruitment, blood collection, and follow-up of patients.

The authors declare no conflict of interest.

References

- Siak PK, Khoo ASB, Leong CO, Hoh BP, Cheah SC. Current status and future perspectives about molecular biomarkers of nasopharyngeal carcinoma. *Cancers* 2021; 13: 3490.

- Benider A, Harif M, Karkouri M, et al. Registre des cancers de la région du Grand Casablanca pour la période 2008–2012. Lalla Salma Foundation 2016.
- Sun XS, Li XY, Chen QY, Tang LQ, Mai HQ. Future of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Radiol* 2019; 92: 20190209.
- Zhang X, Yang J. Role of non-coding RNAs on the radiotherapy sensitivity and resistance of head and neck cancer: from basic research to clinical application. *Front Cell Dev Bio* 2020; 18: 637435.
- Wang JS, Wang HJ, Qian HL. Biological effects of radiation on cancer cells. *Military MedRes* 2018; 5: 1-10.
- Tang L, Wei F, Wu Y, et al. Role of metabolism in cancer cell radio-resistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37: 87.
- Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Sig Transduct Target Ther* 2020; 5: 60.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 193-204.
- Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, Carrara HH, Andrade JM, Takahashi CS. DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 polymorphisms and their relationship with the level of micronuclei in breast cancer patients. *Genet Mol Biol* 2010; 33: 637-640.
- Soliman AHM, Zaki NN, Fathy HM, Mohamed AA, Ezzat MA, Rayan A. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, and XRCC3 DNA repair genes and DNA damage in radiotherapy workers. *Environ Sci Pollut Res Int* 2020; 27: 43786-43799.
- Liu YP, Zheng CC, Huang YN, He ML, Xu WW, Li B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *Med Comm* 2021; 2: 315-340.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001; 291: 1284-1289.
- Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *MutatRes* 2000; 459: 1-18.
- Guo CX, Yang GP, Pei Q, Yin JY, Tan HY, Yuan H. DNA repair gene polymorphisms do not predict response to radiotherapy-based multimodality treatment of patients with rectal cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 713-718.
- Osti MF, Nicosia L, Agolli L, et al. Potential Role of single nucleotide polymorphisms of XRCC1, XRCC3, and RAD51 in predicting acute toxicity in rectal cancer patients treated with preoperative radiochemotherapy. *Am J Clin Oncol* 2017; 140: 535-542.
- Batar B, Guven G, Eroz S, Bese NS, Guven M. Decreased DNA repair gene XRCC1 expression is associated with radiotherapy-induced acute side effects in breast cancer patients. *Gene* 2016; 582: 33-37.
- Zhao Y, Xie Y, Jia D, Ma C, Wei D, Zhang X. Application of gene polymorphisms to predict the sensitivity of patients with locally advanced non-small cell lung cancer undergoing chemoradiotherapy. *Am J Transl Res* 2021; 13: 7382-7387.
- Siak PY, Khoo AS, Leong CO, Hoh BP, Cheah SC. Current status and future perspectives about molecular biomarkers of nasopharyngeal carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 3490.
- Gurská S, Farkasová T, Gábelová A. Radiosensitivity of cervical cancer celllines: the impact of polymorphisms in DNA repair genes. *Neoplasma* 2007; 54: 195-201.
- Gong L, Luo M, Sun R, Qiu L, Chen C, Luo Z. Significant association between XRCC1 expression and its rs25487 polymorphism and radiotherapy-related cancer prognosis. *Front Oncol* 2021; 11: 654784.
- Chacon-Cortes D, Griffiths L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J Biorepos Sci Appl Med* 2014; 2: 1-9.
- Liu Z, Chen Y, Su Y, Hu X, Peng X. Nasopharyngeal carcinoma: clinical achievements and considerations among treatment options. *Front Oncol* 2021; 11: 635737.
- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 2012; 9: 193-199.
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000; 21: 965-971.
- Lin J, Ye Q, Wang Y, Wang Y, Zeng Y. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and susceptibility to nasophary-

- ryngeal carcinoma: an update meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e11852.
26. Narter KF, Ergen A, Ağaçhan B, Görmüş U, Timirci O, Isbir T. Bladder cancer and polymorphisms of DNA repair genes (XRCC1, XRCC3, XPD, XPG, APE1, hOGG1). *Anticancer Res* 2009; 29: 1389-1393.
 27. Krupa R, Sliwinski T, Wisniewska-Jarosinska M, et al. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer – a case control study. *MolBiol Rep* 2011; 38: 2849-2854.
 28. Dos Santos Pereira J, Fontes FL, de Medeiros SR, de Almeida Freitas R, de Souza LB, da Costa Miguel MC. Association of the XPD and XRCC3 gene polymorphisms with oral squamous cell carcinoma in a Northeastern Brazilian population: a pilot study 2016. *Arch Oral Bio* 2016; 164: 19-23.
 29. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sørensen FB, Overgaard J. Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM – a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 577-586.
 30. Zhai XM, Hu QC, Gu K, Wang JP, Zhang JN, Wu YW. Significance of XRCC1 Codon399 polymorphisms in Chinese patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with radiation therapy. *Asia Pac J Clin Oncol* 2016; 12: e125-32.
 31. Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, et al. Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4802-4809.
 32. Nanda SS, Gandhi AK, Rastogi M, et al. Evaluation of XRCC1 gene polymorphism as a biomarker in head and neck cancer patients undergoing chemoradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018; 101: 593-601. 33. Langsenlehner T, Renner W, Gerger A, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the gene for XRCC1 and radiation-induced late toxicity in prostate cancer patients. *Radiother Oncol* 2011; 98: 387-393.
 33. Yang Z, Liu Z. Potential functional variants in DNA repair genes are associated with efficacy and toxicity of radiotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J Oncol* 2020; 2020: 3132786.
 34. Chen H, Wu M, Li G, Hua L, Chen S, Huang H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphism and acute radiation reaction in patients with nasopharyngeal carcinoma: a cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96: e8202.
 35. Jin H, Xie X, Wang H, et al. ERCC1 Cys8092Ala and XRCC1 Arg-399Gln polymorphisms predict progression-free survival after curative radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e101256.
 36. Osawa K, Nakarai C, Uchino K, et al. XRCC3 gene polymorphism is associated with survival in Japanese lung cancer patients. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 16658-16667.
 37. Burri RJ, Stock RG, Cesaretti JA, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in SOD2, XRCC1 and XRCC3 with susceptibility for the development of adverse effects resulting from radiotherapy for prostate cancer. *Radiat Res* 2008; 170: 49-59.
 38. Shen XY, Lu FZ, Wu Y, Zhao LT, Lin ZF. XRCC3 Thr241Met polymorphism and clinical outcomes of NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8: e69553.
 39. Qiu M, Xu L, Yang X, et al. XRCC3 Thr241Met is associated with response to platinum-based chemotherapy but not survival in advanced non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013; 8: e77005.
 40. Yoshihara T, Ishida M, Kinomura A, et al. XRCC3 deficiency results in a defect in recombination and increased endoreduplication in human cells. *EMBO J* 2004; 23: 670-680.
 41. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Brandt-Rauf PW. Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein. *Protein J* 2007; 26: 541-546.

Address for correspondence

Imane Chaoui

Biology and Medical Research Unit
National Center of Energy
Sciences and Nuclear Techniques
Rabat, Morocco
e-mail: im_chaoui@yahoo.fr

Submitted: 14.11.2022

Accepted: 21.04.2023

III. Corrélation entre les variations génétiques *GSTP1* Ile105Val et *GPX1* Pro198Leu et la réponse à la radiothérapie chez les patients atteints du NPC

Le cancer du nasopharynx (NPC) est une tumeur maligne qui apparaît dans l'épithélium de la paroi postérieure du nasopharynx. Son épidémiologie, son histopathologie et sa présentation clinique sont différentes des autres cancers de la tête et du cou. Le NPC est largement connu pour son étiologie multifactorielle, y compris l'infection par virus Epstein-Barr (EBV), les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Le NPC a une distribution ethnique et géographique marquée. Plus précisément, son incidence qui est très élevée en Asie de Sud-Est et en Afrique du Nord.

En raison de sa radiosensibilité et de son emplacement anatomique profond, la radiothérapie a été établie comme méthode de traitement primaire. Mais, il y a certains patients souffrant de la récurrence. La radiorésistance est la principale cause d'échec du traitement du NPC, plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la radiorésistance du NPC. Parmi ces mécanismes, il y a les facteurs génétiques.

Les rayonnements ionisants peuvent cibler directement l'ADN nucléaire, qui peuvent soit endommager directement l'ADN, soit indirectement provoquer des lésions à l'ADN en stimulant la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Diverses conséquences peuvent être engendrées, telles que l'apoptose, l'autophagie, la nécrose et la sénescence cellulaire.

L'efficacité de la radiothérapie peut être diminuée à cause d'une détoxification et élimination des ROS par l'intermédiaire de nombreux systèmes enzymatiques. Parmi ces enzymes, il y a les glutathion S-transférases (GST) et les glutathion peroxydases (GPX).

Il a été signalé que certains polymorphismes au niveau des gènes codants pour ces deux protéines pourraient être impliqués dans le développement et la radiorésistance du NPC. Le polymorphisme rs1695 (Ile105Val) du gène *GSTP1* et le polymorphisme rs1050450 (Pro198Leu) du gène *GPX1* sont parmi les polymorphismes les plus associés au développement du NPC et à la réponse aux traitements.

L'objectif de cette étude est d'explorer la présence de polymorphismes rs1695 et rs1050450 chez une population marocaine atteinte du NPC, ainsi que d'évaluer une potentielle association entre ces polymorphismes et la réponse à la radiothérapie.

Dans une population d'étude de 101 patients atteints de NPC, le génotypage révéla la présence de deux génotypes seulement : Pro/Pro (57,4 %) et Pro/Leu (40,6 %) pour le gène *GPX1*. Les fréquences alléliques des allèles C et T étaient respectivement de 78,7 % et 21,3 %. Pour le gène *GSTP*, les génotypes homozygotes Val/Val et Leu/Leu ont été détectés chez 35,6% et 12,9% des patients, respectivement. Le génotype hétérozygote Val/Leu a été trouvé chez 51,5% des patients. Les fréquences alléliques ont montré la présence des deux allèles A et G dans 57,1% et 42,9 % respectivement. L'analyse statistique n'a révélé aucune association significative entre les polymorphismes génétiques *GSTP* Val105Ile et *GPX1* Pro198Leu, ni avec les caractéristiques sociodémographiques et clinico-pathologiques, ni avec la réponse à la radiothérapie ($p>0,05$).

Les résultats trouvés sont préliminaires, et d'autres recherches sur le rôle des polymorphismes des gènes de détoxification dans la réponse à la radiothérapie sont nécessaires afin d'identifier des biomarqueurs non invasifs et prédictifs de la radiorésistance.

Research Article

GSTP1 Ile105Val and GPX1 Pro198Leu Polymorphisms and Their Association with Response to Radiotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma Patients

 **Rajaa Benzeid**,^{1,2}  **Amina Ghibid**,³  **Nadia Bencheikroun**,⁴  **Karima Bendahhou**,⁴  **Naima El Benna**,⁵  **Amal Guensi**,⁶  **Abdellatif Benider**,⁴  **Nezha Tawfiq**,⁴  **Abdelkarim Filali Maltouf**,²  **Mohammed El Mzibri**,¹  **Mohammed Attaleb**,¹  **Meriem Khyatti**,³  **Imane Chaoui**¹

¹Biology Unit and Medical Research, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco

²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Rabat, Morocco

³Laboratory of Viral Oncology, Pasteur Institute, Casablanca, Morocco

⁴Department of Radiotherapy-Oncology, Mohammed VI Center for Treatment of Cancer, Ibn Rochd Hospital Center, Casablanca, Morocco

⁵Department of Radiology, Ibn Rochd University Hospital, Hopital 20 Août, Casablanca, Morocco

⁶Department of Nuclear Medicine, Ibn Rochd University Hospital, Hassan II University, Casablanca, Morocco

Abstract

Objectives: Radio-resistance poses a major challenge in nasopharyngeal carcinoma (NPC) treatment. Due to individual variations in radio-sensitivity, biomarkers are needed to tailor radiation treatment. Within this frame, the identification of series of genetic signatures mainly SNPs for NPC patients treated with radiotherapy may help to predict treatment outcome and deliver personalized therapy. The aim of this study was to evaluate the possible association between the GSTP1 Ile105Val and GPX1 Pro198Leu polymorphisms and response to radiotherapy in NPC patients.

Methods: From September 2016 to October 2018, a total of 101 patients with confirmed NPC, recruited at Mohammed IV Center for Treatment of Cancer of Casablanca, underwent radiotherapy. DNA was extracted from peripheral blood. Genotyping of the GPX1 Pro198Leu and GPX1 Val105Leu polymorphisms was carried out by PCR amplification and DNA sequencing. SPSS was used to analyse the association of GSTP1 and GPX1 genotypes with clinico-pathological features and response to radiotherapy.

Results: The genotyping data revealed the presence of only two genotypes namely Pro/Pro (57.4%) and Pro/Leu (40.6%) for GPX1 gene. The allelic frequencies of C and T alleles were 78.7% and 21.3% respectively. For GSTP1 gene, the homozygous genotypes Val/Val and Leu/Leu were detected in 35.6% and 12.9% of patients respectively. The heterozygous genotype Val/Leu prevailed (51.5%). Allelic frequencies showed the presence of the two alleles A and G in 57.1% and 42.9% patients respectively. Statistical analysis failed to find any significant association between GSTP1 Val105Ile and GPX1 Pro198Leu genetic polymorphisms and socio-demographic and clinico-pathological features as well as response to radiotherapy ($p > 0.05$).

Conclusion: Further research is warranted on the potential role of SNPs within antioxidant defines genes in radiotherapy response and to identify reliable predictive and non-invasive biomarkers for radio-resistance among NPC patients for personalised therapies.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, genetic polymorphisms, GSTP1, GPX1, radio-resistance, prognosis

Cite This Article: Benzeid R, Ghibid A, Bencheikroun N, Bendahhou K, El Benna N, Guensi A, et al. GSTP1 Ile105Val and GPX1 Pro198Leu Polymorphisms and Their Association with Response to Radiotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. EJMO 2022;6(1):64–72.

Address for correspondence: Imane Chaoui, PhD. Biology Unit and Medical Research, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco

Phone: +212 537 713 205 **E-mail:** im_chaoui@yahoo.fr; chaoui@cnesten.org.ma

Submitted Date: February 14, 2022 **Accepted Date:** March 07, 2022 **Available Online Date:** March 10, 2022

©Copyright 2022 by Eurasian Journal of Medicine and Oncology - Available online at www.ejmo.org

OPEN ACCESS This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignant epithelial neoplasm arising from the epithelial lining of the nasopharynx and poses a public health problem in many countries in Southeast Asia and north Africa. In Morocco, like other countries in the Mediterranean basin, the incidence of NPC is moderate, at 3-8 per 100 000 people.^[1, 2]

NPC is widely known for its multifactorial aetiology, including Epstein-Barr virus (EBV) infection, environmental factors and genetic susceptibility.^[3]

Scientific evidence has shown that NPC is highly sensitive to ionizing radiation. As such, radiotherapy (RT) is the main and the most effective treatment of NPC.^[4, 5] However, the main problem faced by clinicians is the growing number of radio-resistance, affecting the treatment outcome and reducing the overall survival (OS) of NPC patients, which suggest the involvement of genetic susceptibility in this radio-resistance.^[6] Radio-resistance is a complex biological process associated with abnormal DNA damage response, apoptosis, autophagy, gene mutations, cell cycle checkpoint and deregulated signalling pathways which hampered the success of RT.^[7] It's widely accepted that radiotherapy acts directly on cellular components through the ionizing radiations and indirectly through generated reactive oxygen species (ROS) in the cell matrix.^[8] Hence, persistence of ROS in the NPC environment will be of a great interest to produce DNA damage and induce apoptosis. Conversely, rapid detoxification and ROS elimination will be associated with a decrease RT efficacy.

Many genetic studies have been conducted and showed that Pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) and glutathione peroxidase1 (GPX1) are the most proteins involved in cell detoxification and xenobiotic elimination. These two proteins play a key role in preventing the accumulation of xenobiotics in cells, reducing their damage and the occurrence of various diseases.

Growing interest was given to investigate the role of GSTP1 and GPX1 and their involvement in cancer development and resistance. GSTP1 enzyme, encoded by the GST pi gene, is an isozyme widely reported to be expressed in human epithelial tissues,^[9] that plays an important regulatory role in detoxification and anti-oxidative damage. GSTP1 is also involved in maintaining cell integrity and protecting DNA from genotoxic and cell-damaging molecules by catalysing the detoxification of reactive electrophilic compounds.^[10] Large studies were conducted on the association between genetic polymorphisms in *GSTP1* gene and cancer development, including NPC, and have focused on some specific polymorphisms like rs1695 (Ile105Val) and rs1138272 (Ala114Val) that alter the catalytic activity of the protein. Indeed, polymorphisms in *GSTP1* gene have been

reported to be associated with bladder and testicular cancers,^[11] head and neck cancers,^[12] hepatocarcinoma,^[13] lung cancer,^[14] oral carcinoma^[15] and breast cancer.^[16, 17]

GPX1 is a selenium-dependent enzyme highly involved in cell antioxidant defence by protecting cells and their environments from oxidative damage. GPX1, encoded by *GPX1* gene, is able to eliminate the hydrogen peroxide (H₂O₂) through its reduction into water.^[18] In *GPX1* gene, a wide interest is given to rs1050450C>T polymorphism, resulting on proline (Pro) to leucine (Leu) amino acid substitution at codon 198 (Pro198Leu), close to the C-terminus of the protein.^[19] GPX1 Pro198Leu SNP, has been shown to decrease the enzymatic activity of glutathione peroxidase in the cells expressing the mutant protein, which further can increase the oxidative damage.^[20] GPX1 Pro198Leu polymorphism has been shown to be associated with colorectal and gastrointestinal cancers in relationship with exposure at various environmental factors.^[21, 22] A recent meta-analysis has reported a positive correlation between GPX1 Pro198Leu SNP and the development of bladder, head and neck and brain cancers.^[23]

There are limited data addressing the association of genetic polymorphisms in *GSTP1* and *GPX1* genes with tumour response to radiotherapy and/or chemotherapy. Accordingly, an association between *GSTP1* polymorphism and treatment outcome was reported in breast cancer,^[24] bladder cancer^[25] and NPC,^[26] providing accumulating evidence of the role of genetic variants in predicting response to radio and/or chemotherapy in cancer patients. Data regarding genetic background of radio-resistance-related SNPs in NPC are scarce. So, we designed this study to investigate the association of Pro198Leu and Ile105Val polymorphisms in detoxification genes namely *GPX1* and *GSTP1* with response to radiotherapy in NPC patients and thus their potential use as biomarkers for better management of NPC in Morocco.

Methods

Study Design

A total of 101 histologically confirmed NPC patients were recruited at Mohammed IV Center for Treatment of Cancer of Casablanca, between September 2016 and October 2018. Patients with previous cancer and those who had previous chemotherapy or radiotherapy treatments were excluded from this study.

A questionnaire was administrated to each patient to collect information regarding the socio-economic status (age, sex, familial history of cancer, tobacco habits, alcohol consumption and childhood habitat). Clinical data including

histological type and clinical stage were retrieved from their medical records.

Patients were given a median dose of 50 Gy in the nasopharyngeal tumour area and 66 Gy in the involved lymph nodes. A daily fraction of 2 Gy was delivered five times per week and the treatment was completed within 5 to 7 weeks. For patients with an advanced stage of the disease, neoadjuvant chemotherapy was administered using different regimens based on cisplatin, anthracycline and fluorouracil.

Clinical staging of NPC was determined according to the 7th edition of the International Union Against Cancer (IUC) and American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system.^[27] The follow-up was done at 3 month intervals for the first two years and six monthly thereafter. All patients were subjected to peripheral blood sampling before initiation of the treatment for plasmatic cell-free DNA extraction. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Morocco; and a written informed consent was obtained from each patient before its enrolment.

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from leukocyte nuclei using phenol chloroform DNA extraction method. DNA concentration and purity were assayed using the NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). DNA was used immediately for PCR amplification or stored at -20°C until use.

GPX1 Pro198Leu and GSTP1 Ile105Val Genotyping

Pro198Leu and Ile105Val polymorphisms screening were carried out by PCR amplification and DNA sequencing. For GPX1Pro198Leu, primers flanking a region in exon 2 of *GPX1* gene containing the SNP rs1050450 C>T were used. For GSTP1 Ile105Val, primers flanking a region in exon 6 of *GSTP1* gene harboring the SNP rs1695 A>G were used. The primers sequences of the two SNPs and their characteristics are shown in Table 1.

PCR amplification was performed in a total volume of 25µl, containing 1X PCR buffer, 200µM of each dNTP, 200nM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.5U Platinum Taq DNA poly-

merase (Invitrogen) and 50ng of genomic DNA. The mixtures were first denatured at 94°C for 7 min. Then, 40 cycles of PCR were performed with denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 60°C for 30 s and primer extension for 30 s at 72°C. At the end of the last cycle, amplicons were incubated at 72°C for 7 min. For each PCR run, a negative control, in which DNA template was omitted from the amplification mixture, was included. GSTP1 and GPX1 fragments' amplification was checked by DNA size separating by electrophoresis on 2% agarose gel and visualization under ultraviolet light.

PCR products were then purified using ExoSAP-IT® (Applied Biosystems) to eliminate the primers and unincorporated remaining dNTPs. Sequencing of purified PCR products was done with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequencing reactions were performed in a final volume of 10µl, containing 1µl of 2.5X Big Dye ready reaction mix v3.1, 10 pmol of forward or reverse primer and 100ng of purified PCR product. Sequencing mixtures were first incubated at 96°C during 1 minute, then followed 25 cycles of denaturation at 96°C for 10s, primer annealing at 50°C for 5s and extension at 60°C for 4 min. The sequencing reaction products were then purified using Sephadex G-50 gel-exclusion chromatography (GE Healthcare Life Sciences) to eliminate the excess of ddNTPs. Direct sequencing of amplified DNA was performed by capillary electrophoresis on an ABI 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed using Sequencing Analysis v5.4 software (Applied Biosystems).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Software Package for Social Sciences (SPSS) version 23.0. The differences were considered significant if the p value did not exceed 0.05. Allelic frequency and genotypic frequencies were also calculated using the corresponding formula.

Results

The socio-demographic, clinical and pathological characteristics of all cases are summarized in Table 2. The median age of the recruited NPC patients was 54 years old,

Table 1. Primers Characteristics

Gene	rs no.	SNP	Codon	Change in amino acid	Primer sequences	Amplicon size (Bp)
GPX1	rs1050450	C>T	198	Pro>Leu	5'-CGCCACCGCGCTTATGACCG-3' 5'-GCAGCACTGCAACTGCCAAGCAG-3'	238
GSTP1	rs1695	A>G	105	Val>Ile	5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3' 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCCT-3'	176

Table 2. Socio-demographic, clinical and pathological characteristics of NPC patients

Parameter	Total cases	Percentage (%)
Gender		
Male	61	60.39
Female	40	39.61
Age		
≤30	23	23.76
>30	78	76.24
Smoking habit		
Smoke	32	31.68
Non-smoke	69	68.32
Alcoholic habit		
Alcoholic	10	9.9
Non-Alcoholic	91	90.1
Tumour stage		
I-II	13	12.87
III-IV	88	87.13
Histological type		
Type I	1	0.99
Type II	7	6.93
Undifferentiated type	90	89.1
Other types	3	2.97
TNM		
Tumoral extension		
T1-T2	24	23.8
T3-T4	77	76.2
Regional lymph node involvement		
N=0	8	7.9
N≥1	93	92.4
Metastasis		
M0	65	75.2
M1	36	24.8

ranging from 12 to 80 years old. In this cohort, males' patients prevailed (60%) with sex ratio of 1.5. Smoking and alcoholic habits concerned 31.68% and 9.9% of the patients respectively. The clinico-pathological tumor characteristics revealed that 87.13% of patients were at advanced stages (III and IV), and most patients exhibited the undifferentiated type (89.1%). TNM staging revealed that 75% of patients were classified in T3-T4 categories and up to 34.6% of patients presented distant metastasis (M1). No involvement of regional lymph nodes was observed in 7.9% of patients.

In this study, we identified SNPs (rs1050450 and rs1695) by PCR-Sequencing within NPC patients.

Genotypes Distribution and Allelic Frequencies

For *GPX1* gene, only two genotypes were detected namely Pro/Pro (57.4%) and Pro/Leu (40.6%). The homozygous

genotype (Leu/Leu) of the *GPX1* variant was not found. The allelic frequencies of C and T alleles were 78.7% and 21.3% respectively.

For *GSTP* gene, the heterozygous genotype Val/Leu prevailed (51.5%). The homozygous genotypes Val/Val and Leu/Leu were detected in 35.6% and 12.9% of patients respectively. Allelic frequencies showed the presence of the two alleles A and G in 57.1% and 42.9% patients respectively (Table 3).

Association between SNPs and Socio-Demographic & Clinico-Pathological Parameters

The genotypes distributions of *GPX1* Pro198Leu and *GSTP1* Val105Ile polymorphisms according to socio-demographic and clinico-pathological characteristics of NPC patients are summarized in Tables IV and V respectively. The expressions of genotypes were unrelated to gender, age, and clinical stage. Overall, no association was detected between *GPX1* Pro198Leu genetic variants and any of the studied parameter. Also, Statistical analysis failed to find any significant association between *GSTP1* Val105Ile polymorphism and socio-demographic and clinico-pathologic features.

Among the 101 diagnosed NPC patients, 67.3% (68/101) underwent radiotherapy and among them, 86% had a complete remission. Although C allele was four times more prevalent than T allele for *GPX1* Pro198Leu polymorphism, statistical analysis failed to find any significant association between this polymorphism and radiotherapy response ($p > 0.05$) (Table 4).

For *GSTP1* Ile105Val polymorphism, we noted that both alleles had same frequencies within radio-resistant patients. Despite the prevalence of heterozygous genotypes AG within radiosensitive patients, no significant association was found between this polymorphism and response to radiotherapy ($p > 0.05$) (Table 5).

Table 3. Genotypes distribution and allelic frequencies within NPC patients

Gene/ Genotype	No. Of patients	%	Allele	%
GPX1				
CC	58	57.4	C	78.7
CT	43	42.6	T	21.3
TT	0	0		
GSTP1				
AA	36	35.6	A	57.1
AG	52	51.5	G	42.9
GG	13	12.9		

Table 4. Association between demographic, clinico-pathological data and GPX1 Pro198Leu polymorphism

GPX1 Pro198Leu	N	Genotype				Allele		
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	P	C (%)	T (%)	P
Sex								
Female	40	20 (50.00)	20 (50.00)	0	0.221	60 (75.00)	20 (25.00)	0.317
Male	61	38 (62.29)	23 (37.70)	0		99 (81.14)	23 (18.85)	
Age								
≤ 30	23	12 (52.17)	11 (47.82)	0	0.582	35 (76.08)	11 (23.91)	0.689
> 30	78	46 (58.97)	32 (41.02)	0		124 (79.48)	32 (20.51)	
Clinical stage								
I-II	13	6 (46.15)	7 (53.84)	0	0.417	19 (73.07)	7 (26.92)	0.467
III-IV	87	51 (58.62)	36 (41.37)	0		140 (79.54)	36 (23.70)	
Response to radiotherapy								
RadioS	57	33 (57.89)	24 (42.11)	0	0.814	90 (78.94)	24 (21.06)	0.922
RadioR	11	6 (54.55)	5 (45.45)	0		17 (77.27)	5 (22.63)	

Table 5. Association between demographic, clinico-pathological data and GSTP1 Ile105Val polymorphism.

GSTP1 Ile105Val	N	Genotype				Allele		
		AA (%)	AG (%)	GG (%)	P	A (%)	G (%)	P
Sex								
Female	40	13 (32.5)	19 (47.5)	8 (20)	0.894	45 (60.81)	29 (39.18)	0.91
Male	61	23 (37.70)	33 (54.1)	5 (8.2)		79 (61.71)	49 (38.28)	
Age								
≤ 30	23	7 (30.43)	13 (56.52)	3 (13.04)	0.562	27 (40.90)	19 (28.78)	0.897
> 30	78	29 (37.17)	39 (50.00)	10 (12.82)		97 (62.17)	59 (37.82)	
Clinical Stage								
I-II	13	7 (53.84)	4 (30.76)	2 (15.38)	0.902	18 (69.23)	8 (30.76)	0.793
III-IV	87	28 (32.18)	48 (55.17)	11 (12.64)		104 (60.36)	70 (40.22)	
Response to radiotherapy								
RadioS	57	19 (33.33)	30 (52.63)	8 (12.90)	0.378	88 (65.67)	46 (34.32)	0.666
RadioR	11	3 (27.27)	5 (45.45)	3 (27.27)		11 (50.00)	11 (50.00)	

Discussion

NPC is a malignant disease with skewed ethnic and geographic distribution.^[28] The deep-seated anatomical position of NPC made this malignancy not accessible by surgery and thus the principal treatment approach is radiotherapy. Although NPC is highly radio-sensitive, patients are prone to recur loco-regionally and to develop distant metastasis.^[29]

Radio-resistance hampers the success of treatment of NPC and multiple signalling pathways are involved in this phenomenon.^[30] Hence, deciphering new molecular targets and pathways is essential for enhancing and promoting the radio-sensitivity of NPC patients since clinical TNM staging has limited accuracy in NPC response prediction. Despite progress towards molecular mechanisms underlying radiotherapy response, there are no effective biomarkers for NPC

radio-sensitivity/radio-resistance.^[31] Up to date, there is no standard test available that may reliably predict radio-sensitivity for cancer patients.^[32] Due to individual variations in radio-sensitivity, biomarkers are selected to tailor radiation treatment to NPC. Hence, there is a need to identify genes involved in radio-resistance along with the biological process contributing to the development of radio-resistance.^[31]

Extensive studies reported that some genetic polymorphisms have been implicated in increased susceptibility to NPC.^[33, 34] Of interest, several studies have evaluated the association between GSTP1 c.105A>G and GPX1 c.198C>T polymorphisms and risk of cancer development with type specific effects, however, these studies yielded conflicting results.^[23, 35-41]

By establishing a radio-resistant cell line, Guo et al. identified a panel of candidate's genes including GSTP1 whom

might become a potential biomarker in predicting NPC response to radiotherapy.^[31] In this study, we identified c.105A>G SNP in GSTP1 gene within NPC patients and the results clearly showed that this polymorphism had no relevant effect neither on clinic-pathological features nor with radiotherapy response. Likewise, in a recent study, no association was detected between this polymorphism and primary tumour site, clinico-pathological characteristics, treatment (chemotherapy and/or radiotherapy) and survival time of the head and neck cancer (HNC) patients.^[42] Moreover, a meta-analysis performed by Lang et al. failed to qualify c.105A>G SNP in GSTP1 gene as risk for developing HNC in many studies.^[43]

To the best of our knowledge, no study has investigated the association between this SNP and RT response in NPC. The variant genotype was reported to be linked with CT and RT responses and side effects in different malignancies. Pasqualetti et al. have shown that this SNP was associated with different OS in glioblastoma patients treated with RT and temozolamide.^[44] Also, it was reported that this SNP might be a useful biomarker for prediction of clinical benefit and toxicities of platinum-based chemotherapy in Thai epithelial ovarian cancer.^[45] In contrast, Deng et al. found that patients carrying GSTP1 variant genotypes were rather at lower risk of recurrence following an intravesical therapy and thus, suggested that c.105A>G SNP may predict chemotherapy outcome in patients with bladder cancer (BC) and may, therefore, serve as molecular marker to monitor BC recurrence.^[25] Similarly, in a meta-analysis performed by Shen et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism was associated with tumour response, progression free survival, and OS in gastric and colorectal cancers after CT.^[46]

Accumulating evidence implicates that GPX1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumour susceptibility to cancer; individuals carrying variant Leu allele (Pro/Leu and Leu/Leu) were associated with an increased risk of cancer.^[47, 48] In NPC, the association between became evidenced; Laribi et al. found strong association between GPX1 Pro-198Leu genetic variant and NPC risk. Moreover, this variant increased the risk of progression to regional lymph node metastasis.^[49] Dequanter et al. found that GPX1 low expressing HNSCC were at T3-T4 clinical stages and that GPX1 expression does not influence neither the response to radiotherapy nor the survival.^[50] In contrast, in the present study, the expressions of GPX1 Pro198Leu genotypes in patients with NPC were irrelevant to gender, age, clinical stage and response to RT.

Indeed, studies on the relationships between genetic polymorphisms in radio-resistance related genes and radiotherapy sensitivity in NPC have been performed.^[31, 49]

Ban et al. suggest Wnt/beta-catenin as a novel prognostic factor for NPC patients treated with RT.^[51] More specifically, rs18880481 and rs3864004 polymorphisms in the catenin beta 1 gene (CTNNB1) and rs3755557 polymorphism in the glycogene synthase kinase 3 beta gene (GSK3beta), were significantly associated with a poorer efficacy of RT in NPC patients.^[52] Wang et al. have investigated the relationship between SNPs (G2677T exon 21 and C3435T in exon 26) in human multidrug resistance 1 gene (MDR) and radio-sensitivity and found that patients with 2677G-3435C haplotype had better response to radiotherapy compared to other haplotypes.^[53] Very recently, inflammation-associated gene SNPs were found to be associated with increased radiotherapy sensitivity of HNSCC patients.^[54] Likewise, Seibold et al. reported that variants in oxidative stress-related genes may affect radiotherapy response.^[55] However, in NPC, the relationship between SNPs in detoxification related genes and the response of NPC patients to radiotherapy has not been reported.

Plenty of studies were performed to access the potential role of GPX1 and GSTP1 SNPs in the risk of Cardiovascular diseases^[56] and solid tumours^[57] but studies on their contribution to predict (chemo)radiotherapy treatment outcomes in NPC patients are very scarce. Treatment outcome is difficult to set; it is hampered by heterogeneity of tumours. Indeed, patients with same clinical stages, according to the TMN staging system, have different outcomes albeit receiving similar treatments. Recently, accumulated knowledge on tumour behaviour as well as response to cancer treatment has led to emergence of radiogenomics which links genetic variation with response to radiotherapy to improve decision making and thus patient outcomes.^[58]

Overall, the present study failed to statistically establish the associations between the well characterized functional GSTP1 c.105A>G and GPX1 c.198C>T polymorphisms within NPC patients and response to radiotherapy. Further studies with larger sample size and targeting additional polymorphisms may better demonstrate the interaction of GSTP1 & GPX1 germline polymorphisms as well different haplotypes and response to the radiotherapy and then select potential candidate biomarkers to predict NPC response to radiotherapy for personalized therapeutic strategies in the future.

This study was funded by the Institut de Recherche sur le Cancer (IRC) Ref: 201932.

Disclosures

Acknowledgements: The authors are grateful to Mohammed VI Center for Cancer Treatment staff for patients' recruitment, blood collection and follow up of patients.

Ethics Committee Approval: The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Morocco on November, 2017.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: None declared.

Authorship Contributions: Concept – M.A., M.E.M., M.K.; Design – M.A., M.E.M., N.T.; Supervision – I.C., M.K.; Materials – R.B., A.Gi., I.C.; Data collection &/or processing – A.Gi., A.Gu., A.B., K.B., N.E.B.; Analysis and/or interpretation – R.B., M.A.; Literature search – R.B.; Writing – R.B., I.C., M.E.M., Critical review – A.F.M., M.A.; M.K.

References

- Benider A, Harif M, Karkouri M, Quessar A, Sahraoui S, Sqalli S. Registre des Cancers de la région du Grand Casablanca pour la période 2008–2012. Lalla Salma Foundation; 2016. Available at : https://www.contrelecaner.ma/site_media/uploaded_files/RCRGC.pdf. Accessed Mar 1, 2022.
- 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;68:394–424.
- Shannon-Lowe C, Rickinson A. The global landscape of EBV-associated tumors. *Front Oncol* 2019;9:713.
- Lee HM, Okuda KS, González FE, Patel V. Current perspectives on nasopharyngeal carcinoma. *Adv Exp Med Biol* 2019;1164:11–34.
- Aksoy A, Elkiran ET, Harputluoglu H, Dagli AF, Isikdogan A, Urakci Z. Is excision repair cross-complementation Group1 expression a biological marker in nasopharynx carcinoma? *J Cancer Res Ther* 2019;15:550–5.
- Li W, Chen J, Liu C. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism and oral cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci* 2013;10:392–8.
- Rycak K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol* 2014;90:615–21.
- Ameziane-El-Hassani R, Boufraquech M, Lagente-Chevallier O, Weyemi U, Talbot M, Métivier D, et al. Role of H₂O₂ in RET/PTC1 chromosomal rearrangement produced by ionizing radiation in human thyroid cells. *Cancer Res* 2010;70:4123–32.
- Bocedi A, Noce A, Marrone G, Noce G, Cattani G, Gambardella G, et al. Glutathione transferase P1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution. *Nutrients* 2019;11:1741.
- Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis* 2018;7:8.
- Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997;18:641–4.
- Morita S, Yano M, Tsujinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999;80:685–8.
- Chen YL, Tseng HS, Kuo WH, Yang SF, Chen DR, Tsai HT. Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma. *BMC Med Genet* 2010;11:46.
- Ding F, Li JP, Zhang Y, Qi GH, Song ZC, Yu YH. Comprehensive Analysis of the Association Between the rs1138272 Polymorphism of the GSTP1 Gene and Cancer Susceptibility. *Front Physiol* 2019;9:1897.
- Yadav P, Banerjee A, Boruah N, Singh CS, Chatterjee P, Mukherjee S, et al. Glutathione S-transferasesP1 AA (105Ile) allele increases oral cancer risk, interacts strongly with c-jun kinase and weakly detoxifies areca-nut metabolites. *Sci Rep* 2020;10:6032.
- Al-Eitan LN, Rababa'h DM, Alghamdi MA, Khasawneh RH. Association Of GSTM1, GSTT1 And GSTP1 Polymorphisms With Breast Cancer Among Jordanian Women. *Onco Targets Ther* 2019;12:7757–65.
- Farmohammadi A, Arab-Yarmohammadi V, Ramzanpour R. Association analysis of rs1695 and rs1138272 variations in GSTP1 gene and breast cancer susceptibility. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020;21:1167–72.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1–40.
- Lee CH, Lee KY, Choe KH, Hong YC, Noh SI, Eom SY, et al. Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer. *J Prev Med Public Health* 2006;39:130–4.
- Ji M, Tang J, Zhao J, Xu B, Qin J, Lu J. Polymorphisms in genes involved in drug detoxification and clinical outcomes of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Chinese Han breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2012;13:264–71.
- Baroudi O, Benammar-Elgaaied A. Involvement of genetic factors and lifestyle on the occurrence of colorectal and gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016;107:72–81.
- Pérez S, Taléns-Visconti R, Rius-Pérez S, et al. Redox signaling in the gastrointestinal tract. *Free Radic Biol Med* 2017;104:75–103.
- Wang C, Zhang R, Chen N, Yang L, Wang Y, Sun Y, et al. Association between glutathione peroxidase-1 (GPX1) Rs1050450 polymorphisms and cancer risk. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10:9527–40.
- Tulsyan S, Chaturvedi P, Agarwal G, Lal P, Agrawal S, Mittal RD, et al. Pharmacogenetic influence of GST polymorphisms on anthracycline-based chemotherapy responses and toxicity in breast cancer patients: a multi-analytical approach. *Mol Diagn*

- Ther 2013;17:371–9.
25. Deng X, Yang X, Cheng Y, Liu X, Li X, Zhao R, et al. GSTP1 and GSTO1 single nucleotide polymorphisms and the response of bladder cancer patients to intravesical chemotherapy. *Sci Rep* 2015;5:14000.
 26. Pincinato EC, Costa EFD, Lopes-Aguiar L, Nogueira GAS, Lima TRP, Visacri MB, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms in outcomes of head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cisplatin chemoradiation. *Sci Rep* 2019;9:9312.
 27. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471–4.
 28. Petersson F. Nasopharyngeal carcinoma: a review. *Semin Diagn Pathol* 2015;32:54–73.
 29. Holleccek B, Stegmaier C, Radosa JC, Solomayer EF, Brenner H, Brenner H. Risk of loco-regional recurrence and distant metastases of patients with invasive breast cancer up to ten years after diagnosis - results from a registry-based study from Germany. *BMC Cancer* 2019;19:520.
 30. Zhan Y, Fan S. Multiple mechanisms involving in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* 2020;11:4193–204.
 31. Guo Y, Zhu XD, Qu S, Li L, Su F, Li Y, et al. Identification of genes involved in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by integrating gene ontology and protein-protein interaction networks. *Int J Oncol* 2012;40:85–92.
 32. Drobin K, Marczyk M, Halle M, Danielsson D, Papiez A, Sangsuan T, et al. Molecular profiling for predictors of radiosensitivity in patients with breast or head-and-neck cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12:753.
 33. Jiang Y, Li N, Dong P, Zhang N, Sun Y, Han M, et al. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and nasopharyngeal cancer in the East of China: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:3097–100.
 34. Cao M, Mu X, Jiang C, Yang G, Chen H, Xue W. Single-nucleotide polymorphisms of GPX1 and MnSOD and susceptibility to bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2014;35:759–64.
 35. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 2000;60:6381–3.
 36. Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C, Sato K, et al. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol* 2004;172:728–32.
 37. Hu J, Zhou GW, Wang N, Wang YJ. GPX1 Pro198Leu polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:425–31.
 38. Hansen RD, Krath BN, Frederiksen K, Tjønneland A, Overvad K, Roswall N, et al. GPX1 Pro(198)Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, interaction with alcohol consumption and smoking, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res* 2009;664:13–9.
 39. Erdem O, Eken A, Akay C, Arsova-Sarafinovska Z, Matevska N, Suturkova L, et al. Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk. *Hum Exp Toxicol* 2012;31:24–31.
 40. Yu Z, Li Z, Cai B, Wang Z, Gan W, Chen H, et al. Association between the GSTP1 Ile105Val polymorphism and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2013;34:1855–63.
 41. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett* 2018;433:33–42.
 42. Maniglia MP, Russo A, Biselli-Chicote PM, Oliveira-Cucolo JG, Rodrigues-Fleming GH, Maniglia JV, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma treated with chemotherapy and/or radiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020;21:1637–44.
 43. Lang J, Song X, Cheng J, Zhao S, Fan J. Association of GSTP1 Ile105Val polymorphism and risk of head and neck cancers: a meta-analysis of 28 case-control studies. *PLoS One* 2012;7:e48132.
 44. Pasqualetti F, Gonnelli A, Cantarella M, Delishaj D, Molinari A, Ortenzi V, et al. Association of Glutathione S-Transferase P-1 (GSTP-1) rs1695 polymorphism with overall survival in glioblastoma patients treated with combined radio-chemotherapy. *Invest New Drugs* 2018;36:340–5.
 45. Liblab S, Vusuratana A, Areepium N. ERCC1, XRCC1, and GSTP1 Polymorphisms and treatment outcomes of advanced epithelial ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2020;21:1925–9.
 46. Shen X, Wang J, Yan X, Ren X, Wang F, Chen X, et al. Predictive value of GSTP1 Ile105Val polymorphism in clinical outcomes of chemotherapy in gastric and colorectal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77:1285–302.
 47. Chen J, Cao Q, Qin C, Shao P, Wu Y, Wang M, et al. GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1553–61.
 48. Janicka A, Szymańska-Pasternak J, Bober J. Polymorphisms in the oxidative stress-related genes and cancer risk. *Ann Acad Med Stetin* 2013;59:18–28.
 49. Laribi A, Aouf S, Gabbouj S, Bouaouina N, Zakhama A, Harizi H. Human glutathione peroxidase codon 198 variant increases nasopharyngeal carcinoma risk and progression. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2021;278:4027–34.
 50. Dequanter D, Dok R, Koolen L, VanderPoorten V, Nuyts S. Prognostic significance of glutathione peroxidase levels (GPx1) in head and neck cancers. *Front Oncol* 2017;7:84.
 51. Ban S, Konomi C, Iwakawa M, Yamada S, Ohno T, Tsuji H, et al. Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes obtained

- from patients with cancers of the breast, head and neck or cervix as determined with a micronucleus assay. *J Radiat Res* 2004;45:535–41.
52. Yu J, Huang Y, Liu L, Wang J, Yin J, Huang L, et al. Genetic polymorphisms of Wnt/ β -catenin pathway genes are associated with the efficacy and toxicities of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:82528–37.
 53. Wang ZY, Chen LH, Fan Q, Yan WP, Chen YQ, Li QS, et al. Relationship between radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma and MDR1 gene polymorphism. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007;27:580–3.
 54. Li Y, Zhu L, Yao H, Zhang Y, Kong X, Chen L, et al. Association of inflammation-related gene polymorphisms with susceptibility and radiotherapy sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma patients in Northeast China. *Front Oncol* 2021;11:651632.
 55. Seibold P, Hall P, Schoof N, Nevanlinna H, Heikkinen T, Benner A, et al. Polymorphisms in oxidative stress-related genes and mortality in breast cancer patients—potential differential effects by radiotherapy? *Breast* 2013;22:817–23.
 56. Zhang JX, Wang ZM, Zhang JJ. Association of glutathione peroxidase-1 (GPx-1) rs1050450 Pro198Leu and Pro197Leu polymorphisms with cardiovascular risk: a meta-analysis of observational studies. *J Geriatr Cardiol* 2014;11:141–50.
 57. Zmorzyński S, Świdarska-Kołacz G, Koczkodaj D, Filip AA. Significance of polymorphisms and expression of enzyme-encoding genes related to glutathione in hematopoietic cancers and solid tumors. *Biomed Res Int* 2015;2015:853573.
 58. Zhang CD, Yang Y, Chen HH, Zhang T, Wang Q, Liang Y, et al. RTPDB: a database providing associations between genetic variation or expression and cancer prognosis with radiotherapy-based treatment. *Database* 2018;2018:bay118.

Chapiter III : Mesure de la charge virale du virus epstein–barr chez les patients atteints du NPC

I. Les niveaux d'ADN du virus Epstein-Barr et leurs corrélations avec les caractéristiques cliniques chez les patients marocains atteints du NPC

Le cancer du nasopharynx (NPC) représente une maladie rare avec une répartition géographique très contrastée. Cette maladie est endémique dans le sud-est asiatique et le sud de la Chine avec une incidence annuelle qui varie entre 30 et 80 cas / 100 000 habitants. Le bassin méditerranéen et le Maghreb représentent des zones d'incidence intermédiaire. Au Maroc, l'incidence annuelle des cas atteints de NPC est de 4,2/100.000 habitants chez les hommes et 1,2/100.000 habitants chez les femmes selon le registre des cancers de la région du Grand Casablanca.

Cette répartition géographique est influencée par une interaction complexe de facteurs étiologiques viraux, génétiques et environnementaux. Le NPC est lié de façon étroite avec le virus EBV. Cette liaison se caractérise principalement par la détection du génome viral dans les cellules cancéreuses, et par la présence des anticorps de classe IgA dirigés contre les antigènes de la capsid (VCA) et les antigènes précoces (EA), qui représentent des marqueurs de risque pour le NPC. En raison de cette forte liaison, le NPC est l'un des premiers cancers où l'intervention d'un virus est fortement suspectée, et donc peut servir comme outil de dépistage et de diagnostic précoce de cette maladie.

Récemment, différents auteurs s'intéressent à la mesure de la charge en ADN de l'EBV dans le sang circulant comme marqueur tumoral du NPC. La mesure de la charge virale représente l'un des biomarqueurs les plus sensibles pour la prise en charge du NPC. De nombreuses études ont révélé une forte association entre la masse tumorale et la charge d'ADN virale avant le traitement, cette dernière peut également être utile pour prédire la rechute et les métastases distantes.

De plus, Il a été suggéré que la concentration d'ADN virale dans le plasma pourrait compléter la stratification TNM de ce cancer. Par conséquent, l'utilité clinique de ce biomarqueur pour le dépistage, le diagnostic et le pronostic du NPC a été largement mise en évidence dans les régions endémiques de la maladie.

En raison de la variation biologique entre les populations et du nombre limité de recherches examinant la valeur clinique de la charge d'ADN de l'EBV avant le traitement dans les régions intermédiaires et non endémiques. Le présent travail consistait à l'évaluation de l'association possible entre la charge d'ADN virale plasmatique avant le traitement, les facteurs pronostiques

conventionnels et la survie des patients afin d'évaluer leur valeur clinique chez une population marocaine atteinte du NPC en vue d'une meilleure prise en charge de cette maladie.

Nos résultats ont montré que 90,9 % des patients présentaient une quantité détectable d'ADN d'EBV. La corrélation entre la charge virale et les facteurs pronostiques conventionnels a montré une association significative avec l'âge des patients, la classification tumorale, le statut ganglionnaire, le statut de métastases et le stade global du cancer et les antécédents familiaux de cancer. Le risque de mortalité due au NPC était significativement plus élevé chez les patients présentant des niveaux élevés d'ADN viral avant le traitement par rapport à ceux avec des niveaux d'ADN viral bas. De plus, les patients avec des niveaux élevés d'ADN viral avant le traitement présentaient des taux de survie plus faibles.

Nos résultats ont révélé également que l'atteinte ganglionnaire, le statut métastatique et la survie globale sont des facteurs qui influencent la charge virale chez les patients atteints de NPC. Les résultats de la présente étude ont clairement montré une forte association entre la charge virale avant le traitement, les facteurs pronostiques classiques (TNM et stade de la maladie) du NPC et la survie globale, suggérant que la mesure de la charge virale avant le traitement peut être un biomarqueur pronostique utile dans la prise de décision clinique et l'amélioration de la prise en charge du NPC au Maroc.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Circulating cell-free epstein–barr virus DNA levels and clinical features in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma



Amina Gihbid^{1,2}, Raja Benzeid³, Abdellah Faouzi⁴, Jalal Nourlil⁴, Nezha Tawfiq⁵, Nadia Benchakroun⁵, Amal Guensi⁶, Karima Bendahhou⁵, Abdellatif Benider⁵, Naima El Benna⁷, Imane Chaoui³, Rachida Cadi², Mohammed El Mzibri³ and Meriem Khyatti^{1*}

Abstract

Background: The identification of effective prognosis biomarkers for nasopharyngeal carcinoma (NPC) is crucial to improve treatment and patient outcomes. In the present study, we have attempted to evaluate the correlation between pre-treatment plasmatic Epstein-Barr virus (EBV) DNA load and the conventional prognostic factors in Moroccan patients with NPC.

Methods: The present study was conducted on 121 histologically confirmed NPC patients, recruited from January 2017 to December 2018. Circulating levels of EBV DNA were measured before therapy initiation using real-time quantitative PCR.

Results: Overall, undifferentiated non-keratinizing carcinoma type was the most common histological type (90.1 %), and 61.8 % of patients were diagnosed at an advanced disease stage (IV). Results of pre-treatment plasma EBV load showed that 90.9 % of patients had detectable EBV DNA, with a median plasmatic viral load of 7710 IU/ml. The correlation between pre-treatment EBV DNA load and the conventional prognostic factors showed a significant association with patients' age ($p = 0.01$), tumor classification ($p = 0.01$), lymph node status ($p = 0.003$), metastasis status ($p = 0.00$) and overall cancer stage ($p = 0.01$). Unexpectedly, a significant higher level of pre-treatment EBV DNA was also found in plasma of NPC patients with a family history of cancer ($p = 0.04$). The risk of NPC mortality in patients with high pretreatment EBVDNA levels was significantly higher than that of those with low pre-treatment plasma EBV-DNA levels ($p < 0.05$). Furthermore, patients with high pre-treatment EBV-DNA levels (≥ 2000 , ≥ 4000) had a significant low overall survival (OS) rates ($p < 0.05$). Interestingly, lymph node involvement, metastasis status and OS were found to be the most important factors influencing the EBV DNA load in NPC patients.

Conclusions: The results of the present study clearly showed a high association between pre-treatment EBV DNA load, the crucial classical prognostic factors (T, N, M and disease stage) of NPC and OS, suggesting that pre-treatment EBV DNA can be a useful prognostic biomarker in clinical decision-making and improving NPC treatment in Morocco.

Keywords: Epstein-barr virus, Plasma DNA load, Nasopharyngeal carcinoma, Prognostic

* Correspondence: meriem.khyatti@pasteur.ma

¹Laboratory of Viral Oncology, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Introduction

Nasopharyngeal carcinoma (NPC), one of the most common head and neck cancers, has a streaking geographical distribution; rare in most parts of the world, it is endemic in southern parts of China and other parts of south-east Asia (Malaysia, Indonesia, Vietnam), with an incidence varying between 30 and 80 cases per 100,000 per year. Intermediate rates are also observed in certain areas including the Maghreb (Morocco, Algeria & Tunisia), the Inuit of Greenland and Alaska [1, 2]. In Morocco, according to the cancer registry of Casablanca, the incidence of NPC is 4.2/100.000 in men and 1.2/100.000 in women yearly [3]. The age incidence curves for NPC are different across endemic and non-endemic populations. A bimodal age distribution characterizes the population of the Maghreb, with a first peak incidence occurring at 15–25 and a second one at 50–59 years of age, while only one peak around ages 45–59 is observed in endemic areas for NPC [4].

NPC development seems to be multifactorial, in which ethnic background, genetic susceptibility and environmental carcinogens play a crucial role [5]. The strong association between Epstein Barr virus (EBV) and NPC implies that targeting EBV may be an efficient approach at different levels of NPC management. As such, EBV infection remains the most extensively studied etiological factor for NPC.

Several prognostic factors including clinical, biological and pathological data are widely used to characterize NPC evolution. In clinical practice, oncologists often rely on age, histological type and clinical stage as essential factors to predict the prognosis of NPC [6].

Currently, new prognostic biomarkers are being evaluated for their clinical involvement. Interestingly, the quantification of circulating EBV DNA represents one of the most sensitive peripheral blood biomarkers for NPC management [7]. Results from earlier studies demonstrate a strong association between tumor burden and pre-treatment EBV DNA load [8], the latter can also be useful to predict relapse and distant metastasis, which are the main challenge faced by clinicians in NPC management [9]. Moreover, many studies suggested that plasma EBV DNA level could improve and supplement TNM staging of NPC [10]. Accordingly, the clinical utility of this biomarker in screening, diagnostic and prognostication of NPC was largely highlighted in endemic areas for NPC (Asian populations) [11, 12].

Taking into account the biological variation between populations, which may influence the EBV DNA load, and the limited number of studies examining the clinical value of pre-treatment EBV DNA load in intermediate and non-endemic areas of NPC, this prospective study was designed to evaluate the correlation between pre-treatment plasmatic EBV DNA load, the conventional

prognostic factors and patient's survival in order to assess their clinical value in Moroccan NPC patients for better management of NPC.

Materials & methods

Study setting

A total of 121 histologically confirmed NPC patients were recruited at Mohammed IV Center for Treatment of Cancer of Casablanca, from January 2017 to December 2018. Sixty healthy individuals with no evidence of any personal history of cancer or other chronic disease were used as controls. The recruited healthy controls were matched to NPC cases by age and sex. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Morocco and written informed consent was obtained from each patient.

Study design

At recruitment, all patients underwent a pre-treatment examination. Magnetic resonance imaging (MRI) of the neck and nasopharynx and Positron Emission Tomography–Computed Tomography (PET-CT) were performed for patients before the initiation of oncological therapy. All patients were staged according to the 7th edition of the International Union Against Cancer / American Joint Committee on Cancer system using MRI and PET/CT findings. A face-to-face interview was conducted with all participants to collect socio-economic information regarding: age, sex, familial history of cancer, tobacco habits, alcohol consumption and childhood habitat. Clinical information including histological type and clinical stage were retrieved from patients' medical records. Patients included in this study were treated with chemo-radiotherapy with or without induction chemotherapy, according to the hospital practice guidelines. Patients as well as healthy individuals were subjected to peripheral blood sampling before initiation of treatment for plasmatic cell-free DNA extraction and EBV DNA quantification.

Quantification of plasmatic EBV DNA

Plasma from NPC patients was recovered and conserved at -80 °C until use. A volume of 200 µl of plasma was used to extract DNA using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, France). Circulating levels of EBV DNA were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) and were expressed as International Unit/ml (IU/ml). The q-PCR reaction was performed using the RealStar® EBV PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Germany) on ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were 95 °C for 10 min and 45 cycles of 95 °C for 15 sec, 58 °C for 1 min, 68 °C for 30 sec. For each

run, two negative controls without any DNA template were included.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0 for Windows. Descriptive statistics were calculated and presented as number and percentages. The Kruskal-Wallis H and the Mann-Whitney U tests were applied to study the association between classical prognostic factors and pre-treatment EBV viral load as appropriate. Overall survival (OS) was defined as the time from random assignment until death or loss to follow-up. The mortality rates of each group of patients were tested by the χ^2 test. Three-year survival rates were estimated, and the periods of OS among the different groups of patients were evaluated by the Kaplan-Meier method and analyzed by the log-rank test. Differences were considered significant when *p* values were less than 0.05.

Results

The socio-economic and clinico-pathologic data of the 121 NPC patients enrolled in this study are reported in Table 1 and showed that 76 were men and 45 were women (sex-ratio: 1.7). The median age of patients was 45 years with extreme ages of 12 and 80 years old. The proportion of young patients ≤ 30 years old was 24.8 %. The distribution of patients according to birth area showed that 43.3 % were from rural areas whereas 56.2 % were from urban areas. Of note, 22.3 % of patients had a family history of cancer.

The World Health Organization (WHO) has classified NPC into the three subtypes based on histology: the keratinizing squamous cell carcinoma (type 1), the differentiated non-keratinizing carcinoma (type 2), and the undifferentiated non-keratinizing carcinoma (type 3). Pathological data showed that the most frequent histopathologic type was the undifferentiated non-keratinizing carcinoma (type 3) found in 90.1 % of cases. According to the available results of PET/CT and MRI, primary tumors of 27.9 % of patients were T1-T2, while those of 72.0 % of patients were T3-T4. Moreover, 39.8 % of patients had N0-N1 lymph-node involvement and 60.2 % N2-N3. Distant metastasis at initial diagnosis was detected in 32.2 % of patients. Clinical staging was as follows: 73 patients were classified at stage IV (61.8 %), 27 at stage III (22.8 %), 15 at stage II (12.7 %) and 3 at stage I (2.5 %).

Data of pre-treatment plasma EBV quantification showed that EBV DNA was detected in 110 out of 121 patients (90.9 % of cases) with an overall median plasmatic viral load of 7710 IU/ml [0–2,742,000]. Furthermore, EBV DNA was detected in only one of the 60 healthy tested individuals, with an overall median

Table 1 Socio-economic and clinico-pathologic characteristics of patients recruited in the study.

Characteristics	Number of cases	%
Age		
≤ 30 years	30/121	24.8
> 30 years	91/121	75.2
Gender		
Female	45/121	37.2
Male	76/121	62.8
Gender and Age		
Female, ≤ 30	16/121	13.2
Female, > 30	29/121	23.9
Male, ≤ 30	17/121	14.0
Male, > 30	59/121	48.7
Childhood habitat		
Rural	53/121	43.3
Urban	68/121	56.2
Family history of cancer		
No	94/121	77.7
Yes	27/121	22.3
Histological type		
Type 1	1/121	0.8
Type 2	8/121	6.6
Type 3	109/121	90.1
Others	3/121	2.5
TNM classification		
T1-T2	33/118	27.9
T3-T4	85/118	72.0
N0-N1	47/118	39.8
N2-N3	71/118	60.2
Metastasis status		
M0	80/118	67.7
M1	38/118	32.2
Stage of the disease		
I	3/118	2.5
II	15/118	12.7
III	27/118	22.8
IV	73/118	61.8
IVA	30/118	25.4
IVB	5/118	4.2
IVC	38/118	32.2

plasmatic EBV load in the healthy group of 0 UI/ml [0–445 UI/ml]. The correlation between EBV DNA load and the conventional prognostic factors are reported in Table 2. In addition to the age and sex, largely considered as classical prognostic factors, correlations between

Table 2 Distribution of plasma EBV DNA loads according to conventional prognostic factors.

Characteristics	EBV DNA load		p-value
	Mean (IU/ml)	σ	
Age			
≤ 30	24,694	± 63,760	0.01
> 30	119,801	± 369,113	
Gender			
Female	62,539	± 186,538	0.1
Male	80,909	± 231,513	
Gender and Age			
Female, ≤ 30	42,658	± 93,241	0.4
Female, > 30	70,876	± 214,835	
Male, ≤ 30	10,957	± 19,628	
Male, > 30	101,064	± 259,527	
Cigarette smoking			
No	109,881	± 368,262	0.2
Yes	66,385	± 195,496	
Alcohol consumption			
No	95,116	± 324,783	0.2
Yes	106,263	± 328,960	
Family history of cancer			
No	63,627	± 160,216	0.04
Yes	209,697	± 612,347	
Tumor classification			
T1-T2	30,072	± 58,802	0.012
T3-T4	124,706	± 381,729	
Lymph node status			
N0-N1	32,175	± 85,392	0.003
N2-N3	141,974	± 412,092	
Metastasis status			
M0	30,455	± 67,107	0.00
M1	240,946	± 546,896	
Stage of the disease			
I	2197	± 3442	0.01
II	29,266	± 58,612	
III	29,515	± 77,795	
IV	141,779	± 476,377	

cigarette smoking, alcohol consumption and family history of cancer and EBV DNA levels were also performed. Our results revealed a significant association between EBV DNA load and patient's age ($p = 0.01$). In fact, the mean pre-treatment EBV DNA load was significantly low in young patients (24,694 IU/ml), while, it was considerably high in the plasma of patients older than 30 years (119,801 IU/ml). Regarding gender, although a minor variation was observed while comparing EBV

DNA levels between men and women, the difference was statistically not significant ($p = 0.5$). Our data further showed that young females and young males had a low EBV DNA load as compared to older groups although the difference was not statically significant ($p = 0.4$). Moreover, statistical analysis revealed no significant difference between plasma EBV DNA load, cigarette smoking and alcohol consumption ($p > 0.05$). Unexpectedly, EBV DNA load was found to increase significantly in plasma of NPC patients with a family history of cancer ($p = 0.04$).

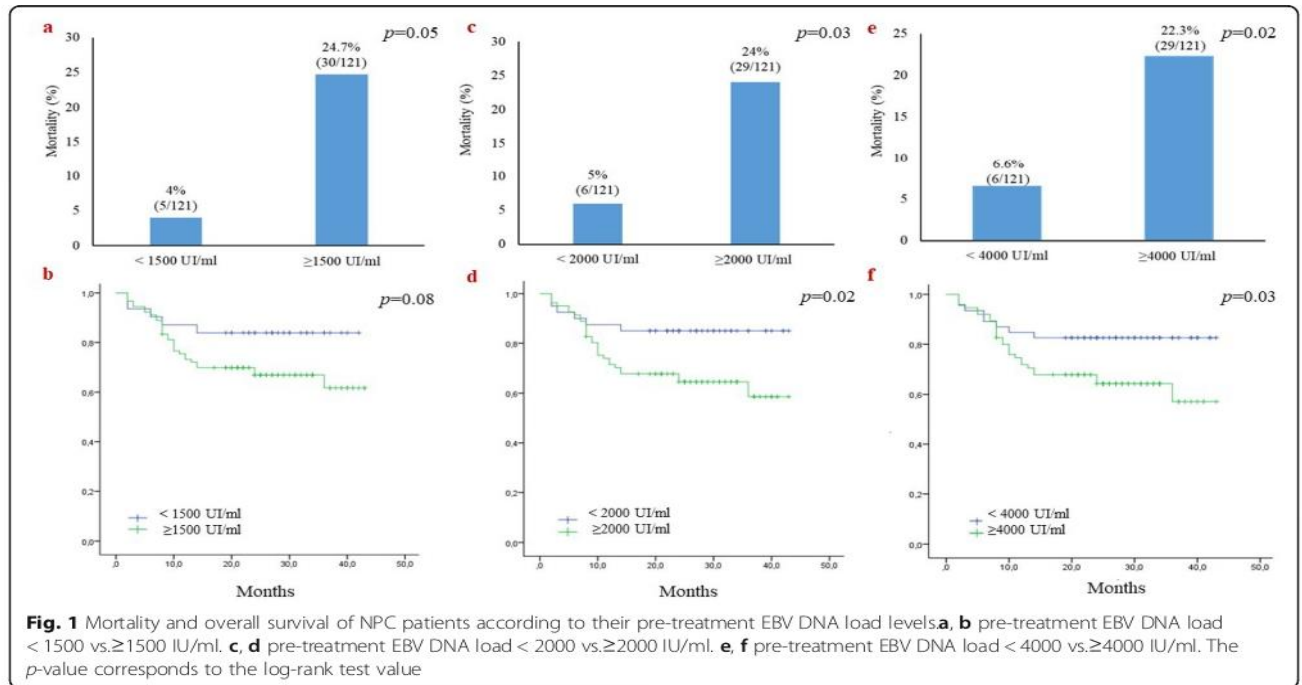
Interestingly, statistical analysis clearly showed that plasma EBV DNA loads correlate significantly with tumor classification ($p = 0.007$), lymph node status ($p = 0.004$), metastasis status ($p = 0.00$), and overall cancer stage ($p = 0.01$). EBV DNA levels were much higher in T3-T4 groups (124,706 IU/ml), N2-N3 groups (141,974 IU/ml) and in patients with distant metastasis (240,946 IU/ml), as compared to patients diagnosed in T1-T2 category (30,072 IU/ml), N0-N1 groups (32,175 IU/ml) and patients without metastasis (30,455 IU/ml), respectively.

Similarly, our data showed that plasma EBV DNA load correlates significantly with disease stage ($p < 0.01$). Indeed, corresponding plasma EBV DNA levels for clinical stages of NPC I, II, III and IV were 2197 IU/ml, 29,266 IU/ml, 29,515 IU/ml and 141,779 IU/ml, respectively. It is also noteworthy that EBV DNA loads of patients at stage IV were 60 times higher than those of patients at stage I.

In the present study, survival rates were estimated for a 3-year period (2 years' median period follow-up). Our results showed that pre-treatment EBV DNA load impacted significantly the OS; in fact, the risk of mortality in patients with high pretreatment EBVDNA levels was significantly higher compared to those with low pre-treatment plasma EBV-DNA levels ($p < 0.05$; Fig. 1a, c and e). The OS rate was 84 % among patients having an EBV DNA load less than 1500 IU/ml and 61 % among those with an EBV DNA load higher than 1500 copies/ml, although the difference was not statistically significant ($p > 0.05$; Fig. 1b). Further, patients with high pre-treatment EBV-DNA levels (≥ 2000 IU/ml or ≥ 4000 IU/ml) had a significant low overall survival (OS) rates ($p < 0.05$; Fig. 1d and f).

Discussion

Over the past decades, several studies have supported that EBV DNA viral load represents one of the most sensitive and non-invasive biomarkers for NPC monitoring. In the present study, pre-treatment plasmatic EBV DNA loads of Moroccan NPC patients were quantified and assessed according to the conventional patient and



clinical related prognostic factors and patient's survival to evaluate their prognostic value. Overall, EBV DNA positivity was 90.9 %, which is comparable to that found in endemic areas [13], but higher than what was reported in non-endemic areas (79.2 %) [14]. Of particular interest, our results revealed a median plasmatic EBV viral load before treatment of 7710 IU/ml, which is comparable to previously findings among Tunisian and Chinese patients with NPC [15, 16]. Most of these previous studies revealed the potential value of this biomarker, whatever the geographic region or the ethnic group. In addition, comparative studies showed that plasmatic EBV DNA before treatment was superior to EBV IgA / VCA serum antibodies in the prognosis of NPC; in fact, studies reported that the levels of some antibodies remain high even when the patients were in complete remission [8, 17, 18].

Like all cancers, the most classical determining factors used to predict prognosis are age, sex, histological type and disease stage. As NPC is characterized by a bimodal age distribution in North-African countries, we analyzed the prognostic value of EBV DNA load in NPC patients stratified by age (≤ 30 vs. > 30 year of age). Our results showed a statistically significant difference between the two patients groups ($p = 0.01$); EBV DNA load was 4 times higher in patients older than 30 years old (119,801 IU/ml), compared to those less or equal to 30 years old (24,694 IU/ml). Our finding is consistent with

previous studies showing that EBV replication is more active in older age groups with NPC [19–21].

TNM staging system has traditionally been the most important prognostic factor for NPC and it was largely established that EBV-DNA loads in NPC patients increased with disease stage. In this study, statistical analysis showed that pre-treatment EBV DNA levels correlate significantly with tumor, lymph node and metastatic status of our patients. The mean plasma EBV DNA levels were 124,706 IU/ml, 141,974 UI/ml and 240,946 UI/ml in patients with T3-T4, N3-N4 and distant metastasis, respectively, which is much higher than those obtained with T1-T2 (30,072 UI/ml), N1- N2 (32,175 IU/ml) and non-metastatic cases (30,455 UI/ml), respectively. These findings are in agreement with previous reports supporting the strong correlation between TNM staging and EBV DNA load and considering EBV DNA load as a useful tool to supplement the TNM system prognosis in NPC [14, 22].

In addition to the previous classical prognostic factors for NPC, we also evaluated the association between EBV DNA level and other factors incremented in other head and neck cancers. Cigarette smoking and alcohol drinking were reported to be associated with poor outcomes in patients with head-and-neck squamous cell carcinomas [23]. In our study, 31.4 % of patients were smokers and 9.9 % were alcohol consumers, but no significant differences of EBV DNA levels neither between smokers

and non-smokers, nor between alcohol drinkers and non-drinkers were observed. Lv et al. have reported, in a large study involving 1051 NPC patients, that cigarette smoking and baseline plasma EBV DNA were independent prognostic factors for survival outcomes. In addition, the combined prognostic value of cigarette smoking and baseline plasma EBV DNA was found to be more significant than the individual factors [24].

Overall, 22.3 % of patients had a family history of cancer. It is also noteworthy that EBV DNA load was found to increase significantly in plasma of NPC patients with a family history of cancer ($p = 0.04$). This is in line with our recently published study using clustering algorithms and unexpectedly showing that familial history of cancer was strongly associated with advanced stage of NPC [25]. To the best of our knowledge, only one study, conducted on 1773 Chinese NPC patients, has examined the relationship between family history of cancer and prognosis of NPC, and has reported that EBV DNA levels were significantly higher in patients with family history of cancer, suggesting that these patients may have a genetic predisposition, promoting the biological process related to the initiation and progression of this disease, notably the activation of EBV viral cycle [26].

Regarding mortality and OS of NPC patients according to their pre-treatment EBV DNA load levels, our results showed patients with high pre-treatment EBV-DNA levels (≥ 2000 , ≥ 4000) have significant high rates of mortality and low OS rates. A meta-analysis study on 7698 patients has confirmed that higher levels of EBV DNA before treatment were associated with higher risk of death (pooled hazard ratios (HR) = 2.420 (95 % confidence interval [CI] = 1.806–3.244, $p < 0.001$)), higher risk of disease progression (HR = 3.005 (95 % CI = 2.245–4.022; $P < 0.001$)) and higher risk of the occurrence of distant metastasis (HR = 3.684, 95 % CI = 3.055–4.444, $p < 0.001$) [13]. It is widely accepted that EBV DNA in the peripheral circulation of NPC patients is released from apoptotic and necrotic tumor cells and reflect the tumor burden [27]. Accordingly, EBV DNA becomes undetectable in NPC patients in complete remission and high pre-treatment plasma EBV DNA load correlates with poor prognosis [23].

The present study is very informative and clearly shows that EBV DNA load is higher in older patients and in patients with family history of cancer. Moreover, the level of EBV DNA is much higher according to tumor and clinical stages, lymph node status and metastatic status, whereas OS was impacted by a high levels of pre-treatment EBV DNA, suggesting that this EBV DNA load could be an effective and good prognostic biomarker of NPC in intermediate incidence risk area. However, the main limitations of this study is the small number of patients.

In Morocco, detection of EBV and assessment of EBV DNA load are not used as standard tests in the clinical practice of NPC. The present study highlights the value of plasma EBV DNA load quantification as useful biomarker, in combination with TNM staging, for NPC diagnosis and prognosis in Moroccan context.

Conclusions

Globally, this study provides the first global report of EBV plasmatic viral load in NPC Moroccan patients. The outcomes highlight a very strong association between level of circulating EBV DNA, the classical prognostic factors and patient's overall survival, suggesting that this biomarker could be predictive of the prognosis of NPC patients in intermediate endemic areas of NPC such as Morocco.

Acknowledgements

We are grateful to Mohammed VI Center for Cancer Treatment staff for patients' recruitment, blood collection and follow up of patients.

Authors' contributions

AG: participated in the project design, experimental analysis, statistical analysis and drafted the manuscript; RB: participated in the experimental analysis; AF: participated in the experimental analysis; JN: participated in the experimental analysis; NT: participated in the project design and review of the final manuscript; NB: participated in patient's recruitment and data collection; AG: participated in patient's recruitment and data collection; KB: participated in the statistical analysis; AB: participated in patient's recruitment and data collection; NE: participated in patient's recruitment and data collection; IC: participated in the experimental analysis; RC: participated in the design of the project and review of the final manuscript; MEM: participated in the design of the project and review of the final manuscript; MK: participated in the design and coordination of the project and review of the final manuscript. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

This study was funded by the Institut de Recherche sur le Cancer (IRC) Ref: 201932.

Availability of data and materials

The prospective data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Laboratory of Viral Oncology, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco. ²Laboratory of Pathophysiology, Molecular Genetics and Biotechnology, Faculty of Sciences Ain Chock, Hassan II University, Casablanca, Morocco. ³Biology and Medical Research Unit, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat, Morocco. ⁴Laboratory of Medical Virology & BSL-3, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco. ⁵Mohammed VI Center for Cancer Treatment, Ibn Rochd University Hospital, Casablanca, Morocco. ⁶Nuclear Medicine Department, Ibn Rochd University Hospital, Hassan II University, Casablanca, Morocco. ⁷Department of Radiology, Ibn Rochd University Hospital, Hôpital 20 Août, Casablanca, Morocco.

Received: 1 October 2020 Accepted: 2 February 2021

Published online: 18 February 2021

References

1. Tang LL, Chen WQ, Xue WQ, et al. Global trends in incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2016;374:22–30.

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2048;68:394–424.
3. Benider A, Harif M, Karkouri M, et al. Registre des Cancers de la région du Grand Casablanca pour la période 2008–2012. Lalla Salma Foundation. 2016. https://www.contrelecancer.ma/site_media/uploaded_files/RCRCG.pdf.
4. Bray F, Haugen M, Moger T, et al. Age-Incidence Curves of Nasopharyngeal Carcinoma Worldwide: Bimodality in Low-Risk Populations and Aetiological Implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev*. 2008;17:2356–65.
5. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:23.
6. Liu MT. Prognostic Factors Affecting the Outcome of Nasopharyngeal Carcinoma. *Jap J Clin Oncol*. 2006;33:501–8.
7. Hui EP, Ma BBY, Chan AKC, et al. Clinical utility of plasma Epstein-barr virus DNA and ERCC1 single nucleotide polymorphism in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2015;121:2720–9.
8. Ma BBY, King A, Lo YMD, et al. Relationship between pretreatment level of plasma Epstein-Barr virus DNA, tumor burden, and metabolic activity in advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66:714–20.
9. Lo YM, Chan AT, Chan LY, et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA. *Cancer Res*. 2000;60:6878–81.
10. Guo R, Tang LL, Mao YP, et al. Proposed modifications and incorporation of plasma Epstein-Barr virus DNA improve the TNM staging system for Epstein-Barr virus-related nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2019;125:79–89.
11. Li HP, Hsu CL, Chang YS. Screening of nasopharyngeal carcinoma using plasma Epstein-Barr virus DNA for at-risk population. *Ann Nasopharynx Cancer*. 2018;2:3.
12. Kimura H, Kwong YL. EBV Viral Loads in Diagnosis, Monitoring, and Response Assessment. *Front Oncol*. 2019;9:62.
13. Liu TB, Zheng ZH, Pan J, et al. Prognostic role of plasma Epstein-Barr virus DNA load for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Clin Invest Med*. 2017;40(1):E1–12.
14. Alfieri S, Iacovelli NA, Marceglia S, et al. Circulating pre-treatment Epstein-Barr virus DNA as prognostic factor in locally-advanced nasopharyngeal cancer in a non-endemic area. *Oncotarget*. 2017;47780–89.
15. Hassen E, Farhat K, Gabbouj S, et al. Epstein-Barr virus DNA quantification and follow-up in Tunisian nasopharyngeal carcinoma patients. *Biomarkers*. 2011;16:274–80.
16. Yip TTC, Ngan RKC, Fong AHW, et al. Application of circulating plasma/serum EBV DNA in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2014;50:527–38.
17. Shao JY, Li YH, Gao HY, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2004;100:1162–70.
18. Twu CW, Wang WY, Liang WM, et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiation Oncol Biology Physics*. 2007;67:130–7.
19. Thomasini RL, Pereira DS, Pereira FSM, et al. Aged-associated cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. *PLoS ONE*. 2017;12:e0180841.
20. Bennett JM, Glaser R, Malarkey WB, et al. Inflammation and Reactivation of Latent Herpesviruses in Older Adults. *Brain Behavior Immunity*. 2012;26:739–46.
21. Wang C, Liu Y, Xu LT, et al. Effects of aging, cytomegalovirus infection, and EBV infection on human B cell repertoires. *J Immunol*. 2014;192:603–11.
22. Zhang B, Mo Z, Du W, et al. Intensity-modulated radiation therapy versus 2D-RT or 3D-CRT for the treatment of nasopharyngeal carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2015;51:1041–6.
23. Fortin A, Wang CS, Vigneault E. Influence of Smoking and Alcohol Drinking Behaviors on Treatment Outcomes of Patients With Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Int J Radiation Oncol Biology Physics*. 2009;74:1062–9.
24. Lv JW, Chen YP, Zhou GQ, et al. Cigarette smoking complements the prognostic value of baseline plasma Epstein-Barr virus deoxyribonucleic acid in patients with nasopharyngeal carcinoma undergoing intensity-modulated radiation therapy: a large-scale retrospective cohort study. *Oncotarget*. 2016;7:16806–17.
25. Rehioui H, Idrissi A, Koukam A, et al. On the Use of Clustering Algorithms in Medical Domain. *Int J Artificial Intel*. 2019;17:236–47.
26. OuYang PY, Su Z, Mao YP, et al. Prognostic impact of family history in southern Chinese patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;109:788–94.
27. Zhang W, Chen Y, Chen L, et al. The Clinical Utility of Plasma Epstein-Barr Virus DNA Assays in Nasopharyngeal Carcinoma: The Dawn of a New Era? *Medicine*. 2015;94(20):e845.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



II. L'analyse de l'évolution de la charge virale dans le plasma tout au long du suivi thérapeutique offre des perspectives de prédiction du pronostic dans le NPC

Le cancer du nasopharynx (NPC) est un cancer d'origine épithéliale, qui se développe dans la partie postérieure du nasopharynx. Cette maladie se caractérise par une répartition géographique et ethnique très particulière, elle est endémique dans certaines régions comme l'Asie du sud-est et l'Afrique du nord. En raison de sa localisation anatomique profonde, et d'absence de symptomatologie spécifique, le NPC est une tumeur dont le diagnostic est difficile et souvent tardif à des stades avancés dans plus de 70% des cas. Environ 20 à 30 % des patients finissent par développer une récurrence locale ou à distance après le traitement.

Le pronostic du NPC est généralement basé sur la classification des tumeurs et des ganglions, il est largement affecté par le stade clinique de la maladie et la technique du traitement. Cette approche pronostique est régulièrement confrontée au développement des récurrences locales ou à distances. Par conséquent, l'identification de nouveaux facteurs pronostiques, dans le cadre d'une approche thérapeutique ciblée, est d'une grande importance pour une meilleure prise en charge du NPC.

Plusieurs études ont montré l'association entre l'ADN circulant du virus EBV chez les cas NPC, le volume tumoral et l'extension. En conséquence, une charge élevée de l'ADN circulant du virus EBV avant l'apparition du NPC a été proposée comme biomarqueur intéressant pour le dépistage du NPC dans les zones endémiques.

La mesure de la charge virale en ADN circulant du virus EBV dans le plasma des patients NPC avant et après traitement constitue un biomarqueur prometteur de diagnostic du NPC, comme elle apparaît corrélée à la survie et au pronostic des patients.

De même, d'après des études plus récentes, ce bio marqueur possède un effet sur la progression tumorale chez les patients atteints du NPC. De plus, des études menées dans des régions endémiques pour le NPC ont montré que les patients ayant une charge d'ADN virale détectable à la fin du traitement, développent des taux élevés de récurrences loco-régionales et de métastases à distance après trois mois, comparativement à ceux ayant une charge d'ADN indétectable.

Dans cette optique, la présente étude visait à étudier l'évolution dynamique de la charge d'ADN plasmatique du virus EBV avant le traitement et à divers moments après le traitement, à la fin du traitement, et à 6, 18 et 24 mois après le traitement et son importance clinique dans le NPC.

Nos données ont montré que des taux élevés d'ADN viral mesurés avant le traitement étaient associés à une survie sans métastases à distance (DMFS) et à une survie sans progression (PFS) significativement plus faibles ; des taux d'ADN viral détectables à la fin du traitement étaient associés à un mauvais taux de survie sans récurrence loco-régionale (LRRFS) et sans progression (PFS). Une ADN virale détectables 6 mois après le traitement étaient associés à une survie globale (OS), DMFS et PFS significativement plus faibles ($p < 0,05$).

De plus, dans l'étude de l'association entre la charge virale avant le traitement et le stade clinique de la maladie, nos résultats ont montré que les patients au stade III-IVA avec une faible charge virale avant le traitement avaient des taux de survie similaires à ceux avec un stade II et une charge virale faible /élevée avant le traitement, mais avaient de meilleurs taux de survie que ceux au stade III-IVA avec une charge virale élevée avant le traitement.

Nos résultats ont bien montré la valeur clinique des tests de la charge d'ADN du virus EBV avant et après le traitement. De plus, la combinaison de la charge virale avant le traitement et de la classification TNM pourrait contribuer à élaborer un modèle pronostique amélioré pour le NPC.

Article

The Dynamic Change in Plasma Epstein–Barr Virus DNA Load over a Long-Term Follow-Up Period Predicts Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma

Amina Ghibid ^{1,2} , Raja Benzeid ³, Abdellah Faouzi ⁴, Imane El Alami ¹, Nezha Tawfiq ⁵, Nadia Benchakroun ⁵, Karima Bendahhou ⁵, Abdellatif Benider ⁵, Amal Guensi ⁶, Wafa Khaali ¹, Imane Chaoui ³ , Mohammed El Mzibri ³ , Rachida Cadi ² and Meriem Khyatti ^{1,*}

¹ Laboratory of Viral Oncology, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca 20360, Morocco

² Laboratory of Pathophysiology, Molecular Genetics and Biotechnology, Faculty of Sciences Ain Chock, Hassan II University, Casablanca 20100, Morocco

³ Biology and Medical Research Unit, National Center of Energy, Sciences and Nuclear Techniques, Rabat 10000, Morocco

⁴ Laboratory of Medical Virology & BSL-3, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca 20360, Morocco

⁵ Mohammed VI Center for Cancer Treatment, Ibn Rochd University Hospital, Casablanca 20100, Morocco

⁶ Nuclear Medicine Department, Ibn Rochd University Hospital, Hassan II University, Casablanca 10001, Morocco

* Correspondence: meriem.khyatti@pasteur.ma; Tel.: +212-5-22-43-44-57; Fax: +212-5-22-26-09-57



Citation: Ghibid, A.; Benzeid, R.; Faouzi, A.; El Alami, I.; Tawfiq, N.; Benchakroun, N.; Bendahhou, K.; Benider, A.; Guensi, A.; Khaali, W.; et al. The Dynamic Change in Plasma Epstein–Barr Virus DNA Load over a Long-Term Follow-Up Period Predicts Prognosis in Nasopharyngeal Carcinoma. *Viruses* **2023**, *15*, 66. <https://doi.org/10.3390/v15010066>

Academic Editors: Sumita Bhaduri-McIntosh, Micah Luftig and Joe S. Mymryk

Received: 5 November 2022

Revised: 19 December 2022

Accepted: 21 December 2022

Published: 25 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The current study was designed to investigate the changes in the circulating Epstein–Barr virus DNA load (EBV DNA) at various time points before and after treatment and its clinical significance in nasopharyngeal carcinoma (NPC). A total of 142 patients with NPC were prospectively enrolled in this study. The plasma EBV DNA concentration was measured before and after treatment using qPCR. The prognostic values of the EBV DNA load were analyzed using the Kaplan–Meier and Cox regression tests. Following multivariate analysis, our data showed that high pre-EBV DNA loads were associated with significantly poorer distant metastasis free survival (DMFS) and progression free survival (PFS); detectable end-EBV DNA loads were associated with significantly worse loco-regional recurrence free survival (LRRFS) and PFS, and the detectable 6 months-post-EBV DNA loads were associated with significantly poorer overall survival (OS), DMFS and PFS ($p < 0.05$). Additionally, combining the pre-EBV DNA load and the stage of the disease, our results showed that patients at stage III-IVA with a low pre-EBV DNA load had similar survival rates as patients at stage II with a low or high pre-EBV DNA load, but had better survival rates than those at stage III-IVA with a high pre-EBV DNA load. Taken together, we showed that the change of the EBV DNA load measured at several time points was more valuable than at any single time point for predicting patients' survival for NPC. Furthermore, combining the pre-EBV DNA load and the TNM classification could help to formulate an improved prognostic model for this cancer.

Keywords: circulating EBV DNA load; nasopharyngeal carcinoma; TNM classification; prognostic; biomarker

1. Introduction

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a squamous cell carcinoma arising from the epithelium of the nasopharynx [1]. Although NPC remains a rare head and neck cancer worldwide, it is particularly endemic in South China, Southeast Asia and North Africa with age-standardized rates ranging from 4 to 25 cases per 100,000 individuals [2,3]. The etiology of NPC is multifactorial, involving host genetic factors, Epstein–Barr virus (EBV) infection and environmental factors [4–6].

Currently, radiotherapy (RT) combined with cisplatin-based chemotherapy is the commonly used treatment regimen for patients diagnosed with loco-regionally advanced

NPC; RT alone being used to treat limited nasopharyngeal tumors [7]. Generally, clinical observations have revealed that more than 70% of patients present, at diagnosis, a loco-regionally advanced disease with a very poor prognosis, and approximately 20–30% of patients will ultimately develop local or distant recurrence after treatment. NPC prognosis is usually based on tumor and node classification, and is largely affected by the disease stage and treatment approach. This prognosis approach is regularly confronted with the development of a local or distant recurrence [8]. Therefore, the identification of new prognostic factors, as a part of a targeted therapy approach, is of great importance for better management of NPC [9,10].

Accumulating evidence has shown that circulating EBV DNA in NPC patients, derived from nasopharyngeal cancer cells [11], correlates with tumor volume and extension [12,13]. Accordingly, elevated circulating EBV DNA load before NPC onset has been suggested as an interesting biomarker for NPC screening in endemic areas [14].

To date, the circulating EBV DNA load before and at the end of treatment has emerged as a promising biomarker for NPC diagnosis and a valuable tool for disease prognosis. Recent studies suggest the EBV DNA load as a potential dynamic biomarker that can change reversibly reflecting NPC tumor progression. Studies from endemic areas for NPC, showed that patients with a detectable EBV DNA load at the end of, and 3-months after, treatment had high rates of loco-regional recurrence and distant metastasis, compared to those with an undetectable EBV DNA load [10,15,16]. However, few studies have evaluated EBV DNA as a dynamic biomarker over a long time period after treatment [17,18]. Thus, the present study was planned to investigate the dynamic change in the plasmatic EBV DNA load before treatment (pre-DNA) and at various time points after treatment (at the end, and 6, 18 and 24 months' (mo) post-treatment) and its clinical significance in NPC. A risk classification system based on the pre-EBV DNA load and the TNM classification was also evaluated in this study.

2. Materials and Methods

2.1. The Study Setting

The study included 142 patients, with histologically confirmed NPC, treated at the Mohammed IV Center for Cancer Treatment of Casablanca between January 2017 and March 2019. All patients were followed until February 2021 or until death. The research protocol was approved by the ethical committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca—Morocco, and written informed consents were obtained from all participants. The characteristics of the NPC patients recruited in this study are described in Table S1.

The pre-treatment evaluation included a complete patient history, physical examination, biological tests, magnetic resonance imaging (MRI) and/or computed tomography (CT) of the nasopharynx and neck, abdominal sonography or CT and/or positron emission tomography (PET)-CT. Detailed epidemiological and clinical characteristics were collected using a direct questionnaire with patients and from the medical records. All patients were staged according to the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system based on imaging data.

All patients were routinely examined at the end of treatment, and then every 3 months during the first year, every 6 months during the second and third year and annually thereafter. Using EDTA tubes, a 10-mL blood sample was collected from each patient before treatment (pre-), at the end of treatment (end-), and at 6, 18 and 24 months after treatment achievement. Due to patient drop-out rates, the blood sampling, which was initially performed for a cohort of 142 NPC patients, was reduced to 75, 51, 26 and 16 patients, at the end of treatment, and at 6, 18 and 24 months after treatment completion, respectively.

2.2. The Quantification of Plasmatic EBV DNA Load

DNA extraction from plasma and circulating EBV DNA quantification were performed as previously described [13]. Briefly, 200 μ L of plasma was used to extract DNA using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, France). A real-time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) was used to assess circulating EBV DNA following the manufacturer's recommendations, and results were expressed as International Units /mL (IU/mL).

2.3. The Follow-Up of NPC Patients

All patients were subject to a post-treatment follow-up according to the hospital practice guidelines. Information regarding patient survival was collected through medical records and/or by telephone contact with patients. The overall survival (OS) was defined as the interval from the date of diagnosis to the date of death from any cause or the last follow-up. The loco-regional recurrence-free survival (LRRFS) was defined as the interval from the date of diagnosis to the first evidence of radiological or histological loco-regional recurrence, death from any cause or the last follow-up. The distant metastasis free survival (DMFS) was defined as the interval from the date of diagnosis to the first evidence of radiological distant metastatic lesions, death from any cause or the last follow-up. The progression free survival (PFS) was defined as the time from the diagnosis to progression of the disease, death or the last follow-up (whichever occurred first).

2.4. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with SPSS (version 22.0, Chicago, IL, USA). A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to estimate the cut-off values of pre-EBV DNA levels. Life-table estimation was obtained using the Kaplan–Meier method and differences across groups were evaluated with the log-rank test. The Cox proportional hazard model was further used for multivariate analysis, including the following variables: gender, age (≥ 30 vs. < 30 years), T stage (T1–2 vs. T3–4), N stage (N0–1 vs. N2–3), overall disease stage (I–II vs. III–IV) and pre- and post-EBV DNA levels. The results were presented as hazard ratios (HRs) with 95% confidence intervals (CIs). For all tests, the significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. The Dynamic Change of Pre- and Post-Treatment Plasma EBV DNA Load

Pre-EBV DNA was detectable in 90.1% of patients (128/142) with a mean viral load of 0.4 UI/mL (range: $0\text{--}2.7 \times 10^6$ UI/mL). At the end of treatment, EBV DNA was still detected in 16.0% of patients (12/75), with a mean viral load of 142.6 UI/mL (range: $0\text{--}3.9 \times 10^3$ UI/mL). EBV DNA was detected in 25.5% of patients, 6 months after the end of treatment (13/51) (6-mo- EBV DNA mean: 300.2 UI/mL, range $0\text{--}8 \times 10^3$ UI/mL); in 15.4% of patients, 18 months after the end of treatment (4/26) (18-mo- EBV DNA mean: 236.9 UI/mL, range: $0\text{--}4 \times 10^3$ UI/mL); and in only 1 patient, 24 months after treatment achievement (6.25%) (viral load: 312.5 UI/mL) (Table 1).

Table 1. The prevalence of EBV DNA and EBV DNA levels in the plasma of patients with NPC at various time points.

	Number of Patients	Prevalence of EBV DNA	Mean EBV DNA Levels (UI/mL)
Pre-EBV DNA load	142	90.1% (128/142)	0.4 [$0\text{--}2.7 \times 10^6$]
End-EBV DNA load	75	16.0% (12/75)	142.6 [$0\text{--}3.9 \times 10^3$]
6-mo-EBV DNA load	51	25.5% (13/51)	300.2 [$0\text{--}8 \times 10^3$]
18-mo-EBV DNA load	26	15.4% (4/26)	236.9 [$0\text{--}4 \times 10^3$]
24-mo-EBV DNA load	16	6.25% (1/16)	312.5 [$0\text{--}5 \times 10^3$]

Our data further showed that all patients (14/142) with undetectable pre-EBV DNA, maintained undetectable EBV DNA at all post-treatment analyses (end, 6 mo, 18 mo and 24 mo). Furthermore, among the 63/75 (84%) patients with undetectable end-EBV DNA, nine patients had detectable EBV DNA after 6 and/or 18 months of achieving the treatment; the characteristics of these patients are detailed in Table S2 of supplementary data. Of particular interest, the majority of these patients were diagnosed at advanced disease stages: one patient at stage II, two at stage III, three at stage IV-A and one at stage IV-C; and five of them developed disease recurrence during the follow-up.

3.2. The Determination of the Cut-Off Values

The cut-off value of the pre-EBV DNA load, defined using ROC curve analyses, was 4000 UI/mL (Figure S1). This cut-off value was then used to classify NPC patients into low and high pre-EBV DNA groups. After grouping patients based on their pre-EBV DNA levels, 63 patients (44.3%) were in the low pre-EBV DNA load group (<4000 UI/mL) and 79 patients (55.6%) in the high pre-EBV DNA load group ($\geq$ 4000 UI/mL). Referring to previous studies [10,19], a cut-off value of 0 UI/mL was used for the post-EBV-DNA load to classify patients into undetectable and detectable EBV DNA groups for all post-treatment end points.

3.3. Survival Outcomes (OS and PFS) among Age Subgroups of NPC Patients According to the Plasma Pre and End-EBV DNA Load

Considering that the age incidence curve of NPC in our population shows a bimodal distribution with a significant age peak in the teens and the potential difference in NPC pathogenesis between children and adult patients, we performed a subgroup analysis according to age. As shown in Table 2, poor OS and PFS rates were observed in NPC patients with a high pre-EBV DNA load and a detectable end-EBV DNA load, regardless of the age group of our patients.

Table 2. The 4-years' survival rates (OS and PFS) among age subgroups of NPC patients according to plasma EBV DNA load before and at the end of treatment.

Group of Age	Number and Percentage of Patients	OS Rates (%)		PFS Rates (%)		OS Rates (%)		PFS Rates (%)	
		Pre-DNA EBV Load (UI/mL)		End-DNA EBV Load (UI/mL)					
		<4000	$\geq$ 4000	<4000	$\geq$ 4000	<0	$\geq$ 0	<0	$\geq$ 0
[12–21]	22/142 (15.5%)	81.8	69.3	81.8	60.6	90.0	50.0	81.8	50.0
[22–32]	13/142 (9.2%)	100	50	77.8	0.00	81.8	-	62.3	0.00
[33–42]	21/142 (14.8%)	85.7	66.7	52.5	32.4	100	66.7	65.7	0.00
[43–52]	36/142 (25.4%)	87.5	56.6	76.6	10.7	100	50.0	61.9	0.00
[53–62]	35/142 (24.6%)	58.4	58.6	49.6	24.2	80.4	0.00	47.8	0.00
[63–72]	14/142 (9.9%)	75.0	0.00	75.0	0.00	0.00	-	0.00	-
>72	1/142 (0.7%)	-	0.00	-	0.00	-	-	-	-

3.4. Survival Outcomes According to EBV DNA Load at Various Time Points

The association between OS, LRRFS, DMFS and PFS of patients with NPC and EBV DNA load was assessed and reported in Figures 1 and 2. Our results showed that a high pre-EBV DNA load was significantly associated with worse OS (HR CI 95% = 2.59 (1.30–5.15), $p = 0.006$), LRRFS (HR (CI 95%) = 2.25 (1.01–5.00), $p = 0.04$), DMFS (HR (CI 95%) = 3.63 (1.95–6.74), $p = 0.000$) and PFS (HR (CI 95%) = 3.34 (1.93–5.77), $p = 0.000$). Similarly, detectable end-EBV DNA was strongly associated with a high risk of death (HR (95%) = 6.37 [(2.04–19.8), $p = 0.001$], loco-regional recurrence (HR (CI 95%) = 4.81 (1.72–13.45), $p = 0.003$), distant metastasis (HR (CI 95%) = 3.02 (1.23–7.41), $p = 0.01$) and disease progression (HR (CI 95%) = 4.88 (2.29–10.40), $p = 0.000$).

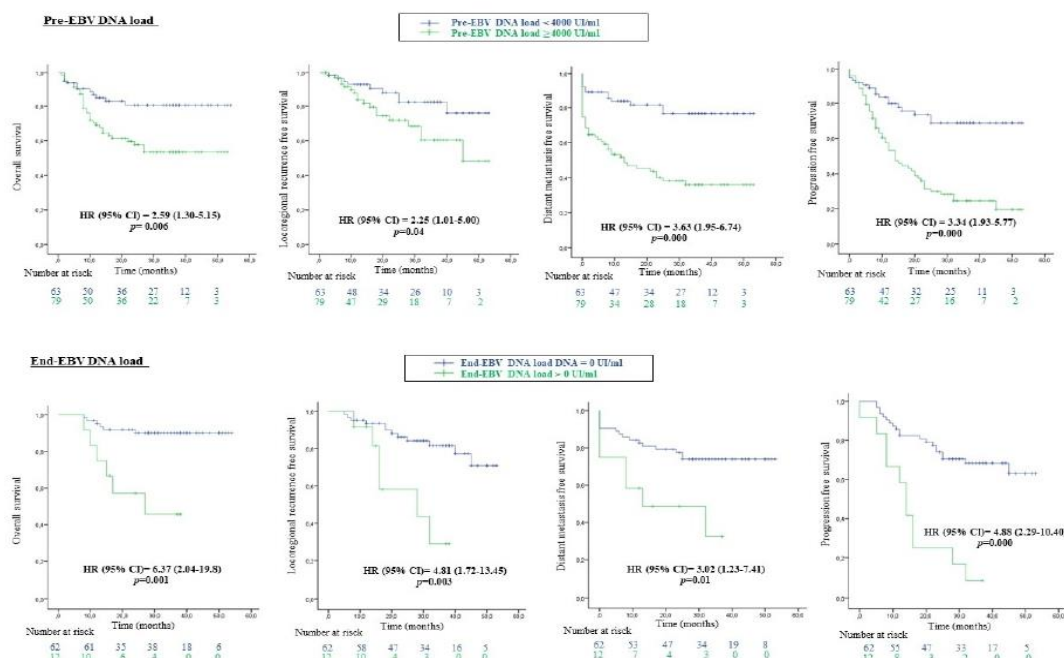


Figure 1. The 4-years' survival outcomes of patients with NPC according to the EBV DNA load before and at the end of treatment.

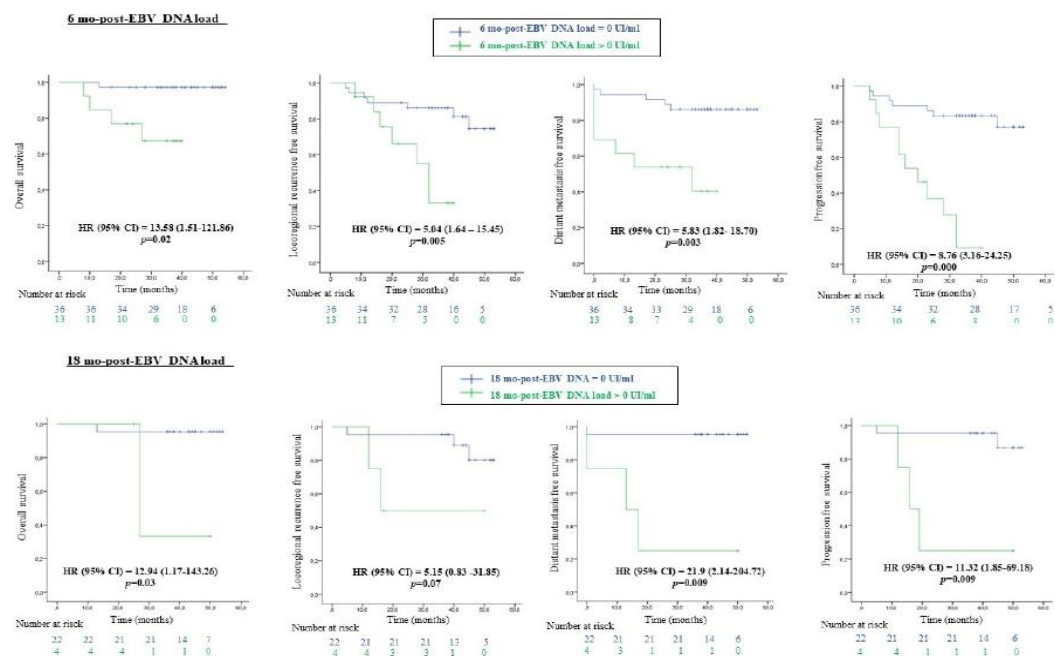


Figure 2. The 4-years' survival outcomes of patients with NPC according to EBV DNA load 6 and 18 months after treatment.

Patients with an undetectable 6-mo-EBV DNA load achieved better OS (HR (CI 95%) = 13.58 (1.51–121.86), $p = 0.02$), LRRFS (HR (CI 95%) = 5.04 (1.64–15.45), $p = 0.005$), DMFS (HR (CI 95%) = 5.83 (1.82–18.70), $p = 0.003$) and PFS (HR (CI 95%) = 8.76 (3.16–24.25), $p = 0.000$) compared to patients with a detectable 6 mo-EBV DNA load. Furthermore, patients with an undetectable 18 mo-EBV DNA load had significantly higher OS (HR (CI 95%) = 12.94 (1.17–143.26), $p = 0.03$), DMFS (HR (CI 95%) = 21.9 (2.14–204.72), $p = 0.009$) and PFS (HR (CI 95%) = 11.32 (1.85–69.18), $p = 0.009$) rates.

3.5. The Subgroup's Analysis of Dynamic Change in Plasmatic EBV DNA Loads

In the current study, the 75 patients for which EBV DNA tests were performed at both pre- and end-treatment time points, were stratified into four subgroups (Figure 3 (1)): subgroup 1 (low pre-EBV DNA and undetectable end-EBV DNA loads, $n = 32$ patients) (42.7%), subgroup 2 (low pre-EBV DNA and detectable end-EBV DNA loads, $n = 6$ patients (8%)), subgroup 3 (high pre-EBV DNA and undetectable end-EBV DNA loads, $n = 31$ patients (41.3%)) and subgroup 4 (high pre-EBV DNA and detectable end-EBV DNA loads, $n = 6$ patients (8%)). Interestingly, subgroup 1 had the highest rates of OS (100%), LRRFS (83.0%), DMFS (93.3%), and PFS (89.9%); followed by subgroup 3, exhibiting OS, LRRFS, DMFS and PFS rates of 71.1%, 71.3%, 54.5% and 37.1%, respectively. Regardless of the pre-EBV DNA load, patients with detectable end-EBV DNA loads (subgroup 2 and 4), presented poorer survival rates, with an OS of 79.0% and 26.7%, SSRLR of 27.8% and 26.7%, SSMD of 44.4% and 25.0% and PFS of 16.7% and 0%, respectively.

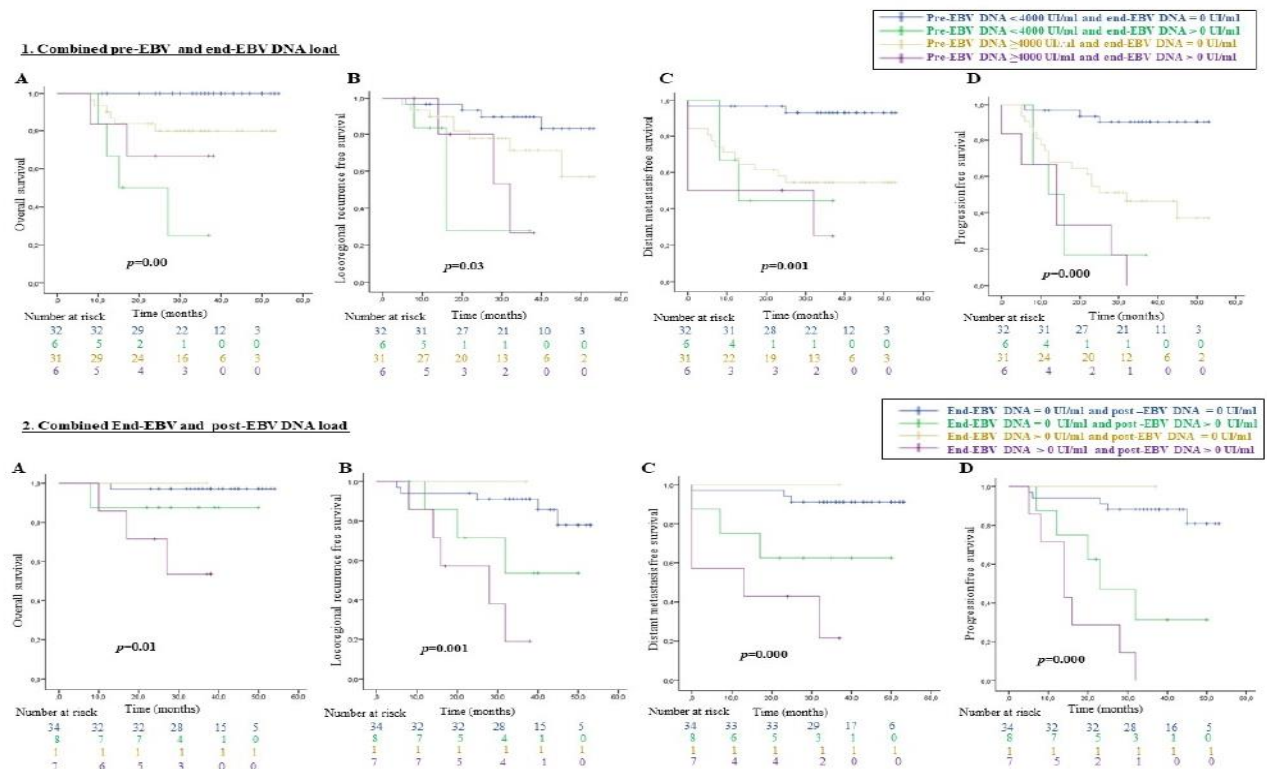


Figure 3. (A) Overall survival, (B) loco-regional recurrence free survival, (C) distant metastasis free survival, (D) progression free survival are illustrated for the different subgroups of patients with NPC according to the dynamic change in plasmatic EBV DNA loads.

The patients who were subjected to EBV DNA quantification at the end of treatment and at post-treatment times (6 and/or 18 mo), were divided into 4 subgroups: subgroup 1' (the end-EBV DNA undetectable and post-EBV DNA undetectable, $n = 34$ patients (68%)), subgroup 2' (the end-EBV DNA undetectable and post-EBV DNA detectable, $n = 9$ patients (18%)), subgroup 3' (the end-EBV DNA detectable and post-EBV DNA undetectable, $n = 1$ patient (2%)), and subgroup 4' (the end-EBV DNA detectable and post-EBV DNA detectable, $n = 6$ patients (12%)). The assessment of prognostic values of the end-EBV DNA paired with the post-EBV DNA load (6-mo and 18 mo-EBV DNA load) is depicted in Figure 3 (2) and the results showed statistically significant differences for OS, LRRFS, DMFS and PFS rates between the four subgroups ($p < 0.05$). Accordingly, the patients of subgroup 4' had the worst prognosis with an OS of 53.4%, LRRFS of 19%, DMFS of 21.4% and null PFS rates, followed by those of subgroup 3' with an OS of 87.5%, LRRFS of 53.6%, DMFS of 62.5 % and PFS of 31.3%. It is also noteworthy that the patients of subgroup 1' had the best prognosis with the highest OS (97.1%), LRRFS (77.9%), DMFS (91.2 %) and PFS (80.9%) rates.

3.6. The Prognostic Value of the Combined Pre-EBV DNA Load and the TNM Classification

Considering the pre-EBV DNA load as a factor of stratification, patients' survival analysis (OS and PFS) according to the T, N, M and UICC stages' categories, clearly showed that the OS and PFS rates were higher in patients with an early tumor (T1) and nodal (N0) and/or overall NPC stages (I–II), regardless of the EBV viral level (Table S3). In patients diagnosed at the advanced tumor (T2–4), nodal (N1–3) and/or overall NPC stages (III–IVA), the OS and PFS rates were significantly higher in those with low pre-EBV DNA loads as compared to those with high pre-EBV DNA loads.

Table 3 compares the 4-years' survival rates among subgroups defined by combining the plasma pre-EBV DNA load, TNM classification and UICC stages. Regarding tumor size, our results showed that patients with T2–4, exhibiting low pre-EBV DNA levels had better OS, LRRFS, DMFS and PFS rates compared to those with high pre-EBV DNA loads (82.7% vs. 52.3%, $p = 0.007$; 79.4% vs. 48.4%, $p = 0.18$; 63.5% vs. 35.1%, $p = 0.00$; 68.3% vs. 20.2%, $p = 0.00$, respectively). Similarly, pre-EBV DNA loads can identify high risk subgroups among patients classified as N1–2. In fact, significantly high rates of OS, LRRFS, DMFS and PFS were reported in the N1–2 patients having low pre-EBV DNA loads compared to those with high pre-EBV DNA loads (81.5% vs. 57.1%, $p = 0.00$; 87.7% vs. 43.1%, $p = 0.02$; 68.3% vs. 33.8%, $p = 0.00$ and 73.9% vs. 19.3%, $p = 0.00$, respectively). Patients with N0 had the best survival rates, whereas those with N3 had the worst survival rates, regardless of pre-EBV DNA levels. Notably, our findings highlight that metastatic patients with low pre-EBV DNA loads had significantly better OS, LRRFS and PFS compared to those with high pre-EBV DNA loads (54.5% vs. 15.0%, $p = 0.00$; 100% vs. 66.4%, $p = 0.02$; 45.5% vs. 0%, $p = 0.00$, respectively).

Regarding the UICC stages, the patients at stages I–II had the best prognosis, while those at stages IVB had the worst prognosis, regardless of pre-EBV DNA loads. For the patients at stages III–IVA, high pre-EBV DNA loads were found to be associated with poorer OS, LRRFS, DMFS and PFS rates (75.8%, 40.5%, 57.3% and 18.2%, respectively), compared to the patients exhibiting low pre-EBV DNA loads (86.9%, 81.5%, 85.6% and 75.8%, respectively). Interestingly, the patients at stages III–IVA with low pre-EBV DNA load had favorable survival rates and similar prognosis to the patients at stage II (OS = 86.9% vs. 88.9%, LRRFS = 81.5% vs. 81.5%, DMFS = 85.6% vs. 88.9% and PFS = 75.8% vs. 88.9%), respectively.

Table 3. Comparisons of the 4-years' survival rates among subgroups of NPC patients defined by the combination of plasma pre-EBV DNA, TNM classification and UICC Stages.

	Number of Patients	4-Years OS	<i>p</i> Value	4-Years LRFS	<i>p</i> Value	4-Years DMFS	<i>p</i> Value	4-Years PFS	<i>p</i> Value
Tumor Classification									
T1-low * or high ** EBV	11/142	72.7%	0.007	70.0%	0.18	63.6%	0.00	54.5%	0.000
T 2,3,4-low EBV	54/142	82.7%		79.4%		63.5%		68.3%	
T 2,3,4- high EBV	77/142	52.3%		48.4%		35.1%		20.2%	
Lymph Node Status									
N0-low EBV or high	11/142	100%	0.00	75.0%	0.02	100%	0.00	90%	0.00
N1,2-low EBV	46/142	81.5%		87.7%		68.3%		73.9%	
N1,2-High EBV	58/142	57.1%		43.1%		33.8%		19.3%	
N3- low or high EBV	27/142	42.8%		53.7%		24.3%		16.7%	
Metastasis Status									
M0-low or high EBV	96/142	82.0%	0.00	64.0%	0.02	73.4%	0.00	55.9%	0.00
M1-low EBV	11/142	54.5%		100%		0.00%		45.5%	
M1-EBV high	35/142	15.0%		66.4%		0.00%		0.00%	
UICC Stages									
I- low or high EBV	4/142	100%	0.40	75.0%	0.01	100%	0.05	100%	0.001
II-low or high EBV	14/142	88.9%		100%		88.9%		88.9%	
III, IVA- low EBV	35/142	86.9%		81.5%		85.6%		75.8%	
III, IVA-high EBV	32/142	75.8%		40.5%		57.3%		29.8%	
IVB- low or high EBV	11/142	70.1%		26.5%		58.9%		18.2%	

Low * EBV: pre-EBV DNA load < 4000 UI/mL; high ** EBV: pre-EBV DNA load ≥ 4000 UI/mL.

3.7. The Multivariate Survival Analysis for Survival Endpoints

All factors displaying a significant association in the univariate analysis were further explored in a multivariate analysis, in order to determine if they could be regarded as independent prognostic factors for NPC. Our results indicated that higher pre-EBV DNA loads were independently associated with a poorer DMFS and PFS ($p = 0.01$ and 0.02 , respectively). Moreover, the end-EBV DNA load was an independent prognostic factor for the LRRFS and PFS ($p < 0.05$); and the 6mo-post-EBV DNA load was an independent prognostic factor for the OS, DMFS and PFS ($p = 0.02$, 0.04 and 0.004 , respectively) (Table 4). The pre- and end-EBV DNA load combination was found to predict LRRFS, DMFS and PFS ($p = 0.006$, 0.03 and 0.001 , respectively), while the end- and post- EBV DNA load combination was found to predict PFS ($p = 0.005$).

Table 4. Multivariate Cox regression analyses for the studied survival endpoints according to the EBV DNA load.

	OS		LRRFS		DMFS		PFS	
	Multivariate Analyses (HR (95% CI))	<i>p</i> Value	Multivariate Analyses (HR (95% CI))	<i>p</i> Value	Multivariate Analyses (HR (95% CI))	<i>p</i> Value	Multivariate Analyses (HR (95% CI))	<i>p</i> Value
Pre-EBV DNA load	0.87 (0.24–3.13)	0.83	0.99 (0.33–2.97)	0.99	4.45 (1.40–14.14)	0.01	2.93 (1.15–7.44)	0.02
Post-EBV DNA load	4.45 (0.89–22.15)	0.06	4.18 (1.28–13.61)	0.01	2.58 (0.95–6.95)	0.05	3.96 (1.75–8.92)	0.001
6 mo-post-EBV DNA load	29.10 (1.47–575.00)	0.02	2.29 (0.67–7.81)	0.18	4.12 (1.05–16.12)	0.04	5.60 (1.75–17.87)	0.004
18 mo-post-EBV DNA load	4.79 (0.40–57.28)	0.21	2.73 (0.33–22.36)	0.34	8.35 (0.83–83.43)	0.07	8.04 (0.80–80.74)	0.07
Pre and end- EBV DNA load	-	0.10	-	0.006	-	0.03	-	0.001
End and post- EBV DNA load	-	0.52	-	0.18	-	0.07	-	0.005

4. Discussion

During the last decade, increasing interest has been directed toward pre- and end-EBV DNA loads as promising biomarkers for early detection, diagnosis and prognosis of NPC [20,21]. In this study, we showed that the plasmatic pre-EBV DNA was detected in 90.1% of NPC patients with a mean viral load of 0.4 UI/mL, which is consistent with the widely reported prevalence rates ranging from 53% to 96% [22]. Furthermore, and as expected, the frequency of circulating EBV DNA positivity and levels of viral load decreased considerably at the end of treatment to 16.0% and to a mean viral load of 142.6 UI/mL, respectively. However, although the clinical value of EBV DNA load testing before and after treatment has been well documented and discussed, most follow-up studies have focused on only a few time points after treatment completion (at the end of treatment and 3 months after treatment). According to the available data, EBV DNA clearance from the plasma of NPC patients occurs rapidly after treatment, generally after the two first weeks of RT, and any increase after the end of treatment is typically a sign of disease recurrence [10,16,23–25]. The EBV DNA can recur 3 months after the end of treatment, highlighting the need for long-term monitoring of the EBV DNA load dynamic in NPC patients [15]. In this context, our results showed that 25.5% (mean = 300.2 UI/mL), 15.4% (mean = 236.9 UI/mL) and 6.25% (mean = 312.5 UI/mL) of patients had detectable EBV DNA in their plasma at 6, 18 and 24 months' post-treatment, respectively. These results agree with previous evidence suggesting that EBV DNA in the plasma of NPC patients is derived from apoptotic and necrotic tumor cells and may reflect the tumor's growth and decline [11].

Considering that for NPC, the OS, LRRFS, DMFS and PFS are the commonly used endpoints for patient follow-up and treatment efficiency evaluation, the association between the EBV DNA load and these four survival parameters was investigated. Our results indicated that the NPC patients with high pre-EBV DNA loads and detectable end-EBV DNA loads have poor survival rates, regardless of the age group. Our findings further revealed that a higher pre-EBV DNA load (≥ 4000 UI/mL) was independently associated with poorer DMFS and PFS ($p < 0.05$); and a detectable end-EBV DNA load was an independent prognostic factor for worse LRRFS and PFS ($p < 0.05$) in NPC. Furthermore, by using the multivariate prognostic model, our data showed that the pre- and end-EBV DNA load combination predicts, independently, the LRRFS, DMFS and PFS ($p < 0.05$). These results concur with data from several Chinese studies, supporting the pre- and end-EBV DNA load as a good prognostic biomarker in NPC [26,27]. During follow-up, we revealed that patients with detectable 6-mo and 18-mo-EBV DNA loads had a higher risk of mortality, loco-regional recurrence, distant metastasis and disease progression (more than 12, 5, 5 and 8 fold, respectively), than those with undetectable 6-mo and 18-mo levels of EBV DNA. Additionally, end- and post-EBV DNA load combination predict, independently, the PFS ($p = 0.005$) in the multivariate analysis. These patients' poor survival outcomes may be linked to the persistence of residual tumor cells that can escape early endoscopic and radiological post-treatment evaluations, as well as chemo-radiotherapy sensitivity that varies among individuals even at the same stage of the disease. In this context, Twu et al. have suggested the benefit of providing additional adjuvant chemotherapy for patients with persistently detectable post-EBV DNA loads after RT, plus induction/concurrent chemotherapy, which would significantly reduce distant failures and improve the overall survival of these patients [28].

Currently, and according to most studies, the patients with detectable end-EBV DNA loads are at an extremely high risk of loco-regional and distant recurrences, whereas the patients with undetectable EBV DNA after treatment have a good prognosis. In our study, the end-EBV DNA load was undetectable, but reemerged 6 and/or 18 mo later in the plasma of nine patients, of whom five subsequently developed loco-regional and/or distant failure. This reappearance of plasmatic EBV DNA after its clearance, which may precede clinical signs of the disease recurrence, could be an accurate early predictor of disease recurrence [15]. We therefore believe that post-treatment EBV DNA quantification is of significant relevance in post-treatment evaluation and can improve the follow-up

evaluation of patients, adding value to routine endoscopy and radiology examination. Meanwhile, a specific algorithm for introducing post-EBV DNA quantification in NPC management should be proposed. Moreover, patients with a 6-mo and/or 18-mo positive post-EBV DNA load and a negative post-treatment endoscopy or normal CT/MRI should be monitored more closely, preferably with biopsy endoscopy and PET/CT; especially in the presence of local inflammation and the fibrotic side effects resulting from RT.

Concurring with previous studies [29,30], we observed that the patients with undetectable pre-EBV DNA loads maintained an undetectable end-, 6-mo and 18-mo-EBV DNA load. A possible explanation for this might be that this group of patients may have non-EBV origin tumors. There are, however, other possible explanations. In fact, the absence of, or a low, detectable plasma EBV DNA may also be due to tumor heterogeneity in the EBV copy number that ranged from 2 to 137 copies EBV/cell [31]. Additionally, other studies have reported variability in copies of the promoter Wp within each genome in NPC. In this field, Nicolls et al. found either a low or the absence of the expression of EBER in tumors of patients with undetectable plasma EBV DNA, as compared to those with a detectable EBV DNA load; suggesting that the EBV genome may be poorly incorporated in the tumor cells in this subgroup of patients leading to impaired expression of the EBER and plasma EBV DNA production [30].

The results of the present study, as well as those of subsequent studies, confirm the great interest of the EBV DNA load in the management of NPC [13,32]. However, the most important challenges remain as the use of the EBV DNA load in patients' staging and the risk stratification before, during and after chemo-radiotherapy. Accordingly, and rather than replacing TNM staging, few studies suggest that pre-EBV DNA loads may be used to complement and refine this conventional approach to better assess patient prognosis [35,36]. We previously reported a significant association between pre-EBV DNA load, TNM classification, overall stage and OS [13]. In the present study, we showed that the pre-EBV DNA load is a promising biomarker, able to identify among patients at the same or different disease stages, a subgroup with a high risk of recurrence or treatment failure. Indeed, the data of the present study revealed that patients at stage III-IVA with a low pre-EBV DNA load had comparable survival rates to patients at stage II with low or high pre-EBV DNA loads, but had better survival rates than those at stage III-IVA with a high pre-EBV DNA load. These results are globally aligned with those reported by Zhang et al. that have suggested a segregation of disease stages into four different risk groups with regards to the pre-EBV DNA load [33]: (1) very low risk, stage I regardless of the pre-EBV DNA load; (2) low risk, stages II, III, IVA–b with low EBV DNA loads; (3) intermediate risk, stages II–III with high EBV DNA loads; (4) high risk, stages IVA–b with high EBV DNA loads. More recently, two studies proposed refining the eighth edition of the AJCC/UICC TNM staging system by incorporating the pre-EBV DNA load. This refinement should help to improve the prognostic performance of the AJCC/UICC TNM staging system and contribute to the development of individualized treatment strategies for NPC, for better management of this disease [34,35]. In this field, a recent study proposed a validated recursive-partitioning analysis (RPA) model to classify NPC patients based on their end-EBV DNA levels and the TNM stage, and showed that the combination of the circulating end-EBV DNA and the TNM stage improved the risk stratification of NPC. Interestingly, the RPA model (c-index 0.712) showed better risk discrimination compared to the TNM stage (0.604) or the end-EBV DNA alone (0.675) [3].

The present study is clearly informative and highlights the interest of integrating EBV DNA loading in the management of NPC prognosis and disease risk stratification. This should, however, be interpreted in the context of its limitations: (1) the prospective nature of the study involved a small number of patients; (2) the low number of patients with a post-EBV DNA load, owing to different constraints including, patients who were lost to follow up; (3) the middle follow-up time (4 years). Further research including a larger number of patients and a longer follow-up period will undoubtedly refine the results of this study.

5. Conclusions

The results showed strong evidence that EBV DNA load testing is a promising dynamic and a minimally invasive biomarker for prognosis and follow-up of the juvenile and adult form of NPC. Regardless of the time point, patients with a high pre-EBV DNA load had poorer survival rates, and persistently high or detectable post-EBV DNA levels might be a good indicator of local, regional or distant tumor recurrence. The EBV DNA load is, therefore, a good biomarker to complete conventional approaches for better management of NPC.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15010066/s1>, Figure S1: The time-dependent receiver operating characteristic curve analysis of OS prediction of NPC patients based on the pre-EBV DNA load.; Table S1: The socio-economic and clinical features of NPC patients recruited in the study ($n = 142$); Table S2: Characteristics of patients with an undetectable end-EBV DNA load and a detectable 6 (and/or) 18-months post-EBV DNA load; Table S3: The 4-years' survival rates' (OS and PFS) comparisons between subgroups of patients according to the pre-EBV DNA load and TNM classification.

Author Contributions: Conceptualization, M.K., M.E.M. and N.T.; methodology, M.K., M.E.M., N.T., A.G. (Amina Ghibid) and A.F.; formal analysis, A.G. (Amina Ghibid) and K.B.; investigation, A.G. (Amina Ghibid), R.B., I.E.A. and A.F.; resources, A.G. (Amina Ghibid), I.E.A., N.B., A.B., N.T. and A.G. (Amal Guens); writing—original draft preparation, A.G. (Amina Ghibid); writing—review and editing, A.G. (Amina Ghibid), W.K., I.E.A., M.K., I.C., R.C., M.E.M. and N.T.; supervision, M.K., R.C., M.E.M., I.C. and N.T.; project administration, M.K. and N.T.; funding acquisition, M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Institut de Recherche sur le Cancer (IRC) Ref: 201932, and the Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST).

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ibn Rochd Hospital of Casablanca, Morocco and written informed consent was obtained from each patient. All procedures performed in these studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional committee on human experimentation and with the Helsinki declaration of 1975, as revised in 1983.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all patients involved in the study; written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to all study patients and their families for their participation in this study. Our gratitude is also extended to the staff of the Mohammed VI Center for Cancer Treatment, Nuclear Medicine Department at Ibn Rochd University Hospital, Hassan II University and the Department of Radiology, Hôpital 20 Août, Ibn Rochd University Hospital for patients' recruitment and the assistance of patients' appointments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest, and the funders had no role in the design of the study nor in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Milk, C.; Jits, W.; Ep, H.; Atc, C. Nasopharyngeal Carcinoma. *Lancet* **2016**, *387*, 1012–1024. [\[CrossRef\]](#)
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Chang, E.T.; Ye, W.; Zeng, Y.-X.; Adami, H.-O. The Evolving Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2021**, *30*, 1035–1047. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Jia, W.-H.; Qin, H.-D. Non-Viral Environmental Risk Factors for Nasopharyngeal Carcinoma: A Systematic Review. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 117–126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Perri, F.; Della Vittoria Scarpati, G.; Giuliano, M.; D'Aniello, C.; Gnoni, A.; Cavaliere, C.; Licchetta, A.; Pisconti, S. Epstein-Barr Virus Infection and Nasopharyngeal Carcinoma: The Other Side of the Coin. *Anticancer. Drugs* **2015**, *26*, 1017–1025. [\[CrossRef\]](#)

6. Dai, W.; Zheng, H.; Cheung, A.K.L.; Lung, M.L. Genetic and Epigenetic Landscape of Nasopharyngeal Carcinoma. *Chin. Clin. Oncol.* **2016**, *5*, 16. [\[CrossRef\]](#)
7. Liu, Z.; Chen, Y.; Su, Y.; Hu, X.; Peng, X. Nasopharyngeal Carcinoma: Clinical Achievements and Considerations Among Treatment Options. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 4972. [\[CrossRef\]](#)
8. Lee, A.W.M.; Ma, B.B.Y.; Ng, W.T.; Chan, A.T.C. Management of Nasopharyngeal Carcinoma: Current Practice and Future Perspective. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 3356–3364. [\[CrossRef\]](#)
9. Ghibid, A.; Cherkaoui Salhi, G.; El Alami, I.; Belgadir, H.; Tawfiq, N.; Bendahou, K.; El Mzibri, M.; Cadi, R.; El Benna, N.; Guensi, A.; et al. Pretreatment [18F]FDG PET/CT and MRI in the Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Ann. Nucl. Med.* **2022**, *36*, 876–886. [\[CrossRef\]](#)
10. Li, W.; Yang, C.; Lv, Z.; Li, J.; Li, Z.; Yuan, X.; Wu, S.; Yuan, Y.; Cui, L.; Lu, J.; et al. Integrating Pre- and Post-Treatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA Levels for Better Prognostic Prediction of Nasopharyngeal Carcinoma. *J. Cancer* **2021**, *12*, 2715–2722. [\[CrossRef\]](#)
11. Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F.O.; Hesch, R.D.; Knippers, R. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1659–1665. [\[PubMed\]](#)
12. Lu, L.; Li, J.; Zhao, C.; Xue, W.; Han, F.; Tao, T.; Chang, H.; Jia, W.; Lu, T. Prognostic Efficacy of Combining Tumor Volume with Epstein-Barr Virus DNA in Patients Treated with Intensity-Modulated Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma. *Oral. Oncol.* **2016**, *60*, 18–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Ghibid, A.; Benzeid, R.; Faouzi, A.; Nourilil, J.; Tawfiq, N.; Benchakroun, N.; Guensi, A.; Bendahhou, K.; Benider, A.; El Benna, N.; et al. Circulating Cell-Free Epstein-Barr Virus DNA Levels and Clinical Features in Moroccan Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. *Infect. Agent Cancer* **2021**, *16*, 15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Chan, K.A.; Woo, J.; King, A.; Zee, B.; Lam, W.K.; Chan, S.; Chu, W.I.; Mak, C.; Tse, I.; Leung, S.; et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 513–522. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhang, Y.; Li, W.-F.; Mao, Y.-P.; Guo, R.; Tang, L.-L.; Peng, H.; Sun, Y.; Liu, Q.; Chen, L.; Ma, J.P.; et al. Risk Stratification Based on Change in Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load after Treatment in Nasopharyngeal Carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 9576–9585. [\[CrossRef\]](#)
16. Chan, D.C.T.; Lam, W.K.J.; Hui, E.P.; Ma, B.B.Y.; Chan, C.M.L.; Lee, V.C.T.; Cheng, S.H.; Gai, W.; Jiang, P.; Wong, K.C.W.; et al. Improved Risk Stratification of Nasopharyngeal Cancer by Targeted Sequencing of Epstein-Barr Virus DNA in Post-Treatment Plasma. *Ann. Oncol.* **2022**, *33*, 794–803. [\[CrossRef\]](#)
17. Li, W.; Chen, J.; Liang, B.; Li, Z.; Li, J.; Yuan, X.; Wu, S.; Zeng, F.; Peng, X.; Li, Y.; et al. Long-term Monitoring of Dynamic Changes in Plasma EBV DNA for Improved Prognosis Prediction of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Med.* **2021**, *10*, 883–894. [\[CrossRef\]](#)
18. He, S.; Wang, Y.; Yang, Y.; Niu, S.; Zhu, M.; Lu, L.; Chen, Y. Circulating Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load During the Follow-up Periods Predicts Recurrence and Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer J.* **2022**, *28*, 85–92. [\[CrossRef\]](#)
19. Wang, W.-Y.; Twu, C.-W.; Chen, H.-H.; Jiang, R.-S.; Wu, C.-T.; Liang, K.-L.; Shih, Y.-T.; Chen, C.-C.; Lin, P.-J.; Liu, Y.-C.; et al. Long-Term Survival Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma by Plasma Epstein-Barr Virus DNA Levels. *Cancer* **2013**, *119*, 963–970. [\[CrossRef\]](#)
20. Han, B.-L.; Xu, X.-Y.; Zhang, C.-Z.; Wu, J.-J.; Han, C.-F.; Wang, H.; Wang, X.; Wang, G.-S.; Yang, S.-J.; Xie, Y. Systematic Review on Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma in Asian Populations. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 2577–2581. [\[CrossRef\]](#)
21. Qu, H.; Huang, Y.; Zhao, S.; Zhou, Y.; Lv, W. Prognostic Value of Epstein-Barr Virus DNA Level for Nasopharyngeal Carcinoma: A Meta-Analysis of 8128 Cases. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2020**, *277*, 9–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Fung, S.Y.H.; Lam, J.W.K.; Chan, K.C.A. Clinical Utility of Circulating Epstein-Barr Virus DNA Analysis for the Management of Nasopharyngeal Carcinoma. *Chin. Clin. Oncol.* **2016**, *5*, 18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lo, Y.M.D.; Leung, S.-F.; Chan, L.Y.S.; Chan, A.T.C.; Lo, K.-W.; Johnson, P.J.; Huang, D.P. Kinetics of Plasma Epstein-Barr Virus DNA during Radiation Therapy for Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res* **2000**, *60*, 2351–2355. [\[PubMed\]](#)
24. Chan, A.T.C.; Ma, B.B.Y.; Lo, Y.M.D.; Leung, S.F.; Kwan, W.H.; Hui, E.P.; Mok, T.S.K.; Kam, M.; Chan, L.S.; Chiu, S.K.W.; et al. Phase II Study of Neoadjuvant Carboplatin and Paclitaxel Followed by Radiotherapy and Concurrent Cisplatin in Patients With Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma: Therapeutic Monitoring With Plasma Epstein-Barr Virus DNA. *JCO* **2004**, *22*, 3053–3060. [\[CrossRef\]](#)
25. Muhanna, N.; Di Grappa, M.A.; Chan, H.H.L.; Khan, T.; Jin, C.S.; Zheng, Y.; Irish, J.C.; Bratman, S.V. Cell-Free DNA Kinetics in a Pre-Clinical Model of Head and Neck Cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16723. [\[CrossRef\]](#)
26. Zhao, F.-P.; Liu, X.; Chen, X.-M.; Lu, J.; Yu, B.-L.; Tian, W.-D.; Wang, L.; Xu, X.; Huang, H.-R.; Zhang, M.-W.; et al. Levels of Plasma Epstein-Barr Virus DNA Prior and Subsequent to Treatment Predicts the Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 2888–2894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Liang, H.; Lv, X.; Wang, L.; Wu, Y.-S.; Sun, R.; Ye, Y.-F.; Ke, L.-R.; Yang, Q.; Yu, Y.-H.; Qiu, W.-Z.; et al. The Plasma Epstein-Barr Virus DNA Level Guides Precision Treatment for Nasopharyngeal Carcinoma in the Intensity-Modulated Radiotherapy Era: A Large Population-Based Cohort Study from an Endemic Area. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2018**, *10*, 1758835918782331. [\[CrossRef\]](#)

28. Twu, C.-W.; Wang, W.-Y.; Chen, C.-C.; Liang, K.-L.; Jiang, R.-S.; Wu, C.-T.; Shih, Y.-T.; Lin, P.-J.; Liu, Y.-C.; Lin, J.-C. Metronomic Adjuvant Chemotherapy Improves Treatment Outcome in Nasopharyngeal Carcinoma Patients with Postradiation Persistently Detectable Plasma Epstein-Barr Virus Deoxyribonucleic Acid. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2014**, *89*, 21–29. [[CrossRef](#)]
29. Le, Q.-T.; Yom, S.S.; Ng, R.H.W.; Bratman, S.V.; Welch, J.J.; Chan, K.C.A.; Kim, K.Y. In Reply to Zoto Mustafayev and Ozyar. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2017**, *99*, 1307. [[CrossRef](#)]
30. Nicholls, J.M.; Lee, V.H.-F.; Chan, S.-K.; Tsang, K.-C.; Choi, C.-W.; Kwong, D.L.-W.; Lam, K.-O.; Chan, S.-Y.; Tong, C.-C.; So, T.-H.; et al. Negative Plasma Epstein-Barr Virus DNA Nasopharyngeal Carcinoma in an Endemic Region and Its Influence on Liquid Biopsy Screening Programmes. *Br. J. Cancer* **2019**, *121*, 690–698. [[CrossRef](#)]
31. Andersson-Anvret, M.; Forsby, N.; Klein, G.; Henle, W. Relationship between the Epstein-Barr Virus and Undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma: Correlated Nucleic Acid Hybridization and Histopathological Examination. *Int. J. Cancer* **1977**, *20*, 486–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sun, P.; Chen, C.; Cheng, Y.-K.; Zeng, Z.-J.; Chen, X.-L.; Liu, L.-Z.; Gu, M.-F. Serologic Biomarkers of Epstein-Barr Virus Correlate with TNM Classification According to the Seventh Edition of the UICC/AJCC Staging System for Nasopharyngeal Carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2014**, *271*, 2545–2554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhang, L.; Tang, L.-Q.; Chen, Q.-Y.; Liu, H.; Guo, S.-S.; Liu, L.-T.; Guo, L.; Mo, H.-Y.; Zhao, C.; Guo, X.; et al. Plasma Epstein-Barr Viral DNA Complements TNM Classification of Nasopharyngeal Carcinoma in the Era of Intensity-Modulated Radiotherapy. *Oncotarget* **2015**, *7*, 6221–6230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guo, R.; Tang, L.-L.; Mao, Y.-P.; Du, X.-J.; Chen, L.; Zhang, Z.-C.; Liu, L.-Z.; Tian, L.; Luo, X.-T.; Xie, Y.-B.; et al. Proposed Modifications and Incorporation of Plasma Epstein-Barr Virus DNA Improve the TNM Staging System for Epstein-Barr Virus-Related Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer* **2019**, *125*, 79–89. [[CrossRef](#)]
35. Lee, V.H.-F.; Kwong, D.L.-W.; Leung, T.-W.; Choi, C.-W.; O’Sullivan, B.; Lam, K.-O.; Lai, V.; Khong, P.-L.; Chan, S.-K.; Ng, C.-Y.; et al. The Addition of Pretreatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA into the Eighth Edition of Nasopharyngeal Cancer TNM Stage Classification. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1713–1722. [[CrossRef](#)]
36. Hui, E.P.; Li, W.F.; Ma, B.B.; Lam, W.K.J.; Chan, K.C.A.; Mo, F.; Ai, Q.Y.H.; King, A.D.; Wong, C.H.; Guo, R.; et al. Integrating Postradiotherapy Plasma Epstein-Barr Virus DNA and TNM Stage for Risk Stratification of Nasopharyngeal Carcinoma to Adjuvant Therapy. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 769–779. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Discussion Générale

Discussion Générale

Par ses caractéristiques épidémiologiques et histopathologiques, le NPC représente une entité spécifique différente du reste des cancers de la sphère oto-rhino-laryngologique (Lee et al., 2019). Sa répartition géographique est très contrastée, avec des taux d'incidence qui sont 50 à 100 fois plus élevés dans les zones endémiques (Chine, Asie du Sud-Est) (Wong et al., 2021). Il est constamment associé à l'infection par le virus EBV (Hau et al., 2020). Du point de vue histopathologique, l'UCNT reste le type le plus fréquent de cette affection (Wu et al., 2018). Les stades avancés au moment du diagnostic, et la fréquence élevée des métastases, font du NPC une maladie sévère, qui demeure un problème de santé publique considérable dans le monde et surtout dans les zones endémiques (Fles et al., 2017).

La radiothérapie est une modalité de traitement incontournable de l'arsenal thérapeutique du cancer. En raison de sa radiosensibilité et de sa localisation anatomique profonde, la radiothérapie est établie comme une pierre angulaire du traitement du NPC depuis 1965 (Sun et al., 2019).

Au cours des dernières décennies, l'évolution de la gestion du NPC a été très impressionnante. Grace aux améliorations technologiques et au grand réseau de la recherche en oncologie, des taux élevés de contrôle local du NPC ont été atteints (Lee et al., 2019). Mais, la radiorésistance qui se traduit par les tumeurs persistantes, les récurrences locorégionales et les métastases, constitue un obstacle majeur à ce succès. En effet, 30 à 50 % des patients résistent à la radiothérapie, ce qui fait de la radiorésistance l'un des plus grands défis de ce cancer (Blanchard et al., 2011).

Deux masses tumorales identiques (même stade et même taille) peuvent répondre différemment au traitement radiothérapeutique. Donc, connaître et comprendre les mécanismes qui sous-tendent la radiosensibilité ou la radiorésistance du NPC permet de développer des thérapies qui favorisent la rémission complète des patients et réduisent la dose du rayonnement nécessaire, améliorant ainsi le taux de survie et la qualité de vie des patients atteints du NPC.

La radiorésistance est un concept très vaste, incluant de nombreux facteurs. Certains sont liés au patient et d'autres à la biologie tumorale (Biau et al., 2015). Sur le plan génétique, la résistance à la radiothérapie peut être le résultat de différents événements génétiques et épigénétiques, tels que l'hyperméthylation, l'expression aberrante des gènes, l'activation

anormale de certaines voies de signalisation, l'altération du microenvironnement tumoral et la présence des SNPs dans certains gènes (Zhan and Fan, 2020).

Du fait des progrès technologiques considérables de la biologie moléculaire, de nombreuses études se sont intéressées à l'identification des altérations génétiques associées au risque du développement du NPC et à la radiorésistance. Parmi les altérations les plus étudiées dans ce sens, il y a les SNPs (Chen et al., 2017), qui sont soit sans effet sur l'expression génique soit ils touchent directement les protéines et leurs régulations (Vignal et al., 2002). Les SNPs peuvent jouer un rôle non négligeable dans la susceptibilité aux cancers (Deng et al., 2017), ils peuvent donc être utilisés comme des biomarqueurs de diagnostic précoce du NPC afin de régler le problème de diagnostic tardif de ce cancer et d'améliorer ainsi son pronostic (Wu et al., 2017).

En plus de leur rôle prédictif du risque du développement du NPC, les SNP ont été utilisés dans l'évaluation des résultats du traitement du cancer (CTOP, cancer treatment outcome predictor) et pour évaluer leurs effets sur plusieurs gènes candidats à la radiorésistance/radiosensibilité dans le NPC dans le but de déterminer le traitement adéquat et la prévention de rechute chez les patients (Greve et al., 2012).

A date, aucune étude n'a évalué la corrélation de la radiorésistance et les variations génétiques et épigénétiques chez les patients atteints du NPC dans le contexte marocain. La recherche de biomarqueurs prédictifs de la radiorésistance est en effet l'un des enjeux de la cancérologie. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de cette thèse qui consistent en l'identification des biomarqueurs qui permettent de prédire la réponse tumorale à la radiothérapie et d'identifier les patients ayant un grand risque de radiorésistance, afin d'élaborer un profil moléculaire de la tumeur, d'orienter le clinicien dans la décision thérapeutique et par conséquent assurer une prise en charge plus efficace du NPC au Maroc.

SNPs : Biomarqueurs de radiorésistance/ radiosensibilité

Nous avons étudié l'association de certains SNPs des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et dans la détoxification avec la réponse à la radiothérapie chez une population marocaine atteinte du NPC. Les gènes ont été sélectionnés sur la base de leurs fonctions biologiques dans la réponse à la radiothérapie.

Les mécanismes de résistance à la radiothérapie peuvent inclure à la fois une augmentation de la détoxification, ainsi qu'une augmentation de la capacité à réparer les lésions d'ADN induites. Grâce aux avancées de la biologie moléculaire, de nombreuses études génétiques ont associé la réponse tumorale au traitement à la présence des SNPs au niveau des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN endommagé.

Les voies de réparation de l'ADN sont fortement liées à la résistance au traitement (Li et al., 2021). NER est une voie des systèmes de réparation qui joue un rôle essentiel dans la protection du génome contre les cancérigènes chimiques et les rayonnements ionisants (Kumar et al., 2020).

La radiothérapie détruit habituellement les cellules tumorales en causant des dommages à l'ADN qui pourraient être réparés par la voie NER. En tant que protéine NER, ERCC1 (Excision repair cross-complementing group1) joue un rôle crucial. Il a été démontré qu'une déficience de la capacité de réparation du gène *ERCC1* est liée à la présence des SNPs qui altèrent l'expression d'ARNm ou l'activité de la protéine (Pasqui et al., 2022).

Dans cette étude, Nous nous sommes donc intéressés à analyser en premier temps la présence de deux SNPs *ERCC1* C8092A (rs3212986) et *ERCC1* C118T (rs11615) chez les patients atteints du NPC ; ces SNPs ont été rapportés comme étant des contributeurs du développement de diverses tumeurs malignes, notamment le NPC et des marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements dans différents cancers (Yang et al., 2009 ; Lee et al., 2020 ; Jiang et al., 2021 ; Rajabi-Moghaddam and Abbaszadeh, 2022 ; Wu et al., 2023). Le génotypage a été effectué par la technique d'amplification PCR suivie du séquençage par la technique Sanger. Par la suite, une analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS pour évaluer l'association possible entre les résultats du génotypage et les stades cliniques des patients ainsi que leur réponse à la radiothérapie.

Nos résultats ont révélé que les deux SNPs du gène *ERCC1* ont été présents dans les différents stades cliniques, aucune association significative n'a été trouvée entre le stade clinique du NPC et les SNPs. Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés dans une étude japonaise menée sur 90 patients atteints du NSCLC, indiquant que les polymorphismes C8092A et C118T du gène *ERCC1* ne sont pas significativement associés aux stades cliniques des patients (Okuda et al., 2011). De plus, dans une étude réalisée sur 267 patients atteints du NPC et 304 témoins,

Yang et ses collaborateurs n'ont signalé aucune association significative entre les fréquences génotypiques des polymorphismes C8092A et C118T du gène *ERCC1* et les stades cliniques des patients atteints du NPC ($P > 0,05$).

Le rôle de la protéine ERCC1 dans la reconnaissance et la réparation de l'ADN endommagé a été largement étudié et corrélé avec la réponse à la chimiothérapie, mais son association avec la radiorésistance des patients atteints du NPC est peu élucidée.

Dans le cadre de l'évaluation de la corrélation entre la réponse à la radiothérapie et le SNP C8092A du gène *ERCC1* dans le NPC, aucune association n'a été trouvée dans la présente étude. Ces résultats suggèrent que ce SNP ne peut pas être utilisé comme un biomarqueur de la radiorésistance chez les patients atteints du NPC.

Ces résultats sont en accord avec une étude chinoise menée par Du et al., soulignant que le SNP C8092A du gène *ERCC1* n'était pas associé avec la réponse à la radiothérapie chez les patients atteints du cancer du poumon traités par IMRT (Du et al., 2018). De même, dans une méta-analyse portant sur 2097 patients atteints du NSCLC, traités par chimiothérapie à base de platine, la corrélation entre le SNP C8092A du gène *ERCC1* et la réponse au traitement n'a révélé aucune association significative (Yin et al., 2011).

Par ailleurs, Chen et al ont signalé le SNP C8092A comme un marqueur prédictif indépendant d'un faible PFS (HR, 1.63; 95% ; CI, 1.08- 2.61; P , 5.047) chez 101 patients NPC traités par chimiothérapie à base de cisplatine (Chen et al., 2013). De plus, dans une étude réalisée sur 75 patients atteints du NPC et traités soit par radiothérapie seule, soit par une chimio-radiothérapie, une association entre le SNP C8092A et la PFS a été bien établie (Xie et al., 2014).

Concernant le SNP C118T, une faible association a été trouvée entre ce SNP et la réponse à la radiothérapie chez notre population d'étude ($p=0.07$). Cette signification limite observée peut être principalement due à la taille de la population d'étude. Dans ce sens, Jiang et ses collaborateurs ont montré que ce SNP peut jouer un rôle important dans la prédiction de la sensibilité à la radiothérapie et du pronostic des patients atteints du NSCLC (Jiang et al., 2021). En effet, les patients porteurs de l'allèle C avaient un meilleur taux de survie par rapport à ceux qui portent l'allèle T (30,9 vs. 16,2 mois ; $p=0,003$). Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Wang et son équipe, qui n'ont observé aucune corrélation significative entre le SNP C118T

et la réponse au traitement, chez 176 patients NSCLC traités par radiochimiothérapie (Wang et al., 2016).

La radiothérapie qui génère aussi bien des dommages de bases que des cassures des simples et doubles brins va donc activer plusieurs systèmes de réparation, dont le système BER (Biau et al., 2019). Ce dernier est un processus multienzymatique de réparation qui nécessite plusieurs enzymes. La protéine XRCC1 (X-ray repair cross complementing protein 1) appartient à cette voie, elle interagit avec l'ADN polymérase- β , l'ADN ligase III et le PARP pour réparer l'ADN endommagé, y compris les altérations induites par la radiothérapie (Biau et al., 2019).

En outre, la réponse à la radiothérapie a été liée à la présence de certains polymorphismes au niveau du gène *XRCC1*. Les SNPs au niveau de ce gène ont été associés à la réponse tumorale aux différentes modalités de traitement dans plusieurs cancers, dont le cancer gastrique (Xu et al., 2014), le cancer colorectal (Liang et al., 2010), le cancer du poumon (Chen et al., 2012) et le NPC (Wang et al. 2017).

Cependant, cette association est controversée. C'est dans cette optique que nous avons réalisé une étude d'association entre la réponse à la radiothérapie et le SNP Arg399Gln (rs25487) du gène *XRCC1* ; qui est associé au risque de développement de diverses tumeurs malignes et a été décrit comme un facteur pronostique pour les patients traités par radiothérapie (Lin et al., 2018 ; Gong et al. 2021) ; dans le but de mieux comprendre et clarifier l'effet de ce SNP sur la réponse au traitement.

Les résultats ont révélé que les fréquences génotypiques et alléliques du SNP Arg399Gln du gène *XRCC1* n'ont aucune association significative avec les stades cliniques (p (génotype) = 0,559; p (allèle) = 0,440). Ces résultats concordent avec une étude indienne qui a été réalisée sur 211 patients atteints du cancer du poumon, et qui n'a montré aucune relation entre le SNP Arg399Gln et les stades cliniques du cancer. Aussi, aucune association significative entre le SNP Arg399Gln du gène *XRCC1* et les stades cliniques des patients n'a été trouvée (Sreeja et al., 2008).

Dans une étude plus récente, Dutta et al ont révélé qu'il n'y avait pas de liaison significative entre le polymorphisme Arg399Gln et les stades cliniques chez une population indienne atteinte du HNSCC (Head-and-neck squamous cell carcinoma) (Dutta et al., 2020).

De plus, dans notre étude d'association entre le SNP Arg399Gln du gène *XRCC1* et la réponse tumorale à la radiothérapie, aucun effet de la distribution des génotypes et des allèles du SNP sur la réponse tumorale n'a été observé (p (génotype) = 0,583; p (allèle) = 0,459)). Ces résultats soulignent que le SNP Arg399Gln du gène de réparation *XRCC1* ne contribue probablement pas à la radiorésistance des patients atteints du NPC.

Cette absence d'association entre la présence du SNP Arg399Gln et la réponse tumorale au traitement a été observée dans d'autres cancers, notamment, le cancer de l'œsophage (Liu et al., 2010), le cancer de la vessie (Sakano et al., 2013) et le cancer gastrique (Geng, 2016).

Nos résultats correspondent fortement à ce qui a été rapporté dans une étude plus récente sur la corrélation entre certains polymorphismes, dont le SNP Arg399Gln du gène *XRCC1* et la réponse tumorale à la chimiothérapie à base de sels de platine chez les patients atteints d'un cancer épithélial ovarien. Aucune association entre ce SNP et le statut de la résistance au traitement n'a été trouvé ($p=1$) (Liblab et al., 2020).

En revanche, certaines recherches ont indiqué que le SNP Arg399Gln peut jouer un rôle prédictif dans l'évaluation de la radiosensibilité des tumeurs. Zhai et al. ont révélé que les patients avec NPC porteurs de l'allèle Gln/Gln étaient plus susceptibles d'obtenir une rémission complète de la tumeur après un traitement radiothérapeutique. Concluant ainsi que l'allèle Gln/Gln peut être associé à une meilleure régression tumorale, et peut aussi être un biomarqueur prédictif de la réponse tumorale dans le NPC (Zhai et al., 2016).

Aussi, il a été démontré également que la présence du SNP Arg399Gln est associée à une réduction de la capacité de réparation l'ADN et à une augmentation de la sensibilité aux rayonnements suggérant ainsi que ce SNP peut être considéré comme un facteur prédictif de la réponse à la radiothérapie (Lei et al., 2002).

La protéine XRCC3 (X-ray cross-complementing group 3 protein) joue un rôle crucial dans les voies de réparation de l'ADN. Des preuves scientifiques ont montré qu'une anomalie dans la fonction de la protéine du XRCC3 n'était pas seulement associée à la cancérogenèse, mais aussi à la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Yu et al., 2021). Il a été prouvé que le polymorphisme Thr241Met du gène *XRCC3* peut affecter la fonction enzymatique et l'interaction de la protéine avec d'autres protéines impliquées dans la réparation des dommages

de l'ADN, ce qui peut déclencher le développement du cancer et/ou la résistance aux traitements (Namazi et al., 2015).

L'évaluation de ces associations ; précédemment démontrées ; avec la présence du SNP Thr241Met *XRCC3* a été un de nos objectifs. Après le génotypage et l'analyse d'association entre le SNP Thr241Met et les stades cliniques, aucun lien n'a été révélé. De même, chen et collaborateurs n'ont signalé aucune association significative entre le polymorphisme *XRCC3* Thr241Met et les paramètres clinico-pathologiques des patients atteints du cancer colorectal (Krupa et al., 2011). Cependant, une forte association a été révélée entre le SNP Thr241Met et les stades cliniques d'une population brésilienne atteintes d'un OSCC (oral squamous cell carcinoma), suggérant ainsi que ce SNP pourrait contribuer au développement de l'OSCC à des stades plus avancés ainsi qu'à la formation de métastases (Dos Santos Pereira et al., 2016).

La relation entre le SNP Thr241Met du gène *XRCC3* et la réponse tumorale à la radiothérapie a été étudiée dans plusieurs cancers, notamment, le glioblastome (Roos et al., 2018), le NSCLC (Shen et al., 2013), la leucémie myéloïde aiguë (Mohseni et al., 2015), le cancer du sein (Goričar et al., 2022).

Concernant le NPC, nous n'avons observé aucun effet du SNP sur le statut de la radiorésistance des cas de notre population d'étude. Nos données sont en accord avec une étude qui a montré que le SNP Thr241Met n'a aucun effet sur les résultats cliniques des patients atteints du NSCLC traités par la chimiothérapie à base de platine (Jin et al., 2014).

De même, l'absence du lien significatif entre le SNP et les résultats de la radiothérapie a été observé également chez des cas de cancer de sein traités par radiothérapie (Popanda et al., 2006).

Récemment, Mališić et al. ont évalué l'influence du SNP Thr241Met sur les effets indésirables de la radiothérapie dans le cancer de la prostate, et ont conclu que le variant Thr du SNP Thr241Met *XRCC3* pourrait prédire le risque de la radiotoxicité génito-urinaire aiguë (Mališić et al., 2022).

Le SNP Thr241Met du gène *XRCC3* est une substitution non conservatrice qui n'affecte pas les interactions protéine-protéine. Néanmoins, cette altération n'a pas d'impact sur l'activité protéique et, par conséquent, elle n'est pas associée au statut de radiorésistance dans le NPC.

D'après les résultats de cette étude, nous suggérons que les polymorphismes au niveau des gènes de réparation de l'ADN sont des biomarqueurs indépendants de la réponse tumorale à la radiothérapie chez les patients atteints du NPC.

Par ailleurs, le processus de détoxification représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances endogènes et exogènes (xénobiotiques) dans le but de faciliter leur biotransformation et leur excrétion hors de l'organisme (Carlisle et al., 2020).

Les altérations au niveau des gènes impliqués dans ce processus de détoxification peuvent augmenter le risque du développement du cancer (Cui et al., 2020), comme elles peuvent moduler de manière très complexe les réponses à des thérapies multiples, et être à l'origine de réponses diverses à la radiothérapie (Cui et al., 2020).

Ainsi, plusieurs auteurs ont rapporté et étudié le rôle des gènes impliqués dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène dans la réponse aux différentes modalités de traitement, mais les résultats étaient incohérents.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'association possible entre les SNPs des gènes codant pour les enzymes de détoxification des substances exogènes (le SNP Ile105Val du gène codant pour la glutathion -S- transférases de classe pi (GSTP1) et le SNP Pro198Leu du gène codant pour le glutathion peroxydase de type I (GPX1)) et la réponse à la radiothérapie chez 101 patients atteints du NPC.

Les résultats ont clairement montré que le SNP Ile105Val du gène *GSTP1* n'avait aucun effet ni sur les caractéristiques clinico-pathologiques ni sur la réponse des patients à la radiothérapie. De même, dans une étude récente, Maniglia et al (2020) ont étudié l'association entre le polymorphisme Ile105Val du gène *GSTP1* et le risque de développement du HNSCC, les facteurs étiologiques, les caractéristiques clinico-pathologiques et le temps de survie des patients traités par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Ils ont montré que ce SNP n'a pas d'impact ni sur les paramètres clinico-pathologiques ni sur la réponse tumorale au traitement (Maniglia et al., 2020).

Cette absence d'association a été également observée chez des patientes atteintes du cancer de l'ovaire traitées par chimiothérapie à base de platine (Liblab et al., 2020). De plus, l'étude réalisée par Russo et al., sur une population brésilienne atteinte du HNSCC, n'a révélé aucune

association entre les polymorphismes de GST étudiés et d'autres caractéristiques clinico-pathologiques de la tumeur (Russo et al., 2013).

L'association entre le polymorphisme Ile105Val et la réponse tumorale à la thérapie a été étudiée chez des patients HNSCC sous chimioradiothérapie. Les patients ayant le génotype *GSTP1* Val105Val avaient 3,87 fois plus de chances de présenter une progression de la maladie que ceux ayant le génotype Ile105Ile ou Ile105Val ($p < 0.01$), concluant que le SNP Ile105Val a un effet sur la réponse tumorale des patients HNSCC traités par chimioradiothérapie.

En plus de la protéine GSTP1, la peroxydase sélénium dépendante GPX1 présente une activité enzymatique antioxydante extrêmement importante dans la détoxification, elle protège les membranes ainsi que les autres organites cellulaires contre le stress oxydant en réduisant le nombre des ROS libérés par la radiolyse de l'eau, après une exposition aux rayonnements ionisants. De ce fait, elle est considérée comme un facteur protecteur du génome contre le stress oxydatif induit par les rayonnements ionisants (Lo et al., 2008). Ceci permet de mentionner le rôle crucial du GPX1 dans la radiorésistance des cellules tumorales en raison de la réduction des ROS et donc la réduction de la fixation des dommages d'ADN au niveau des cellules cancéreuse induite par la radiothérapie (Barker et al., 2015).

Les SNPs peuvent modifier l'expression et l'activité des gènes comme ils peuvent affecter la réponse aux thérapies anti-cancéreuses. Il a été démontré que le SNP Pro198Leu du gène *GPX1* a un effet sur l'expression de la protéine, et l'expression incontrôlée dans une tumeur peut éliminer les ROS, affaiblir l'apoptose, et induire la résistance aux différentes modalités de traitements, favorisant ainsi la survie des cellules cancéreuses (Zhao et al., 2022). Aussi, nos résultats sont en faveur d'une absence d'association possible dans ce sens. Nous suggérons que le SNP Pro198Leu du gène *GPX1* est un événement génétique qui n'est pas impliqué dans la réponse tumorale à la radiothérapie. Nos résultats sont en concordance avec une étude de Nikic et al. qui ont signalé que le SNP du gène *GPX1* n'était pas associé à la survie globale des patients atteints d'un cancer de la vessie urothélial métastatique traités par chimiothérapie au cisplatine chez une population serbe (Nikic et al., 2018).

Par contre, une étude réalisée par Gordon et al. dont l'objectif était de corréliser entre le polymorphisme Pro198Leu et la réponse à la chimio-radiothérapie, les résultats obtenus suggèrent que ce polymorphisme pourrait être un marqueur de pronostic potentiel pour la récurrence

tumorale locale du cancer du rectum permettant de prédire l'efficacité de la chimioradiothérapie (Gordon et al., 2004).

À notre connaissance, la présente étude constitue la première investigation à l'échelle nationale ayant pour but l'étude de l'association des différents SNPs des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et dans la détoxification avec le statut de radiosensibilité/ radorésistance chez les patients marocains atteints du NPC. Cependant et à ce stade, les analyses statistiques ont montré qu'il n'y a pas d'associations significatives entre les polymorphismes *ERCC1* C8092A, *ERCC1* C118T, *XRCC1* Arg399Gln, *XRCC3* Thr241Met, *GSTP1* Ile105Val, *GPX1* Pro198Leu et la réponse à la radiothérapie, ce qui suggère que ces polymorphismes n'ont pas d'impact sur le statut de radorésistance/radiosensibilité des patients atteints du NPC. De ce fait, ils ne peuvent pas être exploités à l'heure actuelle comme des biomarqueurs permettant de prédire la réponse tumorale à la radiothérapie.

D'autres études multicentriques sur un grand nombre d'échantillons et ciblant des polymorphismes supplémentaires pourraient mieux étudier les interactions existantes entre les SNPs ainsi que les différents haplotypes et la réponse tumorale à la radiothérapie ; afin de sélectionner des biomarqueurs candidats pour prédire la réponse tumorale à la radiothérapie et de créer une nouvelle cartographie des polymorphismes associés aussi bien au développement qu'à la résistance du NPC qui pourront venir compléter les tests déjà existants tout en orientant le clinicien dans la décision thérapeutique, et par conséquent améliorer l'efficacité de la thérapie anticancéreuse et la prise en charge du NPC au Maroc.

Charge virale de l'EBV : Outil de diagnostic et de suivi thérapeutique

Les patients atteints du NPC se caractérisent par une augmentation des taux d'anticorps anti-EBV et une charge d'ADN du virus EBV plus élevée. Dans ce contexte, plusieurs études ont été intéressées à la mesure de la charge virale dans le sang périphérique des patients atteints du NPC avant le traitement, révélant ainsi une forte association entre la présence de la tumeur et la charge d'ADN virale, cette dernière peut également être utile pour prédire la rechute et les métastases distantes.

De plus, il a été suggéré que la mesure de la concentration d'ADN virale dans le plasma pourrait compléter la stadification TNM de ce cancer. Par conséquent, l'utilité clinique de ce biomarqueur pour le dépistage, le diagnostic et le pronostic du NPC a été largement mise en

évidence dans les régions endémiques de la maladie. En raison de la variation biologique entre les populations et du nombre limité de recherches examinant la valeur clinique de la charge d'ADN de l'EBV avant le traitement dans les régions intermédiaires et non endémiques.

Dans cette optique, nous avons évalué l'association possible entre la charge d'ADN virale plasmatique avant le traitement, les facteurs pronostiques conventionnels et la survie des patients afin d'évaluer leur valeur clinique chez une population marocaine atteinte du NPC pour une meilleure prise en charge de cette maladie. Nos résultats ont clairement montré que 90.9 % des patients sont testés positifs en ADN du virus EBV, ce qui est comparable aux résultats trouvés par Liu et son équipe dans les zones endémiques (Liu et al., 2017).

Parmi les facteurs déterminants les plus classiques utilisés pour prédire le pronostic du cancer, il y a l'âge, le type histologique et le stade de la maladie. Dans la présente étude, nous avons trouvé une association statistiquement significative entre la charge virale et l'âge des patients ; la charge virale était plus élevée chez les patients âgés, ce qui est en accord avec plusieurs études antérieures montrant que la réplication du virus EBV est plus active chez les patients NPC les plus âgés (Bennett et al., 2012 ; Wang et al. 2014 ; Thomasini et al., 2017).

À ce jour, parmi les facteurs pronostiques les plus utilisés en pratique clinique, il y a la classification TNM. Cette dernière a été corrélée à la charge d'ADN du virus EBV, nos résultats ont démontré que la charge virale augmente en fonction du stade clinique des patients atteints du NPC. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par les deux groupes de Alfieri et Zhang, qui ont soutenu la forte association entre le système de classification TNM et la charge d'ADN du virus EBV et ont considéré la charge d'ADN EBV comme un outil utile en plus du système TNM pour compléter le pronostic dans le NPC (Zhang et al., 2015 ; Alfieri et al., 2017).

Les résultats de notre étude soulignent également la forte association entre la charge virale et les antécédents familiaux du cancer. Ces données corroborent les résultats trouvés par une étude qui a examiné l'association possible entre la charge virale et les antécédents familiaux du cancer chez une population chinoise atteinte du NPC, rapportant que les niveaux d'ADN du virus EBV étaient significativement plus élevés chez les patients ayant des antécédents familiaux de cancer, suggérant que ces patients peuvent avoir une prédisposition génétique et favorisant l'activation du cycle viral du virus EBV et la carcinogenèse (OuYang et al., 2013).

Concernant la relation entre la mortalité, l'OS des patients NPC et la charge virale avant le traitement, nous avons constaté que les patients avec des niveaux élevés d'ADN virale ont des taux élevés de mortalité et des taux faibles de survie. Liu et al ont confirmé que les niveaux les plus élevés d'ADN virale étaient associés à un risque plus élevé de décès, de progression et de métastase à distance (Liu et al. 2017). Ainsi nos résultats suggèrent que la charge d'ADN du virus EBV pourrait être un bon biomarqueur de pronostic chez les patients atteints du NPC dans la zone à risque intermédiaire.

De plus, des études menées dans des régions endémiques pour le NPC ont montré que les patients ayant une charge d'ADN virale détectable à la fin du traitement, développent des récurrences loco-régionales et des métastases à distance après trois mois, comparativement à ceux ayant une charge d'ADN indétectable.

Dans ce travail, nous avons également étudié le changement dynamique de la charge virale avant le traitement et à divers moments après le traitement, ainsi que son importance clinique dans le suivi thérapeutique du NPC. Nous avons constaté que la charge virale a été considérablement diminuée à la fin du traitement

Cependant, bien que la valeur clinique des tests de la charge d'ADN du virus EBV avant et après le traitement a été bien documentée et discutée, la plupart des études de suivi se sont concentrées seulement sur quelques mois après la fin du traitement (juste à la fin du traitement et 3 mois après le traitement). Selon les données disponibles, la clairance de l'ADN virale dans le plasma des patients atteints du NPC se produit rapidement après le traitement, généralement après les deux premières semaines de la radiothérapie, et toute augmentation après la fin du traitement est généralement un signe de récurrence de la maladie (Lo et al., 2000 ; Chan et al., 2004 ; Muhanna et al., 2017 ; Li et al., 2021 ; Chan et al., 2022).

L'ADN du virus EBV peut réapparaître 3 mois après la fin du traitement, ce qui souligne la nécessité d'une surveillance à long terme de la dynamique de la charge virale chez les patients atteints du NPC (Zhang et al., 2016). Dans cette optique, nos résultats ont montré que l'ADN virale a été détectable dans le plasma des patients 6, 18 et 24 mois après le traitement.

Ces résultats concordent avec les données rapportées par Jahr et al suggérant que l'ADN du virus EBV dans le plasma des patients NPC est dérivé des cellules tumorales apoptotiques et nécrotiques et peut refléter la croissance et le déclin de la tumeur (Jahr et al., 2001).

L'association entre la charge virale et les paramètres OS, LRRFS, DMFS et PFS (les quatre paramètres les plus utilisés pour le suivi des patients et l'évaluation de l'efficacité du traitement) a été évaluée dans le cadre de cette étude. Nos résultats ont montré que la charge d'ADN du virus EBV avant et après peut prédire, indépendamment, l'OS, LRRFS, le DMFS et le PFS. Ces résultats sont en accord avec les données de plusieurs études chinoises, concluant que la charge d'ADN du virus EBV avant et après traitement peut être un bon biomarqueur de pronostic dans NPC (Zhao et al., 2015 ; Liang et al., 2018).

Au cours du suivi, les patients ayant une charge virale détectable 6 et 18 mois après le traitement avaient un risque plus élevé de mortalité, de récurrence locorégionale, de métastase à distance et de progression.

De plus, la combinaison de la charge virale pendant la fin et après le traitement peut prédire indépendamment la PFS. Les mauvais résultats de survie de ces patients peuvent être liés à la persistance des résidus de cellules tumorales qui peuvent échapper aux évaluations post-traitement (endoscopie et radiologie), ainsi qu'à la sensibilité à la chimio-radiothérapie qui varie d'un patient à l'autre. Dans ce contexte, Twu et al. ont suggéré de fournir une chimiothérapie adjuvante supplémentaire pour les patients présentant une charge virale détectable après une radiothérapie, ainsi qu'une chimiothérapie d'induction, qui peut améliorer la survie globale de ces patients (Twu et al., 2014).

Dans notre étude, nous avons constaté qu'une charge virale indétectable pendant la fin du traitement peut réapparaître après 6 et/ou 18 mois chez certains patients ; qui ont par la suite développé des récurrences locorégionales ou des métastases à distance. Cette réapparition de l'ADN virale après sa clairance, qui a précédé les signes cliniques de récurrence de la maladie, pourrait être un prédictif précoce précis de la récurrence de la maladie (Zhang et al., 2016).

Par conséquent, la mesure de la charge virale après traitement est d'une importance significative dans l'évaluation post-traitement et pourrait améliorer le suivi des patients atteints du NPC, en ajoutant de la valeur à l'examen endoscopique et radiologique de routine.

MicroARNs et radiorésistance :

Parmi les biomarqueurs moléculaires les plus étudiés dans le NPC, il y a également les microARNs (miARNs) qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel

(Kozomara et al., 2019). L'augmentation ou bien la diminution de l'expression de ces miARNs peut donc être à l'origine du développement du cancer comme elle peut agir sur la sensibilité de la tumeur au traitement (Pulliero et al., 2022). Durant ces dernières décennies, un intérêt croissant a été donné à certains miARNs cellulaires, qui ont été associés à l'acquisition du phénotype de radiorésistance des patients atteints du NPC (Zhan and Fan, 2020 ; Xiao and He, 2021 ; Darvish et al., 2023), et dont l'étude d'expression va probablement permettre de prédire le pronostic en se basant sur des biomarqueurs prédictifs de la réponse à la radiothérapie. Dans ce cadre, nous avons essayé d'étudier les différents niveaux d'expression de certains micro-ARN cellulaires (miR324-3p, miR-21-3p, miR39-3p et miR-34c-5p) par RT qPCR chez des patients atteints du NPC avant et après traitement par radiothérapie. Afin d'évaluer leur relation avec la réponse à la radiothérapie. Cette étude est toujours en cours de réalisation.

Conclusion Générale

En raison de sa profonde localisation et de son caractère asymptomatique aux stades précoces, le cancer du nasopharynx (NPC) est diagnostiqué à des stades très avancés, ce qui est associé à des résultats défavorables et à un mauvais pronostic, principalement en raison du risque de récurrence et de métastase à distance. Au cours des dernières décennies, la compréhension de la génétique du NPC, ainsi que des mécanismes impliqués dans la réponse des patients atteints de NPC aux traitements, a suscité un grand intérêt. Dans ce contexte, plusieurs biomarqueurs ont été identifiés pour améliorer la prise en charge de ce cancer.

À travers le présent travail, nous avons évalué l'implication génétique de certains SNPs dans la réponse à la radiothérapie. À notre connaissance, cette étude constitue la première investigation à l'échelle nationale ayant pour but l'étude de l'association des différents SNPs des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la détoxification avec le statut de radiosensibilité/radiorésistance chez les patients marocains atteints du NPC. Cependant, les analyses statistiques ont montré qu'il n'y a pas d'associations significatives entre les SNPs C8092A et C118T du gène *ERCC1*, Arg399Gln du gène *XRCC1*, Thr241Met du gène *XRCC3*, Ile105Val du gène *GSTP1*, Pro198Leu du gène *GPX1* et la réponse à la radiothérapie, ce qui suggère que ces polymorphismes n'ont pas d'impact sur le statut de radiorésistance/radiosensibilité des patients atteints du NPC. De ce fait, ils ne peuvent pas être exploités, à ce stade, comme des biomarqueurs permettant de prédire la réponse tumorale à la radiothérapie.

Nous avons également examiné la corrélation entre la charge en ADN du virus Epstein-Barr (EBV) dans le plasma avant le traitement et les facteurs pronostiques traditionnels au sein de notre groupe d'étude. Ensuite, Nous avons analysé l'évolution de cette charge virale avant le traitement et à différents moments après le traitement, en évaluant sa pertinence clinique dans le contexte du NPC.

Les résultats de cette investigation suggèrent que la charge du virus EBV avant le traitement pourrait être un biomarqueur pronostique précieux pour orienter les décisions cliniques et que la mesure de la charge virale après le traitement est d'une importance significative dans l'évaluation post-thérapeutique et peut améliorer l'évaluation de suivi des patients atteints du

NPC, en ajoutant de la valeur à l'examen endoscopique et radiologique de routine, en vue d'une meilleure prise en charge de ce cancer au Maroc.

Perspectives

A la lumière des résultats trouvés, nous envisageons à approfondir l'étude des altérations génétiques impliquées dans la réponse à la radiothérapie chez les patients marocains atteints du NPC en augmentant la taille de notre population d'étude, en ciblant d'autres gènes liés à la radiorésistance du NPC.

Ceci permettra dans un premier temps de confirmer nos résultats et de déterminer les gènes candidats liés à la radiorésistance dans le NPC afin d'identifier des biomarqueurs fiables, peu coûteux, et non invasifs avec de bonnes sensibilités et spécificités et générer les données nécessaires pour l'établissement d'un profil moléculaire des patients NPC.

D'autre part, nous envisageons de compléter l'étude de l'expression des micro-ARNs cellulaires (miR324-3p, miR-21-3p, miR39-3p et miR-34c-5p) par RT qPCR chez notre population d'étude avant et après traitement par radiothérapie afin d'évaluer leur effet sur la réponse à la radiothérapie.

Ces approches moléculaires permettront de prédire l'efficacité de la thérapie tout en orientant le clinicien dans la décision thérapeutique, et par conséquent adopter le protocole thérapeutique adéquat en vue d'une prise en charge efficace et efficiente du NPC au Maroc.

REFERENCES

REFERENCES

- Abdul Basit Shah; Hassam Zulficar; ShivarajNagalli. (2023). NasopharyngealCarcinoma. Book. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk554588/>
- Adoga, A. A., Kokong, D. D., Ma'an, N. D., Silas, O. A., Dauda, A. M., Yaro, J. P., ... &Yabak, C. J. (2018). The epidemiology, treatment, and determinants of outcome of primary head and neck cancers at the Jos University Teaching Hospital. *South Asian journal of cancer*, 7(03), 183-187.
- Alexandrie A-K, Rannug A, Juronen E, Tasa G, Warholm M. (2002). Detection and characterization of a novel functional polymorphism in the GSTT1 gene. *Pharmacogenetics*. 12:613–9.
- Alfieri S, Iacovelli NA, Marceglia S, et al. 2017. Circulating pre-treatment EpsteinBarr virus DNA as prognostic factor in locally-advanced nasopharyngeal cancer in a non-endemic area. *Oncotarget*. 2017;47780–89.
- Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., &Malki, M. I. (2020). DNA damage/repair management in cancers. *Cancers*, 12(4), 1050.
- Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao J, Buolamwini J. Molecular Cloning. (1997) Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S -Transferase Pi Gene Variants. *Journal of Biological Chemistry*. 272:10004–12.
- Ambekar, S. S., Hattur, S. S., & Bule, P. B. (2017). DNA: Damage and repair mechanisms in humans. *group*, 1, 7.
- Ardaillou, R. (2008). Radiobiologie-Maurice Tubiana. *Médecine / sciences*, 24(12), 1105-1106.
- Argirion, I., Zarins, K. R., Suwanrungruang, K., Pongnikorn, D., Chitapanarux, I., Sriplung, H., ...&Rozek, L. S. (2020). Subtype specific nasopharyngeal carcinoma incidence and survival trends: differences between endemic and non-endemic populations. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 21(11), 3291.,
- Arsova-Sarafinovska, Z., Matevska, N., Eken, A., Petrovski, D., Banev, S., Dzikova, S., ...&Dimovski, A. J. (2009). Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *International urology and nephrology*, 41(1), 63-70.
- Avadanei, E. R., Giusca, S. E., Negura, L., &Caruntu, I. D. (2018). Single nucleotide polymorphisms of XRCC3 gene in hepatocellular carcinoma–relationship with clinicopathological features. *Polish Journal of Pathology*, 69(1), 73-81.
- Barker, H. E., Paget, J. T., Khan, A. A., & Harrington, K. J. (2015). The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nature reviews Cancer*, 15(7), 409-425.
- Bei, J. X., Zuo, X. Y., Liu, W. S., Guo, Y. M., &Zeng, Y. X. (2016). Genetic susceptibility to the endemic form of NPC. *Chin ClinOncol*, 5(2), 15.
- Bendjemana, K., Satta, D., Adjabi, K., Miali, A., Aiddoudi, S., &Kadri, A. (2011). Étude du profil épidémiologique et des facteurs de risque alimentaires du cancer du nasopharynx dans le Nord-Est algérien. *Journal africain du cancer/African Journal of Cancer*, 1(3), 59-62.

- Bennett JM, Glaser R, Malarkey WB, et al. 2012. Inflammation and Reactivation of Latent Herpesviruses in Older Adults. *Brain Behavior Immunity*. 2012; 26:739– 46. 21.
- Bennis, A., Alami, Z., AChraibi, F., Abdellaoui, M., Bouhafa, T., &Andaloussi, I. B. (2022). Neurotrophic keratitis secondary to radiation therapy for nasopharyngeal UCNT (report of two cases). *Journal francaisd'ophtalmologie*, 45(9), e407-e410.
- Benyahia, Z. (2021). Huge Cervical Mass Hiding A UCNT from the Cavum: About A Case. *Sch J Med Case Rep*, 5, 545-547.
- Berezin.A., Manuel pratique d'ORL à l'usage des étudiants et des médecins généralistes, 1985, Paris (France), Ellipses, 128p.
- Beyene, E. T., Ketema, S. G., Alebachew, A. N., Saleh, M. Y., &Gebremariam, T. A. (2021). Descriptive epidemiology of nasopharyngeal carcinoma at TikurAnbessa Hospital, Ethiopia. *BMC cancer*, 21(1), 540.
- Biau, J., Chautard, E., Miroir, J., & Lapeyre, M. (2015). Radioresistance parameters in head and neck cancers and methods to radiosensitize. *Cancer Radiotherapie: Journal de la SocieteFrancaise de Radiotherapie Oncologique*, 19(5), 337-46.
- Biau, J., Chautard, E., Verrelle, P., &Dutreix, M. (2019). Altering DNA repair to improve radiation therapy: specific and multiple pathway targeting. *Frontiers in oncology*, 9, 1009.
- Blanchard, D., Louis, M. Y., Rame, J. P., & de Raucourt, D. (2013). Tumours of the buccal cavity and the upper respiratory-digestive tracts. *La Revue du praticien*, 63(3), 411-422.
- Blanchard, P., Baujat, B., Holostenco, V., Bourredjem, A., Baey, C., Bourhis, J., ...&MACH-CH Collaborative group. (2011). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiotherapy and oncology*, 100(1), 33-40.
- Blanchard, P., Nguyen, F., Moya-Plana, A., Pignon, J. P., Even, C., Bidault, F., ...& Tao, Y. (2018). New developments in the management of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Radiotherapie: Journal de la SocieteFrancaise de Radiotherapie Oncologique*, 22(6-7), 492-495.
- Boia, E. R., Boia, M., Balica, N. C., Rusu, L. C., Mazilu, O., Solovan, C., &Baderca, F. (2013). Non-keratinizing undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Rom J MorpholEmbryol*, 54(3 Suppl), 839-843.
- Bonfils.P., Chevalier.J., Anatomie ORL, 2005, Paris (France) ; Flammarion, 482p, (2^eedition).
- Bossi, P., Chan, A. T., Licitra, L., Trama, A., Orlandi, E., Hui, E. P., ... &Machiels, J. P. (2021). Nasopharyngeal carcinoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 32(4), 452-465.
- Bossi, P., Chan, A. T., Licitra, L., Trama, A., Orlandi, E., Hui, E. P., ... &Machiels, J. P. (2021). Nasopharyngeal carcinoma: ESMO-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 32(4), 452-465.
- Boussen, H., Bouaouina, N., Mokni-Baizig, N., Gamoudi, A., Chouchane, L., Benna, F., &Ladgham, A. (2005). Les carcinomes du nasopharynx: données actuelles. *PathologieBiologie*, 53(1), 45-51.
- Brigelius-Flohé, R., &Flohé, L. (2020). Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily. *Antioxidants & redox signaling*, 33(7), 498-516.108.

- Bocedi A, Noce A, Marrone G, Noce G, Cattani G, Gambardella G, et al. Glutathione transferase P1-1 an enzyme useful in biomedicine and as biomarker in clinical practice and in environmental pollution. *Nutrients* 2019; 11:1741.
- Bu, G. L., Xie, C., Kang, Y. F., Zeng, M. S., & Sun, C. (2022). How EBV Infects: The Tropism and Underlying Molecular Mechanism for Viral Infection. *Viruses*, 14(11), 2372.
- Budden, T., Davey, R. J., Vilain, R. E., Ashton, K. A., Braye, S. G., Beveridge, N. J., & Bowden, N. A. (2016). Repair of UVB-induced DNA damage is reduced in melanoma due to low XPC and global genome repair. *Oncotarget*, 7(38), 60940.
- Caldecott, K. W. (2019). XRCC1 protein; Form and function. *DNA repair*, 81, 102664.
- Campion, N. J., Ally, M., Jank, B. J., Ahmed, J., & Alusi, G. (2021). The molecular march of primary and recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*, 40(10), 1757-1774.
- Cao M, Mu X, Jiang C, Yang G, Chen H, Xue W. Single-nucleotide polymorphisms of GPX1 and MnSOD and susceptibility to bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(1):759–64. Available from: doi: 10.1007/s13277-013-1103-6).
- Carlisle, A. E., Lee, N., Matthew-Onabanjo, A. N., Spears, M. E., Park, S. J., Youkana, D., ... & Kim, D. (2020). Selenium detoxification is required for cancer-cell survival. *Nature metabolism*, 2(7), 603-611.
- Chaaben, A. B., Abaza, H., Douik, H., Harzallah, L., Charron, D., Krishnamoorthy, R., ...& Tamouza, R. (2014, May). Immunogenetics of nasopharyngeal carcinoma. In *Annales De Biologie Clinique* (Vol. 72, No. 3, pp. 281-291).
- Chan, A.T.C.; Ma, B.B.Y.; Lo, Y.M.D.; Leung, S.F.; Kwan, W.H.; Hui, E.P.; Mok, T.S.K.; Kam, M.; Chan, L.S.; Chiu, S.K.W.; et al. 2004. Phase II Study of Neoadjuvant Carboplatin and Paclitaxel Followed by Radiotherapy and Concurrent Cisplatin in Patients with Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma: Therapeutic Monitoring with Plasma Epstein-Barr Virus DNA. *JCO* 2004, 22, 3053–3060.
- Chan, D.C.T.; Lam, W.K.J.; Hui, E.P.; Ma, B.B.Y.; Chan, C.M.L.; Lee, V.C.T.; Cheng, S.H.; Gai, W.; Jiang, P.; Wong, K.C.W.; et al. 2022. Improved Risk Stratification of Nasopharyngeal Cancer by Targeted Sequencing of Epstein–Barr Virus DNA in Post-Treatment Plasma. *Ann. Oncol.* 2022, 33, 794–803.
- Chang, E. T., Ye, W., Zeng, Y. X., & Adami, H. O. (2021). The evolving epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 30(6), 1035-1047.
- Chen C, Wang F, Wang Z, et al (2013). Polymorphisms in ERCC1 C8092A predict progression-free survival in metastatic/ recurrent nasopharyngeal carcinoma treated with cisplatinbased chemotherapy. *Cancer ChemotherPharmacol*, 72, 315-22.
- Chen H, Wu M, Li G, Hua L, Chen S, Huang H. Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphism and acute radiation reaction in patients with nasopharyngeal carcinoma: A cohort study. *Medicine (Baltimore)*.2017; 96(44)).
- Chen, C., Wang, F., Wang, Z., Li, C., Luo, H., Liang, Y., ...& Li, Y. (2013). Polymorphisms in ERCC1 C8092A predict progression-free survival in metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma treated with cisplatin-based chemotherapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 72, 315-322.

- Chen, G. Z., Zhu, H. C., Dai, W. S., Zeng, X. N., Luo, J. H., & Sun, X. C. (2017). The mechanisms of radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma and current strategies in radiosensitivity. *Journal of thoracic disease*, 9(3), 849.
- Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F., & Hayward, S. D. (2001). Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *Journal of virology*, 75(6), 2929-2937.
- Chen, J., Hu, C. F., Hou, J. H., Shao, Q., Yan, L. X., Zhu, X. F., ... & Shao, J. Y. (2010). Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 regulates mTOR signaling pathway genes which predict poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of translational medicine*, 8(1), 1-9.
- Chen, J., Zhao, Q. W., Shi, G. M., & Wang, L. R. (2012). XRCC1 Arg399Gln and clinical outcome of platinum-based treatment for advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis in 17 studies. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13, 875-883.
- Chen, Y. P., Chan, A. T., Le, Q. T., Blanchard, P., Sun, Y., & Ma, J. (2019). Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*, 394(10192), 64-80.
- Chen, Z., Cao, K., Xia, Y., Li, Y., Hou, Y., Wang, L., ...& Li, W. (2019). Cellular senescence in ionizing radiation. *Oncology reports*, 42(3), 883-894.
- Cheng, C. X., Xue, M., Li, K., & Li, W. S. (2012). Predictive value of XRCC1 and XRCC3 gene polymorphisms for risk of ovarian cancer death after chemotherapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 13(6), 2541-2545.
- Cheuk, I. W. Y., Yip, S. P., Kwong, D. L. W., & Wu, V. W. C. (2014). Association of XRCC1 and XRCC3 gene haplotypes with the development of radiation-induced fibrosis in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Molecular and clinical oncology*, 2(4), 553-558.
- Chitikova, Z. V., Gordeev, S. A., Bykova, T. V., Zubova, S. G., Pospelov, V. A., & Pospelova, T. V. (2014). Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR downregulation and expression of stem cell markers. *Cell Cycle*, 13(9), 1424-1439.
- Chou, J., Lin, Y. C., Kim, J., You, L., Xu, Z., He, B., & Jablons, D. M. (2008). Nasopharyngeal carcinoma—review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 30(7), 946-963.
- Chua, M. L., Wee, J. T., Hui, E. P., & Chan, A. T. (2016). Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*, 387(10022), 1012-1024.
- Costa, M. C., Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2012). Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of structural biology. *International journal of molecular sciences*, 13(8), 10268-10295.
- Cox DG, Hankinson SE, Kraft P and Hunter DJ. No Association between GPX1 Pro198Leu and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(11):1821–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533915> [Accessed 18th January 2019]).

- Croteau, D. L., Peng, Y., & Van Houten, B. (2008). DNA repair gets physical: mapping an XPA-binding site on ERCC1. *DNA repair*, 7(5), 819-826.
- Cui, J., Li, G., Yin, J., Li, L., Tan, Y., Wei, H., ...& Yi, L. (2020). GSTP1 and cancer: Expression, methylation, polymorphisms and signaling. *International Journal of Oncology*, 56(4), 867-878.
- Cui, Q., Zuo, X. Y., Lian, Y. F., Feng, Q. S., Xia, Y. F., He, C. Y., ... & Bei, J. X. (2016). Association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and nasopharyngeal carcinoma risk: evidence from a large-scale case-control study and a meta-analysis. *Tumor Biology*, 37, 14825-14830.
- Dai, W., Chung, D. L. S., Chow, L. K. Y., Yu, V. Z., Lei, L. C., Leong, M. M. L., ... & Lung, M. L. (2020). Clinical Outcome–Related Mutational Signatures Identified by Integrative Genomic Analysis in Nasopharyngeal Carcinoma Clinical Outcome–related Mutational Signatures in NPC. *Clinical Cancer Research*, 26(24), 6494-6504.
- Daniel, V. (1993). Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 28(3), 173-207.
- Darvish, L., Toossi, M. T. B., Azimian, H., Shakeri, M., Dolat, E., Firouzjaei, A. A., ...&Aghaee-Bakhtiari, S. H. (2023). The role of microRNA-induced apoptosis in diverse radioresistant cancers. *Cellular Signalling*, 104, 11058.
- De Ruysscher, D., Niedermann, G., Burnet, N. G., Siva, S., Lee, A. W., & Hegi-Johnson, F. (2019). Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1-20.
- Deng, N. A., Zhou, H., Fan, H., & Yuan, Y. (2017). Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 8(66), 110635.
- Dhouib, H., Mnejja, M., Kallel, S., Frikha, M., Daoud, J., & Ghorbel, A (2009). Cancer du nasopharynx: une extension rare dérout le diagnostic. *J.I. M*: 29 – 32.
- Di Pietro, A. (2020). Epstein–Barr Virus Promotes B Cell Lymphomas by Manipulating the Host Epigenetic Machinery. *Cancers*, 12(10), 3037.
- Dos Santos Pereira J, Fontes FL, de Medeiros SR, de Almeida Freitas R, de Souza LB, da Costa Miguel MC. Association of the XPD and XRCC3 gene polymorphisms with oral squamous cell carcinoma in a Northeastern Brazilian population: A pilot study 2016. *Arch Oral Bio*. 2016; 164:19-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.12.004>.
- Du L, Yu W, Dai X, et al (2018). Association of DNA repair gene polymorphisms with the risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients. *Oncotarget*, 9, 958-68.
- Du L, Yu W, Dai X, et al (2018). Association of DNA repair gene polymorphisms with the risk of radiation pneumonitis in lung cancer patients. *Oncotarget*, 9, 958-68.
- Du, L., Yu, W., Huang, X., Zhao, N., Liu, F., Zhang, S., ...&Qu, B. (2018). GSTP1 Ile105Val polymorphism might be associated with the risk of radiation pneumonitis among lung cancer patients in Chinese population: A prospective study. *Journal of Cancer*, 9(4), 726.

- Dutta, D., Abarna, R., Mehatre, S., Subbiah, K., Duraisamy, S., Chinnusamy, R., & Anbalagan, M. (2020). Effect of Arg399Gln single-nucleotide polymorphism in XRCC1 gene on survival rate of Indian squamous cell head-and-neck cancer patients. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 16(3), 551-558.
- Emanuel, O., Liu, J., Scharfetter, V. H., Nei, W. L., Chan, Y. Y., Tsang, C. M., ... & Lechner, M. (2021). SSTR2 in Nasopharyngeal carcinoma: relationship with latent EBV infection and potential as a therapeutic target. *Cancers*, 13(19), 4944.
- Farhat, F., Sari, M. I., Chrestella, J., & Syari, R. P. (2021, March). The chemical changes in the total antioxidant status and biological activity of GSTP1 polymorphism on nasopharyngeal carcinoma patients. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 713, No. 1, p. 012049). IOP Publishing.
- Faridounnia, M., Folkers, G. E., & Boelens, R. (2018). Function and interactions of ERCC1-XPF in DNA damage response. *Molecules*, 23(12), 3205.
- Farnebo, L., Jerhammar, F., Ceder, R., Grafström, R. C., Vainikka, L., Thunell, L., ... & Roberg, K. (2011). Combining factors on protein and gene level to predict radioresponse in head and neck cancer cell lines. *Journal of oral pathology & medicine*, 40(10), 739-746.
- Fles, R., Bos, A. C. R. K., Rachmawati, D., Waliyanti, E., Tan, I. B., Haryana, S. M., ... & Dewi, F. S. T. (2017). The role of Indonesian patients' health behaviors in delaying the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *BMC public health*, 17, 1-8.
- Foster CB, Aswath K, Chanock SJ, McKay HF, Peters U (2006) Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. *BMC Genet* 7:56. doi:10.1186/1471-2156-7-56.
- Gebert, L. F., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(1), 21-37.
- Geng W. (2016). The molecular basis and clinical significance of CK2 inhibitor CX4945 reversing radiation resistance in cisplatin resistant gastric cancer cells. (2016) pp. 1–102.
- Geng, X., Hao, F., Han, G., Zhang, Y., & Qin, P. (2021). Dural and multiple brain metastases from basaloid nasopharyngeal carcinoma: case report and literature review. *Frontiers in Oncology*, 11, 665652.
- Stepan, K. O., Mazul, A. L., Skillington, S. A., Paniello, R. C., Rich, J. T., Zevallos, J. P., ... & Puram, S. V. (2021). The prognostic significance of race in nasopharyngeal carcinoma by histological subtype. *Head & neck*, 43(6), 1797-1811.
- Globocan, 2020 <https://gco.iarc.fr/>
- Gong, L., Luo, M., Sun, R., Qiu, L., Chen, C., & Luo, Z. (2021). Significant association between XRCC1 expression and its rs25487 polymorphism and radiotherapy-related cancer prognosis. *Frontiers in Oncology*, 11, 654784.
- Gordon, M. A., Zhang, W., Yang, D. Y., Gil, J., Yun, J., Press, O., ... & Lenz, H. J. (2004). MnSOD and GPx-1 polymorphisms in relation to local recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Journal of Clinical Oncology*, 22(14_suppl), 3604-3604.

- Goričar, K., Dugar, F., Dolžan, V., & Marinko, T. (2022). NBN, RAD51 and XRCC3 Polymorphisms as Potential Predictive Biomarkers of Adjuvant Radiotherapy Toxicity in Early HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers*, 14(18), 4365.
- Grenda, A., Błach, J., Szczyrek, M., Krawczyk, P., Nicoś, M., Kuźnar Kamińska, B., ...& Milanowski, J. (2020). Promoter polymorphisms of TOP2A and ERCC1 genes as predictive factors for chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Medicine*, 9(2), 605-614.
- Greve B, Bolling T, Amler S, et al. Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PLoS One* 2012;7:e47185.
- Guo, R., Mao, Y. P., Tang, L. L., Chen, L., Sun, Y., & Ma, J. (2019). The evolution of nasopharyngeal carcinoma staging. *The British journal of radiology*, 92(1102), 20190244.
- Gupta, A., Mathew, D., Bhat, S. A., Ghoshal, S., & Pal, A. (2021). Genetic Variants of DNA Repair Genes as Predictors of Radiation-Induced Subcutaneous Fibrosis in Oropharyngeal Carcinoma. *Frontiers in oncology*, 11, 652049.
- Gwizdek, G. et al (2004). Minihelix –containing RNAs mediate exportin -5-dependent nuclear export of the double – stranded RNA- binding protein ILF3. *J. Biol. Chem.*
- H, Xie X, Wang H, et al (2014). ERCC1 Cys8092Ala and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms predict progression-free survival after curative radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 9, e101256.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gattamaitan, Z., Arias, I. M., & Jakoby, W. B. (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3879-3882.
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American journal of cancer research*, 10(3), 727.
- Hau, P. M., Lung, H. L., Wu, M., Tsang, C. M., Wong, K. L., Mak, N. K., & Lo, K. W. (2020). Targeting Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma. *Frontiers in oncology*, 10, 600.
- Havaki, S., Kotsinas, A., Chronopoulos, E., Kletsas, D., Georgakilas, A., & Gorgoulis, V. G. (2015). The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer letters*, 356(1), 43-51.
- Hay, A., Simo, R., Hall, G., Tharavai, S., Oakley, R., Fry, A., ...& Jeannon, J. P. (2019). Outcomes of salvage surgery for the oropharynx and larynx: a contemporary experience in a UK Cancer Centre. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 276(4), 1153-1159.28.
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., Lawler, S., 2014. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol. Med.* 20, 460–469.
- He, J. F., Jia, W. H., Fan, Q., Zhou, X. X., Qin, H. D., Shugart, Y. Y., & Zeng, Y. X. (2007). Genetic polymorphisms of TLR3 are associated with Nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese population. *BMC cancer*, 7, 194.
- He, Y., Penney, M. E., Negandhi, A. A., Parfrey, P. S., Savas, S., & Yilmaz, Y. E. (2018). XRCC3 Thr241Met and TYMS variable number tandem repeat polymorphisms are associated with time-to-metastasis in colorectal cancer. *PLoS One*, 13(2), e0192316.

- Hendaoui, L., Askri, A., Farhat, L. C. B., Saadi, A., Bouhaouala, M. H., Saadaoui, H., ...&Dali, N. (2010). Imagerie des cancers du nasopharynx. EMC-RADIOLOGIE ET IMAGERIE MÉDICALE: Cardiovasculaire-Thoracique-Cervicale, 1-16.
- Hirakawa, H., Ikegami, T., Azechi, S., Agena, S., Uezato, J., Kinjyo, H., ...&Gahana, A. (2020). ERCC1 C8092A polymorphism predicts fair survival outcome in japanese patients with pharyngo-laryngeal squamous cell carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 277(2), 601-610.
- Ho, J. H. (1978). An epidemiologic and clinical study of nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 4(3-4), 183-198.
- Hsu, J. L., & Glaser, S. L. (2000). Epstein–Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Critical reviews in oncology/hematology*, 34(1), 27-53.
- <https://reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-73894&SEL=R-HSA-73893>
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Lohman K, Case LD (2002) Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Environ Mol Mutagen* 39:208–215.
- Hu, J. J., Smith, T. R., Miller, M. S., Mohrenweiser, H. W., Golden, A., & Case, L. D. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, 22(6), 917-922.
- Hu, S., Jing, Y., Liu, F., & Han, F. (2022). Association between XRCC3 rs861539 Polymorphism and the Risk of Ovarian Cancer: Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *BioMed Research International*, 2022.
- Huang, T., Yin, L., Wu, J., Gu, J. J., Wu, J. Z., Chen, D., ...& He, X. (2016). MicroRNA-19b-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting TNFAIP3/NF-κB axis. *Journal of Experimental&Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-14.
- Hubert, N., Walczak, R., Sturchler, C., Myslinski, E., Schuster, C., Westhof, E., ...&Krol, A. (1996). RNAs mediating cotranslational insertion of selenocysteine in eukaryotic selenoproteins. *Biochimie*, 78(7), 590-596.
- Hutt-Fletcher, L. M. (2014). Epstein–Barr virus replicating in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), 16242-16243.
- Isla, D., et al., Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 2004. 15(8): p. 1194-203.
- Jacobsen, N. R., Raaschou-Nielsen, O., Nexø, B., Wallin, H., Overvad, K., Tjønneland, A., & Vogel, U. (2004). XRCC3 polymorphisms and risk of lung cancer. *Cancer letters*, 213(1), 67-72.
- Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F.O.; Hesch, R.D.; Knippers, R. 2001. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 1659–1665. [PubMed]].
- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). MicroRNA and cancer. *Molecular oncology*, 6(6), 590-610.
- Jeanteur, P. (2010). miARNs et cancer. *Bulletin du cancer*, 97(11), 1231-1239.
- Jiang C, Guo Y, Li Y, et al (2021). The association between the ERCC1/2 polymorphisms and radiotherapy efficacy in 87 patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, 13, 3126-36.

- Jia-Quan, Q., Hong-Mei, Y., Xu, Y., Li-Na, L., Jin-Feng, Z., Ta, X., ... & Zhi-Qiang, X. (2015). MiR-23a sensitizes nasopharyngeal carcinoma to irradiation by targeting IL-8/Stat3 pathway. *Oncotarget*, 6(29), 28341.
- Jin, H., Xie, X., Wang, H., Hu, J., Liu, F., Liu, Z., ...& Tang, J. (2014). ERCC1 Cys8092Ala and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms predict progression-free survival after curative radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 9(7), e101256.
- Jin, Z. Y., Zhao, X. T., Zhang, L. N., Wang, Y., Yue, W. T., & Xu, S. F. (2014). Effects of polymorphisms in the XRCC1, XRCC3, and XPG genes on clinical outcomes of platinum-based chemotherapy for treatment of non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res*, 13(3), 7617-7625.
- Jiromaru, R., Nakagawa, T., & Yasumatsu, R. (2022). Advanced nasopharyngeal carcinoma: current and emerging treatment options. *Cancer Management and Research*, 2681-2689.
- Johnson, D., & Ma, B. B. (2021). Targeting the PD-1/PD-L1 interaction in nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncology*, 113, 105127.
- Junfeng, C. M. (2011). Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and nasopharyngeal cancer in the east of China: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 3097-3100.
- Kaitouni, Z. I., Ammor, Y. M., Benyouness, L., Darfaoui, M., Lalya, I., Elomrani, A., & Khouchani, M. (2023). Therapeutic Aspects of Undifferentiated Nasopharyngeal Cancer in Young Adults (Under 40 Years Old). *SAS J Med*, 6, 650-654.
- Kaltoum, A. B. O., Hind, D., Meryem, Q., Yaya, K., Sellama, N., & Asma, Q. (2021). Effects of GSTP1 Ile105Val polymorphism on both susceptibility and treatment response of chronic myeloid leukemia. *Meta Gene*, 28, 100865.
- Kang, S., et al., Association between excision repair cross-complementation group 1 polymorphism and clinical outcome of platinum-based chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *Exp Mol Med*, 2006. 38(3): p. 320-4.
- Kaur, J., Sambyal, V., Guleria, K., Singh, N. R., Uppal, M. S., Manjari, M., & Sudan, M. (2020). Association of XRCC1, XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism with esophageal cancer risk. *Clinical and experimental gastroenterology*, 13, 73.
- Khaled Al Tabaa, Romain Kania (2017) *ORL: Chirurgie cervico-faciale ; Stomatologie ; Chirurgie maxillo-faciale*.
- Kim, W., Lee, S., Seo, D., Kim, D., Kim, K., Kim, E., ...& Youn, B. (2019). Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells*, 8(9), 1105.
- Kim Curran, V., Zhou, C., Schmid-Bindert, G., Shengxiang, R., Zhou, S., Zhang, L., & Zhang, J. (2011). Lack of correlation between ERCC1 (C8092A) single nucleotide polymorphism and efficacy/toxicity of platinum based chemotherapy in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *Advances in medical sciences*, 56(1), 30-38.
- King, A. D. (2022). MR imaging of nasopharyngeal carcinoma. *Magnetic Resonance Imaging Clinics*, 30(1), 19-33.

- Kobayashi, E., Kondo, S., Dochi, H., Moriyama-Kita, M., Hirai, N., Komori, T., ...&Yoshizaki, T. (2022). Protein Farnesylation on Nasopharyngeal Carcinoma, Molecular Background and Its Potential as a Therapeutic Target. *Cancers*, 14(12), 2826.
- Kong, L., & Lu, J. J. (2016). Reirradiation of locally recurrent nasopharyngeal cancer: history, advances, and promises for the future. *Chin ClinOncol*, 5(2), 26.
- Koutsoukos, K., Andrikopoulou, A., Dedes, N., Zagouri, F., Bamias, A., &Dimopoulos, M. A. (2020). Clinical Perspectives of ERCC1 in Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8829.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155-D162.
- Krupa R, Sliwinski T, Wisniewska-Jarosinska M, Chojnacki J, Wasylecka M, Dziki L, Morawiec J, Blasiak J. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer--a case control study. *MolBiol Rep*. 2011; 38(4):2849-54. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0430-6>.
- Krupa, R., Synowiec, E., Pawlowska, E., Morawiec, Z., Sobczuk, A., Zadrozny, M., ...&Blasiak, J. (2009). Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Experimental and molecular pathology*, 87(1), 32-35.
- Kumar, N., Moreno, N. C., Feltes, B. C., Menck, C. F., &Houten, B. V. (2020). Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins. *Genetics and Molecular Biology*, 43.
- Kundu, S., Das, R., Laskar, S., Choudhury, Y., & Ghosh, S. K. (2022). Cancer Genomics and Diagnostics: Northeast Indian Scenario. In *Cancer Diagnostics and Therapeutics: Current Trends, Challenges, and Future Perspectives* (pp. 509-529). Singapore: Springer Singapore.
- Kutilin, D. S., Gusareva, M. A., Kosheleva, N. G., Gabrichidze, P. N., Dontsov, V. A., Legostaev, V. M., ... &Krokhmal Yu, N. (2020).Aberrant gene transcriptional activity as a factor for radioresistance of ht-29 cell lineage. *MODERN PROBLEMS OF SCIENCE AND EDUCATION. SURGERY №2*.
- Lee CH, Lee KY, Choe KH, Hong YC, Eom SY, Ko YJ, Zhang YW, Yim DH, Kang JW, Kim H, Kim YD. Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase1 (hOGG1) on lung cancer. *JPrev Med Public Health*. 2006;39(2):130–4.
- Lee E, Eum SY, Slifer SH, et al (2020). Association Between Polymorphisms in DNA Damage Repair Genes and Radiation Therapy-Induced Early Adverse Skin Reactions in a Breast Cancer Population: A Polygenic Risk Score Approach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 106, 948-57.
- Lee, A. W., Ng, W. T., Chan, J. Y., Corry, J., Mäkitie, A., Mendenhall, W. M., ... &Ferlito, A. (2019). Management of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Cancer treatment reviews*, 79, 101890.
- Lee, C. H., Lee, K. Y., Choe, K. H., Hong, Y. C., Noh, S. I., Eom, S. Y., ... & Kim, Y. D. (2006). Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 39(2), 130-134.

- Lee, H. M., Okuda, K. S., González, F. E., & Patel, V. (2019). Current perspectives on nasopharyngeal carcinoma. *Human Cell Transformation: Advances in Cell Models for the Study of Cancer and Aging*, 11-34.
- Leeson.T.S., Leeson.C.R., Histologie, 1980, Paris (France), Masson, 531p, (2^eédition).
- Legent F., Perlemuter L.,Vandenbrouck C., Cahiers d'anatomie ORL,1986,Paris (France),Masson, p, (4^e édition).
- Legent, F., Perlemuter, L., &Vandenbrouck, C. (2002).Cahiers d'anatomie ORL. Tome 2: Fosses nasales et pharynx.
- Lei YC, Hwang SJ, Chang CC et al. Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat Res* 2002; 519: 93–101. 22 Wang Y, Spitz MR, Zhu Y et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)* 2003; 2: 901–8.
- Leitão, A. L., &Enguita, F. J. (2022). A structural view of miRNA biogenesis and function. *Non-coding RNA*, 8(1), 10.
- Li, G., Liu, Y., Su, Z., Ren, S., Zhu, G., Tian, Y., & Qiu, Y. (2013). MicroRNA-324-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by directly targeting WNT2B. *European journal of cancer*, 49(11), 2596-2607.
- Li, G., Wang, Y., Liu, Y., Su, Z., Liu, C., Ren, S., ...&Qiu, Y. (2014). miR-185-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by targeting WNT 2B in vitro. *Cancer science*, 105(12), 1560-1568.
- Li, H., Liu, S., Hu, J., Luo, X., Li, N., Bode, A. M., & Cao, Y. (2016). Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. *International journal of biological sciences*, 12(11), 1309.
- Li, L. N., Xiao, T., Yi, H. M., Zheng, Z., Qu, J. Q., Huang, W., ...& Xiao, Z. Q. (2017). MiR-125b Increases Nasopharyngeal Carcinoma Radioresistance by Targeting A20/NF-κB Signaling PathwayNasopharyngeal Carcinoma Radioresistance and miR-125b. *Molecular cancer therapeutics*, 16(10), 2094-2106.
- Li, L. Y., Guan, Y. D., Chen, X. S., Yang, J. M., & Cheng, Y. (2021). DNA repair pathways in cancer therapy and resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 629266.
- Li, L., Elledge, S. J., Peterson, C. A., Bales, E. S., &Legerski, R. J. (1994). Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11), 5012-5016.
- Li, W. Z., Wu, H. J., Lv, S. H., Hu, X. F., Liang, H., Liu, G. Y., ... & Xiang, Y. Q. (2021). Assessment of Survival Model Performance Following Inclusion of Epstein-Barr Virus DNA Status in Conventional TNM Staging Groups in Epstein-Barr Virus-Related Nasopharyngeal Carcinoma. *JAMA network open*, 4(9), e2124721-e2124721.
- Li, W.; Yang, C.; Lv, Z.; Li, J.; Li, Z.; Yuan, X.; Wu, S.; Yuan, Y.; Cui, L.; Lu, J.; et al. Integrating Pre- and Post-Treatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA Levels for Better Prognostic Prediction of Nasopharyngeal Carcinoma. *J. Cancer* 2021, 12, 2715–2722.
- Liang, H.; Lv, X.; Wang, L.; Wu, Y.-S.; Sun, R.; Ye, Y.-F.; Ke, L.-R.; Yang, Q.; Yu, Y.-H.; Qiu, W.-Z.; et al. 2018. The Plasma Epstein-Barr Virus DNA Level Guides Precision Treatment for Nasopharyngeal

Carcinoma in the Intensity-Modulated Radiotherapy Era: A Large Population-Based Cohort Study from an Endemic Area. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2018, 10, 1758835918782331.

- Liang, J., Jiang, T., Yao, R. Y., Liu, Z. M., Lv, H. Y., & Qi, W. W. (2010). The combination of ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms better predicts clinical outcome to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 66, 493-500.
- Liblab, S., Vasuratana, A., & Areepium, N. (2020). ERCC1, XRCC1, and GSTP1 polymorphisms and treatment outcomes of advanced epithelial ovarian cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 21(7), 1925.
- Lin, J., Ye, Q., Wang, Y., Wang, Y., & Zeng, Y. (2018). Association between XRCC1 single-nucleotide polymorphisms and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma: An update meta-analysis. *Medicine*, 97(32).
- Lindahl, T., & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897-1905
- Liu S-s, Yiliyasi M, Zhang J-r, Zeng M, Ge F. A correlation study of the expression of XRCC1 and ERCC1 to the effect of radiotherapy and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Xinjiang Med Univ* (2010) 33 (5):477–81. doi: 10.3969/j.issn.1009-5551.2010.05.003, NSCLC Zhao.
- Liu TB, Zheng ZH, Pan J, et al. Prognostic role of plasma Epstein-Barr virus DNA load for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Clin Invest Med.* 2017;40(1):E1–12.
- Liu, J., Yu, H., Sun, X., Wang, D., Gu, Y., Liu, Q., ...& Fry, A. (2017). Salvage endoscopic nasopharyngectomy for local recurrent or residual nasopharyngeal carcinoma: a 10-year experience. *International Journal of Clinical Oncology*, 22(5), 834-842.
- Liu, L., Li, C. H., Jin, T. F., & Xu, D. Y. (2014). Study on the ERCC1 gene polymorphism response to chemotherapy and prognosis of gastric cancer. *Genet Mol Res*, 13(4), 8722-8728.
- Liu, N., Lamerdin, J. E., Tebbs, R. S., Schild, D., Tucker, J. D., Shen, M. R., ... & Thompson, L. H. (1998). XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Molecular cell*, 1(6), 783-793.
- Liu, S. Y., & Xue, W. (2020). XRCC1 Arg194Trp polymorphism and thyroid cancer. *Journal of Endocrinological Investigation*, 43, 749-753.
- Liu, Y. P., Zheng, C. C., Huang, Y. N., He, M. L., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Molecular mechanisms of chemo-and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*, 2(3), 315-340.42
- Liu, Y. P., Zheng, C. C., Huang, Y. N., He, M. L., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Molecular mechanisms of chemo-and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm*, 2(3), 315-340.
- Lo, H. W., Stephenson, L., Cao, X., Milas, M., Pollock, R., & Ali-Osman, F. (2008). Identification and functional characterization of the human glutathione S-transferase P1 gene as a novel transcriptional target of the p53 tumor suppressor gene. *Molecular Cancer Research*, 6(5), 843-850.

- Lo, Y.M.D.; Leung, S.-F.; Chan, L.Y.S.; Chan, A.T.C.; Lo, K.-W.; Johnson, P.J.; Huang, D.P. 2000. Kinetics of Plasma Epstein-Barr Virus DNA during Radiation Therapy for Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Res* 2000, 60, 2351–2355.
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical oncology*, 25(10), 578-585.
- London, R. E. (2020). XRCC1—Strategies for coordinating and assembling a versatile DNA damage response. *DNA repair*, 93, 102917.
- Luo, F., Lu, F. T., Qiu, M. Z., Zhou, T., Ma, W. J., Luo, M., ... & Yang, D. J. (2021). Gemcitabine and APG-1252, a novel small molecule inhibitor of BCL-2/BCL-XL, display a synergistic antitumor effect in nasopharyngeal carcinoma through the JAK-2/STAT3/MCL-1 signaling pathway. *Cell death & disease*, 12(8), 1-14.
- Ma, B. B., Poon, T. C., To, K. F., Zee, B., Mo, F. K., Chan, C. M., ... & Chan, A. T. (2003). Prognostic significance of tumor angiogenesis, Ki 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma—a prospective study. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 25(10), 864-872.
- Ma, J., Zhu, S. L., Liu, Y., Huang, X. Y., & Su, D. K. (2017). GSTP1 polymorphism predicts treatment outcome and toxicities for breast cancer. *Oncotarget*, 8(42), 72939.
- Mališić, E., Petrović, N., Brengues, M., Azria, D., Matić, I. Z., SrbljakČuk, I., ... & Nikitović, M. (2022). Association of polymorphisms in TGFB1, XRCC1, XRCC3 genes and CD8 T-lymphocyte apoptosis with adverse effect of radiotherapy for prostate cancer. *Scientific Reports*, 12(1), 21306.
- Maniglia, M. P., Russo, A., Biselli-Chicote, P. M., de Oliveira-Cucolo, J. G., Rodrigues-Fleming, G. H., Maniglia, J. V., ... & Goloni-Bertollo, E. M. (2020). Glutathione S-transferase polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma treated with chemotherapy and/or radiotherapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 21(6), 1637.
- Mankowski, N. L., & Bordoni, B. (2020). *Anatomy, Head and Neck, Nasopharynx*.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal*, 275(15), 3959-3970.
- McNeil, E. M., & Melton, D. W. (2012). DNA repair endonuclease ERCC1–XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic acids research*, 40(20), 9990-10004.
- Men T, Zhang X, Yang J, Shen B, Li X, Chen D, Wang J. The rs1050450 C > T polymorphism of GPX1 is associated with the risk of bladder but not prostate cancer: evidence from a metaanalysis. *Tumour Biol*. 2014;35(1):269–75. Available from :doi: 10.1007/s13277-013-1035-1).
- Meng, M., Gu, B., Bi, L., Song, S., Feng, D. D., & Kim, J. (2022). DeepMTS: Deep multi-task learning for survival prediction in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma using pretreatment PET/CT. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*.

- Mohabatkar, H., Ebrahimi, S., & Moradi, M. (2021). Using Chou's five-steps rule to classify and predict glutathione S-Transferases with different machine learning algorithms and pseudo amino acid composition. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 309-316.
- Mohseni, A. R., Toogeh, G., Faranoush, M., Sharifi, Z., Sharifi, M. J., Rostami, S., & Alipour, B. (2015). Polymorphism in the DNA repair gene XRCC3 and therapeutic outcomes in patients with AML. *Genetics in the Third Millennium*, 13(3), 4040-4044.
- Mohtasham, N., Najafi-Ghobadi, K., & Abbaszadeh, H. (2023). The XRCC1 Arg194Trp polymorphism was associated with the risk of head and neck squamous cell carcinoma development: Results from a systematic review and meta-analysis. *Cancer Reports*, 6(3), e1776.
- Muhanna, N.; Di Grappa, M.A.; Chan, H.H.L.; Khan, T.; Jin, C.S.; Zheng, Y.; Irish, J.C.; Bratman, S.V. 2017. Cell-Free DNA Kinetics in a Pre-Clinical Model of Head and Neck Cancer. *Sci. Rep.* 2017, 7, 16723.
- Murata, T., & Tsurumi, T. (2014). Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Reviews in medical virology*, 24(3), 142-153.
- Namazi A, Abedinzadeh M, Nourbaksh P, et al. Association between the XRCC3 Thr241Met polymorphism and risk of colorectal cancer: a meta analysis of 5,193 cases and 6,645 controls. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2263–8].
- Nawaz, I., Moumad, K., Martorelli, D., Ennaji, M. M., Zhou, X., Zhang, Z., ...& Hu, L. F. (2015). Detection of nasopharyngeal carcinoma in Morocco (North Africa) using a multiplex methylation-specific PCR biomarker assay. *Clinical Epigenetics*, 7(1), 1-12.
- Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human genomics*, 1(6), 1-5.
- Nguyen, H. Q., To, N. H., Zadigue, P., Kerbrat, S., De La Taille, A., Le Gouvello, S., & Belkacemi, Y. (2018). Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 129, 13-26.
- Niculet, E., Lungu, M., Onisor, C., Rebegea, L., Vesa, D., Bezman, L., ...& Tatu, A. L. (2022). Nasopharyngeal carcinoma: A new synthesis of literature data. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(2), 1-7.
- Nikic, P.; Dragicevic, D.; Savic-Radojevic, A.; Pljesa-Ercegovac, M.; Coric, V.; Jovanovic, D.; Bumbasirevic, U.; Pekmezovic, T.; Simic, T.; Dzamic, Z.; et al. (2018). Association between GPX1 and SOD2 genetic polymorphisms and overall survival in patients with metastatic urothelial bladder cancer: A single-center study in Serbia. *J. Buon* 2018, 23, 1130–1135. [PubMed].
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
- Odumade, O. A., Hogquist, K. A., & Balfour Jr, H. H. (2011). Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 193-209.
- Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R. M., Volker, M., Takenaka, K., Cloney, R., ...& Lehmann, A. R. (2010). Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Molecular cell*, 37(5), 714-727.

- Okuda, K., Sasaki, H., Hikosaka, Y., Kawano, O., Yukiue, H., Yano, M., & Fujii, Y. (2011). Excision repair cross complementation group 1 polymorphisms predict overall survival after platinum-based chemotherapy for completely resected non-small-cell lung cancer. *Journal of Surgical Research*, 168(2), 206-212
- Orelli, B., McClendon, T. B., Tsodikov, O. V., Ellenberger, T., Niedernhofer, L. J., & Schärer, O. D. (2010). The XPA-binding domain of ERCC1 Is Required for Nucleotide Excision Repair but Not Other DNA Repair Pathways 2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 3705-3712.
- Ouellette, M. M., Zhou, S., & Yan, Y. (2022). Cell Signaling Pathways That Promote Radioresistance of Cancer Cells. *Diagnostics*, 12(3), 656.
- OuYang PY, Su Z, Mao YP, et al. 2013. Prognostic impact of family history in southern Chinese patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer*. 2013; 109:788–94.
- Ozoran, E., Trabulus, F. D. C., Erhan, D., Batar, B., & Guven, M. (2022). Association of XRCC3, XRCC4, BAX, and BCL-2 Polymorphisms with the Risk of Breast Cancer. *International Journal of Breast Cancer*, 2022.
- Painting, F. (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *WORLD HEALTH ORGANIZATION*.
- Park, D.J., et al., ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2003. 1(3): p. 162-6.
- Pasqui, A., Boddi, A., Campanacci, D. A., Scoccianti, G., Bernini, A., Grasso, D., ...& Pillozzi, S. (2022). Alteration of the Nucleotide Excision Repair (NER) Pathway in Soft Tissue Sarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8360.
- Peng, X., Zhou, Y., Tao, Y., & Liu, S. (2021). Nasopharyngeal Carcinoma: The Role of the EGFR in Epstein–Barr Virus Infection. *Pathogens*, 10(9), 1113.
- Petrusheva, I. O., Evdokimov, A. N., & Lavrik, O. I. (2014). Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 6(1 (20)), 23-34.
- Pincinato, E. C., Costa, E. F., Lopes-Aguiar, L., Nogueira, G. A., Lima, T. R., Visacri, M. B., ... & Lima, C. S. (2019). GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms in outcomes of head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cisplatin chemoradiation. *Scientific reports*, 9(1), 9312.
- Poh, S. S., Chua, M. L. K., & Wee, J. T. (2016). Carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma: an alternate hypothetical mechanism. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 1-9.
- Popanda O, Tan XL, Ambrosone CB, Kropp S, Helmbold I, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Chang-Claude J . 2006. Genetic polymorphisms in the DNA double-strand break repair genes XRCC3, XRCC2, and NBS1 are not associated with acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(5):1048-50. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0046>.]
- Prisyazhnyuk, V., Sydorchuk, L., Sydorchuk, R., Prisyazhniuk, I., Bobkovych, K., Buzdugan, I., ...& Prisyazhnyuk, P. (2021). Glutathione-S-transferases genes-promising predictors of hepatic dysfunction. *World Journal of Hepatology*, 13(6), 620.

- Pulliero, A., &Izzotti, A. (2022). “Role of MicroRNA in Cancer Development and Treatment”. *Journal of Personalized Medicine*, 12(3), 503.
- Putz, R., & Pabst, R. (2000). *Atlas de anatomiahumanaSobotta*. In *Atlas de anatomiahumanaSobotta* (pp. 405-405).
- Qu, J. Q., Yi, H. M., Ye, X., Zhu, J. F., Yi, H., Li, L. N., ... & Xiao, Z. Q. (2015). MiRNA-203 Reduces Nasopharyngeal Carcinoma Radioresistanceby Targeting IL8/AKT SignalingNasopharyngeal Carcinoma Radioresistance and miR-203. *Molecular cancertherapeutics*, 14(11), 2653-2664.
- Rajabi-Moghaddam, M., &Abbaszadeh, H. (2022). Gene polymorphisms and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*.
- Raleigh, D. R., & Haas-Kogan, D. A. (2013). Molecular targets and mechanisms of radiosensitization using DNA damage response pathways. *Future oncology*, 9(2), 219-233.
- Ravn-Haren, G., Olsen, A., Tjønneland, A., Dragsted, L. O., Nexø, B. A., Wallin, H., ...& Vogel, U. (2006). Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 27(4), 820-825.
- Registre des cancers de la région du grand casablanca 2018.
- Ren, Y. J., &Lv, X. Q. (2016). Influence on radiosensitivity of lung glandular cancer cells when ERCC1 gene silenced by targeted siRNA. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(7), 672-676.
- Richardo, T., Prattapong, P., Ngernsombat, C., Wisetyaningsih, N., Iizasa, H., Yoshiyama, H., &Janvilisri, T. (2020). Epstein-Barr virus mediated signaling in nasopharyngeal carcinoma carcinogenesis. *Cancers*, 12(9), 2441.
- Rivera, S., Keryer, C., Busson, P., &Maingon, P. (2005). Nasopharyngeal carcinomas: from biology to clinic. *Cancer Radiotherapie: Journal de la SocieteFrancaise de Radiotherapie Oncologique*, 9(1), 55-68.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., &Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and molecular life sciences*, 66, 981-993.
- Roos, W. P., &Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer letters*, 332(2), 237-248.
- Roos, W. P., Frohnapfel, L., Quiros, S., Ringel, F., &Kaina, B. (2018). XRCC3 contributes to temozolomide resistance of glioblastoma cells by promoting DNA double-strand break repair. *Cancer Letters*, 424, 119-126.
- Russo A, Francelin PR, Galbiatti AL, et al (2013). Association between GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms involved in xenobiotic metabolism and head and neck cancer development. *Mol Biol Rep*, 40, 4181-8.
- Saadat, M. (2017). Evaluation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Ile105Val polymorphism and susceptibility to type 2 diabetes mellitus, a meta-analysis. *EXCLI journal*, 16, 1188.
- Sadoughi, F., Mirsafaei, L., Dana, P. M., Hallajzadeh, J., Asemi, Z., Mansournia, M. A., ...&Yousefi, B. (2021). The role of DNA damage response in chemo-and radio-resistance of cancer cells: Can DDR inhibitors sole the problem. *DNA repair*, 101, 103074.

- Sakano S, Ogawa S, Yamamoto Y, Nishijima J, Miyachika Y, Matsumoto H, et al. ERCC1 and XRCC1 expression predicts survival in bladder cancer patients receiving combined trimodality therapy. *Mol Clin Oncol* (2013) 1 (3):403–10. doi: 10.3892/mco.2013.85.
- Santivasi, W. L., & Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxidants & redox signaling*, 21(2), 251-259.
- Schmukler, E., Grinboim, E., Schokoroy, S., Amir, A., Wolfson, E., Kloog, Y., & Pinkas-Kramarski, R. (2013). Ras inhibition enhances autophagy, which partially protects cells from death. *Oncotarget*, 4(1), 142.
- Schulz, R., Emmrich, T., Lemmerhirt, H., Leffler, U., Sydow, K., Hirt, C., ...& Bednarski, P. J. (2012). Identification of a glutathione peroxidase inhibitor that reverses resistance to anticancer drugs in human B-cell lymphoma cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(21), 6712-6715.
- Scotté.F., Colonna.P., Andrieu.J-M., *Cancérologie*, 2002, Paris (France) Ellipses, 336p).
- Sharma, A., Pandey, A., Sharma, S., Chatterjee, I., Mehrotra, R., Sehgal, A., & Sharma, J. K. (2014). Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations. *Meta gene*, 2, 134-142.
- Shen, M. R., Jones, I. M., & Mohrenweiser, H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer research*, 58(4), 604-608.
- Shen, X. Y., Lu, F. Z., Wu, Y., Zhao, L. T., & Lin, Z. F. (2013). XRCC3 Thr241Met polymorphism and clinical outcomes of NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 8(8), e69553].
- Shih, L. C., Tsai, C. W., Tsai, M. H., Tsou, Y. A., Chang, W. S., Li, F. J., ... & Bau, D. T. (2012). Association of cyclin D1 genotypes with nasopharyngeal carcinoma risk. *Anticancer research*, 32(3), 1093-1098.
- Siak, P. Y., Khoo, A. S. B., Leong, C. O., Hoh, B. P., & Cheah, S. C. (2021). Current status and future perspectives about molecular biomarkers of nasopharyngeal carcinoma. *Cancers*, 13(14), 3490.
- Singh, S. A., & Ghosh, S. K. (2016). Polymorphisms of XRCC1 and XRCC2 DNA repair genes and interaction with environmental factors influence the risk of nasopharyngeal carcinoma in Northeast India. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(6), 2811-2819.
- Spence, T., Bruce, J., Yip, K. W., & Liu, F. F. (2016). MicroRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *Chin Clin Oncol*, 5(2), 17.
- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., ...& White, R. (1993). Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 75(5), 951-957.
- Sreeja, L., Syamala, V. S., Syamala, V., Hariharan, S., Raveendran, P. B., Vijayalekshmi, R. V., ...& Ankathil, R. (2008). Prognostic importance of DNA repair gene polymorphisms of XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys751Gln in lung cancer patients from India. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134, 645-652.
- Stelow, E. B., & Wenig, B. M. (2017). Update from the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: nasopharynx. *Head and neck pathology*, 11, 16-22.

- Sterpone, S., &Cozzi, R. (2010). Influence of XRCC1 genetic polymorphisms on ionizing radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids*, 2010.
- Stevens.A., Lowe.J., Histologie humaine, 2006, Paris (France), Elsevier, 459p, (3^e édition).
- Sun, X. S., Li, X. Y., Chen, Q. Y., Tang, L. Q., & Mai, H. Q. (2019). Future of radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *The British journal of radiology*, 92(1102), 20190209.
- Sweeney, C., McClure, G. Y., Fares, M. Y., Stone, A., Coles, B. F., Thompson, P. A., ...&Ambrosone, C. B. (2000). Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Research*, 60(20), 5621-5624.
- Syrjänen, S., &Syrjänen, K. (2021). HPV-associated benign squamous cell papillomas in the upper aero-digestive tract and their malignant potential. *Viruses*, 13(8), 1624.
- Tan, G., Tang, X., & Tang, F. (2015). The role of microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biology*, 36, 69-79.
- Tan, S. C. (2018). Low penetrance genetic polymorphisms as potential biomarkers for colorectal cancer predisposition. *The journal of gene medicine*, 20(4), e3010.
- Tan, S. C., Low, T. Y., Hussain, H. M. J., Sharzehan, M. A. K., Sito, H., Kord-Varkaneh, H., & Islam, M. A. (2022). Association between XRCC3 p. Thr241Met polymorphism and risk of glioma: A systematic review and meta-analysis. *Plos one*, 17(10), e0276313.
- Tang, L. L., Chen, Y. P., Chen, C. B., Chen, M. Y., Chen, N. Y., Chen, X. Z., ... & Ma, J. (2021). The Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) clinical guidelines for the diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Communications*, 41(11), 1195-1227.
- Tang, L., Wei, F., Wu, Y., He, Y., Shi, L., Xiong, F., ...&Zeng, Z. (2018). Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-15.
- Tang, F, Tang, X, Tia, D and Cao.Y. (2012) Chemical Carcinogenesis and Nasopharyngeal Carcinoma. P: 25.
- Taylor, G. S., & Steven, N. M. (2016).Therapeutic vaccination strategies to treat nasopharyngeal carcinoma. *Chin ClinOncol*, 5(2), 23.
- Tejasvi, M. A., Maragathavalli, G., Putcha, U. K., Ramakrishna, M., Vijayaraghavan, R., &Avinash, C. A. (2020). Impact of ERCC1 gene polymorphisms on response to cisplatin based therapy in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 63(4), 538.
- Thomasini RL, Pereira DS, Pereira FSM, et al.(2017). Aged-associated cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. *PLoS ONE*. 2017;12: e0180841. 20.
- Tian, H., Gao, Z., Li, H., Zhang, B., Wang, G., Zhang, Q., ...& Zheng, J. (2015). DNA damage response—a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy. *Cancer letters*, 358(1), 8-16.
- Tsang, C. M., Yip, Y. L., Lo, K. W., Deng, W., To, K. F., Hau, P. M., ...& Tsao, S. W. (2012). Cyclin D1 overexpression supports stable EBV infection in nasopharyngeal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), E3473-E3482.

- Tsao, S. W., Yip, Y. L., Tsang, C. M., Pang, P. S., Lau, V. M. Y., Zhang, G., & Lo, K. W. (2014). Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral oncology*, 50(5), 330-338.
- Twu, C.-W.; Wang, W.-Y.; Chen, C.-C.; Liang, K.-L.; Jiang, R.-S.; Wu, C.-T.; Shih, Y.-T.; Lin, P.-J.; Liu, Y.-C.; Lin, J.-C. 2014. Metronomic Adjuvant Chemotherapy Improves Treatment Outcome in Nasopharyngeal Carcinoma Patients with Postradiation Persistently Detectable Plasma Epstein-Barr Virus Deoxyribonucleic Acid. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014, 89, 21–29.
- Unsal, A. A., Booth, J. R., Rossi, N. A., Byrd, J. K., & Kountakis, S. E. (2019). Basaloid nasopharyngeal carcinoma: A population-based analysis of a rare tumor. *The Laryngoscope*, 129(12), 2727-2732.
- Van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-biological interactions*, 129(1-2), 61-76.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics selection evolution*, 34(3), 275-305.
- W. Fang, Y. Yang, Y. Ma, S. Hong, L. Lin, X. He. Camrelizumab (SHR-1210) alone or in combination with gemcitabine plus cisplatin for nasopharyngeal carcinoma: results from two single-arm, phase 1 trials. *Lancet Oncol* 2018 ; 19 : 1338–50.
- Wang C, Liu Y, Xu LT, et al. Effects of aging, cytomegalovirus infection, and EBV infection on human B cell repertoires. *J Immunol.* 2014;192:603–11.
- Wang C, Nie H, Li Y, et al (2016). The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. *Sci Rep*, 6, 26526.
- Wang, C., Zhang, R., Chen, N., Yang, L., Wang, Y., Sun, Y., ...& Li, W. (2017). Association between glutathione peroxidase-1 (GPX1) Rs1050450 polymorphisms and cancer risk. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(9), 9527.
- Wang, H. B., Zhang, H., Zhang, J. P., Li, Y., Zhao, B., Feng, G. K., ... & Zeng, M. S. (2015). Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nature communications*, 6(1), 1-13.
- Wang, J., Guo, C., Gong, X., Ao, F., Huang, Y., Huang, L., ...& Li, J. (2017). The impacts of genetic polymorphisms in genes of base excision repair pathway on the efficacy and acute toxicities of (chemo) radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 8(45), 78633.
- Wang, S., Chen, S., Zhong, Q., & Liu, Y. (2022). Immunotherapy for the treatment of advanced nasopharyngeal carcinoma: a promising new era. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1-9.
- Wang, S., Claret, F. X., & Wu, W. (2019). MicroRNAs as therapeutic targets in nasopharyngeal carcinoma. *Frontiers in oncology*, 9, 756.
- Wang, Z., Wang, Y., Ren, H., Jin, Y., & Guo, Y. (2017). ZNRF3 inhibits the invasion and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma cells by inactivating the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25(4), 571-577.
- Warnecke-Eberz U, Vallböhmer D, Alakus H, et al (2009). ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J GastrointestSurg*, 13, 1411-21.)

- Wei, K. R., Xu, Y., Liu, J., Zhang, W. J., & Liang, Z. H. (2011). Histopathological classification of nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(5), 1141-1147.
- Wong, K. C., Hui, E. P., Lo, K. W., Lam, W. K. J., Johnson, D., Li, L., ... & Chan, A. T. (2021). Nasopharyngeal carcinoma: an evolving paradigm. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(11), 679-695.
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science*, 291(5507), 1284-1289.
- Wu, L., Li, C., & Pan, L. (2018). Nasopharyngeal carcinoma: A review of current updates. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(4), 3687-3692.
- Wu, M. Y., Huang, S. J., Yang, F., Qin, X. T., Liu, D., Ding, Y., ... & Wang, X. C. (2017). Detection of nasopharyngeal carcinoma susceptibility with single nucleotide polymorphism analysis using next-generation sequencing technology. *Oncotarget*, 8(32), 52708.
- Wu, X., Lu, W., Jiang, C., Zhang, D., Zhang, W., Cui, Y., ... & Chen, S. (2023). Effect of ERCC1 polymorphisms on the response to platinum-based chemotherapy: A systematic review and meta-analysis based on Asian population. *Plos one*, 18(5), e0284825.
- Xiao, J., & He, X. (2021). Involvement of non-coding RNAs in chemo-and radioresistance of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Management and Research*, 8781-8794.
- Xiong, D., Du, Y., Wang, H. B., Zhao, B., Zhang, H., Li, Y., ... & Zeng, M. S. (2015). Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates Epstein–Barr virus infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 11036-11041.
- XS. Sun, XY. Li, QY. Chen, LQ. Tang, HQ. Mai. Nasopharyngeal carcinoma special feature: Review Article. Future of Radiotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Radiol* 2019; 92: 20190209.
- Xu, J. Y., Wei, X. L., Wang, Y. Q., & Wang, F. H. (2022). Current status and advances of immunotherapy in nasopharyngeal carcinoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 14, 17588359221096214.
- Xu, J., Ma, J., Zong, H. T., Wang, S. Y., & Zhou, J. W. (2014). Pharmacogenetic role of XRCC1 polymorphisms on the clinical outcome of gastric cancer patients with platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Genet Mol Res*, 13(1), 1438-1446.
- Xu, L., Jiang, Y., Zheng, J., Xie, G., Li, J., Shi, L., & Fan, S. (2013). Aberrant expression of β -catenin and E-cadherin is correlated with poor prognosis of nasopharyngeal cancer. *Human pathology*, 44(7), 1357-1364.
- Xu, Y., Shi, Y., Yuan, Q., Liu, X., Yan, B., Chen, L., ... & Cao, Y. (2013). Epstein-Barr Virus encoded LMP1 regulates cyclin D1 promoter activity by nuclear EGFR and STAT3 in CNE1 cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32(1), 1-13.
- Yamada, N. A., Hinz, J. M., Kopf, V. L., Segalle, K. D., & Thompson, L. H. (2004). XRCC3 ATPase activity is required for normal XRCC3-Rad51C complex dynamics and homologous recombination. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23250-23254.
- Yang ZH, Dai Q, Kong XL, Yang WL, Zhang L. (2009). Association of ERCC1 polymorphisms and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog*, 48, 196-201.

- Yang, C.-F.; Yang, G.-D.; Huang, T.-J.; Li, R.; Chu, Q.-Q.; Xu, L.; Wang, M.-S.; Cai, M.-D.; Zhong, L.; Wei, H.-J.; et al. EB-virus latent membrane protein 1 potentiates the stemness of nasopharyngeal carcinoma via preferential activation of PI3K/AKT pathway by a positive feedback loop. *Oncogene* 2016, 35, 3419–3431.
- Yang, F., Zhou, L., Chen, J., Luo, Y., & Wang, Y. (2022). Survival association of XRCC1 for patients with head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Genetics*, 13.
- Yao, R. W., Wang, Y., & Chen, L. L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature cell biology*, 21(5), 542-551.
- Yi, M., Cai, J., Li, J., Chen, S., Zeng, Z., Peng, Q., ...&Xiang, B. (2018). Rediscovery of NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma: How genetic defects of NF- κ B pathway interplay with EBV in driving oncogenesis. *Journal of cellular physiology*, 233(8), 5537-5549.
- Yin, M., Yan, J., Voutsina, A., Tibaldi, C., Christiani, D. C., Heist, R. S., ...& Wei, Q. (2011). No evidence of an association of ERCC1 and ERCC2 polymorphisms with clinical outcomes of platinum-based chemotherapies in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lung cancer*, 72(3), 370-377.
- Yin, Q. H., Liu, C., Li, L., Zu, X. Y., & Wang, Y. J. (2012). Association between the XRCC3 T241M polymorphism and head and neck cancer susceptibility: a meta-analysis of case-control studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(10), 5201-5205.
- Yu, J. J., Lee, K. B., Mu, C. H. U. A. N. J. I. E., Li, Q. I. N. G. D. I., Abernathy, T. V., Bostick-Bruton, F., & Reed, E. (2000). Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *International journal of oncology*, 16(3), 555-615.
- Yu, J. J., Mu, C., Lee, K. B., Okamoto, A., Reed, E. L., Bostick-Bruton, F., ...& Reed, E. (1997). A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutation Research/Mutation Research Genomics*, 382(1-2), 13-20.
- Yu, L., Wei, J., & Liu, P. (2022, October). Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 85, pp. 69-94). Academic Press.
- Yu, X., Wang, Q., He, G., & Yu, H. (2021). Association between XRCC3 Thr241Met polymorphism and risk of gynecological malignancies: a meta-analysis. *Cancer genetics*, 254, 11-17.
- Yuan, L., Yi, H. M., Yi, H., Qu, J. Q., Zhu, J. F., Li, L. N., ... & Xiao, Z. Q. (2016). Reduced RKIP enhances nasopharyngeal carcinoma radioresistance by increasing ERK and AKT activity. *Oncotarget*, 7(10), 11463.
- Y-y, Yu Z. Association between XRCC1 , DNA-PKcs, and PCNA and radiotherapeutic effect in non-small cell lung cancer. *Chin Clin Oncol* (2010) 15(6):514–7.
- Zendjabil, M., Favard, S., Tse, C., Abbou, O., &Hainque, B. (2017). Les microRNA comme biomarqueurs: quelles perspectives.Comptes Rendus Biologies, 340(2), 114-131.
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research*, 32(16), 4776-4785.

- Zhai, X. M., Hu, Q. C., Gu, K., Wang, J. P., Zhang, J. N., & Wu, Y. W. (2016). Significance of XRCC1 Codon399 polymorphisms in Chinese patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with radiation therapy. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 12(1), e125-e132.
- Zhan, Y., & Fan, S. (2020). Multiple mechanisms involving in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cancer*, 11(14), 4193.
- Zhang B, Mo Z, Du W, et al. 2015. Intensity-modulated radiation therapy versus 2D-RT or 3D-CRT for the treatment of nasopharyngeal carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2015;51:1041–6.
- Zhang, H., Wang, J., Yu, D., Liu, Y., Xue, K., & Zhao, X. (2017). Role of Epstein-Barr virus in the development of nasopharyngeal carcinoma. *Open Medicine*, 12(1), 171-176.
- Zhang, N., Ouyang, Y., Chang, J., Liu, P., Tian, X., & Yu, J. (2020). Pharmacogenetic association between XRCC1 polymorphisms and response to platinum-based chemotherapy in asian patients with NSCLC: a meta-analysis. *BioMed Research International*, 2020.
- Zhang, Y.; Li, W.-F.; Mao, Y.-P.; Guo, R.; Tang, L.-L.; Peng, H.; Sun, Y.; Liu, Q.; Chen, L.; Ma, J.P.; et al. 2016. Risk Stratification Based on Change in Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load after Treatment in Nasopharyngeal Carcinoma. *Oncotarget* 2016, 7, 9576–9585.
- Zhang, Z., Yu, X., Zhou, Z., Li, B., Peng, J., Wu, X., ...& Yang, L. (2019). LMP1-positive extracellular vesicles promote radioresistance in nasopharyngeal carcinoma cells through P38 MAPK signaling. *Cancer medicine*, 8(13), 6082-6094.
- Zhao, F.-P.; Liu, X.; Chen, X.-M.; Lu, J.; Yu, B.-L.; Tian, W.-D.; Wang, L.; Xu, X.; Huang, H.-R.; Zhang, M.-W.; et al. 2015. Levels of Plasma Epstein-Barr Virus DNA Prior and Subsequent to Treatment Predicts the Prognosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Oncol. Lett*. 2015, 10, 2888–2894.
- Zhao, H., Liang, D., Grossman, H. B., & Wu, X. (2005). Glutathione peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. *Urology*, 66(4), 769-774.
- Zhao, L., Yin, X. X., Qin, J., Ye, X. H., Zhou, Y., Wang, W., & He, X. F. (2022). Evaluation of association studies and a systematic review and meta-analysis of XRCC1 polymorphisms in breast cancer risk.
- Zhao, R., & Chen, G. (2015). Role of GSTP1 Ile105Val and XRCC1 Arg194Trp, Arg280His and Arg399Gln gene polymorphisms in the clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 14909.
- Zhao, Y., Deng, X., Wang, Z., Wang, Q., & Liu, Y. (2012). Genetic polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(2), 665-669.
- Zhao, Y., Wang, H., Zhou, J., & Shao, Q. (2022). Glutathione Peroxidase GPX1 and Its Dichotomous Roles in Cancer. *Cancers*, 14(10), 2560.
- Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, et al. Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):4939-4943.

- Zhou, S., Zhu, Q., Liu, H., Jiang, S., Zhang, X., Peng, C., ...& Lu, Q. (2021). Associations of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure and its interaction with XRCC1 genetic polymorphism with lung cancer: A case-control study. *Environmental Pollution*, 290, 118077.
- Zhou, W., Gurubhagavatula, S., Liu, G., Park, S., Neuberg, D. S., Wain, J. C., ...& Christiani, D. C. (2004). Excision repair cross-complementation group 1 polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 4939-4943.
- Zhou, Y., Xia, L., Lin, J., Wang, H., Oyang, L., Tan, S., ...& Liao, Q. (2018). Exosomes in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cancer*, 9(5), 767.
- Zhu, X., Zhong, Z., Zhang, X., Zhao, X., Xu, R., Ren, W., & Li, S. (2012). DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and bladder cancer risk in a Chinese population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(6), 640-643.
- Zipprich, J., Terry, M. B., Brandt-Rauf, P., Freyer, G. A., Liao, Y., Agrawal, M., ...& Santella, R. M. (2010). XRCC1 polymorphisms and breast cancer risk from the New York Site of the Breast Cancer Family Registry: A family-based case-control study. *Journal of carcinogenesis*, 9.
- Zhongwei W., Yali W., Hongtao R., Yingying J., and Ya G. (2017). ZNRF3 Inhibits the Invasion and Tumorigenesis in Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Inactivating the Wnt/b-Catenin Pathway. Department of Medical Oncology, The Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, P.R. China.14;25(4):571-577<https://doi.org/10.3727/97818823455816x14760478220149>
- Zou, X., Zhu, D., Zhang, H., Zhang, S., Zhou, X., He, X., ...& Zhu, W. (2020). MicroRNA expression profiling analysis in serum for nasopharyngeal carcinoma diagnosis. *Gene*, 727, 144243.