



Original Article

## The Contribution of Immunohistochemistry (IHC) in Undifferentiated Carcinoma

Author (s): Dr. Fatiha Atif<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service d'oncologie médicale du Centre hospitalier Pierre et Marie Curie d'Alger

Corresponding Author: \*Dr. Fatiha Atif (Email: [oncoatif@yahoo.fr](mailto:oncoatif@yahoo.fr))

### 1. Abstract:

**Introduction:** The contribution of immunohistochemistry (IHC) to undifferentiated carcinoma of the nasopharynx (UCNT) has been the subject of several studies. The purpose of this work is to demonstrate its interest apart from the positive diagnosis.

**Methods:** The retrospective study collected UCNT diagnosed by standard histology on biopsy samples (cavum or lymph node), which, once fixed in formalin and embedded in paraffin, allowed immunohistochemically analysis using specific antibodies for the following markers: VEGF, EGFR, LMP1, Bcl2, Ki67, C-kit, and P53.

**Results:** The expression levels of the markers were variable. A significant relationship between some markers and the young age of the patients, the viral load of Epstein-Barr virus (EBV), and the presence of metastases was noted, while others were predictive of the therapeutic response and had an impact on the prognosis.

**Discussion:** The mechanisms involved in the appearance of UCNT, its diagnosis, or its treatment still raise many questions. The markers used in IHC have several interests apart from those allowing for a positive diagnosis. The EBV-UCNT relationship is well known due to the hypoexpression of some markers, especially in young subjects. In our study, they were correlated with other markers at an advanced stage of the disease in its lymph node or distant metastatic form and were indicators of relapse and a poor prognosis. In some cases, the hypoexpression of the markers was a harbinger of resistance to treatment. Our results overlapped with data from the literature.

**Conclusion:** IHC is a very useful step in pathological anatomy. It makes it possible to establish the positive diagnosis emphasized by the clinic. The IHC markers of UCNT have made it possible to highlight the link with EBV as well as prognostic and predictive elements of response to therapy.

#### Manuscript Information

**Received Date:** 08-07-2023

**Accepted Date:** 30-08-2023

**Publication Date:** 07-09-2023

**Plagiarism Checked:** Yes

**Manuscript ID:** IJCRM:2-5-1

**Peer Review Process:** Yes

#### How to Cite this Manuscript

Dr. Fatiha Atif. The Contribution of Immunohistochemistry (IHC) in Undifferentiated Carcinoma. *International Journal of Contemporary Research in Multidisciplinary*. 2023; 2(5):01-04.

2. **Keyword:** EBV, IHC, Metastases, Prognosis, UCNT

### 3. Introduction:

Le recours à l'immunohistochimie est indispensable dans le diagnostic de l'UCNT qui montre une positivité des cellules tumorales pour les cytokératines et une négativité pour le CD45 et le CD20, ce qui permet de le différencier des autres néoplasies comme les lymphomes malins Hodgkiniens et non hodgkiniens, le rhabdomyosarcome, les schwannomes malins, les chondrosarcomes, le mélanosarcome et le neuroblastome olfactif. Cependant, dans le cas où le diagnostic histologique reste douteux, la relation avec L'EBV peut être mise en évidence par hybridation in situ ainsi que par biologie moléculaire. Il est connu qu'il existe un lien entre l'EBV et l'UCNT<sup>[1]</sup>, cependant, les processus impliqués dans la genèse de la tumeur, le diagnostic ou le traitement suscitent de nos jours encore, de nombreuses

interrogations dont il faudra rechercher les réponses, en se référant aux données scientifiques. L'EBV présente deux cibles cellulaires distinctes in vivo qui sont les cellules lymphoïdes B et les cellules épithéliales pharyngées et son implication est précoce dans la transformation cellulaire<sup>[2]</sup>. Parmi les protéines exprimées par l'EBV, la protéine membranaire ou latent membran protein (LMP1)<sup>[3]</sup> qui représente l'exclusive protéine de l'EBV possédant une propriété permettant la transformation néoplasique et qui est exprimée dans plus de 50% des cas soit sur des biopsies de la tumeur au sein même des cellules épithéliales soit au niveau des lymphocytes qui infiltrent l'UCNT. Elle est dotée de plusieurs actions dont le pouvoir fortement métastatique<sup>[4, 5]</sup> et ceci, grâce à l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire. Si des taux sériques du facteur

endothélial vasculaire de croissance de (VEGF) élevés avant et après radiothérapie étaient un facteur de mauvais pronostic, avec un fort potentiel de métastases [6]. L'expression élevée de l'epidermal growth factor receptor (EGFR) est corrélée également à un mauvais pronostic [7]. Cependant, une basse expression de la protéine nucléaire non histonique, (Ki67) rendait les patient chimio et radio résistants et exposait au métastases et à un mauvais pronostic [8] alors que l'hyper expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 était fréquente et pourvoyeuse de rechutes métastatique comme celle de C Kit mais qui se voyait chez le sujet jeune [9]. L'hyper expression de la protéine antitumorale P53 serait fréquente dans les UCNT [10] avec d'une part la présence d'adénopathies (N+) [11] et d'autre part, l'existence de mutations de P53, impliquait un mauvais pronostic [12].

**4. Objectif:**

L'objectif de notre travail était de démontrer le rôle de l'IHC des UCNT en dehors de son intérêt pour le diagnostic positif, en apportant des connaissances supplémentaires sur son utilisation notamment en épidémiologie, clinique, thérapeutique et pronostique.

**5. Méthodes:**

L'étude rétrospective a colligé 45 patients porteurs d'UCNT localement avancés ou métastatiques, diagnostiqués à l'histologie standard sur des prélèvements biopsiques

(cavum ou ganglion). Après fixation au formol et inclusion en paraffine, l'analyse immunohistochimique était effectuée en utilisant des anticorps spécifiques pour chaque marqueur: VEGF, EGFR, LMP1, Bcl2, Ki67, C kit et P53. Nous avons recherché les différentes expressions ou le score variait de zéro croix (0) sans aucune expression, à une croix (+) expression de 25%, deux croix (++) expression entre 25 à 50%, trois croix (+++) expression entre 51 à 75% et enfin quatre croix (++++), expression > 75%.

L'analyse statistique et l'exploitation des données ont été réalisées sur logiciel EPI Info 60/Excel et SPSS pour Windows version 22. L'analyse d'une seule variable par le calcul des fréquences, la moyenne et l'écart type pour un risque  $\alpha=0,05$ . L'analyse multivariée de variables non paramétriques par: le calcul du coefficient de corrélation linéaire de Pearson r avec son intervalle de confiance à 95%; le r<sup>2</sup>: coefficient de détermination, explique que tant de % est la cause de l'événement créé par deux facteurs réunis; V de Cramer: est la mesure d'association qui s'interprète comme un coefficient de corrélation linéaire r et V2: mesure la taille de l'effet en %.

**6. Résultats:**

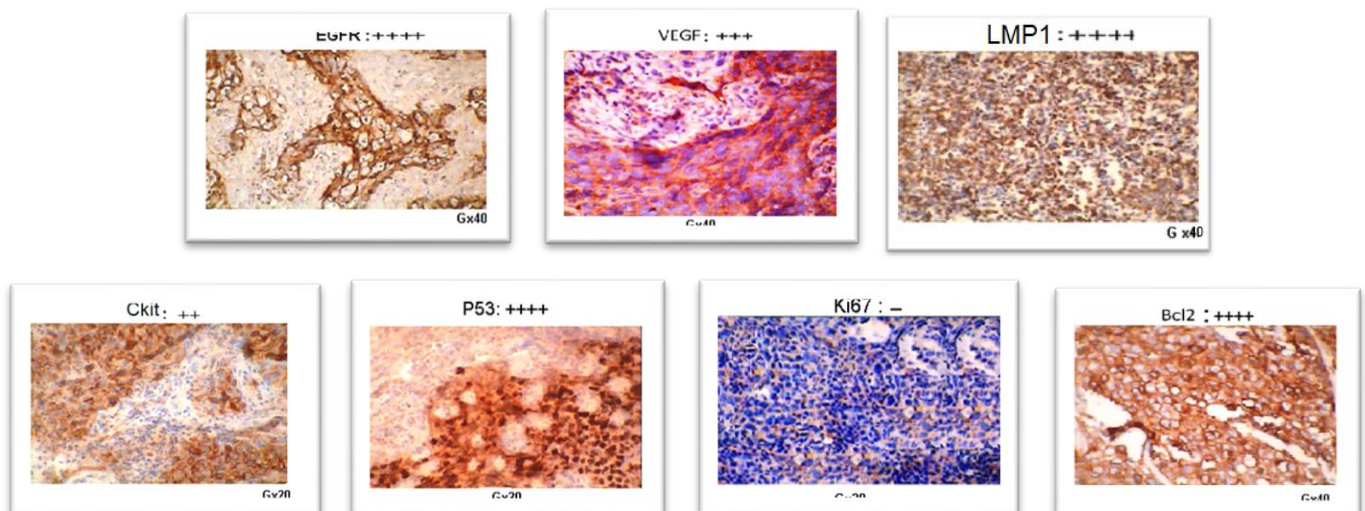
Nous avons noté une hyper expression de 27% de l'EGFR à 4(+), 55,6% du VEGF à 1(+), 44,5% du C Kit à 1(+), 44,5% de P53 à 3(+), 44,5% de LMP1 à 4(+), 66,6 % de Bcl2 à 4(+) et 66,7% du Ki67 à 0 (+).

Résultats (Tableau 1, Figures 1 à 7).

**Tableau 1:** Résultats de l'IHC (score et pourcentage)

Score(+)	0	+	++	+++	++++
%	<10	10-25	26-50	51-75	>75
EGFR	22,2	16,5	11,1	22,2	27
VEGF	17	55,6	11,1	11,1	5,6
C Kit	16,7	44,5	0	22,2	16,5
P53	5,6	16,7	5,6	44,5	27,8
Ki67	66,7	22,2	0	0	11,11
LMP1	22,2	5,6	0	27,8	44,5
Bcl2	0	16,7	0	16,7	66,6

**Figure 1à7:** IHC selon les marqueurs et les scores



Les corrélations de l'IHC avec l'épidémiologie, le stade clinique et la survie sont représentées sur le tableau 2,3 et 4.

**Tableau 2:** Corrélation des marqueurs à l'IHC avec l'épidémiologie

Association	r IC à 95%	p-value	r <sup>2</sup>	Age Moyen (ans)	Lien entre les variables (%)
Marqueur-âge					
C Kit -âge	- 0,308 [0,398 -3 ,022]	<b>0,049</b>	0,098	34,14	9,8
P53 - âge	0,222 [1,497-3,923]	<b>0,047</b>	0,05	44,18	5
Marqueur-EBV	Ac antiVCA(%)	hyperexpression (%)		Age Moyen (ans)	
LMP1-EBV	100	≥ 75		44	
Ckit-EBV	80	50-75		34	
P53-EBV	54	50		42	

**Légende :** r= Corrélation, IC=intervalle de confiance, r<sup>2</sup>=coefficient de détermination

**Tableau 3 :** Corrélation des marqueurs à l'IHC avec le stade TNM

Association	R	P	r <sup>2</sup>	Lien entre les variables (%)	Expression (%)
LMP1- M+	0,278	<b>0,027</b>	0,077	7,7	Variable
KI67- M+	0,139	<b>0,045</b>	0,02	2	10-25
P53-N+	0,186	<b>0,047</b>	0,034	3,4	≥51
P53- M+	0,241	0,05	0,058	5,8	
C Kit -M+	0,139	<b>0,049</b>	0,02	2	≥51
EGFR-M+	0,189	0,05	0,03	3	10 -25
VEGF-M+	0,303	<b>0,042</b>	0,09	9	10-50
Bcl2-M+	0,181	<b>0,003</b>	0,03	3	> 10

**Légende:** r= Corrélation, p=p value, IC=intervalle de confiance, r<sup>2</sup>=coefficient de détermination M+= métastases, N+= ganglion envahi

**Tableau 4:** Corrélation des marqueurs à l'IHC avec la SG

Association	R	p-value	r <sup>2</sup>	Lien entre les variables (%)
KI67- SG	0,206	<b>0,036</b>	0,042	4,2
P53- SG	0,075	<b>0,026</b>	0,005	0,5
C Kit - SG	0,166	0,08	-	-
EGFR- SG	0,287	<b>0,035</b>	0,08	8
VEGF- SG	0,327	<b>0,015</b>	0,106	10,6
Bcl2- SG	0,08	<b>0,031</b>	0,006	0,6

**Légende:** SG=survie globale, r= Corrélation, r<sup>2</sup>=coefficient de détermination

## 7. Discussion:

Les niveaux d'expression des sept marqueurs étudiés en immunohistochimie étaient variables. Sur le plan épidémiologique, seuls les marqueurs Ckit et P53 étaient corrélés significativement avec l'âge jeune de nos patients, où l'âge moyen des patients surexprimant le C Kit était de 34 ans tandis que celui décrit dans la littérature [9] était noté seulement dans 33% des cas chez le sujet jeune. Pour nos patients surexprimant P53, l'âge moyen était de 44ans se rapprochant de celui décrit par Simon Lo *et al* [10], représentant un taux de 85, 5% chez le sujet de la cinquantaine et rarement vu chez le sujet de moins de 30 ans. L'hyper expression de LMP1 était retrouvée chez tous nos patients et correspondait à des taux d'AC anti EBV élevés. Elle variait entre 3 et 4 (+). Nous partageons nos résultats avec les données de la littérature [13]. Pour ce qui est de l'hyper expression de Ckit et de P53, lorsqu'elles étaient identifiées dans notre série, l'EBV était à chaque fois positif. Elles variaient entre 2 et 4 (+) et étaient en parfaite harmonie avec les données de la littérature [9]. La corrélation de l'IHC

avec le stade clinique TNM et le pronostic a objectivé chez tous nos patients métastatiques une expression faible du Ki67 comprise entre 10 et 25% et un lien entre les deux variables estimé à 2%. D'après la littérature, les patients ayant une basse expression de Ki67 seraient chimio et radio résistants, exposés aux métastases et à un mauvais pronostic [8]. Quant à la corrélation entre l'expression du VEGF et les métastases, nous l'avons estimée à 9%. Elle représentait le pourcentage le plus élevée comparée aux autres marqueurs. Zhao *et al* [14] ont montré que l'hyper expression du VEGF était un facteur de mauvais pronostic, surexprimée pour les tumeurs très vascularisées avant et après radiothérapie et était un facteur de mauvais pronostic, et que par conséquent son dosage était utile pour prédire les résultats après traitement surtout pour les patients à un stade avancé [6]. En ce qui concernait l'expression de l'EGFR, nous avons retrouvé un lien avec les métastases à 3% et, ce marqueur était corrélé aussi à un mauvais pronostic des patients UCNT selon Wang *et al* [7]. Pour ce qui était de la corrélation entre P53 et métastases ganglionnaires, elle était significative chez nos patients et estimée à 3, 4%. Nos résultats appuyaient fortement les données de la littérature [11]. Il existait également un lien pour ce même marqueur avec les métastases à distance de 5, 8% et il a été démontré que l'existence de mutations de P53 impliquaient un mauvais pronostic [12]. Parallèlement, l'expression de Bcl2 > 75% était élevée de 66, 6% des cas avec un lien avec les métastases estimé à 3% chez nos patients. L'expression anormalement élevée de ce marqueur était corrélée à un mauvais pronostic des patients UCNT et serait présente dans 80% des cas [10]. Concernant le marqueur C KIT, un lien avec les métastases de notre série était estimé à 2 % et son hyper expression était pourvoyeuse de rechutes métastatiques [9]. Pour ce qui était de la LMP1, un lien de 7, 7% avec les métastases a été noté dans notre série en cas d'hyper expression, elle était exprimée dans environ 50% des cas [15,16] et contribuait au potentiel fortement métastatique de l'UCNT [17].

## 8. Conclusion:

L'immunohistochimie est une étape très utile en anatomie pathologique. Elle permet de poser dans la majorité des cas le diagnostic positif des UCNT orienté par la clinique. Dans le cas où l'étude histologique reste douteuse, la relation avec l'EBV peut être mise en évidence par l'hybridation in situ ainsi que par la biologie moléculaire. Cet article a permis d'une part, de mettre en évidence la relation entre la charge



virale et l'hyper expression de la LMP1 et d'autre part, que des marqueurs étaient corrélés au stade avancé de la maladie avec une hyper expression quasi constante en cas de métastases impactant sur le pronostic tandis que d'autres étaient prédictifs de la réponse thérapeutique. Toutes ces données suggéraient que le carcinome indifférencié du nasopharynx représente un groupe de néoplasies très hétérogènes histologiquement et qu'il faudrait élargir la recherche afin de fournir de nouvelles connaissances sur l'utilité de l'immunohistochimie dans ce type de cancer.

#### 9. Remerciements:

Nous remercions toute l'équipe médicale et paramédicale du service d'oncologie médicale du Centre Pierre et Marie Curie d'Alger et toute notre gratitude aux patients inclus dans cette série.

#### 10. Conflits d'intérêt:

L' auteur ne déclare aucun conflit d'intérêts

#### 11. Lettre de motivation:

Nous auteur principal, attestons que le manuscrit n'a pas été soumis pour publication dans un autre journal et , que nous acceptons que l'article soit publié dans l' **International Journal of Contemporary Research in Multidisciplinary**.

#### 12. Références:

1. Busson P, Keryer C, Ooka T, Corbex M. EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies. *Trends Microbiol.*2004;12:356-60 [[Google Scholar](#)]
2. Raab Traub, Differential signaling pathways are activated in the Epstein-Barr virus-associated malignancies nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 64:5251-5260. [[Google Scholar](#)] [[Academia](#)]
3. Zhang X, Uthaisang W, Hu L, Ernberg IT, Fadeel B. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependant mitochondrial perturbation. *Int. J. Cancer.*2005; 113:397-405. [[Google Scholar](#)] [[Wiley Online Library](#)]
4. Hou X, Zhang L, Zhao C, Li S, Lu LX, Han F, Shao JY, Huang PY: Prognostic impact of plasma Epstein-Barr virus DNA concentration on distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Ai Zheng.*2006; 25:785-792. [[Google Scholar](#)]
5. Lo AK, Lo KW, Tsao SW, Wong HL, Hui JW, To KF, Hayward DS, Chui YL, Lau YL, Takada K, Huang DP: Epstein-Barr virus infection alters cellular signal cascades in human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia.* 2006; 8:173-180. [[Google Scholar](#)] [[Elsevier](#)]
6. Mai HQ, Zeng ZY, Zhang CQ, Feng KT, Guo X, Mo HY, Deng MQ, Min HQ, Hong MH: Elevated plasma big ET-1 is associated with distant failure in patients with advanced-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.*2006; 106:1548-1553. [[Google Scholar](#)]
7. Wang SS, Guan ZZ, Xiang YQ, Wang B, Lin TY, Jiang WQ, Zhang L, Zhang HZ, Hou JH: Significance of EGFR and p-ERK expression in nasopharyngeal carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006; 28:28-31. [[Google Scholar](#)]
8. Shi X, Yuan X, Tao D, Gong J, Hu G: Analysis of DNA ploidy, cell cycle and Ki67 antigen in nasopharyngeal carcinoma by flow cytometry. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.* 2005; 25:198-201. [[Google Scholar](#)]
9. Bar-Sela G, Kuten A, Ben-Eliezer S, Gov-Ari E, Ben-Izhak O. Expression of HER2 and C-KIT in nasopharyngeal carcinoma: implications for a new therapeutic approach. *Mod Pathol.* 2003; 16(10):1035-40. [[Google Scholar](#)]
10. Simon Lo *et al.* Nasopharynx Squamous Cell Carcinoma Over expression of oncogenes. *Radiation Oncology, Indiana University School of Medicine.* March, 2005.
11. Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet.* 2005; 365:2041-54. [[The Lancet](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Thezenas S, *et al.* Lopez-Crapez E, Bibeau F, p53 status and response to radiotherapy in rectal cancer: a prospective multilevel analysis. *Br J Cancer.* 2005; 92:2114-21. [[Google Scholar](#)] [[Nature Springer](#)]
13. Traub- Raabet *al.* Potential Selection of LMP1 Variants in Nasopharyngeal Carcinoma. *Journal of Virology,* Jan. 2004; 868-881. [[Google Scholar](#)]
14. Zhao GQ, Xu Y, Wang Q: Significance of serum vascular endothelial growth factor test before radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2005; 3:274-277. [[Google Scholar](#)]
15. Horikawa T, Sheen TS, Takeshita H, Sato H, Furukawa M, Yoshizaki T. *Am J Pathol.* 2001; 159(1):27-33. [[Google Scholar](#)]
16. Li G, Li XP, Peng Y, Liu X, Li XH: Effective inhibition of EB virus-encoded latent membrane protein-1 by siRNA in EB virus (+) nasopharyngeal carcinoma cell. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2005; 40:406-410. [[Google Scholar](#)]
17. Tsang CW, Lin X, Gudgeon NH, Taylor GS, Jia H, Hui EP, Chan AT, Lin CK, Rickinson AB: CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 in Chinese populations are highly focused on novel C-terminal domain-derived epitopes. *J Virol.* 2006; 80:8263-8266. [[Google Scholar](#)]

#### Creative Commons (CC) License

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) license. This license permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.