

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2014

## THÈSE

Présentée par

**KHENCHOUCHE Abdelhalim**

Pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT EN SCIENCES

**Filière : BIOLOGIE**

**Spécialité : BIOLOGIE MOLECULAIRE**

## THÈME

### LE CANCER DU COL DE L'UTERUS : COINFECTION PAR LE PAPILLOMAVIRUS HUMAIN ET PAR L'EPSTEIN-BARR VIRUS

Soutenue publiquement le 30 octobre 2014

#### DEVANT LE JURY

|            |                         |                                      |
|------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Président  | SENATOR Abderrahmane    | Professeur UFA Sétif -1              |
| Directeur  | BOUGUERMOUH Abdelmadjid | Professeur Institut Pasteur, Alger   |
| Examineurs | AIT HAMMOUDA Rabah      | Professeur Université de Batna       |
|            | BENLATRECHE Cherifa     | Professeur Université de Constantine |
|            | LACHEHEB Abdelmadjid    | Professeur UFA Sétif -1              |
|            | TOUIL-BOUKOFFA Chafia   | Professeur USTHB Alger               |
| Invité     | OOKA Tadamasa           | Professeur CNRS Lyon                 |

---

# DEDICACES

AVEC AMOUR ET AFFECTION, JE VOUDRAI DÉDIER CETTE THÈSE AUX MEMBRES DE MA FAMILLE SANS L'AIDE DE QUI, JE N'AURAIS PAS PU MENER A BIEN CE TRAVAIL. JE NE POURRAIS JAMAIS LES REMERCIER ASSEZ ET "BARAKA ALLAHOU FI-KOUM".

A LA MÉMOIRE DE MES PARENTS : "ALLAH YARHAMHOUM"

A LA MÉMOIRE DE MES DEUX CHERS REGRETTÉS AMIS : LAID SELLOUM ET SAID BOUDJENOUIA : "ALLAH YARHAMHOUM"

---

# REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le soutien de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), Service de virologie humaine (Annexe de Sidi Fredj) au sein de l'équipe "Virus et cancers" dirigée par le Pr. Abdelmadjid BOUGUERMOUH. J'exprime ma reconnaissance à tous les membres de ce laboratoire d'avoir bien voulu chaleureusement m'accueillir et de me procuré la joie de manipuler ces petits virus. Je cite particulièrement Mesdames Harrouz Fatma et Sadouki Nabila. Ce travail a été soutenu financièrement par une subvention de ATRSS (Ex ANDRS, code du projet : 03/05/01/10/024), par une subvention de "Agence Nationale de la Recherche MIME (France), et par une subvention de "coopération Inter-universitaire franco-algérienne" MDU 663. Je suis reconnaissant aux différents directeurs généraux qui se sont succédés à l'IPA (Pr Benhacine M., Pr Abadi M., Pr Tazir M., Pr Kezal) qui m'ont permis de loger à l'annexe de Sidi Fredj et d'accéder au laboratoire où j'ai réalisé une partie de mon travail.

Au professeur Abdelmadjid BOUGUERMOUH : Je vous ai connu depuis ma première thèse sur les Enterovirus et tout au long de cette thèse. J'ai énormément appris à vos côtés. Merci de m'avoir accordé votre confiance pendant toutes ces années. J'ai toujours apprécié votre sens très développé, votre rigueur dans l'accomplissement de chaque tâche, vos qualités humaines sans égal, votre esprit très ouvert, votre sympathie couronnée d'une énorme modestie. Merci pour les invitations et les sorties, bref pour votre hospitalité. Je suis sincèrement honoré de faire votre connaissance. MERCI : Je pense que vous comprendrez tout ce que ce simple petit mot peut cacher de reconnaissance et d'affection. Finalement je l'ai faite cette thèse.

Je remercie également Professeur Tadamassa OOKA qui m'a accueilli dans son laboratoire "Immunologie et de virologie moléculaire" (UMR 5537 CNRS, Faculté de médecine RTH Laënnec, Lyon). Merci pour votre confiance sur le projet EBV-HPV-col utérin. Sans vous, rien de tout cela ne serait peut-être possible. Merci pour votre réconfort dans les périodes de doute. Merci infiniment pour votre inaltérable gentillesse. Vos critiques constructives et vos conseils m'étaient d'une grande utilité dans l'accomplissement de mes tâches.

Je remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font, les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer le travail de ma thèse. Ainsi, je remercie très chaleureusement une première fois le président de ce jury, le Pr Abderahmane Senator. Je remercie également messieurs le Pr Lacheheb Abdelmadjid et le Pr Ait Hammouda Rabah, Ainsi que mesdames le Pr Benlatreche Cherifa et Pr Touil-Boukoffa Chafia d'avoir accepté d'être les examinateurs de mon manuscrit de thèse. Vous avez eu la lourde tâche de lire mon manuscrit ! Je

vous remercie pour son enrichissement.

Je tiens à remercier Mme le Pr Jacqueline Trouillas (Inserm, Faculté de médecine Laennec, Université de Lyon-1). Merci pour Votre chaleureux accueil au sein de votre laboratoire d'histologie. Merci pour les conseils et l'assistance technique qui m'ont permis de faire un bon travail d'immunohistochimie.

Merci également au Pr. Arab Boudriche et au Pr. Abdelaziz Graba et l'ensemble des membres de leurs équipes respectives qui ont contribué à la bonne pratique de prélèvements cervicaux et nous ont fourni le matériel biologique et les informations nécessaires à la réalisation de tous les tests.

Abderrahmane, une deuxième fois merci pour ton sens de l'organisation, pour tes conseils de "maman", pour ton soutien, pour tes encouragements et surtout pour ton calme à toute épreuve. Merci pour tout.

Zahir, merci pour ton aide précieuse avec Latex, quelle horreur ce programme ! Mais qui enfin montre le salut. Reste le même avec ton inaltérable gentillesse et ta disponibilité pour tous, tu es un ange !

Mustapha, merci pour ta lecture critique et tes corrections de mon anglais lors de la préparation de mon article. Merci pour ta disponibilité et pour ton sens de toujours mieux faire.

Merci Walid et Naouel les artistes, merci pour votre aide avec ChemBioDraw, Excel et PPT. Vous étiez tous les deux magnifiques.

Mihoub ! Je pense que tu as du bouillir intérieurement avec mes éternels "belaakal". Merci pour ton aide et ton soutien depuis notre très jeune âge.

Je tiens à remercier Dr Soraya Ouhida (CHU de Sétif, Faculté de médecine UFAS-1). Merci pour ton assistance dans la lecture et l'interprétation histologiques. Merci pour tes encouragements et ta gentillesse.

Samia (plus qu'une collègue, une amie) merci d'avoir été là, à me soutenir. Merci pour tes gâteaux et cookies, tu connais mon côté gourmand.

Enfin la difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne dans mes remerciements. C'est peut-être la tâche la plus difficile. J'exprime toute ma gratitude envers les personnes dont le nom n'apparaîtrait pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Ils se reconnaîtront : merci à tous et pour tout !



## ملخص

من المعلوم أن فيروس الورم الحليمي البشري (HPV) يساهم في تطور سرطان عنق الرحم. إلا أن أثر العدوى المشتركة مع فيروس إبشتاين-بار (EBV) في مستوى عنق الرحم ليس واضحة لحد الآن. لمحاولة فهم هذه الإمكانية تمت دراسة ثمان وخمسون حالة سرطان عنق الرحم، تم اختيارها عشوائياً، ومقارنتها مع 14 نسيج عنق رحم غير مصابة و21 حالة قبل سرطانية متطورة (CIN-2/3) و16 قبل سرطانية غير متطورة (CIN-1). تم البحث عن العدة الوراثية لكل من فيروس الورم الحليمي البشري عال الخطر من جهة وعن فيروس EBV من جهة أخرى باستعمال بادئات عامة المطورة من قبل مانوس (MY09/11). كما تمت دراسة تهجين سلاسل خاصة بكل فيروسو بتقنية التهجين (Digene) الجيل الثاني. تم الكشف عن EBV باستعمال تقنية PCR لتضخيم سلسلة طولها 600 زوج قاعدي تمثل الجين BALF1 بأكمله. من جهة أخرى أجريت دراسة التعبير عن مسرطنات EBV في خزعات تم أخذها من عنق الرحم. ومن خلال هذا البحث وجد أن LMP-1 التي تم كشفها عن طريق RT-PCR من جهة والكشف عن بروتينات هذا الفيروس بتقنية Western blot. أما بخصوص تحديد موقع هذه المسرطنات في مختلف العضيات الخلوية التي استعملت فيها تقنية التلوين النسيجي المناعي (IHC) باستخدام أجسام مضادة وحيدة النسيلة نوعية للبروتينات (LMP-1، BARF-1، EBNA-1). كانت نتائج التلوين النسيجي المناعي (IHC) واضحة، حيث أظهرت فيروسات الورم الحليمي البشري عالية الخطر عن المرضى الذين يعانون من السرطان بنسبة 88% وعند الحالات قبل السرطانية غير المتطورة بنسبة 75%، أما في الحالات قبل السرطانية المتطورة فكانت النسبة 95%. بالمقارنة النسبية سجلت نسبة 14% فقط من وجود فيروس الورم الحليمي البشري. أما عن كشف فيروس EBV فكانت النسب 69%، 12.5%، 38.1% و14% في حالات سرطان عنق الرحم والحالات قبل السرطانية المتطورة والحالات قبل السرطانية غير المتطورة والشواهد على التوالي. تبين أن حالات العدوى الثنائية (HPV-EBV) كانت أكثر بكثير في حالة السرطانات (67%) مقارنة مع الحالات قبل السرطانية المتطورة (29%) والحالات قبل السرطانية غير المتطورة (27%). يمثل ارتفاع نسبة العدوى المشتركة (HPV-EBV) في حالات السرطان مؤشر خطورة وأن وجود فيروس EBV قد يساهم في تطور سرطان عنق الرحم، إذ يمكن اعتباره وجوده أمراً سيئاً لتطور هذا النوع من السرطان. إذا كان الأمر صحيحاً، يجب أن يأخذ بعين الاعتبار في عملية التلقيح ضد سرطان عنق الرحم.

**الكلمات المفتاحية:** فيروس الورم الحليمي البشري، فيروس إبشتاين-بار، سرطان عنق الرحم، العدوى المشتركة (HPV-EBV)

---

## RESUME

### **RÉSUMÉ :**

Bien que la persistance du papillomavirus humain (HPV) au niveau du col utérin soit un phénomène nécessaire à la carcinogenèse et au pronostic du cancer du col utérin, la nécessité d'un cofacteur l'est tout autant. L'impact d'une coïnfection par l'HPV à haut risque (HPV-HR) et Virus d'Epstein-Barr (EBV) n'est pas encore clair. Cinquante-huit cas de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus choisis au hasard, 14 cas de cols normaux, 21 patientes ayant des lésions de haut grade (CIN -2/3) et 16 cas de lésions de bas grade (CIN-1) ont été examinés pour détecter les infections à EBV et à HPV. La recherche des séquences spécifiques des HR-HPV a été réalisée par PCR en utilisant des amorces consensus de Manos (MY09/11) et par hybridation en phase liquide (Digene Hybrid Capturer 2). L'EBV a été révélé par PCR à travers l'amplification d'une séquence spécifique de 660 pb (le gène BALF1 entier). L'étude de l'expression de l'EBV a été faite sur les biopsies cervicales en recherchant les ARNm de LMP-1 par RT-PCR et la détection des protéines BARF-1 par Western Blot. Pour localiser les antigènes de l'EBV dans les tissus cervicaux la technique d'immunohistochimie (IHC) en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques aux protéines, LMP-1 et EBNA-1 a été employée. Les HPV ont été également visualisés par cette dernière technique (IHC). Les résultats obtenus montrent une prévalence des HR-HPV chez les patientes atteintes de cancers de 88%. La prévalence est de 75% dans le cas des lésions de bas grade et de 95% dans les lésions précancéreuses de haut grade. Comparativement, seulement 14% des cas témoins (cols normaux) étaient HPV-positifs. D'autre part, 69%, 12,5%, 38,1%, et 14% des cas étaient EBV-positifs dans les cas respectifs des cancers cervicaux, des lésions de bas grade, des lésions précancéreuses de haut grade et des cols normaux. Les cas de coïnfection (HR-HPV et EBV) ont été révélés beaucoup plus dans les carcinome épidermoïde (67%) par rapport aux autres lésions ou par rapport aux témoins. Ces cas de cancers cervicaux ont en plus montré 27% et 29% d'expression des oncogènes de l'EBV, BARF-1 et LMP-1 respectivement. Le taux élevé de coïnfection (HPV-EBV) dans les cancers étudiés permet d'envisager l'hypothèse d'un rôle éventuellement facilitant de l'EBV qui serait incriminé dans le processus tumoral du col utérin. Si cela était vrai, cette coïnfection devrait être prise en compte pour indiquer un mauvais pronostic dans le développement de ce type de cancer. Le mode d'action de l'EBV dans ce cas doit être approfondi.

**Mots clés :** Virus du papillome humain, virus d'Epstein-Barr, le cancer du col utérin, Confection HPV-EBV.

## **ABSTRACT :**

Despite the fact that the implication of human papillomavirus (HPV) in the carcinogenesis and prognosis of cervical cancer is well established, the impact of a co-infection with high risk HPV (HR-HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) is still not fully understood. Fifty eight randomly selected cases of squamous cell carcinomas (SCC) of the uterine cervix, 14 normal cervixes specimens, 21 CIN-2/3 and 16 CIN-1 cases were examined for EBV and HPV infections. Detection of HR-HPV specific sequences was carried out by PCR amplification using consensus primers of Manos and by Digene Hybrid Capture. The presence of EBV was revealed by amplifying a 660 bp specific EBV sequence of BALF1. mRNA expression of LMP-1 in one hand and protein levels of BARF-1, LMP-1 and EBNA-1 in the other hand were assessed by RT-PCR and immunoblotting and/or immunohistochemistry respectively. HR-HPV infection was found in patients with SCC (88%), low-grade (75%) and high grade (95%) lesions compared to only 14% of normal cervix cases. However, 69%, 12.5%, 38.1%, and 14% of SCC, CIN-1, CIN-2/3 and normal cervix tissues, respectively, were EBV infected. The highest co-infection (HR-HPV and EBV) rate was found in squamous cell carcinoma cases (67%). The latter cases showed 27% and 29% expression of EBV BARF-1 and LMP-1 oncogenes respectively. The high rate of HR-HPV and EBV co-infection in SCC suggests that EBV infection is incriminated in cervical cancer progression. This could be taken into account as bad prognosis in this type of cancer. However, the mode of action in dual infection in cervical oncogenesis needs further investigation.

**key words** : Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, Cervical cancer, Uterine cervix, HPV-EBV Confection.

## **Author Adress :**

Département de microbiologie, Faculté sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas Sétif-1.

---

# ABBREVIATIONS

## A.

ADC : ADenoCarcinome

AGC : Atypical glandular

AIS : Adenocarcinome in situ

ALTS : ASCUS/LSIL Triage Study

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

AP1 : Activating Protein 1

ASC-H : Atypical Squamous Cells cannot exclude HSIL = atypies des cellules malpighiennes ne permettant pas d'exclure une HSIL

ASC-H : Atypical squamous cell in which a high-grade (HSIL) cannot be excluded

ASC-US : Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance = atypies des cellules malpighiennes de signification indéterminée

## B.

BARF-1 BamHI A right frame 1

Bak : Bcl2-homologous antagonist killer

Bax : Bcl2-activated X

Bcl2 : B-cell lymphoma leukemia type 2

BET : Bromure d'Ethidium

BPV : Bovine Papillomavirus

BSA : Bovine serumalbumine

## C.

CAK Cdk Activating Kinase

CBP : CREB Binding Protein

CD : « Cluster of Differentiation »

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CDKI : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor

CFS : Common fragile sites

CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia = Néoplasies Intraépithéliales Cervicales

CIP : cdk-interacting protein

CIS : Cancer in situ CKI : cdk Inhibitor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : CytoMegalovirus

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène

CRPV : Cottontail Rabbit Papillomavirus  
CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques

**D.**

DBD : DNA Binding Domain  
ssDBP : single stranded DNA Binding Protein  
dNTP : désoxyNucléosides Tri Phosphate

**E.**

E : Early region  
EBV : Epstein-Barr virus  
E6-AP : E6-Associated Protein  
E6TP : E6 Terminal Protein  
EDTA : Ethylendiamintetraacetic acid  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGF-R : epidermal growth factor receptor  
EUROGIN : European Research Organisation on Genital Infection and Neoplasia  
EV : Epidermodysplasia Verruciformis

**F.**

FADD : Fas associated death domain  
FCU : Frottis Cervico-Utérin  
FDA : « Food and Drug Administration »

**G.**

G1, G2 : Gap 1, Gap 2  
GADD : Growth Arrest on DNA Damage  
GAR : glycine alanine repeat

**H.**

HC2® : « Hybrid Capture® 2 Test »  
HHV-4 : Human HerpesVirus 4  
HLA : Human Leukocyte Antigen  
HPV : papillomavirus humains  
HPV-BR : HPV bas risque  
HPV-HR : HPV haut risque  
HPVX : Human PapillomaVirus de type X  
H-ras : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog  
HRP : Horseradish peroxidase  
HSGAG : Heparane Sulfate GlycosAminoGlycane  
HSIL : « High Grade Squamous Intrepthelial Lesion »  
HSPG : Heparane Sulfate ProteoGlycane  
HSV : Herpes Simplex Virus  
hTERT : human Telomerase Reverse Transcriptase I.

**I.**

IAP : Inhibiteur des Proteines Apoptotiques

IARC International Agency for Research on Cancer  
IFN : Interféron  
IgA : Immunoglobuline A  
IgA-S : Immunoglobuline A sécrétoire  
IgE : Immunoglobuline E  
IgG : Immunoglobuline G  
IHC : immunohistochimie  
IL- : InterLeukine-  
IPA : Institut Pasteur d'Algérie  
IR1 : Internal Repeat 1  
IST : Infection Sexuellement Transmissible  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs

#### **K.**

kDa kilo-Dalton  
Kpb : kilo paires de base

#### **L.**

L :Late region  
LCR : Long Control Region  
LSIL : Low grade Squamous Intraepithelial Lesion = Lésions intra-épithéliales de bas grade  
LCL : lignées cellulaire lymphoïdes  
LMP-1 : Latent Membrane Protein-1  
LTC : lymphocytes T cytotoxiques

#### **M.**

M : molar = 1 mol/L  
MA : protéine de la matrice  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
Mdm-2 : mouse double minute 2  
MIP-1 : Macrophage inhibitory protein 1  
MNI : mononucléose infectieuse

#### **N.**

NCBI : National Center for Biotechnology Information  
NF- $\kappa$  B : Nuclear Factor kappa B  
NIH : National Institutes of Health  
NK : « Natural Killer »  
NPC : carcinome du nasopharynx

#### **O.**

ORF : Open Reading Frame  
Ori : origine de réplication  
OVPV : Ovine Papillomavirus

#### **P.**

p105Rb : le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome

PA : site de polyadenylation  
Pap : Papanicolaou  
pb : paire de bases  
PBMC : lymphocytes périphériques circulants  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PEG : PolyEthylene Glycol  
PKA : Proteine Kinase dependant de l'AMPc  
PKN : Proteine Kinase N  
POL : Phase Ouvert de Lecture  
pRb : proteine du retinoblastome

#### **R.**

RFLP : « Restriction Fragment Length Polymorphism »  
RLU : « Relative Light Unit »  
RT : Reverse Transcriptase  
RT-PCR : « Reverse Transcriptase-PCR »

#### **S.**

SCC : « Squamous-Cell Carcinoma »  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SDS-PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

#### **T.**

TBE : Tris-Borate-EDTA  
TE : Tris-EDTA  
TGF : Transforming Growth Factor  
TLR : Toll Like Receptor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TP53 : gène codant la protéine p53

#### **U.V.X.Y.Z.**

URR : Upstream Regulatory Region  
UV : rayonnement ultraviolet  
VCA : Viral Capsid Antigen  
VIH : Virus de l'Immunodefiscience Humaine  
VIN : Vulvar Intraepithelial Neoplasia  
VLP : virus-like particles  
VPN : valeur prédictive négative  
VPP : valeur prédictive positive  
ZD : Zinc Domain

---

# LISTE DES TRAVAUX

## PUBLICATIONS

Sadouki N, Boudriche A, **Khenchouche A**, Bandoui D, Harrouz H, Tidadini D, Djennaoui T, Djediat B, Khidri A, Ayache G, Graba A, and Bouguermouh A. Prévalence des papillomavirus à haut risque (HPV-HR) dans le cancer du col : Etude en Algérie. Arch Inst Pasteur Alger, T 67 :199 - 217, 2010a.

Sadouki N, Boudriche A, **Khenchouche A**, Benyacoub D, Djennaoui T, Boudriche H, Bandoui D, Harrouz H, Hamladji F, Ayache G, Keddad N, and Bouguermouh A. Détection des papillomavirus à haut risque dans les lésions précancéreuses du col en Algérie ; état des lieux et perspective. Arch Inst Pasteur Alger, T 67 :53-82, 2010b.

**Khenchouche A**, Sadouki N, Boudriche A, , Houali K, Graba A, Ooka T and Bouguermouh A. Human Papillomavirus and Epstein-Barr virus co-infection in Cervical Carcinoma in Algerian women. Virol J 2013, 10 :340

## COMMUNICATIONS 2014

Souches de papillomavirus humains à haut risque identifiées dans les prélèvements du col de l'utérus en Algérie. **KHENCHOUCHE Abdelhalim**, OUHIDA Soraya, KAABOUR Faiza, HALFAYA zahira, ABDELLOUCHE Djamel-Eddine, MAHNANE Abbas, ROUGE-RON Delphine, SI-MOHAMMED Ali. Journées internationales sur la pathologie cervico-vaginale et vulvaire. Annaba (Algérie, 25-26 avril 2014.

Facteurs de risque virologiques (HPV et EBV) dans le développement du cancer du col de l'utérus. **KHENCHOUCHE Abdelhalim**, BOUDRICHE Arab, SADOUKI Nabila, HALFAYA Zahira, GRABA Abdelaziz, BOUGUERMOUH Abdelmadjid. Journées internationales sur la pathologie cervico-vaginale et vulvaire. Annaba (Algérie, 25-26 avril 2014.

Méthodes de dépistage du cancer du col de l'utérus, Confrontations des différents résultats. **KHENCHOUCHE Abdelhalim**, BOUDRICHE Arab, SADOUKI Nabila, HALFAYA Zahira, GRABA Abdelaziz, BOUGUERMOUH Abdelmadjid. Journées internationales sur la pathologie cervico-vaginale et vulvaire. Annaba (Algérie, 25-26 avril 2014.

Aspect virologique du cancer du col de l'utérus. **KHENCHOUCHE Abdelhalim**, BOUDRICHE Arab, SADOUKI Nabila, BOUGUERMOUH Abdelmadjid. 7<sup>ème</sup> Journée Internationale d'infectiologie de Sétif (thème : les infections sexuellement transmissibles). Sétif (Algérie) 22 mai 2014.



---

# SOMMAIRE

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| Dédicaces                                            | ii        |
| Remerciements                                        | iv        |
| Résumé                                               | vi        |
| Abréviations                                         | x         |
| Liste des Travaux                                    | xi        |
| Liste des figures                                    | xviii     |
| Liste des tableaux                                   | xix       |
| INTRODUCTION GENERALE                                | xx        |
| <b>1 NÉOPLASIE DU COL DE L'UTÉRUS</b>                | <b>1</b>  |
| 1.1 Épidémiologie                                    | 1         |
| 1.2 Anatomie du col de l'utérus                      | 5         |
| 1.3 Facteurs de risque                               | 6         |
| 1.4 Histoire naturelle du cancer du col utérin       | 8         |
| 1.5 Classification et traitements des dysplasies     | 9         |
| 1.5.1 Les dysplasies du col utérin                   | 9         |
| 1.5.2 Stadification du cancer du col de l'utérus     | 11        |
| 1.5.3 Prise en charge des tumeurs du col de l'utérus | 11        |
| <b>2 LE PAPILLOMAVIRUS HUMAIN</b>                    | <b>13</b> |
| 2.1 Cycle cellulaire et sa régulation                | 13        |
| 2.2 Historique des papillomavirus                    | 15        |
| 2.3 Classification                                   | 16        |
| 2.4 Structure des HPV                                | 18        |
| 2.4.1 La capside                                     | 18        |
| 2.4.2 Organisation génomique                         | 19        |

## SOMMAIRE

|          |                                                                  |           |
|----------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5      | Cycle viral                                                      | 21        |
| 2.5.1    | Cycle productif                                                  | 21        |
| 2.5.2    | Cycle intégratif                                                 | 23        |
| 2.5.3    | La latence virale                                                | 23        |
| 2.6      | Modes de transmission des HPV                                    | 23        |
| 2.6.1    | Transmission par voie sexuelle                                   | 24        |
| 2.6.2    | Transmission non sexuelle des HPV                                | 24        |
| 2.7      | Infection HPV sexuelle selon l'âge                               | 26        |
| 2.8      | Association des types d'HPV avec le cancer du col utérin         | 27        |
| 2.9      | Mécanismes de carcinogénèse                                      | 28        |
| 2.9.1    | Intégration du génome viral                                      | 28        |
| 2.9.2    | Rôle des oncoprotéines virales                                   | 29        |
| 2.9.3    | Régulation épigénétique de l'expression des gènes d'HPV          | 35        |
| 2.10     | Techniques de dépistage et de diagnostic du cancer du col utérin | 36        |
| 2.11     | Réponses immunitaires anti-HPV                                   | 37        |
| 2.12     | Echappement des HPV aux réponses immunitaires                    | 38        |
| 2.12.1   | Effet de E6 sur l'immunité innée                                 | 38        |
| 2.12.2   | Effet de E7 sur l'immunité                                       | 38        |
| 2.12.3   | Effet de E5 sur l'immunité                                       | 38        |
| <b>3</b> | <b>L'EPSTEIN-BARR VIRUS</b>                                      | <b>40</b> |
| 3.1      | Historique                                                       | 40        |
| 3.2      | Taxonomie                                                        | 40        |
| 3.3      | Epidémiologie de l'EBV                                           | 41        |
| 3.4      | Structure du virion                                              | 42        |
| 3.5      | Organisation du génome viral                                     | 43        |
| 3.6      | Les latences virales                                             | 45        |
| 3.6.1    | Les différents programmes de latence                             | 46        |
| 3.6.2    | Différents produits de gènes de latence                          | 47        |
| 3.7      | Le cycle lytique                                                 | 51        |
| 3.8      | Réponses immunitaires vis à vis de l'EBV et échappement          | 51        |
| 3.8.1    | Réponses immunitaires spécifique à EBV                           | 52        |
| 3.8.2    | Mécanismes d'échappement au système immunitaire                  | 55        |
| <b>4</b> | <b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>                                      | <b>57</b> |
| 4.1      | Matériel Biologique                                              | 57        |
| 4.1.1    | Étude l'intérêt du tests HPV dans le dépistage                   | 58        |
| 4.1.2    | Coinfection HPV-EBV                                              | 59        |
| 4.2      | Techniques utilisées                                             | 61        |
| 4.2.1    | Extraction et purification de l'ADN                              | 61        |
| 4.2.2    | PCR                                                              | 61        |
| 4.2.3    | Electrophorèse sur gel d'agarose                                 | 62        |
| 4.2.4    | INNO-LiPA HPV genotyping                                         | 63        |
| 4.2.5    | Hybrid Capture® 2                                                | 63        |
| 4.2.6    | Séquençage des produits de PCR MY et FAP                         | 63        |
| 4.2.7    | Southern blot                                                    | 64        |
| 4.2.8    | Dot blot                                                         | 65        |
| 4.2.9    | RT-PCR                                                           | 65        |

## SOMMAIRE

|          |                                                                                   |            |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.10   | Western blot                                                                      | 66         |
| 4.2.11   | Immunohistochimie                                                                 | 67         |
| 4.2.12   | RFLP (Restriction fragment length polymorphism)                                   | 67         |
| <b>5</b> | <b>RÉSULTATS ET DISCUSSION DE L'ÉTUDE : INTÉRÊT DU TEST HPV DANS LE DÉPISTAGE</b> | <b>69</b>  |
| 5.1      | Résultats                                                                         | 69         |
| 5.1.1    | Détection des HPV dans les lésions précancéreuses du col                          | 69         |
| 5.1.2    | Performances du test HPV au niveau CIN2+                                          | 70         |
| 5.1.3    | Odd-Ratio HPV/cancer du col utérin                                                | 71         |
| 5.1.4    | Comparaison entre test HPV et cytologie                                           | 71         |
| 5.1.5    | Recherche des HPV dans les cas ASCUS                                              | 72         |
| 5.1.6    | Comparaisons des tests AMPLICOR-Roche et HC2                                      | 73         |
| 5.1.7    | Charge virale estimée par l'HC2                                                   | 73         |
| 5.1.8    | Génotypage des HPV-HR                                                             | 75         |
| 5.1.9    | Séquençage de quelques souches détectées                                          | 77         |
| 5.2      | Discussion de l'intérêt du tests HPV dans le dépistage                            | 81         |
| 5.2.1    | Dépistage du cancer du col de l'utérus en Algérie                                 | 81         |
| 5.2.2    | Performances du test HPV                                                          | 84         |
| 5.2.3    | Test HPV et suivi des lésions                                                     | 88         |
| 5.2.4    | Charge virale                                                                     | 89         |
| 5.2.5    | Séquençage des souches HPV                                                        | 90         |
| 5.2.6    | Stratégies de dépistage                                                           | 91         |
| 5.2.7    | Test HPV et colposcopie                                                           | 93         |
| 5.2.8    | Prévalence des HPV                                                                | 93         |
| <b>6</b> | <b>RÉSULTATS ET DISCUSSION DE LA COÏNFECTION EBV-HPV</b>                          | <b>97</b>  |
| 6.1      | Résultats de l'étude                                                              | 97         |
| 6.1.1    | Fréquences des HPV au niveau du col utérin                                        | 97         |
| 6.1.2    | Infection à EBV et aggravation des lésions                                        | 99         |
| 6.1.3    | Expression de l'EBV dans les tissus cervicaux                                     | 99         |
| 6.1.4    | Immunohistochimie de marqueurs viraux                                             | 101        |
| 6.2      | Discussion de l'étude de la coïnfection EBV-HPV                                   | 103        |
| 6.2.1    | Présence de l'EBV dans les biopsies du col utérin                                 | 103        |
| 6.2.2    | Expression de l'EBV dans les cellules cervicales                                  | 103        |
| <b>7</b> | <b>Conclusion générale</b>                                                        | <b>106</b> |
|          | <b>Références bibliographiques</b>                                                | <b>144</b> |

---

# LISTE DES FIGURES

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1  | Estimation de l'incidence du cancer du col dans le monde en 2012 [IARC, 2013] .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 2  |
| 1.2  | La mortalité due au cancer du col utérin dans le monde estimée en 2012 [IARC, 2013] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 3  |
| 1.3  | Estimation du taux d'incidence du cancer du col de l'utérus pour 100 000 femmes dans le monde : l'incidence et la mortalité sont respectivement doublées et triplées dans les pays en voie de développement [IARC, 2013] . . . . .                                                                                                                                                                             | 3  |
| 1.4  | Données d'incidence du cancer du col utérin dans la région MENA (Meadle East and North Africa) [Ferlay et al., 2010] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 4  |
| 1.5  | Données d'incidence du cancer du col utérin (Taux standardisés : cas pour 100 000 femmes) à Sétif comparées à celle d'autres régions [Hamdi Cherif, 2010] . . .                                                                                                                                                                                                                                                | 4  |
| 1.6  | Structure anatomique et histologique du col de l'utérus [Chard and Grudzinskas, 1994, Singer and Jordan, 2006] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 5  |
| 1.7  | Facteurs de risques du cancer du col de l'utérus [Luhna et al., 2013] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 7  |
| 1.8  | Aspect d'un koilocyte : cellule dont le noyau est entouré d'un halo claire, effet cytopathique de l'infection HPV [Chard and Grudzinskas, 1994] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                      | 8  |
| 1.9  | Histoire naturelle de l'infection HPV et développement du cancer du col de l'utérus [Moscicki et al., 2012] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 9  |
| 1.10 | Nomenclature de Bethesda et celle de l'OMS [Roberts and Ekman, 2012] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 10 |
| 2.1  | Cycle cellulaire et sa régulation [Ewen, 1994] : protéine activatrices en vert, inhibitrice en rouge. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 13 |
| 2.2  | Évolution du niveau du facteur stimulant la mitose (MPF) au cours du cycle cellulaire [Humphrey and Pearce, 2005] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 14 |
| 2.3  | Phylogénie des papillomavirus à la base de la séquence génétique de la protéine capsidiale L1 [Bernard et al., 2010]. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 17 |
| 2.4  | Structure de la capside des papillomavirus : Capside icosaédrique avec un nombre de triangulation T=7 (première image à gauche). Elle se compose de 12 capsomères en pentamères et 60 en hexamères, pour un total de 420 protéines de capsid. L'image à droite montre une coupe du virion HPV [Belnap et al., 1996]. L'ADN génomique est associé, comme celui des cellules eucaryotes, à des histones. . . . . | 18 |
| 2.5  | Représentation schématique du génome de HPV16 circulaire montrant l'emplacement des gènes précoces (E 1-7), des gènes tardifs (L1 et L2), et de la longue région de contrôle (LCR). [Clarke et al., 2012] . . . . .                                                                                                                                                                                            | 20 |

## Liste des figures

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6  | Attachement et pénétration de l'HPV (inspiré de Culp et al. [2006]) . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 21 |
| 2.7  | Cycle lytique (productif) du HPV [Van Doorslaer et al., 2011] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| 2.8  | Fréquence cumulées des génotypes d'HPV-HR présents dans les cancers du col et impact potentiel de leurs interventions dans la cancérogenèse [Roden and Wu, 2006] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 27 |
| 2.9  | Zones de coupure et de délétion du génome HPV lors de l'intégration du génome HPV dans le chromosome cellulaire [Peitsaro et al., 2002]. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 29 |
| 2.10 | Structure de l'oncoprotéine de l'HPV 16 [Chakrabarti and Krishna, 2003] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 30 |
| 2.11 | Inactivation de p53 par l'action de l'oncoprotéine E6 du HPV [Scheffner et al., 1993] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 31 |
| 2.12 | Structure et fonctions de l'oncoprotéine E7 du HPV [Ohlenschlager et al., 2006] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| 2.13 | Amorces et cibles correspondantes des techniques PCR utilisées pour détecter et génotyper les HPV. Modifiée de Saini et al. [2009] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 36 |
| 3.1  | Taxonomie des Herpesviridae : l'EBV appartient au genre Gammaherpesvirus [Moore et al., 1996] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 41 |
| 3.2  | Structure du virion d'Epstein-Barr (EBV) [Cullen, 2010] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 42 |
| 3.3  | Organisation du génome de l'EBV [Young and Rickinson, 2004] (a) Schéma montrant l'organisation et la transcription des gènes latents de l'EBV sur l'ADN viral double brin épisomique. L'origine de réplication de l'épisome (oriP) est indiquée par le petit rectangle orange. Les grosses flèches violettes représentent les exons des protéines latentes (EBNAs 1, 2, 3A, 3B et 3C, et EBNA-LP, PMT1, 2A, 2B) et la direction dans laquelle elles sont transcrites. Les flèches oranges indiquent le sens de la transcription des EBER (1 et 2). La flèche rouge, à l'extérieure, représente les transcriptions de la latence III. La flèche bleue, plus courte, à l'intérieure, représente la transcription de EBNA-1 à partir du promoteur Qp pendant la latence I et II. (b) Schéma montrant la carte de restriction BamHI du génome linéaire ainsi que l'organisation des cadres ouverts de lecture des protéines latentes de l'EBV (prototype B95.8). Les fragments BamHI sont nommés en fonction de la taille, A étant le plus grand. Les lettres minuscules représentent les plus petits fragments. . . . . | 44 |
| 3.4  | Les différents programmes de latences de l'EBV selon les tissus et la maladie associée [Masy et al., 2002] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 47 |
| 3.5  | Structure et fonctions de LMP-1 [Masy et al., 2002] . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 49 |
| 4.1  | Répartition des 713 prélèvements selon le but de l'étude. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 58 |
| 4.2  | Etude de la coïnfection HPV-EBV dans les 58 cas de cancers. L'étude de l'expression de l'Epstein-Barr virus est réalisée sur 23 cas par Western Blot (WB), par RT-PCR et par immunohistochimie. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 60 |
| 4.3  | Profil thermique de la PCR utilisée pour détecter les transcrits LMP-1 dans les biopsies cervicales . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 66 |
| 5.1  | Détection des HPV par PCR conventionnelle dans les 449 lésions précancéreuses et les 101 cas témoins déterminées par cytologie et/ou histologie. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 70 |
| 5.2  | Comparaison des tests de dépistage du cancer du col utérin : Test HPV (PCR+HC2) versus cytologie testés sur 159 cas dont 28 cas témoins. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 72 |
| 5.3  | Comparaison de la prévalence de l'infection HPV-HR entre les 28 cas ASCUS et les 16 témoins . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 72 |
| 5.4  | Détection des HPV-HR dans les 423 prélèvements cervicaux : comparaison entre 2 tests utilisés (PCR-AMPLICOR et HC2) . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 73 |

## Liste des figures

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5  | Estimation semi-quantitative de la charge virale en unité de luminescence dans les 109 prélèvements cervicaux selon les différents groupes de sujets. <b>CN</b> : col normaux, <b>LSIL</b> : lésions de bas grade, <b>HSIL</b> : lésions de haut grade, <b>SCC</b> : carcinome épidermoïde invasif . . . . .                                                                                                                                                                                                                 | 74  |
| 5.6  | Détection des génotypes d'HPV par PCR AMPLICOR dans 31 carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus par des sondes de groupe. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 75  |
| 5.7  | Pourcentage des différents génotypes d'HPV détectés par la technique INNO-LiPA dans les 87 biopsies du carcinome épidermoïde du col utérin. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 76  |
| 5.8  | Électrophorèse capillaire des séquences L1 destinées au séquençage. Les colonnes 2, 3 et 4 représentent des biopsies positives en ADN L1 amplifié par les amorces MY09/11. La colonne 6 montre un cas positif en ADN L1 amplifié par les amorces FAP. Les colonnes 1, 5, 7, 8 et 9 indiquent des résultats négatifs. . . . .                                                                                                                                                                                                 | 77  |
| 5.9  | Séquences nucléotidique et peptidique partielle du gène L1 amplifiée par les amorces FAP. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 78  |
| 5.10 | Séquences nucléotidique et peptidique partielle du gène L1 amplifiée par les amorces MY09/11. . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 78  |
| 5.11 | Rapport de taxonomie de l'HPV16 détecté. La séquence analysée est de 414 nucléotides de long. Le score de chaque alignement est divisé en 5 couleurs différentes, et les alignements sont placés dans l'ordre des meilleurs scores. La clé de couleur correspond au score d'alignement de la séquence nucléotidique avec les séquences de référence de la base de données (Genbank, NCBI) en utilisant une analyse BLASTN (les lignes rouges indiquent une similarité avec les souches de référence de près de 100%. . . . . | 79  |
| 5.12 | Alignement de la séquence L1 du HPV16 avec une séquence de référence déposée dans la base de donnée "GenBank". La comparaison est effectuée par le logiciel BLASTN 2.2.26 . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 80  |
| 5.13 | Suivi de 143 patientes pendant 40 mois par le test HPV. Les résultats sont obtenus lors d'une étude collaborative entre le laboratoire de l'IPA et Hôpital de Zeralda, Dr Boudriche (Hôpital de Zeralda) . . . . .                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 88  |
| 6.1  | Southern blot pour détecter l'EBV (amplicons hybridés avec sonde marquée au <sup>32</sup> P). A : voies 1-8 certains parmi les 58 cas de cancer ; B : Voies 9-16 certains parmi les 37 lésions précancéreuses. L'ADN de la lignée cellulaire B95-8 et l'eau pure (H <sub>2</sub> O) ont été utilisés comme contrôles positifs et négatifs respectivement. . . . .                                                                                                                                                            | 98  |
| 6.2  | Détection de l'infection uniques (HPV ou EBV) ou de la coïnfection (HPV-EBV) chez les patientes et les sujets normaux : <b>SCC</b> (carcinome épidermoïde) ; <b>HG</b> (Lésions Haut grade) ; <b>BG</b> (Lésions Bas grade) et <b>CN</b> (Col normal). . . . .                                                                                                                                                                                                                                                               | 99  |
| 6.3  | Détection de l'expression de LMP-1 dans 7 parmi les 23 carcinomes épidermoïdes. La RT-PCR a permis d'obtenir une bande de 406 pb amplifié correspondant à l'ADN de LMP-1 et une bande de 200 pb correspondant à la séquence d'ARNm de LMP-1. M : fragments d'ADN de marqueurs moléculaires. C- : contrôle négatif (H <sub>2</sub> O). . . . .                                                                                                                                                                                | 100 |
| 6.4  | Détection de BARF-1 par Western blot dans 5 biopsies du col utérin. La protéine BARF1 codant pour la protéine 29 kDa a été révélée par un antisérum anti-BARF-1 (PepIII) polyclonal de lapin. La protéine BARF1 produite par le système d'adénovirus recombinant a été utilisée comme contrôle positif. . . . .                                                                                                                                                                                                              | 101 |

## *Liste des figures*

- 6.5 Détection des antigènes HPV et EBV par immunohistochimie sur des coupes de tissu du col de l'utérus inclus dans la paraffine. A : carcinome épidermoïde visualisé par coloration à l'héamatoxylin-éosine ; B : cellules de carcinome épidermoïde positives pour EBNA-1 ; C : cellules de carcinome épidermoïde positives en LMP-1 ; D : cellules positives en HPV ; E : carcinome épidermoïde négative en EBNA-1. F : carcinome épidermoïde négatif pour LMP-1. . . . . 102

---

## LISTE DES TABLEAUX

|     |                                                                                                                                                          |     |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.1 | Terminologie des lésions cervicales [Roberts and Ekman, 2012] . . . . .                                                                                  | 10  |
| 1.2 | Classification clinique des cancers du col utérin [Siegel et al., 2012] . . . . .                                                                        | 11  |
| 2.1 | Cancers attribuables aux HPV-HR dans le monde [Parkin and Bray, 2006] .                                                                                  | 16  |
| 3.1 | Modèles d'expression des gènes latents de l'EBV selon les différentes ma-<br>ladies associées à l'EBV [Middeldorp et al., 2003] . . . . .                | 45  |
| 5.1 | Détection des HPV par PCR conventionnelle dans les lésions précancéreuses                                                                                | 70  |
| 5.2 | Répartition selon les génotypes des 14 HPV-HR détectés dans 56 biopsies<br>de cancer du col de l'utérus . . . . .                                        | 76  |
| 5.3 | Génotypes des HPV-HR détectés dans 20 biopsies de cancer du col de l'utérus                                                                              | 77  |
| 5.4 | Classification des différents HPV-HR selon le pouvoir oncogène IARC [2009]                                                                               | 95  |
| 6.1 | Détection des virus (EBV et HPV) par PCR dans les cancers, les lésions<br>précancéreuses et les cols normaux . . . . .                                   | 98  |
| 6.2 | Odds ratio infection, coinfection et aggravation . . . . .                                                                                               | 99  |
| 6.3 | Relation entre la détection des oncoprotéines de l'EBV (LMP-1 and BARF-<br>1) et la coïnfektion (EBV-HPV) dans les biopsies du col de l'utérus . . . . . | 101 |



---

# INTRODUCTION GENERALE

Le cancer du col de l'utérus est un problème de santé publique mondial. Il entraîne une morbidité et une mortalité importantes, avec plus de 500 000 nouveaux cas et plus de 300 000 décès par an dans le monde. Pourtant, il peut être prévenu dans la quasi totalité des cas s'il est dépisté aux premiers stades asymptomatiques. Le dépistage précoce des lésions précancéreuses reste, de ce fait, l'axe principal de la lutte contre la maladie. Cette maladie ne doit, donc, pas être une condamnation à mort, même dans les pays pauvres. Des outils de dépistage peu coûteux et une faible technicité existent aujourd'hui. Ils pourraient réduire sensiblement le fardeau des décès par cancer du col dans ces pays [Bosch et al., 2013].

L'histoire du test de Papanicolaou est résumée par Koss [1989] dans le titre de sa publication dans JAMA «un triomphe et une tragédie». C'est un triomphe parce que son application à large échelle dans les pays industrialisés a permis une réduction très nette du cancer du col. Cette réduction est de 70% à 80% dans les pays scandinaves, le Royaume-Uni et les USA. En plus, il s'agit d'un test indolore, facile à répéter et peu coûteux. Il faut reconnaître également que nous avons la chance, avec le col utérin, de disposer d'un organe d'accès facile et que la durée du développement de la tumeur soit très longue. La chance aussi que les cancers qui s'y développent soient des cancers viro-induits pour lesquels une vaccination est, aujourd'hui, une réalité. La tragédie est que dans certaines sociétés comme la nôtre, les femmes à qui il est prioritairement destiné ne s'y soumettent pas. Plus des trois quarts des décès par cancer du col utérin se produisent dans les pays pauvres. L'autre problème, en matière de cancer du col, est que la faible proportion de celles qui ont un suivi gynécologiques ne respectent pas l'intervalle requis entre les examens, elles sont souvent perdues de vue. Les raisons sont multiples et difficiles à surmonter, mais des efforts doivent être fournis pour s'approcher surtout des femmes à risques. Le test Pap souffre également d'une faible sensibilité (une tragédie). Plus de 30% des cas ne sont pas détectés. Les cas douteux sont aussi trop nombreux, de sorte que le praticien aura de plus en plus de peine à prendre ses décisions. Pour toutes ces considérations, l'éradication de ce cancer n'a pu être obtenue dans aucun des pays du monde. La vaccination anti-HPV permettrait-elle d'espérer à terme l'éradication du cancer du col ? Il est clair que cet objectif ne sera pas atteint sans l'apport du dépistage par des tests virologiques et cytologiques .

L'histoire naturelle du cancers du col de l'utérus a été bouleversée lorsqu'il a été établi que l'infection par des papillomavirus humains (HPV) est le facteur indispensable au développement de la tumeur. Cela a été bien démontré par H. zur Hausen et que ces virus sont associés à ce type de cancer, ce qui lui a valu le Prix Nobel de physiologie et médecine en 2008. Les HPV touchent 70% à 80% des femmes durant leur vie sexuellement active.

---

L'infection est asymptomatique et transitoire dans la grande majorité des cas. Les virus sont éliminés dans 80% des cas en 8 à 12 mois. Dans les 20% des cas restant, l'infection persiste avec apparition de lésions qui finissent par régresser en grande partie. Les patientes qui n'arrivent pas à se débarrasser des virus dits oncogènes ont un risque accru de développer une lésion pré-invasive ou un cancer du col. Les progrès immenses réalisés en biologie moléculaire ont permis la mise au point de vaccins et de tests de dépistage susceptibles de laisser espérer une meilleure prévention du cancer invasif du col utérin. De nombreux tests de différentes valeurs sont disponibles. Le test d'hybridation et la PCR sont destinés à détecter les papillomavirus à haut risque (HPV-HR), agents nécessaires au développement de la tumeur cervicale. La sensibilité de ce test à détecter les lésions de haut grade susceptibles d'évoluer vers un cancer invasif serait supérieure à 95% pour la majorité des spécialistes.

Dans le cadre de ce travail, une première partie porte sur la recherche des HPV chez des patientes algériennes à différents stades de la carcinogenèse cervicale. Elle montre l'intérêt des tests basés sur la détection de l'ADN de ces virus : l'Hybrid Capture 2 (HC2) et la PCR. Les prélèvements ont, au préalable, subi la détermination cytologique ciblant les cellules malpighiennes de la zone de jonction, siège de la tumeur initiale du col de l'utérus. Les cas sont confirmés comme étant des carcinomes épidermoïdes par une étude anatomo-pathologique. Des tissus normaux et quelquefois des prélèvements à partir de lésions précancéreuses ont été pris comme contrôles. Les tests d'ADN viraux sont basés sur l'amplification du signal (HC2) ou de la cible nucléotidique (PCR). Nous avons par conséquent étudié leurs sensibilité et la spécificité à dépister les cancers cervicaux comparée à celles de la cytologie conventionnelle.

Bien que les HPV soient les facteurs de risque les plus importants, plusieurs autres facteurs de risque contribuent au développement de la tumeur. Nous évoquerons l'environnement, le comportement sexuel, les carcinogènes et d'autres facteurs viraux. La deuxième partie du travail est consacrée à la recherche d'autre facteurs (principalement le virus d'Epstein-Barr, ou EBV). Le principal enjeu consiste à détecter l'EBV dans les mêmes tissus cervicaux où ont été détectés les HPV et d'essayer de comprendre s'il est impliqué dans la genèse du cancer du col de l'utérus. Les moyens d'investigation sont, là aussi, la PCR spécifique de ce virus (EBV) et d'autres méthodes qui pourraient montrer sa répllication *in situ*. Comme l'HPV, l'EBV est sexuellement transmis. Il est capable de se répliquer dans les cellules du col utérin. Son rôle oncogène a déjà été bien élucidé dans plusieurs cancers lymphoïdes ou épithéliaux, principalement le lymphome de Burkitt, le lymphome d'Hodgkin, le lymphome à cellules T, le carcinome du nasopharynx, les carcinomes œsophagiens et l'adénocarcinome gastrique [[Zur Hausen et al., 2000](#)]. Ne contribuerait-il pas dans la genèse de la tumeur cervicale? Nous essayerons de répondre à cette question au terme de ce travail.

---

# CHAPITRE 1

---

## NÉOPLASIE DU COL DE L'UTÉRUS

---

### 1.1 Épidémiologie

Avec 528 000 nouveaux cas chaque année (figure 1.1), le cancer du col utérin est le quatrième cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde, après les cancers du sein, colorectal et du poumon. Il est également la quatrième cause la plus fréquente de décès par cancer (266 000 décès en 2012) (figure 1.2) [[IARC, 2013](#)]. Il existe, toutefois, une inégalité marquante dans la répartition de l'incidence selon les pays. En effet, on enregistre environ 85% des cancers du col dans les pays en voie de développement (figure 1.3) où l'accès au dépistage et les soins, la parité importante et l'environnement général étant totalement différents de ceux des pays développés [[Bosch et al., 2013](#), [IARC, 2013](#)].

En Europe, il occupe le 9ème rang des cancers féminins en terme d'incidence, et le 12ème rang en terme de mortalité avec 13500 décès par an [[Ferlay et al., 2013](#)]. On note, dans cette région, depuis 1980, un recul du cancer du col, avec une diminution à la fois de l'incidence et de la mortalité. Ceci s'explique par le développement du dépistage par frottis cervico-utérin, par une parité plus faible, ainsi que par une amélioration de la diététique occidentale. L'apport en vitamines C et E, en folates, en rétinol, en carotènes, semble avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la persistance de l'infection par HPV. En plus, les pouvoirs politiques en ont saisi les enjeux, notamment par l'atteinte d'un taux de couverture du dépistage de 80% pour les femmes de 25 à 65 ans et l'utilisation du test HPV. Aujourd'hui la mise en place des dépistages organisés comprenant des actions de prévention, d'éducation à la santé, et des campagnes de vaccination contre certains génotypes d'HPV (HPV 16 et 18 surtout) vont surement améliorer la situation vis à vis de l'incidence de ce cancer [[Luna et al., 2013](#), [Miyagi et al., 2014](#)].

Selon l'enquête nationale menée par l'Institut National de la Santé Publique en 2002, l'Algérie a recensé 2112 cas représentant 10,5% des cancers féminins et une incidence brute de 10 à 20 pour 100000 femmes [[Hammouda et al., 2002](#)]. Ainsi, cette pathologie est

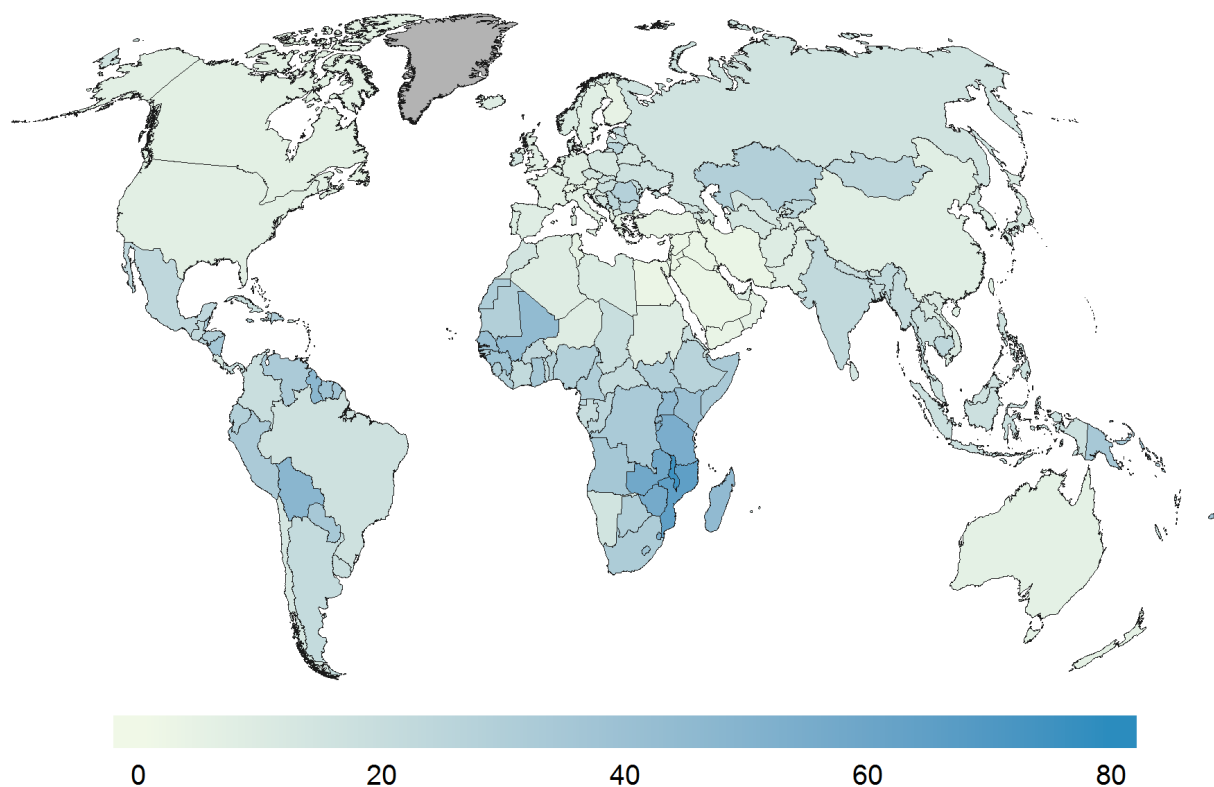


Figure 1.1 – Estimation de l'incidence du cancer du col dans le monde en 2012 [IARC, 2013]

classée au deuxième rang après le cancer du sein durant cette période. En 2008, l'Algérie est classée troisième parmi les pays Arabes (figure 1.4) en terme de prévalence de ce cancer [Ferlay et al., 2010]. A Sétif, le taux standardisé est de 13,9 pour 100 000 femme (figure 1.5) [Hamdi Cherif, 2010].

La prévalence relativement élevée des cas en Algérie serait due à plusieurs facteurs. Les lacunes en termes de prévention par le dépistage serait la cause principale. Plus de la moitié des femmes algériennes découvrent leur cancer trop tardivement, à un stade avancé de la maladie, lorsque le cancer a déjà gagné tout l'appareil génital ou plus. Dans ce cas le taux de survie diminue de 80%. Lorsque le cancer du col, affecte les femmes dans leur jeunesse, il peut avoir des conséquences catastrophiques avec un coût humain, social et économique très élevé.

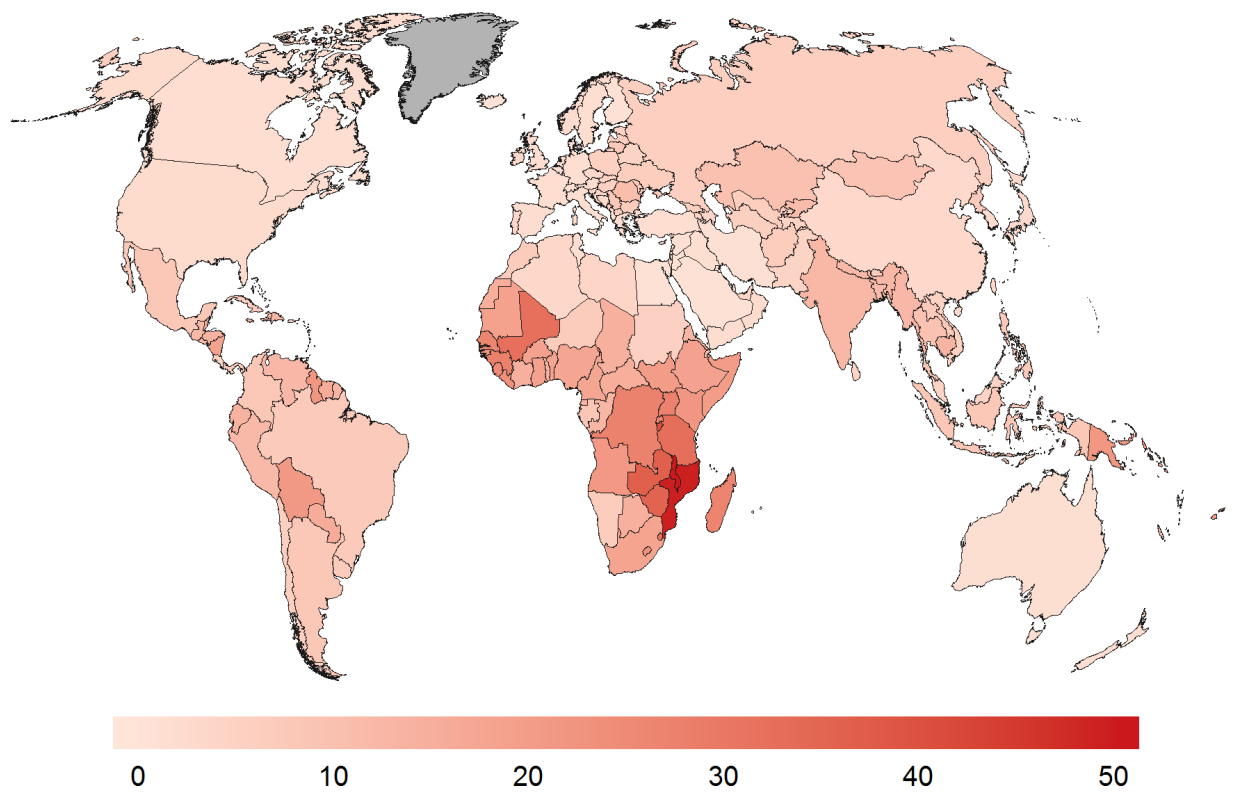


Figure 1.2 – La mortalité due au cancer du col utérin dans le monde estimée en 2012 [IARC, 2013]

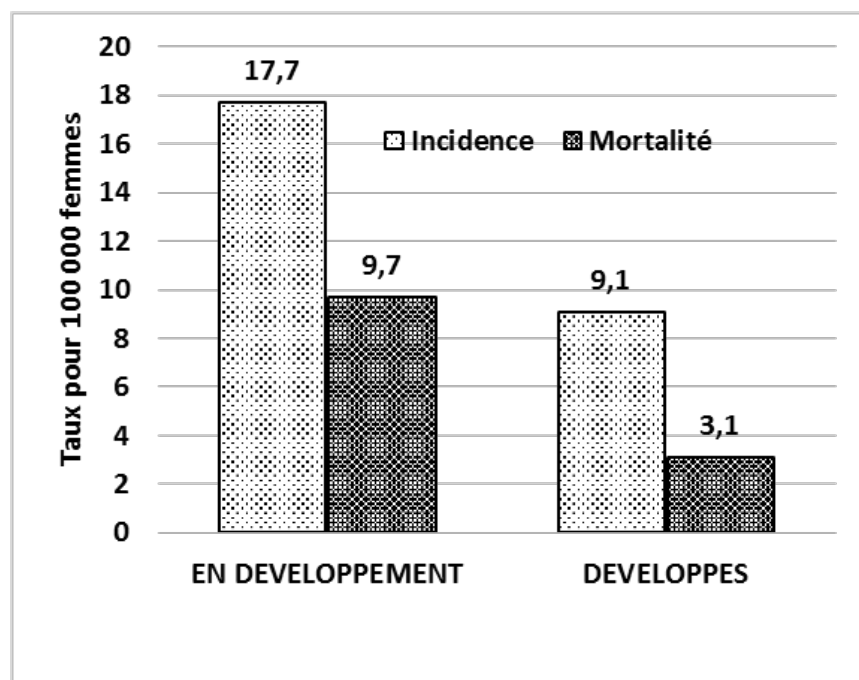


Figure 1.3 – Estimation du taux d'incidence du cancer du col de l'utérus pour 100 000 femmes dans le monde : l'incidence et la mortalité sont respectivement doublées et triplées dans les pays en voie de développement [IARC, 2013]

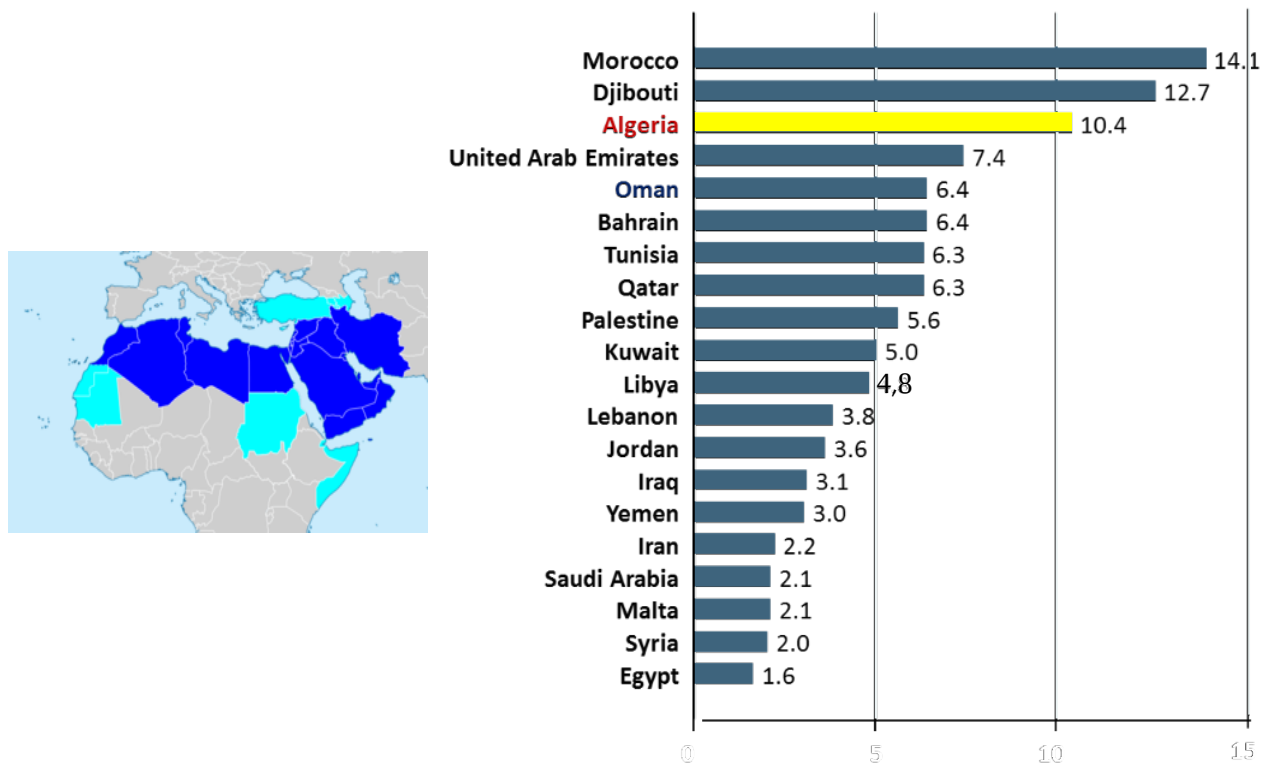


Figure 1.4 – Données d'incidence du cancer du col utérin dans la région MENA (Meadle East and North Africa) [Ferlay et al., 2010]

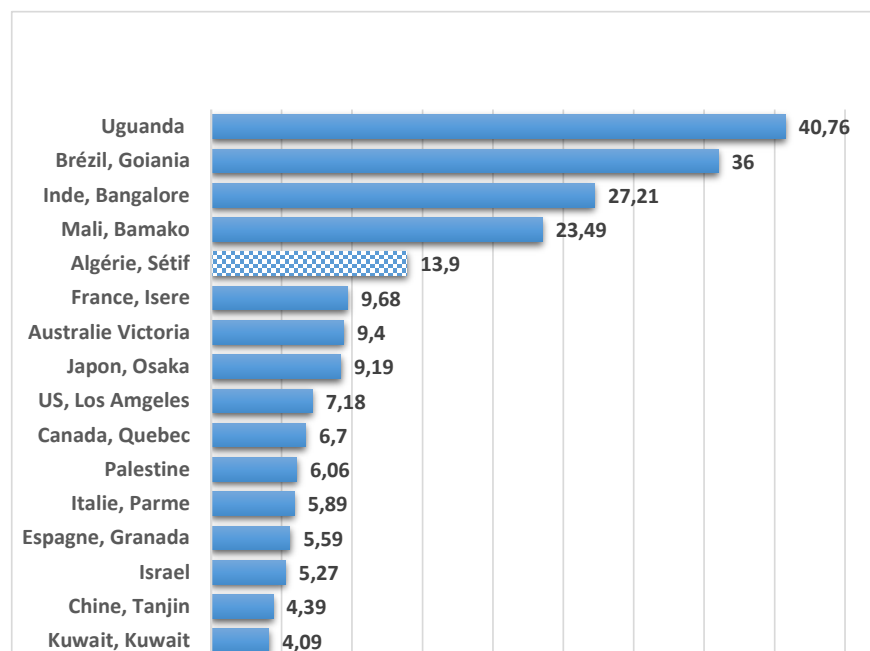
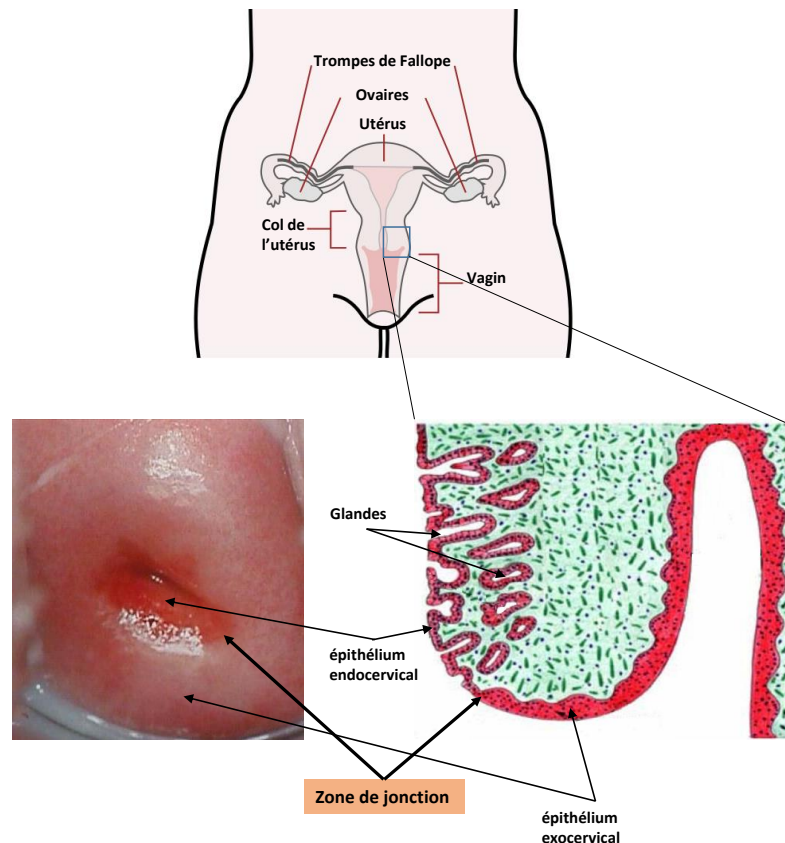


Figure 1.5 – Données d'incidence du cancer du col utérin (Taux standardisés : cas pour 100 000 femmes) à Sétif comparées à celle d'autres régions [Hamdi Cherif, 2010]

## 1.2 Anatomie du col de l'utérus

L'utérus, un muscle lisse creux ayant une forme de poire, possède des parois épaisses (figure 1.6). Un ensemble de structures conjonctives, à savoir les ligaments transverses (le ligament utérosacré et le ligament large), soutient ce muscle. Les ovaires sont, quant à eux, fixés au dos du ligament large.



**Figure 1.6** – Structure anatomique et histologique du col de l'utérus [Chard and Grudzinskas, 1994, Singer and Jordan, 2006]

La cavité utérine est tapissée d'un tissu appelé endomètre. Il s'agit d'un épithélium cylindrique (ou épithélium glandulaire). Celui-ci subit d'importants changements au cours du cycle menstruel. L'utérus mesure normalement environ 10 cm de haut.

Le col de l'utérus, constitué d'un tissu fibromusculaire dense tapissé de deux épithéliums, correspond au tiers inférieur de l'utérus. Il mesure 3 cm de long pour 2,5 cm de diamètre. L'exocol, qui correspond à la partie inférieure du col, s'avance dans le vagin. Il est visible lors d'un examen au spéculum. L'endocol, qui correspond aux deux tiers supérieurs, est situé au-dessus du vagin. Au milieu du col, on trouve le canal cervical qui traverse depuis l'orifice interne jusqu'à l'orifice externe. Ce dernier, visible lors de l'examen au spéculum, se présente sous forme d'une petite ouverture circulaire chez les



femmes nullipares. Chez les femmes ayant eu des enfants, celui-ci à l'aspect d'une fente large et irrégulière, en forme de bouche. Enfin, on peut visualiser grâce à un spéculum endocervical la portion inférieure du canal endocervical. La zone de jonction, **siège du développement du cancer du col**, se situe entre l'endocol et l'exocol. Elle s'appelle aussi zone de transformation [Chard and Grudzinskas, 1994, Singer and Jordan, 2006].

### 1.3 Facteurs de risque

L'insuffisance de suivi gynécologique (Pap ou frottis cervico-utérin [FCU]), est considérée comme un véritable facteur de risque. Par ailleurs, le HPV a été décrit comme étant le facteur étiopathogénique nécessaire mais non suffisant pour l'apparition du cancer du col [Nyitray et al., 2013]. Il est détecté dans plus de 99% de ces cancers [Munoz et al., 2003]. Nous développerons les papillomavirus humains dans le deuxième chapitre.

Plusieurs autres facteurs favorisent l'infection à HPV, parmi lesquels on retrouve l'âge (pic de fréquence entre 25 et 29 ans). Une régression spontanée est observée dans les 3 ans suivant l'infection dans 90% des cas chez les adolescentes et seulement dans 40 à 60% des cas chez les femmes adultes. Si l'infection persiste, elle peut évoluer et entraîner l'apparition de lésions cancéreuses. Les facteurs de persistance sont nombreux et encore mal connus. Ils dépendent à la fois de l'hôte et du HPV infectant (intensité des lésions cytologiques observées, charge virale) [Dalstein et al., 2003]. Ils existent encore d'autres facteurs influençant l'incidence de ce cancer. Ils seront décrits ci-dessous (figure 1.7) :

**Contraception hormonale** : L'usage de l'hormonothérapie contraceptive serait lié au développement du cancer du col utérin chez les femmes HPV positives. Pour ces femmes, le risque semble être multiplié par 2,42 dès lors qu'elles utilisent une telle contraception pendant au moins 10 ans. Le risque augmente avec la durée d'utilisation et diminue après l'arrêt du contraceptif [Luhna et al., 2013].

**Toxiques : alcool et tabac** : Le tabagisme passif majore de 2 fois le risque de développement de cancer du col, probablement en raison des dommages génétiques occasionnés au sein des cellules de l'épithélium cervical. Le risque diminue mais reste néanmoins présent chez les anciennes fumeuses [Zeng et al., 2012]. La consommation alcoolique majore le risque d'infection à HPV, et donc indirectement le risque de cancer du col [Hjartåker et al., 2010].

**Multiparité** : Il est décrit une augmentation du risque de développement de carcinomes épidermoïdes du col utérin chez les patientes multipares au-delà de 7 grossesses menées à terme. De même, le jeune âge lors d'une première grossesse est un facteur de risque [Hinkula et al., 2004].



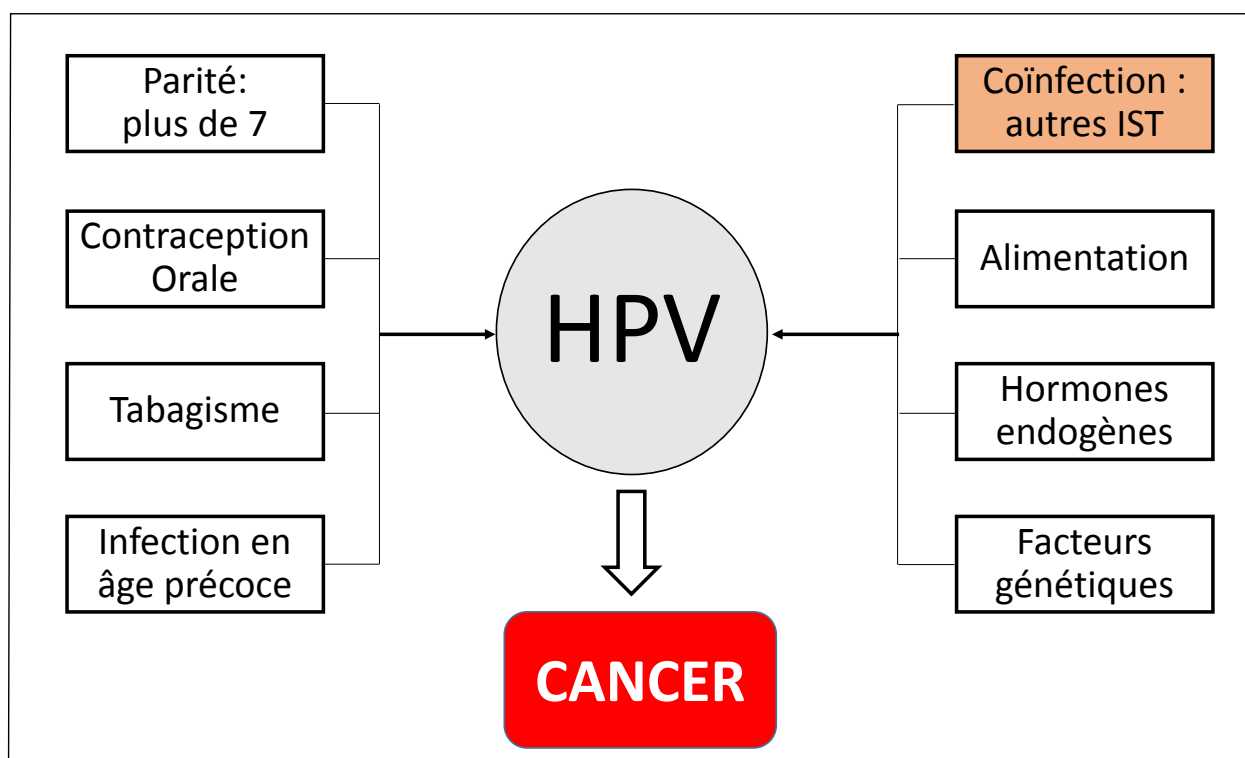


Figure 1.7 – Facteurs de risques du cancer du col de l'utérus [Luhna et al., 2013]

**Comportement sexuel** : La précocité du premier rapport, les antécédents de maladies sexuellement transmissibles, un grand nombre de partenaires sexuels, les rapports réguliers avec un partenaire ayant des antécédents d'infections sexuellement transmissibles, sont autant de facteurs de risque d'infection à HPV [Drolet et al., 2013].

**Immunodépression** : Les femmes immunodéprimées sont plus susceptibles à l'infection à HPV, que ce soit en raison d'un traitement immunosuppresseurs (en cas de transplantation ou de lupus) ou en raison de l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Dans ces cas, l'évolution du cancer invasif du col utérin est plus rapide [Denny et al., 2012].

**Facteurs nutritionnels** : Il semblerait qu'une alimentation riche en fruits, en légumes, en vitamines C et E, ou encore en  $\alpha$ - et  $\beta$ -carotènes, ait un rôle protecteur contre la persistance de l'infection par HPV, tout comme certains régimes alimentaires riches en fibres et vitamines. D'autre part, les vitamines A, B9 et E semblent avoir un effet inhibiteur sur le cancer du col utérin [Garcia-Closas et al., 2005].

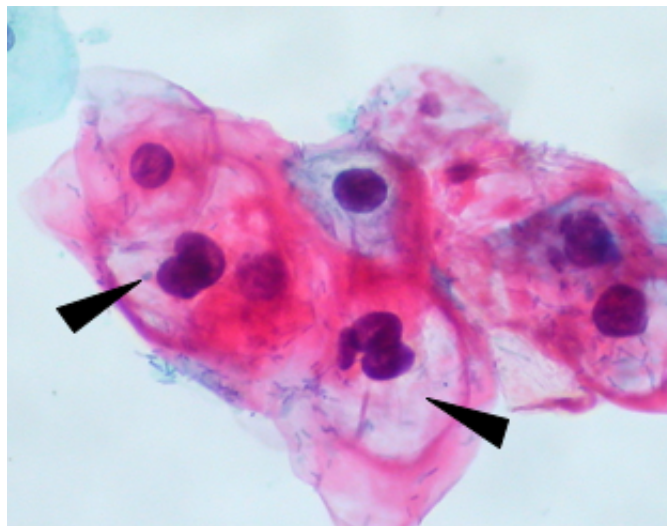
**Cofacteurs viraux** : Il a été démontré que la coïnfection par plusieurs types d'HPV ou par d'autres virus sexuellement transmissibles tels que l'Herpès Simplex Virus 2 [Hil-desheim et al., 1991], l'Epstein-Barr virus (EBV) [Sasagawa et al., 2000] ou encore *Chlamydiae trachomatis* [Koskela et al., 2000], favorise le développement du cancer du col de

l'utérus. Nous développerons dans la partie expérimentale, en détails, la possibilité de l'intervention de l'EBV dans la genèse de la tumeur du col utérin.

**Cofacteurs liés à l'hôte** : L'état général, certains facteurs génétiques, la qualité de la réponse immunitaire, les hormones endogènes de la patiente infectée par HPV, ont un rôle à jouer dans la survenue des cancers du col.

## 1.4 Histoire naturelle du cancer du col utérin

Le cancer du col utérin est se développe très lentement, sur une quinzaine d'années. Les lésions précurseurs de cette pathologie débutent généralement à la jonction entre les muqueuses malpighiennes et glandulaires du col de l'utérus. Il est donc important de localiser cette zone en perpétuel remaniement, car elle correspond à un site privilégié d'infection par les HPV. L'HPV infecte les cellules basales de l'épithélium malpighien, le plus souvent, à travers un microtraumatisme. Les cellules cervicales ainsi infectées prennent un aspect particulier : le noyau s'entoure d'un halo clair aux contours irréguliers, correspondant à une zone de nécrose du cytoplasme. On leur donne alors le nom de koïlocytes (figure 1.8). Cet effet cytopathique est spécifique de l'infection à HPV [[Baba and Câtai, 2007](#)].



**Figure 1.8** – Aspect d'un koïlocyte : cellule dont le noyau est entouré d'un halo claire, effet cytopathique de l'infection HPV [[Chard and Grudzinskas, 1994](#)]

Au niveau histologique, la progression se traduit par la perte de la différenciation cellulaire, donnant l'aspect d'une néoplasie cervicale intraépithéliale (CIN). Cette dernière évolue de CIN 1 vers CIN 3, puis vers le cancer infiltrant. une proportion de 10 à 15% des CIN 1 non traitées passeront au stade CIN 2-3, tandis que les autres régresseront spontanément dans les deux années suivant le diagnostic initial. Le risque d'évolution d'un CIN

1 (figure 1.9) vers un CIN 3 ou une lésion plus grave a été évalué à 1% par an, tandis que le risque de progression d'un CIN 2 vers les stades plus sévères serait de 16% en 2 ans à 25% en 5 ans [Moscicki et al., 2012].

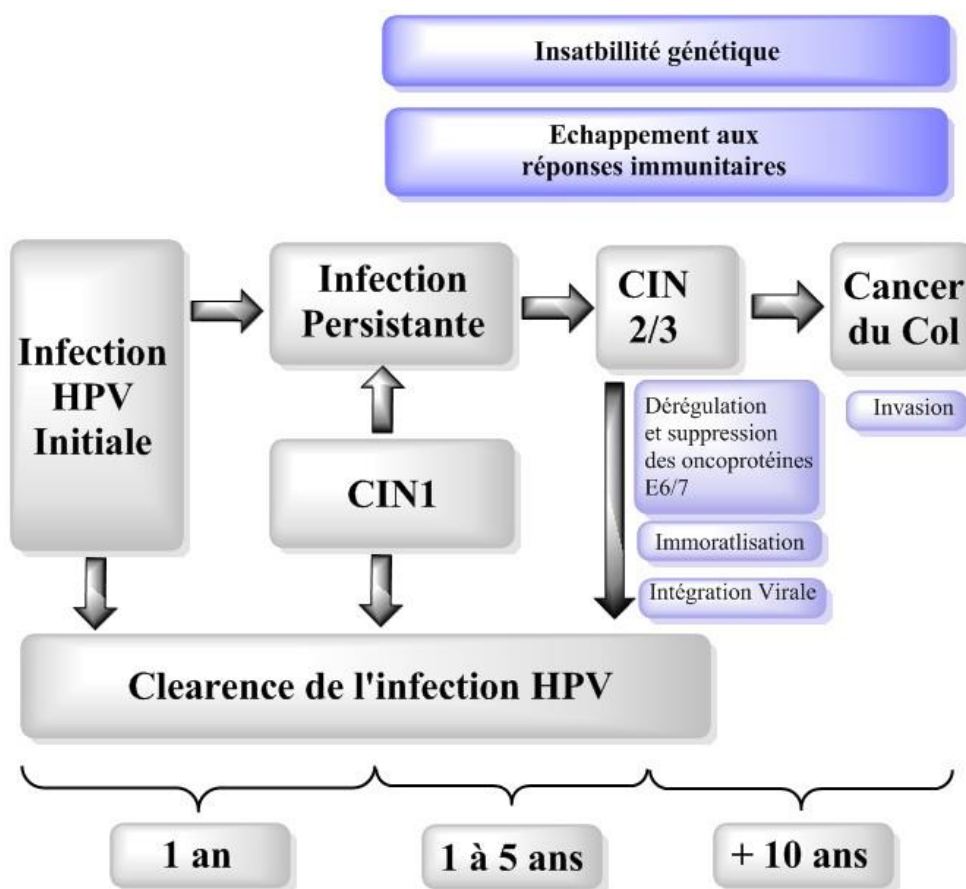


Figure 1.9 – Histoire naturelle de l'infection HPV et développement du cancer du col de l'utérus [Moscicki et al., 2012]

## 1.5 Classification et traitements des dysplasies

### 1.5.1 Les dysplasies du col utérin

Bien que la classification OMS de 2005 ait harmonisé l'ensemble des dénominations pour aboutir au concept de CIN, ce terme est actuellement très peu employé, tant en clinique que dans la littérature [IARC, 2005].

Actuellement en histologie, c'est la terminologie de Bethesda [Roberts and Ekman, 2012] (tableau 1.1) qui est utilisée pour classer les frottis anormaux en fonction des atypies cellulaires identifiées :

La concordance du système de Bethesda et celui de l'OMS est montrée dans la figure 1.10.

Tableau 1.1 – Terminologie des lésions cervicales [Roberts and Ekman, 2012]

| Terminologie de Bethesda     | Type de lésion                                                                                                                                      |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASC :<br>- ASC-US<br>- ASC-H | Atypie des cellules pavimenteuses :<br>- atypies mal définies<br>- atypies ne permettant pas d'exclure une néoplasie intraépithéliale de haut grade |
| LSIL                         | lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade                                                                                                  |
| HSIL                         | lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade                                                                                                 |
| AGC                          | atypies des cellules glandulaires d'origine endocervicale ou endométriale                                                                           |
| Carcinome                    | carcinome épidermoïde invasif                                                                                                                       |
| AIS                          | adénocarcinome in situ                                                                                                                              |
| ADC invasif                  | adénocarcinome invasif                                                                                                                              |

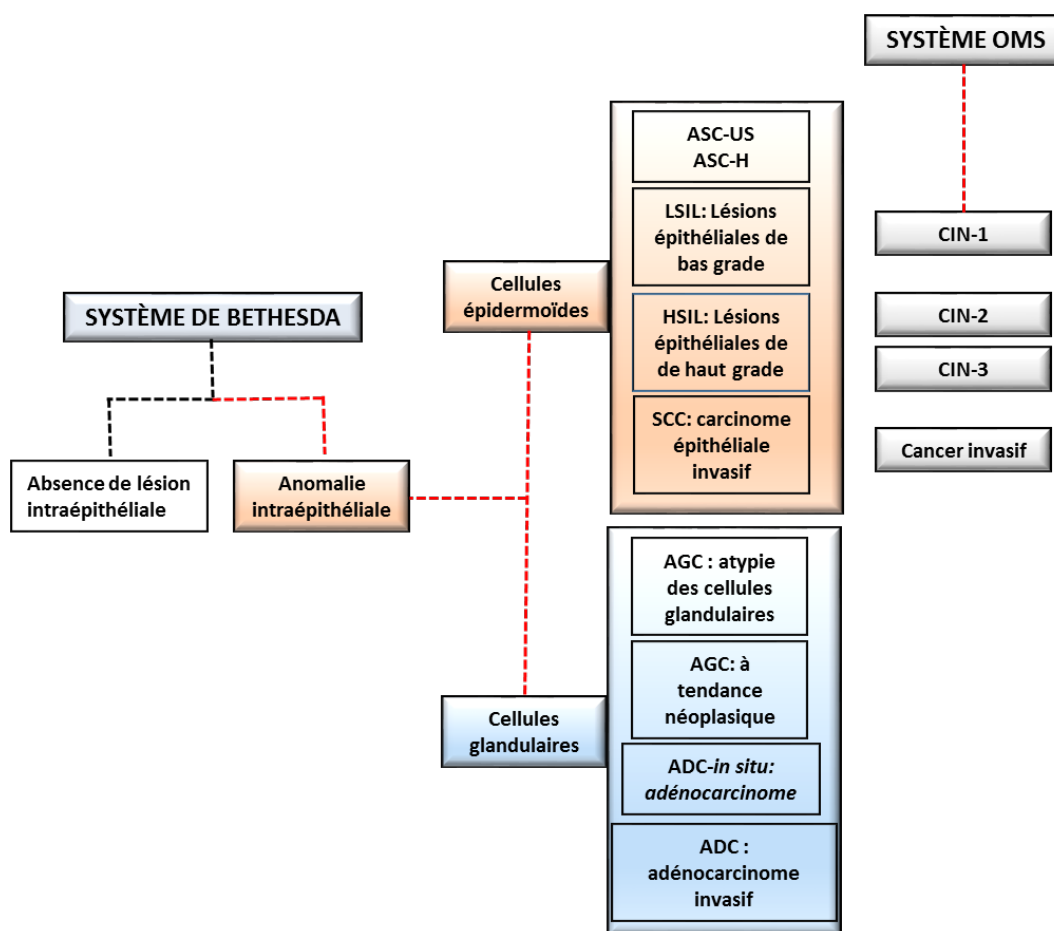


Figure 1.10 – Nomenclature de Bethesda et celle de l'OMS [Roberts and Ekman, 2012]

Les aspects (normaux ou lésés) de la zone de transformation sont visualisés par coloscopie. Cette technique permet de distinguer les modifications non significatives (inflammation, polypes...), les lésions significatives (lésions à HPV et CIN) et les modifications hautement significatives évoquant un cancer invasif [Mergui et al., 2008].

### 1.5.2 Stadification du cancer du col de l'utérus

De la classification des lésions découle la prise en charge, d'où l'importance d'une surveillance régulière des femmes par frottis cervico-utérin (FCU) [Siegel et al., 2012]. La conduite à tenir face à un frottis révélant une CIN est la réalisation d'une colposcopie. Lorsque le diagnostic de la maladie s'effectue au stade «cancer», la classification clinique des cancers du col utérin de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétriques (FIGO) est employée (tableau 1.2).

Tableau 1.2 – Classification clinique des cancers du col utérin [Siegel et al., 2012]

| Stades            | Localisation                                                                                       |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Stades I</b>   | <b>Col strict</b>                                                                                  |
| IA                | Carcinome micro-invasif non visible macroscopiquement                                              |
| - IA1             | - envahissement du chorion $\leq 3\text{mm}$ , largeur $\leq 7\text{mm}$                           |
| - IA2             | - envahissement du chorion $> 3\text{mm}$ et $\leq 5\text{mm}$ , largeur $\leq 7\text{mm}$         |
| IB                | Cancer visible à l'examen clinique ou de taille supérieure à celle du IA2                          |
| - IB1             | - lésion $\leq 4\text{cm}$ de plus grand diamètre                                                  |
| - IB2             | - lésion $> 4\text{cm}$ de plus grand diamètre                                                     |
| <b>Stades II</b>  | <b>Extension extra-utérine, sans atteinte de la paroi pelvienne ni du tiers inférieur du vagin</b> |
| -                 |                                                                                                    |
| IIA               | Extension vaginale sans atteinte des paramètres                                                    |
| - IIA1            | - lésion $\leq 4\text{cm}$ de plus grand diamètre                                                  |
| - IIA2            | - lésion $> 4\text{cm}$ de plus grand diamètre                                                     |
| IIB               | Extension vaginale avec atteinte d'au moins un des paramètres                                      |
| <b>Stades III</b> | <b>Cancer étendu à la paroi pelvienne et/ou au tiers inférieur du vagin</b>                        |
| IIIA              | Cancer étendu au tiers inférieur du vagin sans atteinte des                                        |
| -                 | parois pelviennes                                                                                  |
| IIIB              | Cancer étendu aux parois pelviennes et/ou responsable d'une                                        |
|                   | hydronéphrose ou d'un rein muet                                                                    |
| <b>Stades IV</b>  | <b>Invasion de la vessie, du rectum et au-delà de la cavité pelvienne</b>                          |
| IVA               | Extension à la muqueuse vésicale et/ou à la muqueuse rectale                                       |
| IVB               | Métastases à distance                                                                              |

### 1.5.3 Prise en charge des tumeurs du col de l'utérus

#### Stade Ia1

Le diagnostic se fait sur pièce de conisation. Le suivi classique est le suivant :

- surveillance simple si les marges d'exérèse sont saines
- hystérectomie totale simple si les marges d'exérèse ne sont pas saines
- traitement identique au stade Ia2 en présence d'embolies lymphatiques dans la pièce d'exérèse.

### Stade Ia2

diagnostic sur pièce de conisation

- surveillance simple si les marges d'exérèse sont saines
- trachélectomie ou hystérectomie simple
- résection du paramètre en présence d'embolies lymphatiques, par hystérectomie ou trachélectomie élargies.

Les traitements à ce stade comportent généralement une lymphadénectomie coelioscopique complémentaire.

### Stade Ib1

pas de traitements standards

- chirurgie : colpo-hystérectomie élargie (intervention de Wertheim) ou trachélectomie élargie associée à une lymphadénectomie
- radio-chirurgie : curiethérapie pré-opératoire puis radiochimiothérapie concomitante
- radiothérapie externe et curiethérapie quand la chirurgie est contre-indiquée.

### Stades Ib2 à IVa

la chirurgie première d'exérèse n'est pas indiquée, le traitement de choix est généralement une radiochimiothérapie concomitante. Une chirurgie de complément est à discuter.

### Stade IVb

présence de métastases à distance : le traitement consiste en une radiothérapie et/ou une chimiothérapie.

En cas de récidives locorégionales ou métastatiques, une chimiothérapie palliative est généralement indiquée, mais une chirurgie pelvienne (exentération) avec radiothérapie concomitante peuvent être réalisées. Le suivi post-thérapeutique comporte un examen clinique ainsi qu'un frottis cervico-utérin. Il s'effectue tous les 4 mois pendant 2 ans, puis tous les 6 mois pendant 3 ans, et enfin annuellement.

---

## CHAPITRE 2

---

# LE PAPILLOMAVIRUS HUMAIN

### 2.1 Cycle cellulaire et sa régulation

Le cycle cellulaire est caractérisé par la succession de deux grandes phases, l'interphase et la mitose (figure 2.1). Subdivisée, à son tour en trois étapes (G1, préparation à la réplication de l'ADN ; S, réplication et G2, préparation à la mitose), l'interphase prépare la cellule à la division pour donner deux cellules filles identiques.

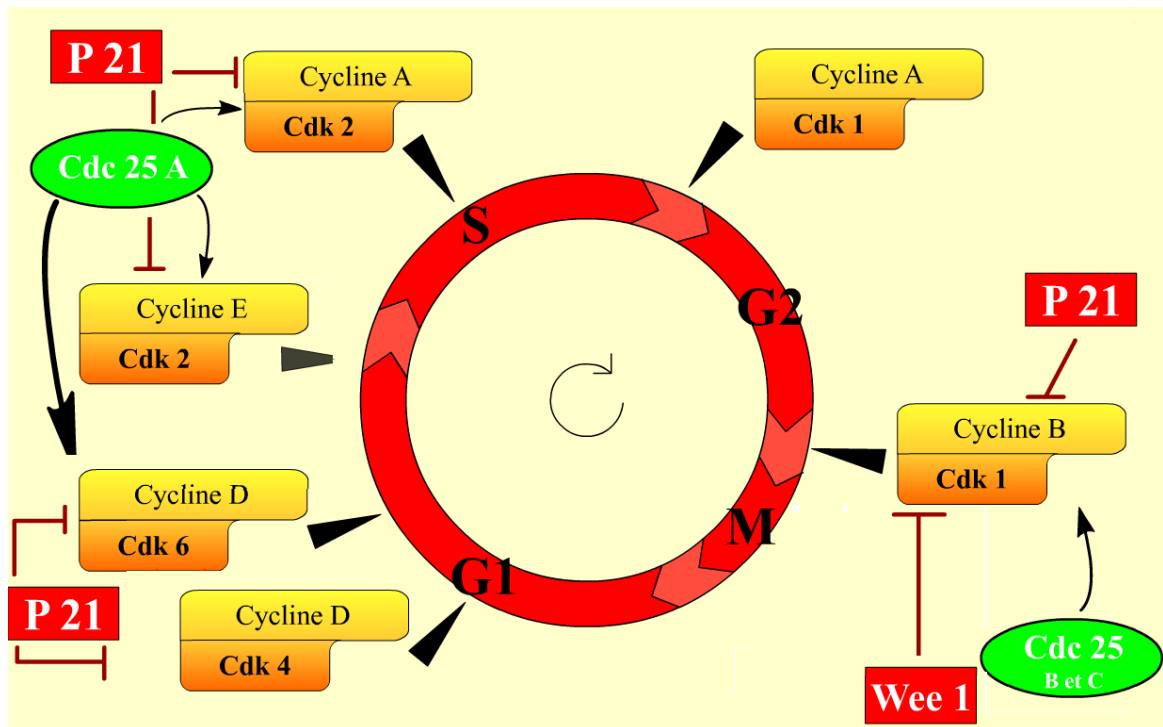


Figure 2.1 – Cycle cellulaire et sa régulation [Ewen, 1994] : protéine activatrices en vert, inhibitrice en rouge.

La régulation de ce cycle utilise le facteur MPF ("mitosis-promoting factor"), caractérisé au début des années 1990 [Ewen, 1994]. Il s'agit d'une kinase cycline-dépendante (Cdk), les cyclines sont leurs sous unités activatrices (figure 2.2). A la fin du XXème siècle, une douzaine de Cycline / Cdk sont décrites chez l'homme. Six d'entre elles interviennent dans le contrôle direct du cycle cellulaire. Chaque Cdk agit sur des substrats définis (figures 2.1 et 2.2).

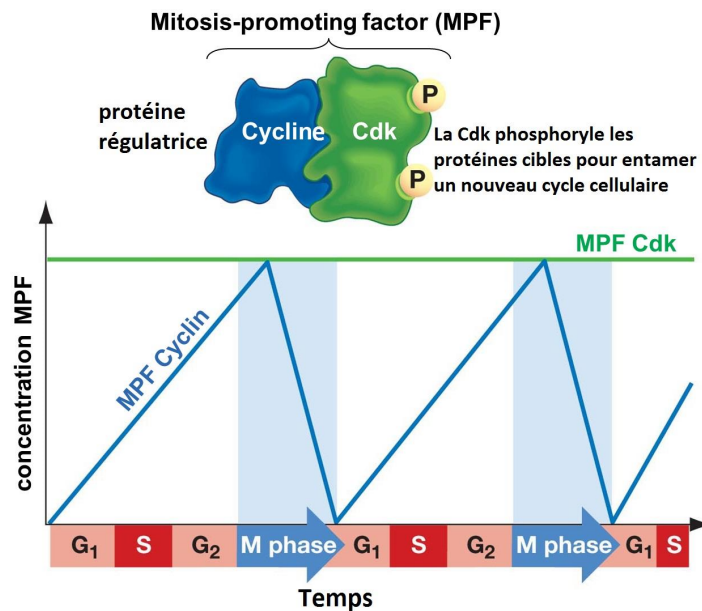


Figure 2.2 – Évolution du niveau du facteur stimulant la mitose (MPF) au cours du cycle cellulaire [Humphrey and Pearce, 2005]

Les Cdk sont des sérine-thréonine kinases, enzymes qui phosphorylent des protéines cibles jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire (fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN...), ou dans l'avancement du cycle par libération des facteurs déclenchant la réplication, notamment E2F [Rohrmann, 2013]. Leur concentration varie avec le temps (figure 2.2). Elles transfèrent le groupement  $\gamma$ -phosphate de l'ATP sur une sérine ou une thréonine, présentes dans ces protéines cibles (la protéine du rétinoblastome, pRb, entre autres), à condition que ses acides aminés (aa) soient dans une séquence spécifiquement reconnue par la kinase (exemple : Ser/Thr-Pro-X-Arg/Lys).

Les Cdk, elles-mêmes, subissent une régulation soit

- par déphosphorylation "activatrices" à l'aide de phosphatases (comme la Cdc 25). Ces phosphatases sont appelées CAK ("Cdk Activating Kinase") et sont composées de la Cycline H et de la Cdk 7.
- ou par phosphorylation "inhibitrices" à l'aide d'autres kinases notamment Wee-1 qui agit sur Cdk1 en phosphorylant les sites tyrosine 15 et thréonine 14 [Ford et al., 2004].



D'autres protéines inhibitrices, les CKI (Cdk Inhibitors : p16, p21, p27) régulent, aussi, le cycle négativement [Neto and Vinson, 2011].

Il faut rappeler que les inhibiteurs des Cdk sont à leur tour activées par l'anti-oncogène p53. Celui-ci est donc considéré comme un inhibiteur du cycle cellulaire. Il a d'autres rôles très importants, déclenche d'une part l'apoptose des cellules (sénescences ou ayant accumulé des aberrations chromosomiques) ou entame la réparation de l'ADN endommagé [Hoffmann, 2006].

## 2.2 Historique des papillomavirus

Les verrues localisées à la sphère génitale ont été fréquemment décrites par les médecins romains et grecs dès 500 avant JC et ont été dénommées ficus et thymion en raison de leur apparence. A.C. Celsius, dans son ouvrage *De Arte Medica* datant de 25 ans avant JC, décrit différents types de verrues génitales : acrochordon, thymion et myrcémie, et observe la transmission sexuelle de ces verrues (Mougin et al, 1997). Du XI<sup>e</sup> au XIX<sup>e</sup> siècle, nombreuses sont les descriptions mentionnant l'existence de condylomes et de leur caractère transmissible. Ce n'est qu'à partir du 19<sup>e</sup> siècle que l'origine virale des verrues a été suspectée. Ciuffo [1907] démontra la nature virale des lésions verruqueuses humaines, après s'être inoculé un broyât stérile de verrues vulgaires filtré sur la porcelaine.

En 1933, R. Shope (1933) décrit la papillomatose du lapin sauvage. Il en prouve la nature contagieuse en appliquant, au niveau de scarifications de plusieurs lapins de laboratoire, une suspension préparée à partir de lésions verruqueuses. Beard and Rous [1934], démontrent que les papillomes cutanés chez le lapin peuvent évoluer vers un carcinome après une longue période de latence. Strauss et al. [1950] confirment les travaux de G. Ciuffo et de R. Shope ; ils observent en microscopie électronique des particules semblables à des virus dans des papillomes cutanés. Par la suite, les papillomavirus humains (HPV) ont été découverts, à l'origine de tumeurs épithéliales bénignes, les papillomes cutanés (verrues) et muqueux (condylomes acuminés). Durant les années 1960 à 1970, les données épidémiologiques ont montré que les lésions cutanées et muqueuses sont transmises par contact sexuel et ont inspiré la recherche d'un agent microbien comme facteur étiologique. A cette époque, les données disponibles indiquaient que l'infection génitale avec le virus herpès simplex (HSV) était probablement coupable. Bien que ce virus ait montré son rôle carcinogénique *in vitro* et *in vivo*, le lien avec le cancer du col n'était qu'indirect. Les papillomavirus ont alors été retrouvés chez de nombreuses espèces animales et chez l'Homme [Lancaster and Olson, 1982].

La preuve de l'existence des HPV humains dans des lésions génitales (condylomes acuminés et cancers) n'est donnée qu'en 1974 par zur Hausen et al. [1974]. Dix ans plus tard, sont découverts des HPV spécifiques dans les biopsies du col utérin. L'association entre ces virus et le cancer du col de l'utérus a été démontrée pour la première fois par Harald

Zur Hausen, lui valant le Prix Nobel de médecine en 2008.

Dans les années 1980, l'attention s'est portée progressivement vers ce nouveau candidat, l'HPV, avec de solides évidences issues de la biologie moléculaire impliquant certains types du virus comme agents responsables de la transformation cellulaire [Monsonégo, 1988]. Les nombreux travaux qui ont suivi ont montré la diversité des HPV [de Villiers, 1989]. On distingue d'une part les HPV dits à haut risque oncogène (HPV-HR), comme les HPV 5 et 8 associés à l'épidermodysplasie verruciforme, et les HPV 16 et 18 associés aux lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus, et d'autre part les HPV dits à bas risque oncogène (HPV-BR), comme les HPV 1 et 2, responsables de l'apparition de verrues bénignes [Van Ranst et al., 1992] ou les HPV 6 et 11, retrouvés dans près de 90% des condylomes [Aubin et al., 2008]. Les HPV-BR ne sont jamais retrouvées seules dans les lésions cancéreuses. Le risque relatif de l'association entre l'HPV et le cancer du col de l'utérus est de 2 à 3 fois plus élevé que celui des autres facteurs de risque [Bosch and de Sanjosé, 2003]. En 1995, l'IARC ("*International Agency for Research on Cancer*") classe les HPV-16 et 18 comme agents carcinogènes chez les humains [IARC, 1995].

Facteur étiologique des cancers du col de l'utérus, les HPV-HR se sont également avérés associés avec d'autres cancers, tractus ano-génital, vagin, vulve, pénis, canal anal (tableau 2.1) et leur rôle est suggéré dans des cancers situés au niveau d'autres sites anatomiques, comme la tête et le cou, les voies aérodigestives supérieures, l'œil et la peau [Parkin and Bray, 2006].

Tableau 2.1 – Cancers attribuables aux HPV-HR dans le monde [Parkin and Bray, 2006]

| Localisation | Nombre (monde) | % HPV + | % HPV16/18 + |
|--------------|----------------|---------|--------------|
| Col utérin   | 492800         | 100     | 70           |
| Pénis        | 26300          | 40      | 63           |
| Vulve, Vagin | 40000          | 40      | 80           |
| Bouche       | 274300         | 3       | 95           |
| Oropharynx   | 52100          | 12      | 90           |

## 2.3 Classification

A l'origine, les papillomavirus formaient avec les polyomavirus la famille des Papovaviridae. La rapide augmentation du nombre de types de papillomavirus isolés a incité les taxonomistes à modifier cette classification. Les papillomavirus forment aujourd'hui la famille des Papillomaviridae pour répondre à trois objectifs importants :

- établir des relations entre les types de papillomavirus ;
- intégrer les termes « genres » et « espèces », utilisés systématiquement dans la classification des organismes biologiques et fréquemment appliqués à la virologie ;
- et permettre de mieux distinguer les relations entre la taxonomie et les propriétés biologiques et pathologiques des virus.

Basée sur les séquences nucléotidiques du gène L1, codant la protéine majeure de la capside, plus de 120 génotypes sont actuellement connus (figure 2.3) et complètement séquencés ([Mougin et al., 2008]).

Le gène L1 est le plus conservé parmi les différents génomes des HPV. Ce sont les homologues de séquences de ce gène qui ont servi à établir la classification des HPV. Ainsi, la famille des Papillomaviridae est composée de 16 genres (nommés alpha à pi) entre lesquels, il y a 45 à 60% d'identité de la séquence L1. Chaque genre regroupe une à plusieurs espèces d'HPV désignées par un chiffre arabe et possédant entre 60 à 70% d'identité. Chaque espèce contient différents types (71 à 89% de similitude). Enfin, chaque type peut être subdivisé en sous-types (différents de seulement 2 à 10% par rapport au type) et variants (moins de 2% de différence).

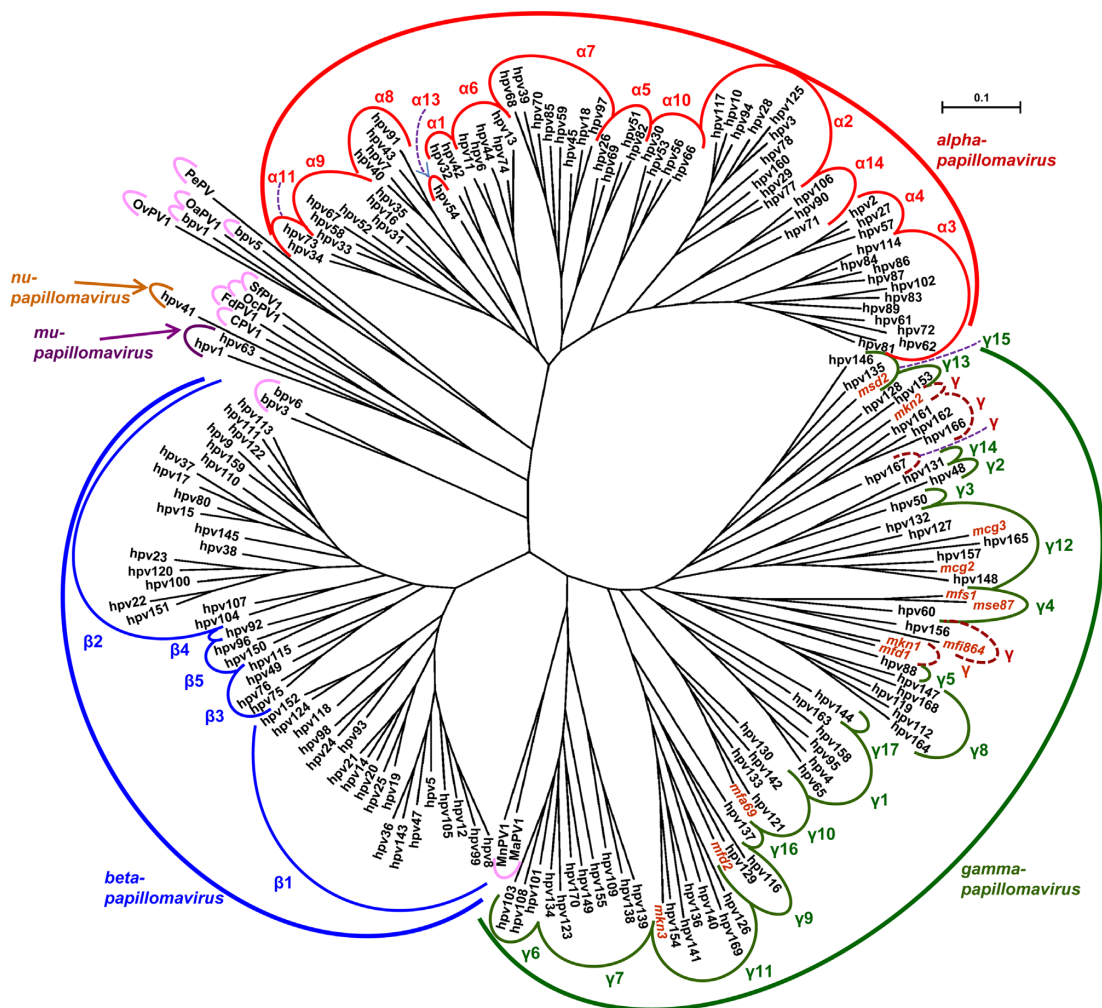


Figure 2.3 – Phylogénie des papillomavirus à la base de la séquence génétique de la protéine capsidiale L1 [Bernard et al., 2010].

Les Papillomavirus sont retrouvés dans de nombreuses espèces animales dont les vertébrés supérieurs (lapins, ovins, cervidés, bovins, équidés, canidés, primates, oiseaux), chez lesquels ils induisent des papillomes ou des fibropapillomes (tumeurs bénignes et régres-

sives) [Nicholls and Stanley, 2000]. Les papillomavirus sont spécifiques de leur hôte : il n'existe pas d'exemple de transmission croisée entre espèces [Jenson et al., 1980].

Parmi les 16 genres de papillomavirus, 5 genres (96 génotypes) sont spécifiques de l'homme («Human Papillomavirus» ou HPV), ce sont les genres alpha, bêta, gamma mu et nu (Figure 2.3).

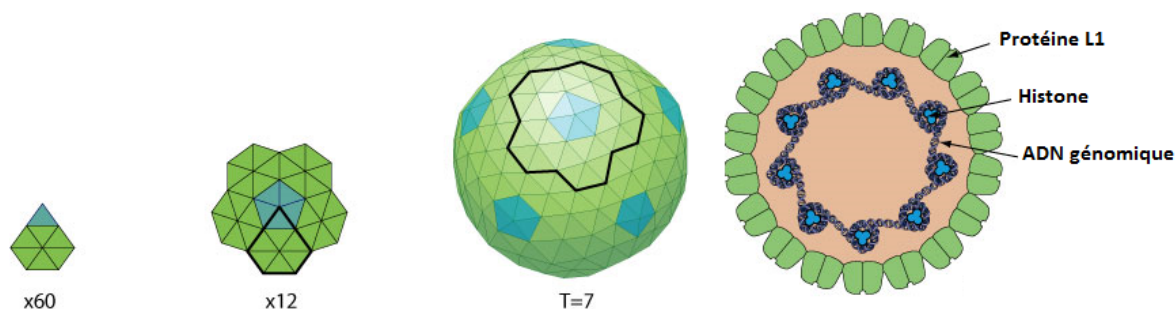
Une classification phylogénique différente, basée sur les différences nucléotidiques au niveau de la région LCR du génome de ces HPV a, en plus, révélé l'existence de nombreux variants, notamment du génotype 16 [de Villiers et al., 2004]. Ces variants sont bien répertoriés et regroupés géographiquement [Heinzel et al., 1995, Yamada et al., 1997, Burk and DeSalle, 2006]. Ainsi, il a été défini des variants européens (E), asiatiques (As), asiatiquo-américains (AA), nord-américains (NA), africains 1 (Af1) et africains 2 (Af2) [Nindl et al., 1999a,b, Chan et al., 1992, Ho et al., 1991].

## 2.4 Structure des HPV

Les virions HPV ne sont pas enveloppés. Ils possèdent une capsidie à symétrie cubique en structure icosaédrique, de 55 nm de diamètre et un ADN bicaténaire, circulaire. Ils se répliquent dans le noyau cellulaire. Virus nus, ils sont particulièrement résistants dans le milieu extérieur (froid, solvants organiques, détergents) [Bernard et al., 2010].

### 2.4.1 La capsidie

La capsidie des HPV, à symétrie icosaédrique est constituée de 360 molécules L1 (protéine majeure) en association avec 12 copies de la protéine L2 par virion (figure 2.4). Elle comporte 72 capsomères, chacun est formé de 5 protéines L1 et une molécule L2 ([Baker et al., 1991, Buck et al., 2008, Pereira et al., 2009]).



**Figure 2.4** – Structure de la capsidie des papillomavirus : Capsidie icosaédrique avec un nombre de triangulation  $T=7$  (première image à gauche). Elle se compose de 12 capsomères en pentamères et 60 en hexamères, pour un total de 420 protéines de capsidie. L'image à droite montre une coupe du virion HPV [Belnap et al., 1996]. L'ADN génomique est associé, comme celui des cellules eucaryotes, à des histones.

La protéine L1, est capable à elle seule de s'auto-assembler pour reconstituer une capsid synthétique identique à la capsid naturelle du virus [Kirnbauer et al., 1992, Bishop et al., 2007, Modis et al., 2002]. L'assemblage des capsomères se fait grâce à des liaisons ioniques mais aussi par des ponts bisulfures intermoléculaires entre les extrémités C-terminales des protéines L1 entre deux capsomères opposés. La protéine L2 de la capsid, dite protéine mineure, joue un rôle secondaire dans l'assemblage du virion. Elle a, plutôt, un rôle facilitant l'infection de la cellule hôte [Buck et al., 2008].

## 2.4.2 Organisation génomique

Le génome viral est une molécule d'ADN circulaire bicaténaire d'environ 8000 paires de bases dont un seul des brins est codant. Il s'associe avec les histones cellulaires pour former des nucléosomes (figure 2.5). Il contient 10 phases ouvertes de lecture (POL) chevauchant et qui sont transcrits en ARN polycistroniques. On distingue trois régions organisées : la région E («Early»), de E1 à E8 (d'environ 4 Kpb), la région L («Late»), L1 et L2 (d'environ 3 Kpb) et la région régulatrice, non codante, LCR (pour «long control region») de taille comprise entre 400 et 1000 pb (Figure 2.5). Cette dernière renferme deux promoteurs majeurs. Le promoteur précoce (p97) initie la transcription en amont du gène E6, alors que le promoteur tardif (p670) se trouve dans la région E7 et s'active durant la phase tardive du cycle viral productif. Les gènes précoces E6, E7, E1 et E2 de l'HPV 16 sont transcrits à l'aide du promoteur précoce. Les protéines E1, E2, E4, E5, L1 et L2 dans le cas du cycle viral productif (lytique) sont transcrits par le promoteur tardif, p670. Les trois régions du génome viral sont séparées par deux sites de polyadénylation : un site précoce AE et un site tardif AL [Mitsuishi et al., 2013].

La région E code des protéines non structurales. leur rôles sont résumés dans ce qui suit :

### — Gènes E

- E1 : Réplication de l'ADN (hélicase) [Ustav et al., 1991]
- E2 : Facteur de transcription et réplication de l'ADN et régule négativement la transcription des oncogènes viraux E6 et E7 [Desaintes and Demeret, 1996].
- E4 : Interaction avec la cytokératine et intervient dans la maturation des particules virales [Doorbar et al., 1986]
- E5 : Stimulation de la prolifération cellulaire. C'est un oncogène chez le papillomavirus bovin 1 [Schlegel et al., 1986]. La protéine E5 de l'HPV 16 est capable de stimuler l'activité du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) [Genther Williams et al., 2005] et de réduire l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I [Ashrafi et al., 2006].
- E6 : Immortalisation, transformation cellulaire. La protéine E6 facilite la dégradation de l'anti-oncogène p53 par le protéasome via l'ubiquitine ligase cellu-



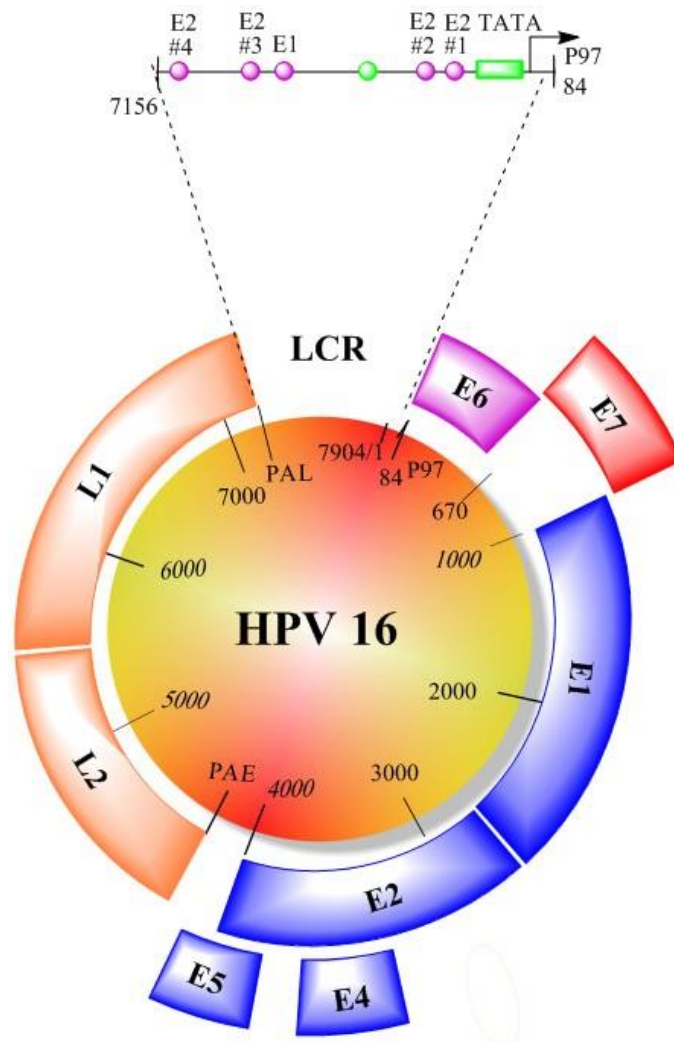
laire, E6AP (E6 associated protein). Cette protéine virale peut aussi activer la télomérase [Münger et al., 2004].

- E7 : Immortalisation, transformation cellulaire. protéasome via l'ubiquitine ligase cellulaire, E6AP (E6 associated protein). Cette protéine virale peut aussi activer la télomérase [Münger et al., 2004]. La protéine E7, quant à elle, a un rôle prolifératif, principalement lié à sa capacité d'interaction avec les protéines à poche p107, p130 et surtout p105Rb [Münger et al., 2004].

— Gènes L

- L1 : protéine majeure de capside : capable d'autoassemblage (VLP)
- L2 : protéine mineure de capside : liaison à l'ADN

Les rôles des protéines E3 et E8 ne sont pas connus. E3 n'est présente que dans de très rares HPV.



**Figure 2.5** – Représentation schématique du génome de HPV16 circulaire montrant l'emplacement des gènes précoces (E 1-7), des gènes tardifs (L1 et L2), et de la longue région de contrôle (LCR). [Clarke et al., 2012]

## 2.5 Cycle viral

Les HPVs infectent les cellules souches des épithéliums stratifiés via des lésions ou des microtraumatismes de la muqueuse cervicale permettant au virus de pénétrer jusqu'à la base de ces épithéliums. L'attachement se fait grâce à des héparanes sulfates à la surface des cellules [Giroglou et al., 2001]. la pénétration dans la cellule est favorisée par des récepteurs comme la sous-unité  $\alpha$ -6 des intégrines [Yoon et al., 2001] ou des composants de la matrice extracellulaire comme la laminine 5 [Culp et al., 2006]. Les particules virales sont ensuite internalisées par endocytose (figure 2.6).

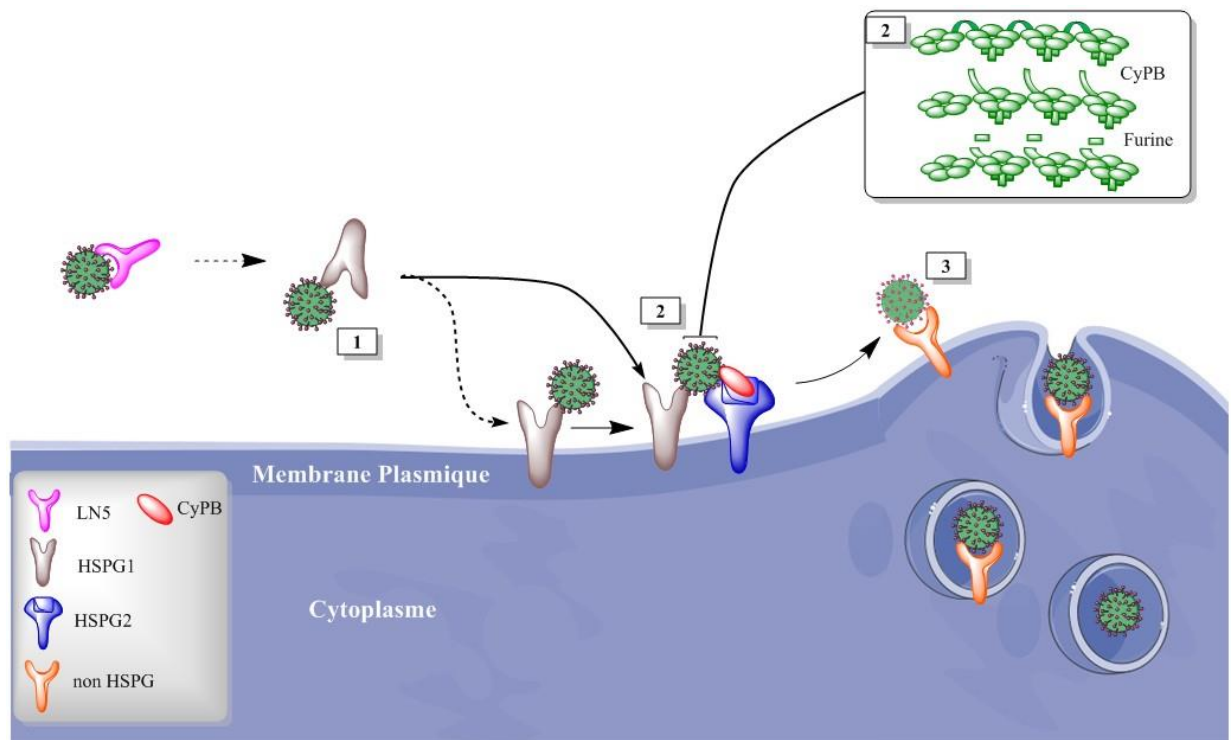


Figure 2.6 – Attachement et pénétration de l'HPV (inspiré de Culp et al. [2006])

Le génome viral est décapsidé dans le cytoplasme et entre ensuite dans le noyau. Il est guidé par le cytosquelette à l'aide d'un processus actif [Selinka et al., 2002]. Les HPV se multiplient alors au rythme des divisions de la cellule hôte. Leur cycle réplcatif est étroitement lié à la différenciation des kératinocytes. Deux types de cycles viraux peuvent avoir lieu : soit un cycle productif avec génération de nouveaux virions, soit un cycle abortif transformant la cellule infectée donnant une tumeur si les mécanismes immunitaires n'arrivent pas à l'éliminer de l'organisme.

### 2.5.1 Cycle productif

Le cycle viral peut être divisé en deux étapes. La première étape est un cycle non productif, au cours duquel le génome viral est amplifié de façon limitée. A ce stade, les pro-

téines virales E1, E2, E6 et E7 sont faiblement exprimées. Les protéines E1 et E2, nécessaires à la réplication virale, se fixent sur des séquences spécifiques E1BS (E1 Binding Site) et E2BS (E2 Binding Site) localisées dans la LCR (figure 2.7) qui contient le site d'origine de la réplication (ori) [Hartley and Alexander, 2002]. La réplication de l'ADN viral s'effectue grâce aux enzymes cellulaires au cours de la phase S dans les cellules basales et suprabasales. Dès qu'ils ont quitté la couche basale, les kératinocytes normaux quittent le cycle cellulaire et amorcent le processus de différenciation.

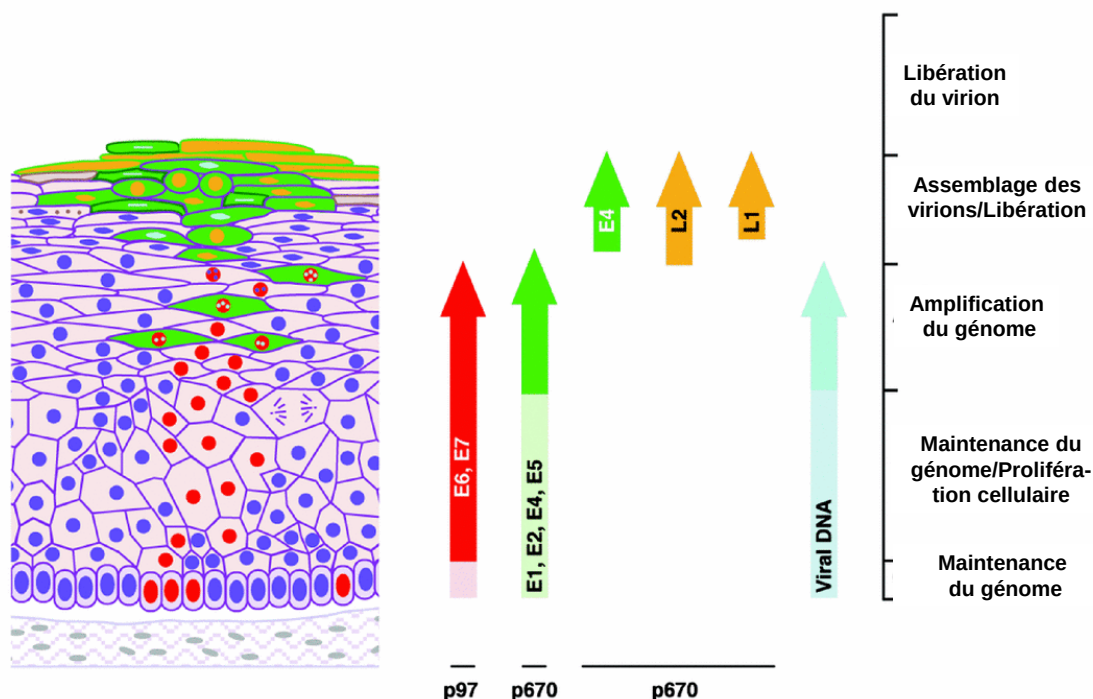


Figure 2.7 – Cycle lytique (productif) du HPV [Van Doorslaer et al., 2011]

Cependant, l'expression de la protéine E7 va permettre aux kératinocytes des couches suprabasales de poursuivre le cycle cellulaire afin de répliquer l'ADN viral. En effet, la liaison de E7 aux protéines à poche p105Rb, p107 et p130 induit la libération du complexe E2F/DP. Les facteurs de transcription E2F permettent ainsi l'entrée et la progression de la phase S, favorisant le cycle viral productif.

La deuxième étape est le cycle productif qui débute lorsque les kératinocytes sont en phase terminale de différenciation et va permettre une forte réplication virale et la production de virus matures. En effet, la différenciation cellulaire provoque l'activation du promoteur tardif et l'augmentation d'expression des protéines de capsid L1 et L2. La production de E4 favorise la libération des virus via la désorganisation de la lamina nucléaire. La réplication du génome viral permet une amplification importante (10 à 100 fois). Une fois l'ADN viral empaqueté au sein de la capsid formée par les protéines L1 et L2, les virions complets sont libérés et disséminés au rythme de la desquamation épithé-



liale [Doorbar, 2006]. Cette infection virale productive, responsable de lésions condylo-mateuses, se traduit par un effet cytopathique, caractérisé par des koilocytes (voir section 1.4, figure 1.8), cellules à cytoplasme clair et à noyau irrégulier ou binucléé [Koss and Durfee, 1956]. Les lésions bénignes peuvent persister pendant 3 à 6 mois, durée nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

### 2.5.2 Cycle intégratif

L'ADN viral peut aussi s'intégrer au sein du génome cellulaire, aboutissant à un cycle viral abortif, caractérisé par l'absence de production de particules virales. Lors de cette intégration, le génome viral se linéarise au niveau de la POL E2 qui devient tronquée et dont le produit (E2 délété) n'inhibant plus l'expression des protéines E6 et E7. L'infection provoque une lésion de haut grade (dysplasie sévère = CIN 2/3 ou carcinome *in situ*), on assiste progressivement à l'expression des gènes viraux E6-E7 qui s'accumulent dans la cellule. A ce stade, le contrôle intercellulaire entre la cellule infectée et les cellules immunitaires (macrophages, immunité à médiation cellulaire) est inopérant. C'est alors qu'on constate l'intégration de l'ADN viral des HPV-HR au génome de la cellule hôte ainsi que l'absence de production de particules virales. Ce phénomène est toujours associé à la cancérisation. Les gènes E6 et E7 sont toujours surexprimés dans les cancers du col de l'utérus, témoignant de leur rôle dans les différentes étapes de la carcinogenèse [Johannsen and Lambert, 2013].

### 2.5.3 La latence virale

Dans la plupart des cas, la lésion consécutive à l'infection virale régresse sous l'action du système immunitaire. L'HPV, comme la plupart des autres virus à ADN, peut persister au sein de quelques cellules dans un état latent. Ceci survient dans les couches les plus inférieures de l'épithélium, et seule l'expression de E1 et E2 serait nécessaire pour maintenir le génome viral dans un état latent [Kadaja et al., 2009]. Toutefois, les mécanismes de cette latence ne sont toujours pas élucidés.

## 2.6 Modes de transmission des HPV

Il convient de mentionner au départ que les HPV résistent à la dessiccation et à différents produits ; ainsi, la conservation du pouvoir infectant de ces virus est de 100, 50 et 30% après déshydratation dans une étuve respectivement pendant un, trois et sept jours [Shukla et al., 2010]. L'HPV semble résistant à l'EDTA et à la chaleur (étuve à 56°C pendant 1 heure) mais pas au passage dans un autoclave.

Bien que le mode de transmission de ces virus soit essentiellement sexuel, d'autres voies de contamination ont été avancées.

### 2.6.1 Transmission par voie sexuelle

Tandis que l'infection à HPV est exceptionnelle chez la femme vierge, dont la prévalence est de 2%, elle est très fréquente chez les femmes en période d'activité sexuelle [Gavillon et al., 2010]. La transmission via les lésions ano-génitales se fait, donc par voie sexuelle, plaçant l'infections à HPV parmi les 3 plus fréquentes infections sexuellement transmissibles (IST) avec l'Herpès génital et les infections à *Chlamydia trachomatis* [Arnheim Dahlström et al., 2011]. On considère que 70 à 80% des femmes sont exposées au moins une fois à ces virus au cours de leur vie sexuelle [Monsonogo, 2007]. Différents travaux ont établi une concordance entre les types d'HPV chez les partenaires sexuels [Bleeker et al., 2005a,b] et au sein des couples établis [Haddad et al., 2008]. Le taux de transmission du virus au cours d'un rapport sexuel est d'environ 40% [Kyo et al., 1994], ce qui montre une importante contagiosité.

#### La digito-transmission

La contamination sexuelle via les doigts et les mains a été évoquée [Moy et al., 1989] et pourrait dans certains cas expliquer la présence d'un même génotype d'HPV dans deux muqueuses distinctes chez un même individu [Winer et al., 2003]. L'auto-transmission ne peut pas être écartée. La transmission des verrues se fait également par auto-inoculation, elle serait favorisée par le grattage.

### 2.6.2 Transmission non sexuelle des HPV

#### La transmission mère-enfant

Il apparait que la transmission de la mère à l'enfant lors du passage dans la filière génitale infectée reste une voie de transmission accessoire [Czegledy, 2001, Park et al., 2012]. Le taux de transmission des HPV serait plus important lors d'un accouchement par voie basse que lors d'une césarienne [Rombaldi et al., 2008]. En effet, une relative diminution d'infections néonatales par HPV a été remarquée chez des patientes présentant des lésions condylomateuses ayant accouché par césarienne [Silverberg et al., 2003].

La contamination peut aussi avoir lieu aux autres moments de la vie du fœtus, car le passage de particules virales par voie transplacentaire a été établi. Plusieurs études montrent la présence d'HPV au niveau de caduques et de syncytiotrophoblaste lors d'avortements spontanées ou dans le liquide amniotique après amniocentèse [Riethmuller et al., 2008, Rombaldi et al., 2008]. La transmission peut avoir lieu également après la naissance.

La transmission verticale per-partum est quant à elle bien établie. Elle est notamment appuyée par la détection d'HPV en post-partum chez des enfants naissant de mères infectées par le virus [Castellsagué et al., 2009]. L'existence de papillomatoses laryngées

juvéniles chez des nourrissons de quelques semaines et dont les mères présentaient des condylomes acuminés, avait soulevé l'hypothèse de ce mode de transmission. Ce sont les génotypes 6 et 11 qui ont été retrouvés chez ces enfants [Mounts et al., 1982].

Enfin, la transmission horizontale post-natale de la mère à l'enfant est possible entre autre par les mains notamment au début de la vie de l'enfant.

### La voie salivaire

Une étude iranienne [SahebJamee et al., 2009] réalisée sur 22 patients atteints de carcinomes épidermoïdes de la cavité orale, a montré une prévalence de 40,9% d'HPV dans la salive des patients, contre 25% dans la population témoin. Les génotypes viraux retrouvés chez les patients atteints de cancers étaient les suivants : HPV 16 (27,3%), HPV 6/11 (13,6%) et HPV 18 (4,5%). Lors d'une autre étude, menée aux USA, Zhao et al. [2005] ont détecté des HPV (notamment HPV 16) dans la salive de patients atteints de carcinomes épidermoïdes des voies aéro-digestives supérieures. Il semblerait donc que la salive puisse jouer le rôle de vecteur de l'infection lorsque la charge virale est élevée.

### Transmission par vêtements et surfaces de contact

Une voie de transmission par contact de surface infectée ou de sous-vêtements a été rapportée par Czegledy [2001]. Cet auteur a montré la présence d'HPV sur les sous-vêtements de patientes atteintes de lésions HPV-induites. Il a également mis en évidence des taux de récurrences de ces lésions plus importants chez les patientes présentant l'HPV sur les sous-vêtements par rapport à celles qui n'en avaient pas.

La transmission peut également être indirecte, par contact avec d'autres objets (vêtements, serviettes de toilette, draps?) et les surfaces contaminées (piscines et douches) favorisent la propagation des verrues plantaires.

### La voie «médicale»

L'infection pourrait être transmise par les instruments médicaux contaminés par le virus. A cause de sa résistance dans l'environnement, l'HPV persiste sur des surfaces inertes, même après un traitement antiseptique. On a retrouvé 1,6% des pinces à biopsie contaminées par le virus après un traitement à la chlorhexidine, et 4,5% sur des sondes de cryothérapie malgré leur immersion dans un bain d'alcool à 90° durant une heure [Ferenczy et al., 1989]. L'HPV a été, même, retrouvé dans des cabinets de médecin ayant une hygiène rigoureuse [Strauss et al., 2002]. Ces éléments soulignent l'importance de règles d'hygiène strictes surtout dans les centres à haute prévalence d'HPV notamment pour les colposcopes et les autres instruments utilisés en pathologie cervicale, d'où l'intérêt de matériel à usage unique et de l'usage de gants. Il paraît, toutefois, important de souligner

que de nos jours, la majorité des instruments médicaux sont stérilisés dans un autoclave, et que les HPV ne résistent pas à ce traitement [Gavillon et al., 2010].

On retrouve également des particules virales au sein des vaporisations provoquées par les lasers médicaux et disséminées lors des interventions chirurgicales [Charles and Sire, 1971, Ferenczy et al., 1989], qui pourraient exposer le personnel médical mal protégé (absence de masques ou de lunettes de protection) à une éventuelle contamination. En 2003, une infirmière allemande, travaillant quotidiennement au bloc de gynécologie, a développé une papillomatose laryngée qui fut reconnue comme étant directement liée à son exposition répétée aux particules disséminées par les lasers CO<sub>2</sub> [Calero and Brusis, 2003].

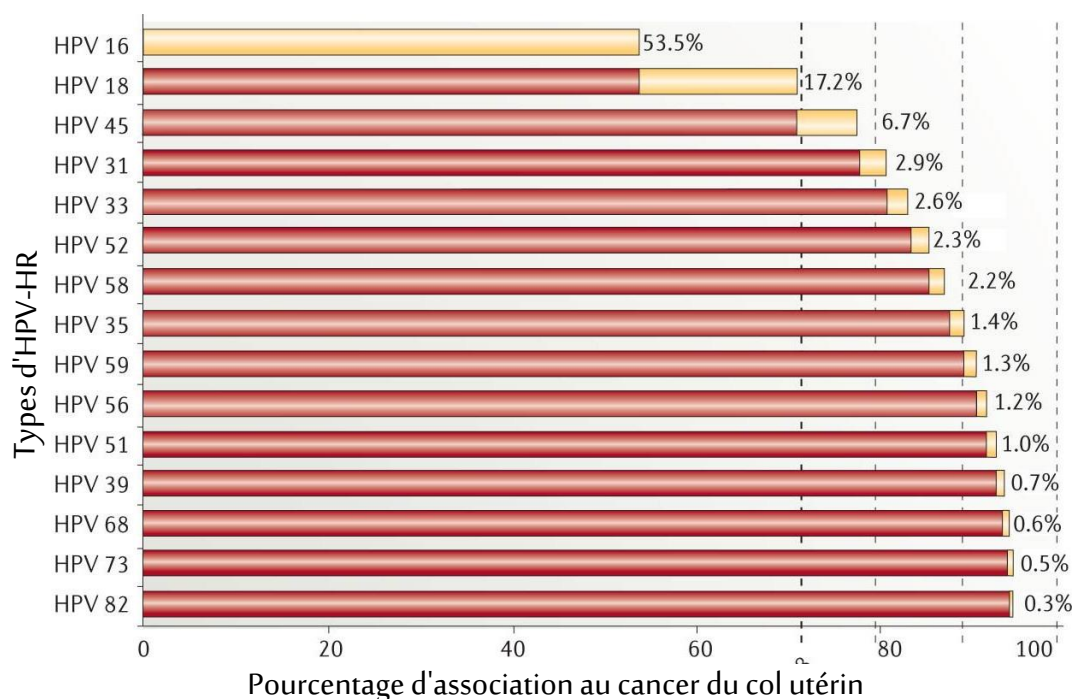
D'autre part, la détection des HPV dans la salive fait penser à la possibilité de présence virale dans les vaporisations extra-buccales servant au refroidissement des instruments rotatifs utilisés en cabinet dentaire. Les chirurgiens-dentistes sont susceptibles d'être contaminés par les HPV de leurs patients s'ils ne portent pas de lunettes de protection et de masques au cours de leur exercice quotidien. Leurs patients courent également le risque d'être contaminés par les instruments utilisés.

## 2.7 Infection HPV sexuelle selon l'âge

L'infection par les HPV génitaux chez les femmes varie en fonction de l'âge. Les taux d'infection les plus importants sont retrouvés avant 25 ans (16,9%). Plus de 60% des primo-infections surviennent dans les cinq années suivant le premier rapport sexuel. Passé la trentaine, la prévalence de l'infection à HPV diminue, se situant entre 5 et 15%. Malheureusement, ce sont le plus souvent des infections persistantes (caractérisées par la présence d'un même type d'HPV sur deux prélèvements cervico-utérins à un an d'intervalle au moins), et par conséquent à plus haut risque d'évolution vers le cancer. Un second pic de fréquence est observé après 45 ans, pour lequel l'hypothèse d'une réactivation virale dans un contexte de bouleversements immunitaires et hormonaux liés à la ménopause a été proposée [Dunne et al., 2007].

## 2.8 Association des types d'HPV avec le cancer du col utérin

Tous les types d'HPV ne sont pas retrouvés avec la même fréquence sur l'ensemble du globe (figure 2.8). Une étude menée dans 22 pays situés en Europe, en Afrique, en Asie et en Amérique [Munoz et al., 2013], a montré une prédominance d'HPV 16 (50 à 60%) dans les cancers invasifs du col de l'utérus, suivie d'HPV 18 (10 à 12%) puis des HPV 31, 45 et 33 (moins de 5% chacun). En Europe et en Amérique du Nord, 70% des cancers du col sont dus aux seuls HPV 16 et 18. En Asie, la prévalence de l'infection par HPV 18 est plus importante et atteint 32%. D'après l'OMS [2005]), la prévalence mondiale des infections à HPV est estimée à 660 millions de personnes. Parmi toutes ces infections à HPV, quel que soit la région considérée, la prévalence est plus élevée pour les HPV à haut risque (66,8%) que pour les HPV à bas risque (27,7%).



**Figure 2.8** – Fréquence cumulée des génotypes d'HPV-HR présents dans les cancers du col et impact potentiel de leurs interventions dans la cancérogenèse [Roden and Wu, 2006]

L'homme intervient, également, dans la chaîne de transmission virale et influence l'épidémiologie de ce cancer [Nyitray et al., 2013]. On estime que 65,2% des hommes asymptomatiques (18-70 ans) sont HPV positifs [Giuliano et al., 2010]. Il semble, néanmoins qu'ils ont une moindre réceptivité ou une meilleure capacité à éliminer le virus. On remarque, en effet, une fréquence plus élevée de la séropositivité à HPV chez les femmes que chez les hommes [Kyo et al., 1994].

## 2.9 Mécanismes de carcinogénèse

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence le pouvoir immortalisant et transformant des protéines précoces E6 et E7 des HPV-HR, les seules protéines à être constamment exprimées dans les tumeurs du col de l'utérus [Vandermark et al., 2012, Persson et al., 2012, Portari et al., 2013]. Ces deux oncoprotéines sont exprimées en quantité importantes après l'intégration du génome viral dans les chromosomes de la cellule hôte. Toutefois cette expression est soumise à un contrôle par des facteurs viraux et cellulaires agissant sur des séquences nucléotidiques situées dans la LCR. Un autre phénomène épigénétique très important, la méthylation des promoteurs viraux, déterminerait l'efficacité de cette expression et conditionne la progression des lésions cervicales vers le cancer invasif.

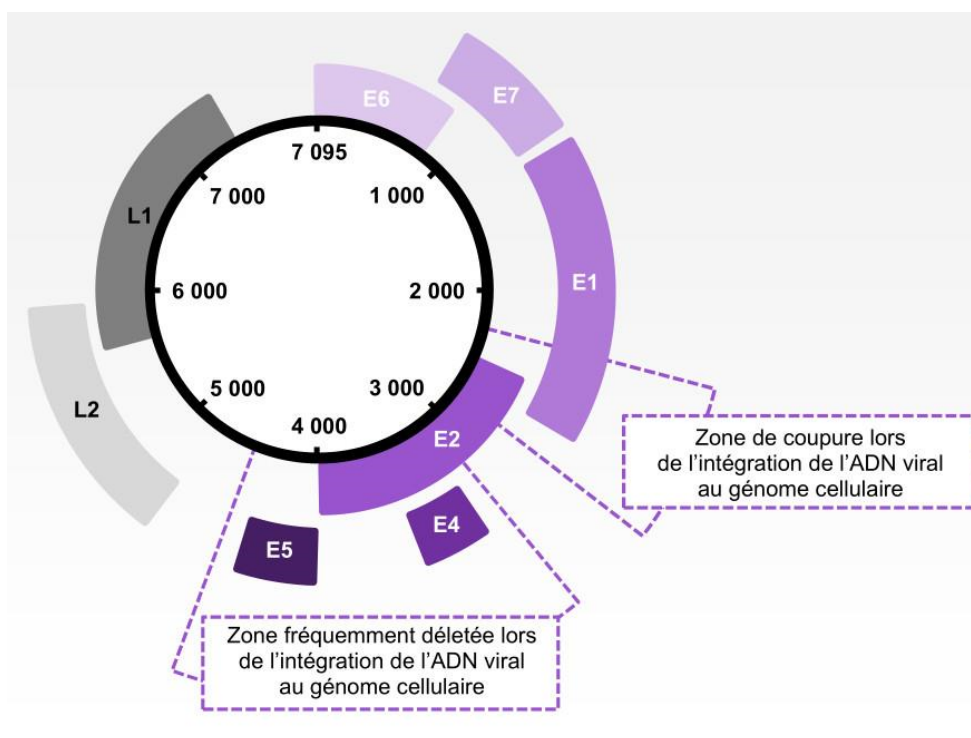
### 2.9.1 Intégration du génome viral

L'intégration du virale doit impérativement passer par la rupture de l'ADN épisomique, le plus souvent, au niveau de la POL E1/E2 [Wang et al., 2013, Xu et al., 2013], ceci arrête la fabrication de nouveaux virions. Elle constitue un événement important du processus de carcinogénèse [Xu et al., 2013]. Les gènes E6 et E7 ne sont plus réprimés car une large délétion fait perdre l'expression de la protéine E2 et E1 (figure 2.9) dont des parties sont éliminées. Il s'en suit une élévation de l'expression des protéines précoces, notamment E6 et E7 [Von Knebel, 2002, Vinokurova et al., 2005, Arias-Pulido et al., 2006].

Etant un phénomène de mutagénèse insertionnelle, l'intégration rompt des cadres de lecture de certains gènes cellulaires. Elle contribue dans le développement d'un phénotype malin sans prendre en compte le rôle joué par les oncoprotéines E6 et E7 [Peitsaro et al., 2002, Syrjänen and Syrjänen, 1999, Glahder et al., 2003]. Plus de 190 sites (dont 75 pour HPV16 seul) d'intégration du génome viral ont été décrit [Xu et al., 2013]. L'intégration de l'HPV se fait le plus souvent dans des sites divers [Wentzensen et al., 2004]. Sastre-Garau et al. [1995] ont montré par des techniques d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes spécifiques marquées et en utilisant la lignée cellulaire SW756 dérivée d'un cancer invasif du col, que des séquences d'HPV18 étaient retrouvées intégrées au niveau de la région chromosomique 12q14-q15. La même région sert à l'intégration du génome d'HPV16 dans les cellules SK-v, dérivant d'une lésion néoplasique intraépithéliale vulvaire (VIN, «Vulvar Intraepithelial Neoplasia»). Ceci fait penser que la région chromosomique 12q14-q15 peut correspondre à un site préférentiel d'intégration de génomes d'HPV dans les cas de tumeurs génitales. D'autres travaux ont signalés l'intégration d'HPV18 de façon préférentielle près du locus de c-myc dans les carcinomes cervicaux [Dürst et al., 1987, Couturier et al., 1991, Bernard et al., 1994, Sastre-Garau et al.,



2000, Ferber et al., 2003, Herrick et al., 2005, Peter et al., 2006]. Ceci suggère que certaines régions sont plus favorables à la recombinaison, appelés CFS («common fragiles sites»).



**Figure 2.9** – Zones de coupure et de délétion du génome HPV lors de l'intégration du génome HPV dans le chromosome cellulaire [Peitsaro et al., 2002].

### 2.9.2 Rôle des oncoprotéines virales

Le délai existant entre l'infection par les HPV-HR et l'apparition d'un cancer peut atteindre plusieurs décennies, témoignant d'une progression multi-étapes des cancers induits par HPV [Steenbergen et al., 2004]. La majorité des cancers invasifs du col de l'utérus comporte des séquences d'ADN d'HPV-HR intégrées au génome de la cellule hôte conduisant à une surexpression des protéines E6 et E7 et à une augmentation des capacités d'immortalisation des HPV [Romanczuk and Howley, 1992, Jeon et al., 1995, Jeon and Lambert, 1995]. Le processus d'intégration induit aussi la stabilisation des messagers viraux d'E6 et E7 [Jeon and Lambert, 1995]. L'expression dérégulée de E6 et E7 entraîne une instabilité génomique qui se manifeste par des aberrations dans la duplication des centrosomes ainsi que par des translocations chromosomiques [Duensing et al., 2001, Duensing and Münger, 2002]. En plus, E6 et E7 induisent de nombreuses perturbations au sein de la cellule hôte. Elles suscitent par conséquent beaucoup d'attention en matière de recherche du fait des applications thérapeutiques qui pourraient en découler. Il semblerait que la protéine E5 serait elle aussi un oncogène.

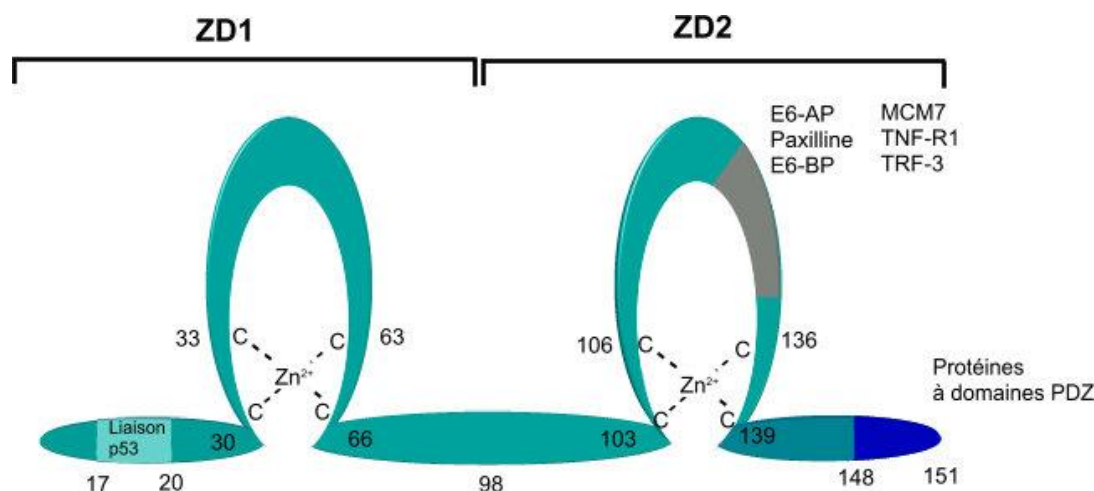


Figure 2.10 – Structure de l'oncoprotéine de l'HPV 16 [Chakrabarti and Krishna, 2003]

### L'oncoprotéine E6

L'oncoprotéine E6 de l'HPV 16 est constituée de 158 résidus amino-acides (aa). Elle comporte quatre motifs CXXC qui s'associent par paire pour former deux domaines de liaison au zinc : ZD1 et ZD2 (figure 2.10) [Barbosa et al., 1989, Grossman, 1989, Nomine et al., 2006]. Sa masse moléculaire est d'environ 19 kDa. Il s'agit d'une protéine essentiellement nucléaire, et se trouve plus particulièrement en périphérie de la chromatine condensée.

La protéine E6 contient quatorze cystéines, dont huit lient le zinc. Elle se replie, par ces deux domaines, E6C et E6N, sur elle-même par formation de ponts disulfures intramoléculaires [Ristiani et al., 2000].

Les modes d'action et les effets cités ci-dessous concernent l'oncoprotéines E6 de l'HPV 16. Ils sont résumés dans ce qui suit.

#### Inactivation de la p53 :

L'activité la plus importante de E6 est sa capacité à dégrader l'anti-oncogène p53 [Scheffner et al., 1990]. Dans le cas du cancer du col utérin, le gène de p53 est rarement muté [Hainaut et al., 1998]. L'inactivation de la p53 serait due à sa dégradation par le système du protéasome (figure 2.11). E6 forme d'abord un complexe avec une ubiquitine ligase, E6AP [Huibregtse et al., 1991, Scheffner et al., 1993]. Cependant E6AP seule n'est pas capable de lier p53 et de le dégrader.

E6 peut également induire des modifications post-traductionnelles de la p53 qui aboutissent à des changements conformationnels de p53 ayant comme conséquence l'inhibition de sa liaison à l'ADN [Thomas et al., 1995].

Le second mécanisme par lequel E6 inhibe la voie de signalisation dépendante de p53 est sa séquestration au sein du cytoplasme [Mantovani and Banks, 2001].



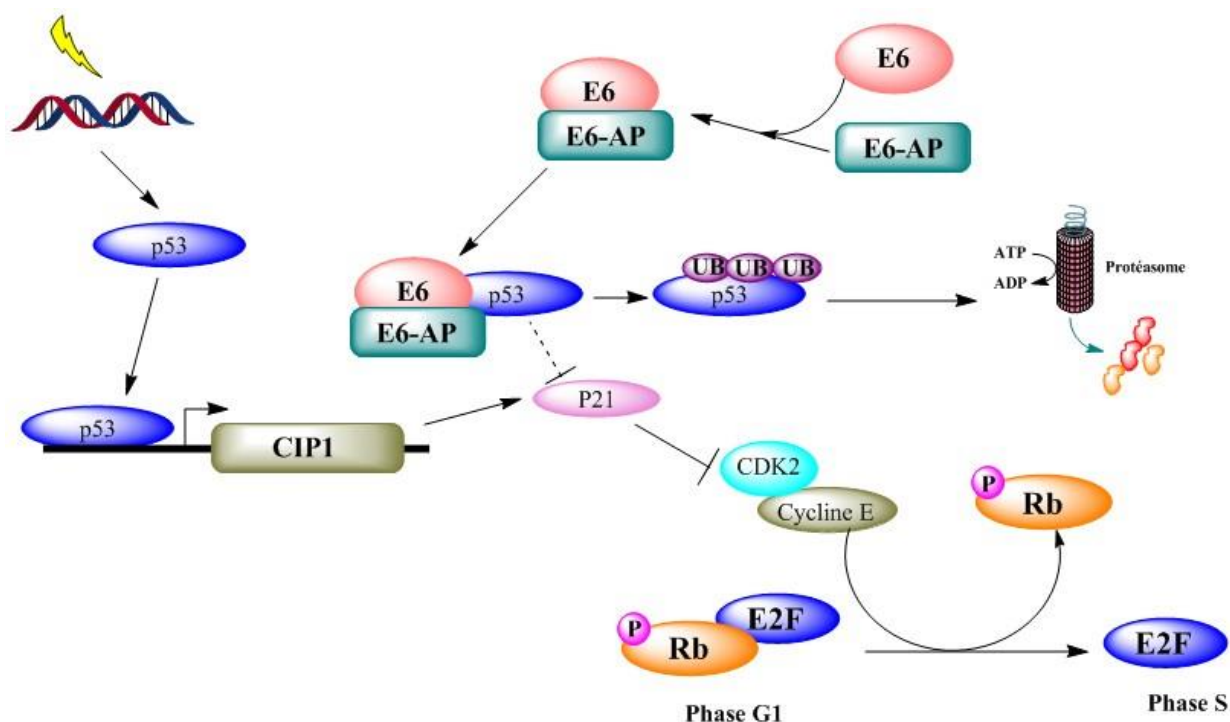


Figure 2.11 – Inactivation de p53 par l'action de l'oncoprotéine E6 du HPV [Scheffner et al., 1993]

Le troisième mécanisme employé par E6 pour inhiber l'activité de p53 est un arrêt de la transactivation induite par p53 grâce à une interaction avec CBP/p300 [Patel et al., 1999] ou hADA3 [Kumar et al., 2002] histone acetyltransférase. Suite à un dommage de l'ADN, p300 acétyle p53, et de ce fait, permet sa liaison à l'ADN [Barlev et al., 2001]. En cas d'infection par HPV-HR, Les protéines E6 lient p300 et inhibe, par conséquent, l'acétylation de p53 [Patel et al., 1999]. Toutes les protéines E6 sont capables de lier p300, mais les oncoprotéines E6 des HPV-HR semblent se lier avec plus d'affinité.

L'oncoprotéine E6 des HPV-HR est également capables d'inhiber l'activation de p53 en interagissant avec le facteur de transcription hADA3 [Kumar et al., 2002].

#### Effet sur l'apoptose :

Parmi les conséquences de la dégradation de p53 par E6 est la réduction de l'apoptose qui permettrait d'éliminer les cellules infectées. Cependant, une activité apoptotique indépendante de p53 peut également avoir lieu. Plus grave, E6 est même capable d'abolir l'apoptose en l'absence de p53 [Pan and Griep, 1995]. En fait, il existe deux mécanismes d'apoptose dans la cellule : un mécanisme intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie et un mécanisme extrinsèque. E6 perturbe les deux mécanismes pour empêcher la mort des cellules infectées. Dans ce cas, la protéine E6 de l'HPV16 est capable de se lier au TNF-R1 et dégrade la protéine adaptatrice de FADD et de la caspase 8 [Filippova et al., 2002, 2004, Garnett et al., 2006].

D'autre part, E6 stimule l'expression d'inhibiteurs des protéines apoptotiques IAP, la survivine et c-IAP2 [Borbely et al., 2006, James et al., 2006].

#### **Effet sur la télomérase :**

La télomérase est responsable du maintien des télomères à l'extrémité des chromosomes. Elle est active au sein des cellules saines uniquement au cours du développement embryonnaire ou au sein des cellules souches alors qu'elle est activée dans 90% des cellules cancéreuses donnant une prolifération continue encore appelée immortalisation répllicative [Kim et al., 1994, Liu et al., 1999]. Ainsi, le raccourcissement des télomères assure la régulation du cycle de vie des cellules saines. En effet, à partir d'un seuil critique de la taille des télomères et en l'absence d'expression de la hTERT, la sénescence répllicative est initiée par des signaux de dommages de l'ADN.

La protéine E6 des HPV-HR peut activer la télomérase [Klingelhutz et al., 1996] dans les cellules épithéliales à n'importe quel "âge". De plus, E6AP jouerait un rôle essentiel dans cette régulation de l'activité hTERT [Gewin et al., 2004]. L'activation de la hTERT se fait par le biais d'interaction entre E6, E6AP, le facteur de transcription c-myc et son cofacteur Max [Veldman et al., 2003]. De plus, E6 est capable d'induire la dégradation d'un répresseur du promoteur de l'hTERT : NFX1-91b [Gewin et al., 2004].

#### **Effet sur la différenciation et la structure épithéliale :**

Une autre caractéristique de la protéine E6 des HPV-HR est sa capacité à inhiber la différenciation des cellules épithéliales qui conduit normalement à la kératinisation et à la mort des cellules. Ainsi, E6 est capable d'interférer avec la différenciation cellulaire chez les souris transgéniques K14-E6 [Pan and Griep, 1995] et cause l'apparition de tumeurs histologiquement non différenciées de l'épithélium indépendamment de p53 [Song et al., 2010].

#### **L'oncoprotéine E7**

Petite protéine d'environ cent résidus (98 aa pour HPV16), E7 présente des homologies de structures avec d'autres protéines virales transformantes telles que E1A de l'Adenovirus ou l'antigène T du virus SV-40 [Levine, 2009]. Comme E1A de l'adenovirus, elle présente trois régions conservées les CR1, CR2 et CR3 (figure 2.12). Ces régions vont contribuer aux activités transformantes des HPV-HR [Edmonds and Vousden, 1989]. Un motif Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) au niveau de la région CR2 est nécessaire et suffisant pour son association avec la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome ou pRb [Munger et al., 1989]. De nombreuses études ont montré que le domaine C-terminal de E7 contiendrait un autre site de liaison à pRb de plus faible affinité [Liu et al., 2006, Patrick et al., 1994]. De plus, des mutants E7 ne présentant pas de CR2 sont incapables de lier les membres de la famille pRb [McLaughlin-Drubin and Munger, 2009]. Ainsi, son

extrémité C-terminale contient un domaine de liaison au zinc composé de deux motifs Cys-X-X-Cys [Barbosa et al., 1989] qui fonctionne comme un motif de dimérisation, *in vitro* [Clemens et al., 1995]. La présence de ces dimères n'a pu être démontrée *in vivo* et leurs rôles potentiels dans l'activation des fonctions protéiques restent inconnus.

**Dégradation de pRB** : E7 s'associe avec la protéine suppresseur du rétinoblastome, pRb et avec les protéines de la même famille p107 et p130 par son motif LXCXE présent au niveau de son domaine CR2 [Munger et al., 1989, Dyson et al., 1992]. Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, le complexe pRb/E2F agit comme un répresseur de la transcription. Dans des cellules saines, la libération de E2F est induite par les kinases dépendantes des cyclines (cdk 4/6 et la cdk2) qui phosphorylent pRb. Comme dans le cas de l'infection par SV-40, E7 va lier préférentiellement pRb lorsqu'il est lié à E2F. Ce dernier se libère et induit de ce fait une perte du contrôle du cycle cellulaire. En revanche à la différence de l'antigène T de SV40, E2F va être libéré non pas suite à la phosphorylation de pRb mais suite à sa dégradation par le système du protéasome [Boyer et al., 1996]. Ce mécanisme ferait intervenir comme ubiquitine ligase, la culline-2 pour l'HPV16 [Huh et al., 2007, Gonzalez et al., 2001]. Les protéines E7 des HPV-HR et des HPV-BR sont capables de lier pRb mais l'affinité sera beaucoup plus faible dans le cas des HPV-BR.

#### Autres activités

##### E7 et instabilité génomique :

Les cellules exprimant l'oncoprotéine E7 vont présenter un nombre de centrosomes aberrant ainsi que des tétasomies [Duensing and Munger, 2003]. Cette instabilité génomique induite par l'expression de E7 semble être indépendante de l'inhibition de la protéine pRb et fait également intervenir E6 [Duensing and Munger, 2003].

##### E7 et hyperprolifération :

De manière indépendante de la liaison aux protéines de la famille pRb, E7 peut également influencer la transcription des gènes induits par le facteur E2F. Ainsi, il a été montré que E7 interagit avec les désacétylases d'histone de classe 1 (HDAC) [Brehm et al., 1999]. Cette interaction se fait par l'intermédiaire de la protéine Mi2- $\beta$ , qui est capable de se lier à des séquences situées dans le domaine en doigt de zinc de E7. L'hyperprolifération cellulaire induite par E7 va être accentuée par l'interaction de son domaine en doigt de zinc avec les facteurs de transcription AP-1 (c-jun, c-fos) [Antinore et al., 1996].

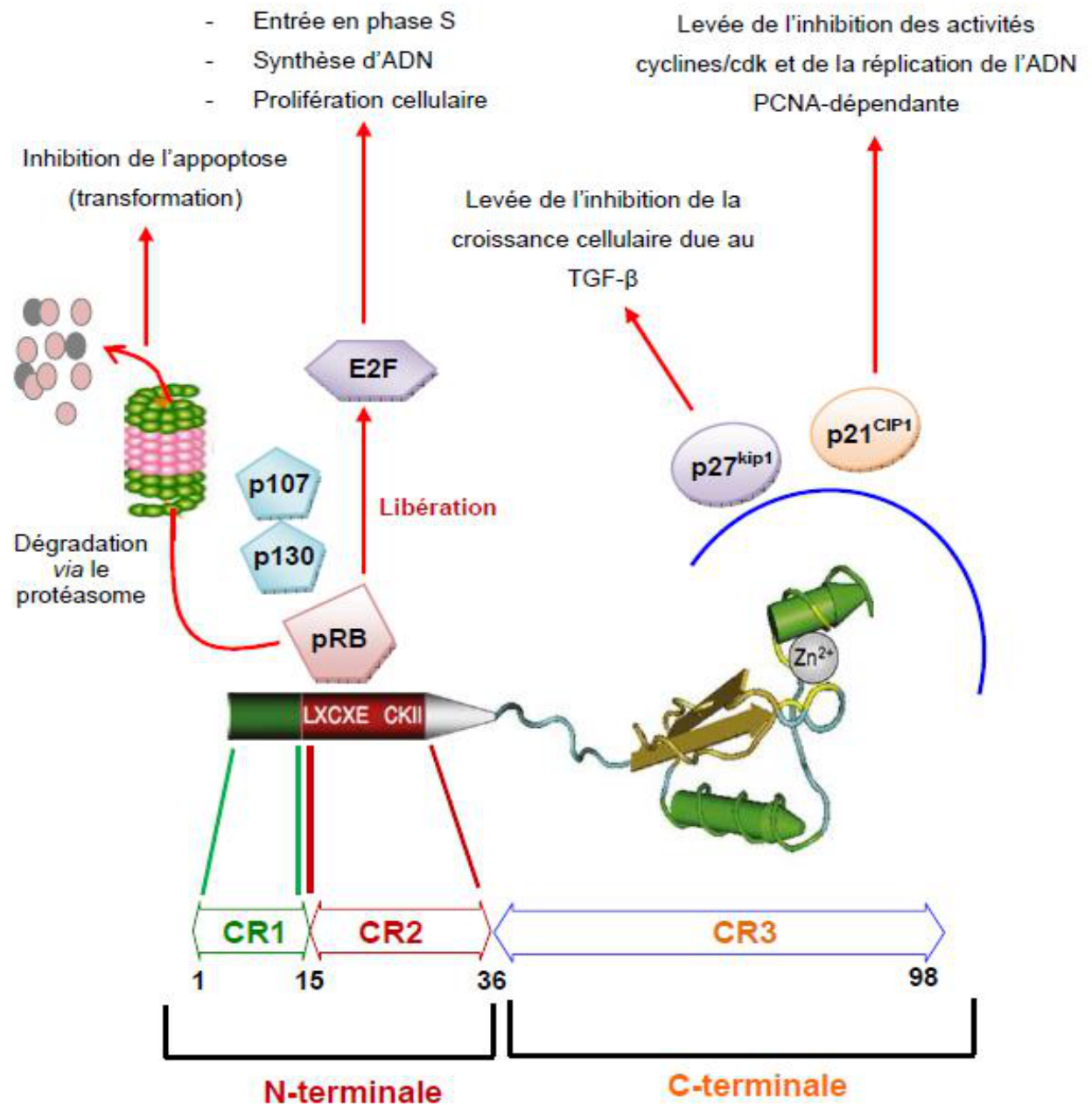


Figure 2.12 – Structure et fonctions de l'oncoprotéine E7 du HPV [Ohlenschläger et al., 2006]

### Rôle de la protéine E5 dans le processus tumoral

L'activation d'EGF-R ("Epidermo growth factor receptor") a pour conséquences une augmentation de la prolifération et la motilité cellulaire et une diminution de l'apoptose, ainsi que dans les phénomènes d'angiogenèse tumorale [Bianco et al., 2007]. En clinique, la surexpression d'EGFR est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à un risque accru de diffusion métastatique [Azuma et al., 2006, Spindler et al., 2006]. Dans la cellule normale, il est régulé négativement (pour être dégradé) afin de régler les cycles cellulaires. Tandis qu'au cours de l'infection, La protéine E5 de l'HPV16 est capable de perturber la voie de dégradation du récepteur à l'EGF. Elle interagit aussi bien avec l'EGF-R pour retarder son endocytose qu'avec une ubiquitine ligase cellulaire, c-Cbl, afin de limiter sa dégradation et perpétuer son ancrage à la membrane plasmique. La combinaison de ces processus aboutit à une augmentation de l'activité de l'EGF-R et une prolongation du signal mitotique [Zhang et al., 2005]. La localisation nucléaire d'EGFR est de mauvais pronostique dans les cancers du sein, des voies aérodigestives supérieures ainsi que dans les cancers de l'ovaire, et pourrait également avoir un impact sur la réponse aux traitements par chimiothérapie et par thérapies ciblées [Lo et al., 2005, Lo, 2010, Lippardi et al., 2011].

La protéine E5 est également capable d'entraîner une diminution de l'expression de la connexine 43, protéine impliquée dans les jonctions communicantes. Ceci est associée à l'augmentation d'expression de la PKC- $\delta$ , qui phosphoryle les connexines. Cette augmentation de phosphorylation des connexines pourrait expliquer l'inhibition de communication intercellulaire [Kivi et al., 2008].

Il a également été rapporté que la protéine E5 est capable, par la voie PKC et les voies de signalisation dépendantes de ras, de stimuler la synthèse des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos [Tsai and Chen, 2003].

### 2.9.3 Régulation épigénétique de l'expression des gènes d'HPV

Les mécanismes épigénétiques, influençant la conformation de la chromatine et joueraient un rôle majeur dans la régulation de la transcription de l'ADN des HPV [Stünkel and Bernard, 1999, Zhao et al., 1999]. Parmi ces mécanismes, la méthylation concerne les dinucléotides CpG. Elle contribue à modifier la conformation des nucléosomes, et modifie ainsi leur interaction avec l'histone désacétylase dans le sens à empêcher la transcription. Il paraît donc très intéressant de comprendre les relations entre la méthylation de l'ADN des HPV et l'expression des gènes viraux, le cycle de vie viral, la persistance du virus et les réponses immunitaires [Hoelzer et al., 2008]. L'état de méthylation des HPV16 et 18 a récemment été étudié [Kalantari et al., 2008, Piyathilake et al., 2011, Sun et al., 2011]. Selon ces auteurs, les gènes L1 de HPV16 et HPV18 seraient hyperméthylés dans le cas des carcinomes, mais ne le sont pas dans le cas des lésions précancéreuses, même si tous

les cas étudiés sont HPV-positifs. Ils ont conclu que l'hyperméthylation des sites CpG situés dans les gènes L1 de HPV16 et HPV18 est corrélée avec la sévérité de la néoplasie cervicale. L'hyperméthylation du gène L1 pourrait donc être utilisée comme un "biomarqueur" de la progression clinique de l'infection HPV-HR lorsqu'elle est détectée dans les lésions néoplasiques.

Les résultats concernant la méthylation de la région LCR des HPV n'étaient pas concluants [Kalantari et al., 2008, Sun et al., 2011]. Ils ne semblent pas corrélés avec la gravité de la néoplasie cervicale [Murakami et al., 2013].

## 2.10 Techniques de dépistage et de diagnostic du cancer du col utérin

Le dépistage des infections à HPV-HR est rarement réalisé en Algérie. Il repose sur le frottis cervical conventionnel. Les tests détectant l'ADN des HPV restent réservés à quelques laboratoires. Ils utilisent un cocktail d'amorces et de sondes spécifiques des HPV-HR. Ces tests HPV peuvent être effectués sur prélèvements muqueux (à la cyto-brosse) et biopsiques. Les méthodes utilisées sont fondées sur l'hybridation moléculaire directe en milieu liquide ou après amplification de séquence cible (PCR).

Certains de ces tests seront détaillés dans la partie expérimentale. Les nouvelles techniques, très sensibles, sont soit des techniques de PCR classiques, soit des techniques de PCR en temps réel. Les amorces utilisées et leurs cibles correspondantes sont présentées dans la figure 2.13.

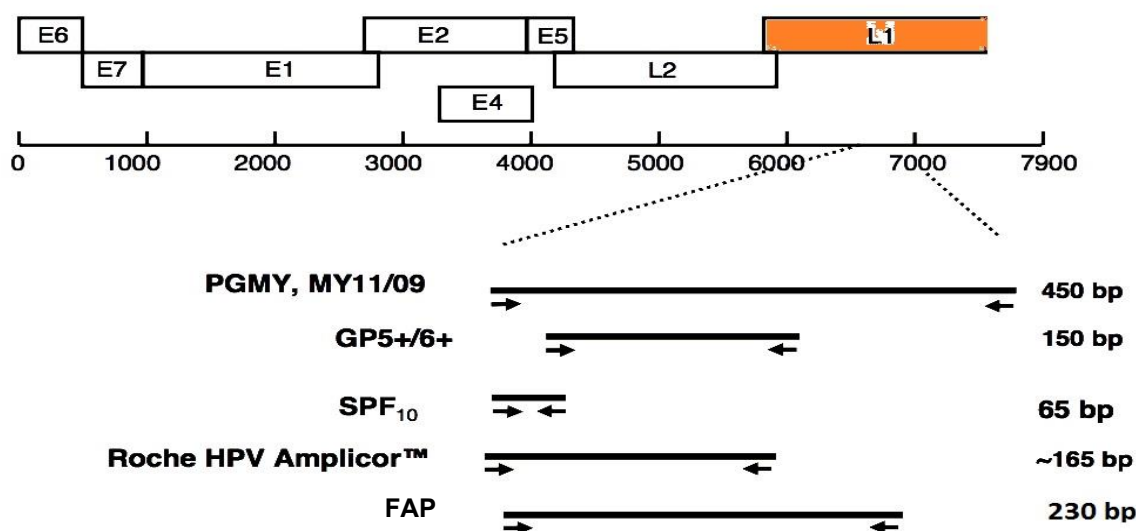


Figure 2.13 – Amorces et cibles correspondantes des techniques PCR utilisées pour détecter et génotyper les HPV. Modifiée de Saini et al. [2009]



## 2.11 Réponses immunitaires anti-HPV

La particularité des HPV est d'avoir pour cible les kératinocytes basaux des épithéliums malpighiens kératinisés ou non. Les antigènes viraux, après leur pénétration dans le kératinocyte, peuvent alors être présentés à la surface de ces cellules sous forme de peptides de petite taille (8 à 11 aa) en association avec les molécules HLA de classe I ou de peptides de plus grande taille (13 à 25 aa) en association avec les molécules HLA de classe II présentes sur les kératinocytes infectés [Monsonogo, 2007].

La stimulation du système immunitaire lymphocytaire T, initialement naïf vis-à-vis des HPV, passe obligatoirement par une présentation de l'antigène aux lymphocytes T, par des cellules présentatrices professionnelles de l'antigène de la lignée des cellules dendritiques (CD) incluant les cellules de Langerhans présentes dans les épithéliums malpighiens. Les cellules de Langerhans ont la propriété de pouvoir fixer les particules virales entières grâce aux récepteurs aux HPV qu'elles présentent à leur surface [Price et al., 1997, Frazer et al., 1999]. Elles ont aussi la propriété d'internaliser des particules virales comme cela a été montré *in vitro* pour les cellules dendritiques en présence de particules virales vides [Da Silva et al., 2001, Lenz et al., 2001]. Les cellules de Langerhans ont ensuite la capacité de pouvoir migrer vers les organes lymphoïdes drainant les sites concernés et transportent alors soit des particules virales entières soit des corps apoptotiques de kératinocytes.

Les cellules de Langerhans, après avoir capté l'antigène, subissent des transformations et l'expression de CCR7 à leur surface leur permet de migrer sous l'attraction de la chimiokine MIP-3 bêta [Charbonnier et al., 1999]. Une fois dans ces organes lymphoïdes, les cellules de Langerhans elles-mêmes ou bien via d'autres cellules dendritiques présentent ces antigènes à la fois aux lymphocytes T CD4+ et T CD8+. Les lymphocytes T ainsi stimulés acquièrent la propriété à leur tour, via un jeu de synthèse de chimiokines et d'expression de molécules de surface, de migrer grâce à la circulation sanguine cette fois, vers les épithéliums infectés et d'aller au contact des kératinocytes infectés. Le rôle des lymphocytes T est de détruire les kératinocytes infectés, soit par cytotoxicité directe, soit par l'interaction de la molécule Fas-L présente sur les lymphocytes T et de la molécule Fas présente sur les kératinocytes infectés ou tumoraux, soit encore grâce à la synthèse par les lymphocytes T de cytokines comme le TNF- $\alpha$ . La reconnaissance des kératinocytes infectés par les lymphocytes T activés est favorisée par la synthèse d'IFN- $\gamma$  qui permet d'augmenter l'expression de molécules HLA de classe I et II à la surface des kératinocytes [Monsonogo, 2007].

Il faut distinguer entre l'immunité basée sur l'induction d'anticorps neutralisants, dirigés contre les protéines structurales L1 et L2, qui s'opposent à la pénétration du virus dans les cellules cibles et des réponses immunitaires contre l'extension des lésions existantes et leur transformation, dirigée, non pas contre les protéines de structure L1 et L2,

mais principalement contre les protéines précoces du virus. Toutefois, au cours de l'infection naturelle les anticorps neutralisants qui sont détectés à des taux faibles sont plus généralement le reflet de l'infection que de véritables acteurs qui s'opposent à la pénétration du virus dans les cellules cibles [Mougin et al., 2009]

## 2.12 Echappement des HPV aux réponses immunitaires

Les lymphocytes T ont parfois des difficultés à être stimulés par les antigènes viraux (antigènes viraux à l'intérieur du kératinocyte, absence de virémie et mauvaise présentation au système immunitaire) et surtout la difficulté de mettre en évidence *in vitro* cette réponse immunitaire à partir des lymphocytes périphériques circulants (PBMC), l'essentiel des réactions s'effectuant *in situ*, au site de l'infection.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> jouent un grand rôle dans la régression spontanée des lésions à HPV. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont essentiels pour cette régression et ne sont plus détectables lorsque les lésions évoluent vers des formes agressives. L'immunité vis-à-vis d'HPV 16 est au moins aussi efficace que celle dirigée contre les HPV non oncogènes.

### 2.12.1 Effet de E6 sur l'immunité innée

: E6 a été montrée comme modulateur de la transcription de nombreux gènes dont les produits sont impliqués dans la réponse immune innée. Elle interagit avec deux protéines qui sont des partenaires de la réponse antivirale innée : l'IRF3 (Interferon Regulatory Factor) [Ronco et al., 1998] et le TLR-9 (Toll Like Receptor). L'interaction d'E6 avec l'IRF3 inhibe ses capacités de transactivation et empêche l'induction de l'IFN- $\beta$ . De même, l'expression exogène d'E6 et E7, inhibe la transcription de TLR-9 ce qui conduit à une perte de la voie de signalisation [Hansan, 2007].

### 2.12.2 Effet de E7 sur l'immunité

E7 peut influencer la réponse immunitaire inflammatoire en s'associant avec l'interféron  $\alpha$  via IRF-1 (Interferon Regulatory Factor) [Park et al., 2000]. Elle va également bloquer la transduction du signal aux interférons par son interaction avec p48 [Barnard and McMillan, 1999].

### 2.12.3 Effet de E5 sur l'immunité

Enfin, la protéine E5 est impliquée dans le défaut d'apprêtement des oncogènes viraux observé dans les lésions associées aux HPV haut risque [Ashrafi et al., 2006]. E5 diminue l'expression de la calnexine, impliquée dans la formation du complexe CMH-I (Complexe



Majeur d'Histocompatibilité I), et de la protéine TAP-1 (Transporter Associated Protein-1) qui assure la migration du complexe jusqu'à la membrane plasmique [[Leykauf et al., 2004](#)]. Ainsi, E5 entraîne la rétention du complexe CMH-I dans l'appareil de Golgi et inhibe sa localisation à la membrane plasmique [[Ashrafi et al., 2006](#)]. Cette inhibition de présentation de l'antigène favorise l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par HPV qui ne sont plus reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques.

---

## CHAPITRE 3

---

# L'EPSTEIN-BARR VIRUS

### 3.1 Historique

Pour la première fois, en 1958, le chirurgien anglais Denis Burkitt a décrit une tumeur du maxillaire supérieur chez les enfants africains associée à une prolifération de lymphocytes B. Depuis lors ce lymphome porte son nom (Lymphome de Burkitt ou LB). Il s'agit de la tumeur infantile la plus fréquente dans certaines régions d'Afrique de l'Est. Inspiré par les travaux de Burkitt, en 1961 Anthony Epstein a entrepris la recherche de ce possible virus par tentatives d'établissement de lignées cellulaires à partir d'explants de LB. En 1964, Epstein, Achong et Barr ont identifié par microscopie électronique des particules de type herpesvirus dans les lignées cellulaires [Epstein et al., 1964].

On a commencé à détecter, à partir de 1970, le génome viral dans les cellules malignes de LB et de carcinomes indifférenciés du nasopharynx (NPC), ce qui confirme l'association de ce virus à des cancers chez l'homme [Henle and Henle, 1970]. Sa capacité à immortaliser les lymphocytes B *in vitro* en lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) et à provoquer des lymphomes chez le primate est alors démontrée et conforte l'EBV dans son rôle d'agent oncogène chez l'homme. Depuis lors, l'EBV a été impliqué dans de nombreuses pathologies bénignes ou malignes d'origine épithéliale ou lymphoïde [Baer et al., 1984].

### 3.2 Taxonomie

L'EBV (ou HHV-4, pour Human HerpesVirus 4) appartient à la famille des Herpesviridae humains qui compte 8 membres [McGeoch et al., 1995]. Il fait partie de la sous-famille des Gamma Herpesviridae et du genre Lymphocryptovirus (figure 3.1).

Les différentes souches d'EBV peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2) sur

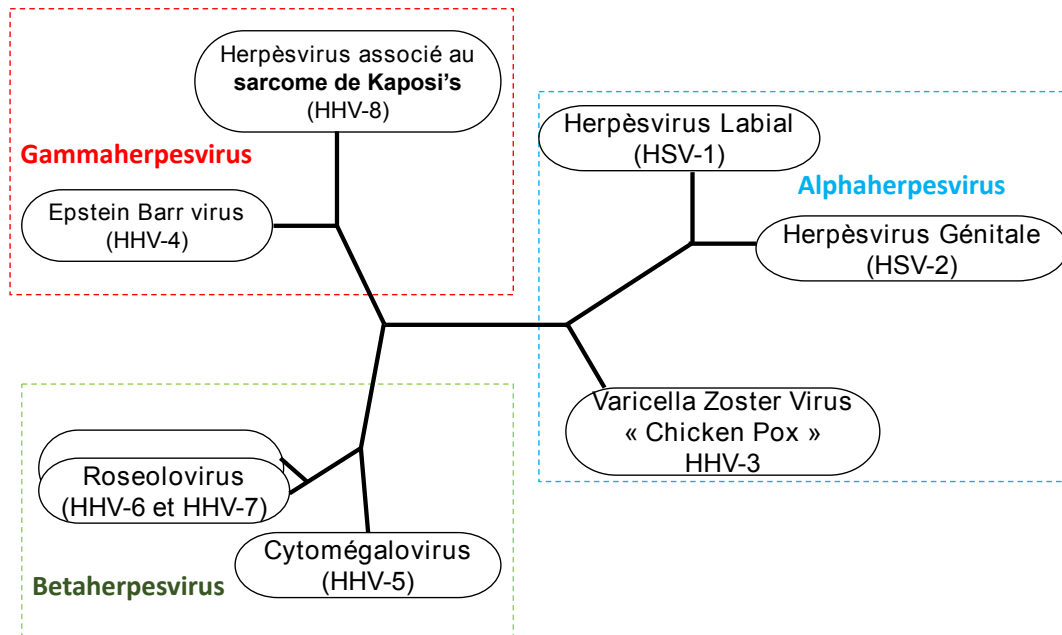


Figure 3.1 – Taxonomie des Herpesviridae : l'EBV appartient au genre Gammaherpesvirus [Moore et al., 1996]

la base du polymorphisme de leurs gènes EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), 3A, 3B et 3C. Des études de séroprévalence ont montré que la souche EBV-1 est majoritaire dans les pays occidentaux, alors que la souche EBV-2 ne prévaut que dans certaines zones d'Afrique Equatoriale et de Nouvelle-Guinée [Macswen and Crawford, 2003].

### 3.3 Epidémiologie de l'EBV

L'EBV est présent dans plus de 95% de la population adulte grâce à une infection latente des lymphocytes B et d'une production virale dans la salive. La majorité des primo-infections touchent les enfants et sont généralement asymptomatiques. Cependant, lorsque la primo-infection a lieu plus tard, chez l'adolescent ou l'adulte jeune, comme c'est le cas dans les pays développés, elle induit une affection généralement bénigne, la mononucléose infectieuse [Young, 2008]. Il s'agit d'une maladie lymphoproliférative B généralisée et transitoire, qui se traduit sur le plan immunologique par une augmentation du nombre de lymphocytes B infectés par l'EBV dans le sang périphérique et par une expansion oligoclonale massive de lymphocytes T CD8+ dirigés contre l'EBV [de Thé et al., 1975].

La transmission du virus se fait généralement par contact avec les sécrétions oropharyngées qui contiennent les particules virales infectieuses. La transmission est également possible après transplantation d'organe ou greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) par les lymphocytes B infectés par l'EBV présents dans le sang des donneurs. Cette infection constitue un facteur de risque de syndrome lymphoprolifératif

post-transplantation. Toutefois, à la différence des lymphomes survenant après greffe de CSH, les cellules tumorales des lymphomes post-transplantation d'organe dérivent en général des cellules B du receveur [Orazi et al., 1997, Swinnen, 1999].

### 3.4 Structure du virion

Le virion d'Epstein-Barr possède une structure commune à tous les Herpes virus, à savoir, du centre vers la périphérie :

- un nucléoïde qui contient l'ADN génomique viral linéaire double brin de 172 kpb ;
- un cœur protéique fibrillaire autour duquel serait enroulé l'ADN viral. Son existence est largement remise en cause pour de nombreux herpèsvirus comme HSV1, HCMV, KSHV [Liu et al., 2007] ;
- une capside icosaédrique (20 faces et 12 sommets) ayant un diamètre de 100-120 nm et comportant 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères)
- un tégument qui est composé de nombreuses protéines virales et cellulaires. Ce tégument n'a pas de structure particulière, même si quelques structures fibrillaires peuvent y être retrouvées (figure 3.2).
- une enveloppe constituée d'un double feuillet lipidique dérivé des membranes de la cellule hôte au niveau desquelles le virus a exprimé ses antigènes de membrane.

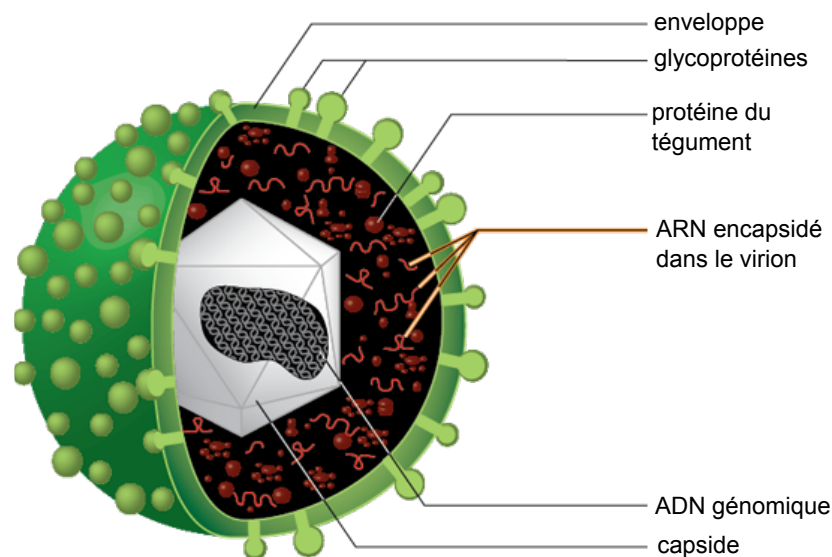


Figure 3.2 – Structure du virion d'Epstein-Barr (EBV) [Cullen, 2010]

L'expression des glycoprotéines d'enveloppe, qui appartiennent aux antigènes de membrane, confère au virion un aspect "spiculé". C'est grâce à l'une d'entre-elles, la gp350/220 que le virus se fixe aux cellules hôtes via son récepteur CD21 (ou CR2, récepteur d'un composant du complément).

## 3.5 Organisation du génome viral

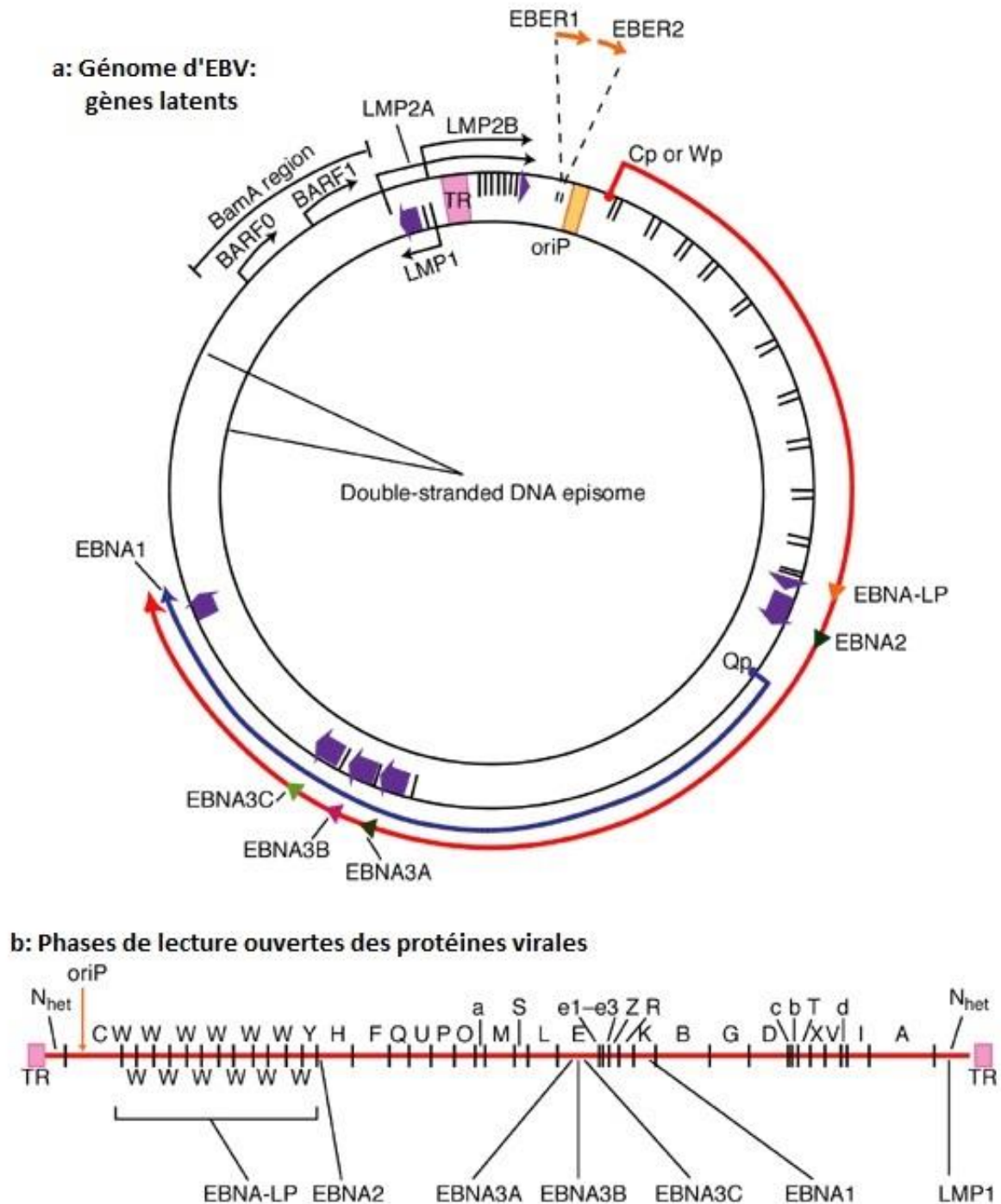
Le génome d'EBV est constitué d'un ADN bicaténaire de 172 kpb. Il comporte des séquences terminales répétées (TR) d'environ 500 pb en tandem direct à ses deux extrémités, ainsi qu'une importante zone de répétition interne (Internal Repeat 1 ou IR1) séparant le génome en deux régions uniques longue et courte (respectivement, "Long Unique region" ou UL et "Short Unique region" ou US) (figure 3.3).

Le nombre des TR varie de 4 à 12. Ces séquences terminales permettent notamment au virus de circulariser son génome pour devenir un épisome. Sous cette forme, l'EBV maintient son génome de façon stable dans les cellules infectées sans avoir à l'intégrer au génome de l'hôte.

L'IR1 est quant à elle constituée de 7 à 12 répétitions en tandem de séquences mesurant environ 3 kpb chacune. Les zones US et UL qu'elle délimite mesurent respectivement environ 15 et 150 kpb. Au sein de l'UL, d'autres répétitions en tandem ont été décrites : IR2, 3 et 4. Des répétitions en tandem de modules de 125 pb et 103 pb ont été respectivement observées pour l'IR2 et l'IR4. L'IR3 est une séquence où trois triplets GGG, GCA et GGA sont réitérés sur 700 pb. Ainsi, la région UL comporte 4 zones uniques appelées U2 à U5 (U1 servant à décrire US). Enfin, deux séquences identiques mesurant 1 kb ont été localisées à 2 endroits différents du génome viral, l'une au contact d'IR2 (séquence DL) et l'autre au contact d'IR4 (séquence DR). C'est dans ces séquences que se trouvent les origines de réplication lytique du virus (*ori lyt*). On retrouve également une origine de réplication latente (*Ori p*) située au niveau de U1.

Le génome a plus de 108 phases ouvertes de lecture (POL). Les POL, les gènes, les sites de régulation ou de transcription sont fréquemment référencés par rapport à des fragments du génome obtenus après digestion par l'enzyme de restriction BamHI. Chaque fragment est nommé par une lettre. Le sens de lecture a été arbitrairement fixé ainsi : sur le génome linéaire, de U1 vers U5 représente le sens R (Rightward) et de U5 vers U1, le sens L (Leftward). Ainsi, par exemple, le gène codant la protéine LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) est parfois appelé BNLF-1 parce qu'il se trouve sur le fragment BamHI N, qu'il est transcrit dans le sens L et qu'il s'agit de la première POL (F-1).

Il existe entre les différents isolats d'EBV un polymorphisme au niveau du nombre des séquences en tandem dans les TRS. Un polymorphisme s'observe également au niveau des IRS et de plusieurs gènes dont BYRF-1 (codant la protéine EBNA-2), BZLF-1 (codant la protéine Zta) et BNLF-1 (codant la protéine LMP-1, Latent Membrane Protein-1).



**Figure 3.3** – Organisation du génome de l'EBV [Young and Rickinson, 2004] (a) Schéma montrant l'organisation et la transcription des gènes latents de l'EBV sur l'ADN viral double brin épisomique. L'origine de réplication de l'épisome (oriP) est indiquée par le petit rectangle orange. Les grosses flèches violettes représentent les exons des protéines latentes (EBNAs 1, 2, 3A, 3B et 3C, et EBNA-LP, PMT1, 2A, 2B) et la direction dans laquelle elles sont transcrites. Les flèches oranges indiquent le sens de la transcription des EBER (1 et 2). La flèche rouge, à l'extérieure, représente les transcriptions de la latence III. La flèche bleue, plus courte, à l'intérieure, représente la transcription de EBNA-1 à partir du promoteur Qp pendant la latence I et II. (b) Schéma montrant la carte de restriction BamHI du génome linéaire ainsi que l'organisation des cadres ouverts de lecture des protéines latentes de l'EBV (prototype B95.8). Les fragments BamHI sont nommés en fonction de la taille, A étant le plus grand. Les lettres minuscules représentent les plus petits fragments.

### 3.6 Les latences virales

Il est possible, *in vitro*, d'immortaliser des lymphocytes B par l'EBV et d'obtenir des lignées cellulaires lymphoïdes (LCL). Ces dernières sont très peu permissives à la réplication virale (cycle lytique) et le virus s'y maintient dans un état dit "de latence". Le statut de latence virale repose sur deux phénomènes très interdépendants.

- Le premier phénomène est la répression du cycle lytique et le maintien du génome viral dans le noyau sous forme d'épisome.
- Le deuxième phénomène, essentiel au maintien de la latence virale, est l'expression des gènes dits "de latence".

Ces gènes ont des fonctions variées. Certains d'entre eux donnent des produits ayant des propriétés immortalisantes des lymphocytes B infectés. Selon les gènes de l'EBV exprimés, il existe trois types de latence (tableau 3.1).

**Tableau 3.1** – Modèles d'expression des gènes latents de l'EBV selon les différentes maladies associées à l'EBV [Middeldorp et al., 2003]

| Malignité associée à EBV                          | Profile de latence | Association avec l'EBV                                  | Expression génétique virale                                       | Traitement EBV spécifique en essais cliniques                                        |
|---------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Lymphome post transplantation (précoce et tardif) | Latence III        | Précoce : majorité EBV+<br>Tardif : moins associé à EBV | Précoce : EBNA1-6, LMP1-2.<br>Tardif : EBNA2-6 (+/-), LMP1 (+/-). | Administration thérapeutique ou préventive de LT anti-EBV autologues ou hétérologues |
| Lymphome de Burkitt                               | Latence I          | Presque 100% dans les régions endémiques                | EBNA1                                                             | Non testé                                                                            |
| Lymphome d'Hodgkin                                | Latence II         | 30 à 50%                                                | EBNA1, MLP1-2                                                     | Administration thérapeutique de LT anti-EBNA1/LMP1-2. Vaccination anti-EBNA1/LMP     |
| Lymphome à cellules NK/T                          | Latence II         | Presque 100% dans les régions endémiques                | EBNA1, LMP2, LMP1 (+/-)                                           | Non testé                                                                            |
| Carcinome du nasopharynx                          | Latence II         | Presque 100% dans les régions endémiques                | EBNA1, LMP1-2                                                     | Administration thérapeutique de LT anti-EBNA1/LMP1-2. Vaccination anti-EBNA1/LMP     |
| Carcinome gastrique                               | Latence I/II       |                                                         | EBNA1, LMP2                                                       | Non testé                                                                            |

Par rapport au nombre total de gènes présents dans le génome d'EBV, il y a peu de gènes de latence. On compte 11 gènes de latence, regroupés en 3 principales familles :

- les gènes qui codent les 6 protéines EBNA,
- les gènes qui codent les 3 protéines LMP
- les gènes qui codent les petits ARN EBER (EBV Encoded RNA) et BART (figure 3.4).

L'expression des protéines immortalisantes et/ou de transformantes de l'EBV influencent la machinerie cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées.

### 3.6.1 Les différents programmes de latence

Le profil d'expression des gènes de latence n'est pas identique dans tous les contextes cellulaires d'infection par EBV. On distingue ainsi 4 types (0, I, II et III) de latence en fonction des différents gènes qui sont exprimés. Il faut noter que les ARN EBER-1 et 2 s'expriment dans chacune des latences. Quant aux ARN BART, ils sont exprimés au moins en partie lors des latences I, II et III mais, aucune donnée n'existe sur leur statut durant la latence 0.

#### latence de type I

La latence de type I est celle que l'on trouve dans le lymphome de Burkitt. Elle se caractérise par la seule présence de la protéine EBNA-1 et un phénotype cellulaire particulier. En effet, les cellules expriment à leur surface les marqueurs CD10 et CD77, et peu ou pas d'antigènes d'activation cellulaire et de molécules d'adhésion [[Gregory et al., 1990](#)].

#### latence de type II

La latence de type II (appelée aussi programme par défaut) est caractéristique du carcinome du nasopharynx (NPC), de la maladie de Hodgkin et de certains lymphomes T/NK et se caractérise par l'expression des protéines EBNA-1, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B.

#### latence de type III

La latence de type III (appelée aussi programme de croissance) se retrouve dans les LCL transformées in vitro par EBV et dans les lymphoproliférations des sujets immuno-déprimés. Elle s'accompagne de l'expression des 9 protéines de latence EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B.

Ces trois types de latence sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à l'EBV. Cependant, en dehors de toute pathologie tumorale, ces trois programmes de latence semblent être caractéristiques des différentes étapes franchies par le virus lors d'une infection asymptomatique. Ainsi, chez les personnes infectées de



façon persistante et asymptomatique, le réservoir viral majeur est une partie des lymphocytes B mémoires de l'hôte, où l'EBV se maintient en latence de type 0 (appelée aussi programme latent). Durant cette latence, les EBER sont transcrits mais aucune protéine virale n'est exprimée [Hochberg et al., 2004].

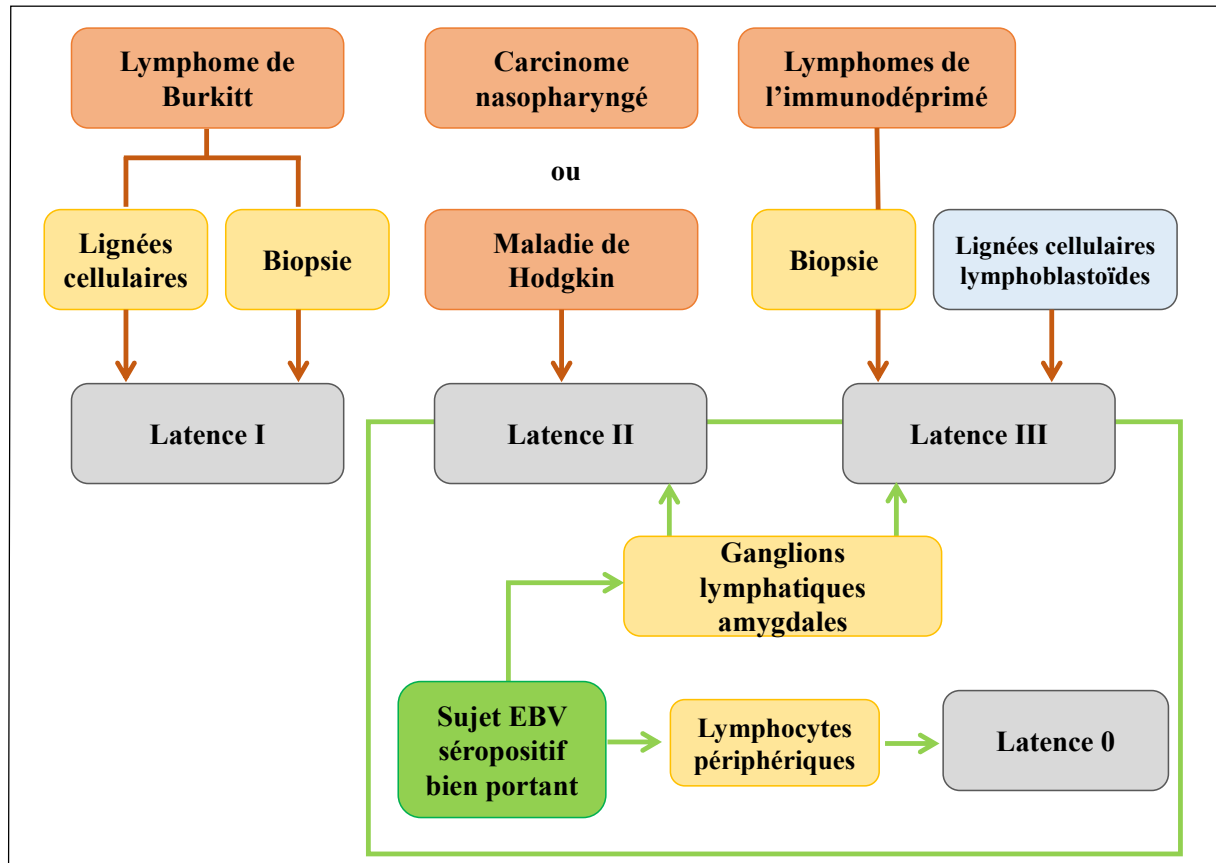


Figure 3.4 – Les différents programmes de latences de l'EBV selon les tissus et la maladie associée [Masy et al., 2002]

### 3.6.2 Différents produits de gènes de latence

#### La famille des EBNAs

Dans un premier temps, l'expression des protéines EBNA (EBV Nuclear Antigen) est initiée à partir du promoteur Wp puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, c'est le promoteur Cp qui prend le relais.

**EBNA-1** Les transcrits EBNA-1 sont initiés à partir du promoteur Wp, au moment de la circularisation du génome viral [Schaefer et al., 1997]. La protéine correspondante est retrouvée dans tous les types de latence et, de ce fait, dans toutes les pathologies associées à EBV. Elle permet la réplication et le maintien du génome viral dans les cellules en prolifération [Wu et al., 2002].

La protéine EBNA-1 peut également agir en tant qu'activateur transcriptionnel, sur quelques promoteurs viraux et cellulaires [Hebner et al., 2003]. A son tour, elle est régulée par la phosphorylation de ses sérines pour pouvoir à la fois transactiver et maintenir le génome viral [Kitamura et al., 2006, Shire et al., 2006].

D'autres études montrent l'importance d'EBNA-1 pour la transformation cellulaire. En effet, des souris transgéniques pour EBNA-1 présentent une forte incidence de lymphomes B [Sheu et al., 1996, Wilson et al., 1996]. De plus, indépendamment de sa fonction de maintien du génome viral, EBNA-1 semble impliqué dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par EBV quel que soit le type de latence exprimée par le virus [Kennedy et al., 2003].

**EBNA-2 et EBNA-LP** : Les protéines EBNA-2 et EBNA-LP sont nucléaire. Elles sont parmi les premières protéines virales exprimées dans les lymphocytes B infectés par l'EBV. Ces deux protéines permettent aux lymphocytes B quiescents de passer de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire, notamment grâce à l'activation de la cycline D2 [Sinclair et al., 1994, Zimmer-Strobl and Strobl, 2001], mais elles permettent également d'induire l'expression d'autres gènes viraux, notamment LMP-1 [Peng et al., 2005]. EBNA-2 et EBNA-LP sont essentielles à l'immortalisation cellulaire induite par EBV.

Parallèlement, l'expression de la protéine EBNA-2 est associée à une diminution de l'expression de la chaîne lourde des immunoglobulines [Yue et al., 2006].

L'activité de la protéine EBNA-LP est également régulée par sa phosphorylation, dépendante du cycle cellulaire [Kitay and Rowe, 1996]. Elle est co-localisée, dans le noyau, avec les protéines pRb, p53 et p14ARF (qui inhibe la dégradation de p53) [Jiang et al., 1991, Szekely et al., 1993, Inman and Farrell, 1995, Kashuba et al., 2003]. Ainsi, il a été suggéré que la protéine EBNA-LP pourrait bloquer l'action de p14ARF et donc diminuer le niveau de la protéine p53 [Ling et al., 2005].

**Les EBNA-3** Les protéines EBNA-3 (EBNA-3A, -3B et -3C) régulent l'expression de certains gènes viraux [Krauer et al., 1998]. Ainsi, EBNA-3C induit l'expression de la protéine virale LMP-1, de CD21 [Lin et al., 2002]. Elle est également capable de supprimer l'arrêt en G2/M, normalement observé après l'action d'agents génotoxiques. EBNA-3C pourrait ainsi contribuer à l'accumulation de dommages sur l'ADN [Wade and Allday, 2000]. Moins étudiée, la protéine EBNA-3A semble également une protéine transformante.

Contrairement aux protéines EBNA-3A et EBNA-3C, la protéine EBNA-3B ne semble pas essentielle à la transformation des lymphocytes B in vitro [Tomkinson and Kieff, 1992, Tomkinson et al., 1993].

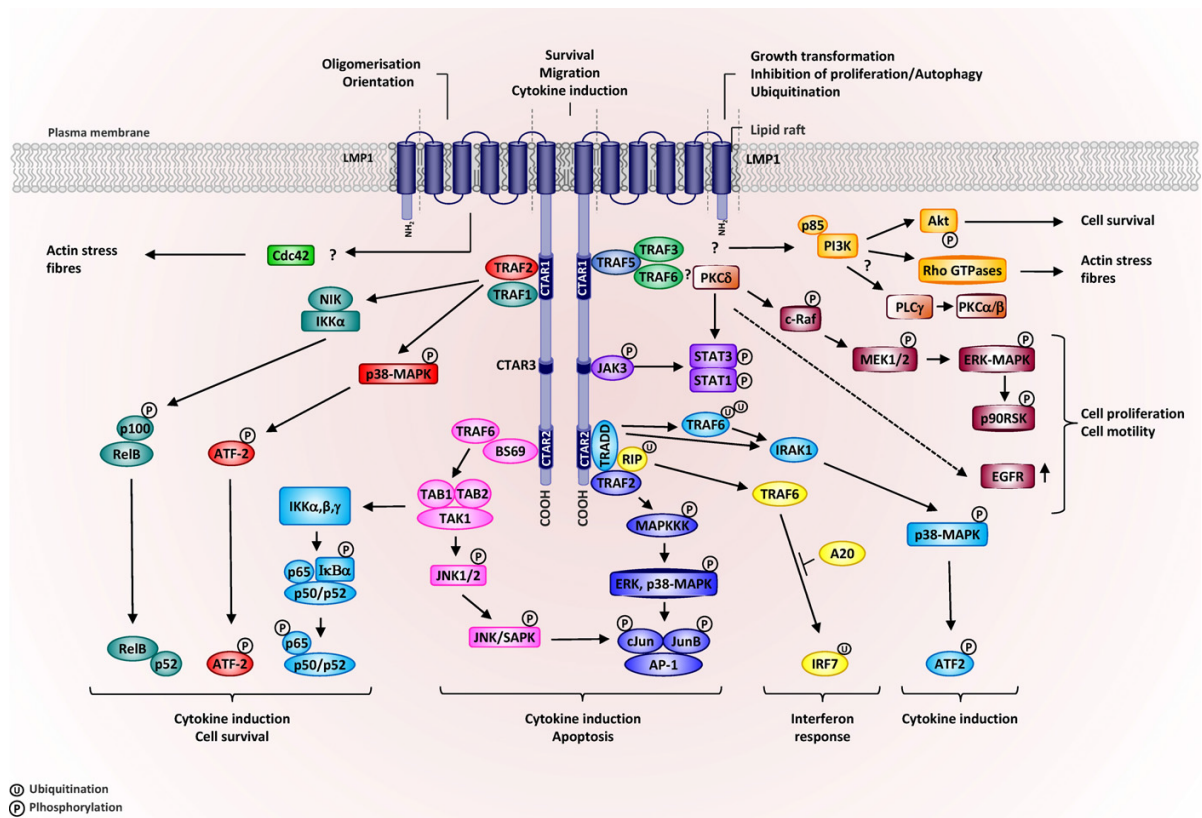


Figure 3.5 – Structure et fonctions de LMP-1 [Masy et al., 2002]

## La famille des LMPs

**LMP-1** : Le transcrit correspondant à la protéine LMP-1 est le plus abondant du cycle de latence (50 à 60 copies par cellule dans la latence de type III). LMP-1 est une protéine de membrane ayant une demi-vie courte (environ 3h). Elle est fortement associée au cytosquelette et forme des agrégats dans la membrane plasmique. Elle comprend 3 domaines : un domaine N terminal (Nt) cytoplasmique de 24 aa, un domaine transmembranaire de 162 aa composé de 6 hélices  $\alpha$  et un domaine C terminal (Ct) cytoplasmique de 200 aa. Les domaines Nt et transmembranaire sont responsables de l'ancrage de LMP-1 à la membrane et de son agrégation constitutive. Le domaine Ct cytoplasmique est, quant à lui, impliqué dans l'activation des voies de signalisation cellulaire induites par LMP-1 (figure 3.5).

LMP-1 est considéré comme l'oncogène majeur de l'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP-1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par l'EBV [Young et al., 2000]. La région Ct est responsables de l'activation des voies p38 et JNK/AP1 et de l'activité NF- $\kappa$ B induite par LMP1.

**Les LMP-2** : Les ARNm de LMP-2A et LMP-2B sont transcrits à partir du même gène. Ainsi, la protéine LMP-2B est une version tronquée de LMP-2A à laquelle il manque tout

le domaine amino-terminal cytosolique. LMP-2A joue un rôle important dans le maintien à l'état latent du virus *in vivo* [Merchant et al., 2001]. En effet, LMP-2A possède des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) qui permettent de lier et de séquestrer les tyrosine kinases Lyn et Syk nécessaires à la signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR). La protéine LMP2A recrute également les ligases (E3) qui vont ubiquitinyler les protéines Lyn et Syk et donc activer leur dégradation par le protéasome [Winberg et al., 2000]. En bloquant la voie de signalisation du BCR, la protéine LMP-2A inhibe le passage de la latence au cycle lytique, normalement induit par la signalisation du BCR [Merchant et al., 2001]. Les transcrits de LMP-2A ou LMP-2B sont fréquemment détectés dans les lymphomes de Hodgkin, le carcinome du nasopharynx et dans le Lymphome de Burkitt [Bell et al., 2006] suggérant que LMP-2A est un facteur clé dans la cancérogenèse liée à l'EBV. LMP-2A est en effet capable de participer à la transformation des cellules épithéliales notamment grâce à l'activation des voies de signalisation cellulaire PI3K-Akt et  $\beta$ -caténine [Morrison and Raab-Traub, 2005], mais également à leur pouvoir métastatique [Pegtél et al., 2005]. Ceci suggère que LMP-2A peut avoir un rôle clé non seulement dans le maintien de la latence chez les porteurs sains, mais également en tant qu'activateur de la carcinogénèse EBV-dépendante [Pang et al., 2009].

#### Les ARN viraux EBER et BART

**EBER** : Les EBERs (EBV Encoded RNA) sont des petits ARN nucléaires (plus d'une centaine de copies par cellule) non polyadénylés. Ils sont exprimés dans tous les programmes de latence d'EBV. Les EBERs semblent impliqués dans l'épissage des transcrits EBNA et LMP. Ils sont aussi impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques, inhibent les effets antiviraux des interférons (INF)-*alpha* et -*gamma* et induisent la production d'interleukine (IL)-10 [Sharp et al., 1999, Yamamoto et al., 2000].

**BART** : Les BART (Rightward Transcrits of the BamHI A region) sont aussi des ARN retrouvés dans tous les types de latence virale. Ils présentent dans leur extrémité 3' terminale un cadre de lecture ouvert, BARF-0. Des études *in vitro*, réalisées avec une des protéines BARF-0 (RK-BARF-0) surexprimée, montrent que cette protéine pourrait induire la transcription de LMP-1 en l'absence d'EBNA-2 grâce à une interaction avec le précurseur du récepteur Notch [Kusano and Raab-Traub, 2001]. Il existe d'autres cadres de lecture ouverts possibles dans les ARN BART, dont RPMS-1 et BARF-1. RPMS-1 s'exprime dans les latences de type I, II et III. Cette protéine se fixe au co-répresseur CIR pour inhiber les transactivations Notch- et EBNA-2-dépendantes [Zhang et al., 2001]. BARF-1 (homologue soluble du récepteur au CSF-1 (Colony Stimulating Factor-1)), a une expression restreinte aux tumeurs d'origine épithéliale. Cette protéine est abondamment sécrétée et a, ainsi, des propriétés oncogènes d'un facteur de croissance surexprimé [Busson et al., 2004, de Turenne-Tessier and Ooka, 2007].

### 3.7 Le cycle lytique

Spontanément, seules 2 à 10% des cellules EBV infectées entrent en cycle lytique. On peut augmenter ce taux en traitant les cultures cellulaires avec divers agents chimiques (esters de phorbol, butyrate de sodium ou 5-azacytidine) ou biologiques (anti-immunoglobulines de surface, ou vecteur exprimant les protéines activatrice de la réplication comme EB1, Zta et ZEBRA-Z). Cette faible proportion à activer le cycle lytique vient du fait que les protéines exprimées lors de la latence s'opposent à l'entrée dans le cycle lytique. La protéine LMP-1 est particulièrement impliquée dans cette inhibition du cycle lytique. En effet, la protéine LMP-1 active la voie de signalisation NF $\kappa$ B. Or, le niveau d'expression du facteur de transcription NF $\kappa$ B joue un rôle majeur pour le passage de la latence au cycle lytique en bloquant à la fois l'expression et l'activité de la protéine Zta [Brown et al., 2003].

La protéine Zta, qui code le gène BZLF-1, est le commutateur induisant le passage de la latence au cycle lytique. Quand Zta est exprimée, elle induit sa propre expression mais également celle des facteurs de transcription Rta et Mta, qui codent les gènes BRLF1 et BMLF1, respectivement. De plus, elle inhibe ses propres inhibiteurs, les facteurs de la famille NF $\kappa$ B [Dreyfus et al., 1999].

L'expression des protéines Zta, Rta et Mta, qui sont les antigènes précoces immédiats (IEA : "*Immediate Early Antigen*") du cycle lytique, va permettre l'expression d'autres antigènes précoces (EA : "*Early Antigen*") qui vont constituer le pool de protéines nécessaires à la formation du complexe de réplication virale et à la biosynthèse des antigènes tardifs qui sont les antigènes de capsid VCA ("*Viral Capsid Antigen*") et d'enveloppe MA (Membrane Antigen) [Maréchal and Piolot, 2000].

### 3.8 Réponses immunitaires vis à vis de l'EBV et échappement

Le tissu tumoral est le siège d'un important infiltrat leucocytaire, comportant en majorité des lymphocytes T CD4+ et CD8+, mais aussi des macrophages et des cellules dendritiques. Quant aux connaissances relatives aux cytokines produites dans le microenvironnement tumoral, elles restent encore insuffisantes [Beck et al., 2001]. On sait cependant que les cellules épithéliales malignes et les cellules infiltrantes produisent des cytokines inflammatoires : interleukine-1, interféron gamma et MIP-1 (Macrophage inhibitory protein-1) [Huang et al., 1999, Tang et al., 2001].

La croissance tumorale témoigne de l'absence d'une réaction immunitaire locale adaptée. L'échappement immunitaire local ne résulte pas d'un défaut de présentation d'antigènes par les cellules épithéliales malignes [Khanna et al., 1998]. On connaît, plutôt, deux

mécanismes d'échappement de l'EBV à l'égard des défenses immunitaires :

- la sélection dans le tissu tumoral de souches non immunogéniques dans le contexte HLA du patient [Edwards et al., 2004] ;
- la production locale de facteurs immunosuppresseurs. Deux de ces facteurs pourraient être le TGF-beta et le ligand de Fas. Leur production a été mise en évidence dans certains cas de carcinome du nasopharynx [Ogino et al., 2007].

Les lymphocytes infiltrants ne sont pas seulement les effecteurs d'une réponse immunitaire naturelle efficace mais ils pourraient jouer un rôle favorisant le développement tumoral.

Le rôle de l'immunité innée sur le contrôle de l'infection à EBV est encore obscur. L'EBV interagit avec différents types cellulaires qui jouent un rôle important dans l'immunité innée incluant les neutrophiles et monocytes/macrophages. En outre, les résultats obtenus dans les modèles animaux [Gosselin et al., 1999, Baiocchi et al., 2001] ainsi que les observations faites sur les sujets souffrant d'immunodéficiency génétique suggèrent que les cellules NK jouent le rôle d'effecteur et de régulateur important contre l'infection à EBV [Benoit et al., 2000].

### 3.8.1 Réponses immunitaires spécifique à EBV

L'infection à EBV donne lieu à une large gamme de produits des gènes viraux exprimés dans les cellules infectées. Il n'est donc pas surprenant de voir exprimer un nombre important d'effecteurs du système immunitaire. Cependant, la signification biologique de ces aspects varie considérablement en fonction des différentes phases de l'infection [Benoit et al., 2000].

La réponse immunitaire anti-EBV agit à deux niveaux du cycle biologique du virus :

- au niveau du cycle lytique lors de la primo-infection ou lors des réactivations ;
- au niveau de la phase de latence du virus.

Cette réponse permet ainsi de contrôler la multiplication du virus et la prolifération des cellules transformées. Elle va limiter chez l'immunocompétent la pathologie liée à l'EBV à quelques cas de mononucléose infectieuse. Cependant, fréquemment chez le sujet immunodéprimé et plus rarement chez le sujet immunocompétent, le virus peut échapper à la surveillance immunitaire et être à l'origine de processus malins [Kimura, 2006].

#### Réponse humorale

La cinétique d'apparition des anticorps contre les protéines du virus suit l'évolution du cycle biologique du virus *in vivo*. Le sérum des individus infectés par l'EBV contient un niveau élevé d'anticorps spécifiques aux antigènes latents et lytiques d'EBV. L'augmentation du titre des anticorps spécifique des antigènes lytiques représente une valeur « diagnostique » pour de nombreuses pathologies associées à l'EBV [Liu and Yeh, 1998].



**Réponse humorale au cours de la primo-infection** : La primo-infection est caractérisée par une étape de réplication virale productive au niveau des cellules épithéliales et des lymphocytes B puis à une étape de prolifération des cellules B, enfin à une étape de mise en place de la réponse immunitaire cellulaire suivie de l'entrée en latence 0 [Nicholas et al., 1997].

Au cours de la primo-infection, on assiste d'abord à une étape de réplication virale productive au niveau des cellules épithéliales et des lymphocytes B puis à une étape de prolifération des cellules B, enfin à une étape de mise en place de la réponse immunitaire cellulaire suivie de l'entrée en latence 0 [Nicholas et al., 1997].

Une forte augmentation de lymphocytes atypiques et l'apparition d'anticorps hétérophiles (IgM non spécifiques) sont observées dans le sérum. Ces lymphocytes atypiques sont des lymphocytes T primaires dont la plupart sont dirigés contre les cellules B infectées par l'EBV. Les symptômes cliniques caractéristiques de la MNI sont attribués à la prolifération et à l'activation de ces lymphocytes T ; ils disparaissent en général en quelques semaines. Les premiers anticorps détectables sont dirigés contre les protéines d'enveloppe (anti-gp350), les protéines de capsid (VCA) et les protéines de la matrice (MA) [Edwards et al., 2004].

Les anticorps anti-gp350 et anti-gp110 sont neutralisants, mais peuvent participer aussi à la destruction des cellules infectées par un mode de cytotoxicité médiée par les anticorps [Strang and Rickinson, 1997, Khyatti et al., 1991, Edwards et al., 2004]. Ils participent au contrôle de la réplication virale au cours de la primo-infection et des réactivations, et peuvent persister dans la salive ou dans le sérum [Yao et al., 1991].

Les anticorps anti-VCA apparaissent aussi très précocement avant les signes cliniques de la MNI. Ils comportent toujours des IgM spécifiques qui disparaissent en 3 à 4 semaines et des IgG qui persistent indéfiniment. La présence d'IgG VCA associée à des IgM VCA signe une primo-infection [Nicholas et al., 1997].

Les anticorps contre les protéines précoces immédiates, en particulier ZEBRA et des protéines précoces EA apparaissent aussi au début de la primo-infection, diminuent rapidement et se stabilisent à des niveaux très faibles. Ils peuvent réapparaître au cours de réactivations mais leur interprétation clinique est délicate [Wolfgang and Farrell, 2005].

L'inhibition de la réplication virale par l'action conjointe des anticorps neutralisants et de l'immunité cellulaire force le virus à entrer en latence. La destruction des cellules proliférantes par le système immunitaire va avoir pour conséquence la libération des protéines nucléaires EBNA. Les anticorps anti-EBNA vont donc apparaître plus tardivement, longtemps après les signes cliniques de la primo-infection [Nicholas et al., 1997].

Les profils sérologiques permettent de définir le statut immunitaire, mais les anticorps ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de l'infection latente et de la prolifération cellulaire.

**Immunité à médiation cellulaire**

Le nombre de cellules T spécifiques pour un épitope unique provenant de protéine structurale ou de régulation durant le cycle productif peut être estimé à environ 10% du total des CD8+ dans le sang périphérique chez les patients atteints de mononucléose infectieuse. On distingue classiquement deux types de réponse : une réponse non spécifique par les cellules NK (Natural killer) et une réponse spécifique par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) [[Annels et al., 2000](#)].

**Cellules NK** : Avant la mise en place de l'immunité spécifique, les cellules NK permettent l'élimination des cellules infectées sans reconnaissance spécifique des antigènes. Cette réponse est moins efficace que celle des lymphocytes cytotoxiques spécifiques, mais limite la prolifération virale au cours de la primo-infection. La diminution de l'activité des cellules NK semble jouer un rôle dans la progression de l'infection chronique active du virus EBV [[Wakiguchi et al., 1989](#), [Williams et al., 2005](#)].

Les cellules NK concourent aussi à l'élimination des cellules infectées après apparition de la réponse humorale en intervenant dans la cytotoxicité médiée par les anticorps. Les cellules NK ne jouent cependant pas de rôle prépondérant dans le contrôle de l'infection à EBV [[Sohlberg et al., 2013](#)].

**Les lymphocytes T cytotoxiques** : Les phagocytes présentent, aux lymphocytes T CD4, (LT4) des molécules de CMH II associées à des peptides de 15 à 30 acides aminés antigéniques. Ces peptides ont été, au préalable phagocytés sous forme de protéine virale exocellulaire. Stimulés par les LT4, les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent des cellules infectées par l'EBV par interaction entre leur récepteur T (TCR) et un peptide viral, de 8 à 10 acides aminés, présenté par une molécule de CMH I [[Cooper et al., 2001](#)].

Les lymphocytes T cytotoxiques, après reconnaissance de leur cible peptidique, exercent un pouvoir cytolytique par la sécrétion d'enzymes (perforines, granzymes) ou par la sécrétion de cytokines (IFN  $\gamma$ , IL, TNF $\alpha$ ) ou induisent l'apoptose de la cellule infectée par l'interaction Fas/Fas ligand [[Murray et al., 1990](#)].

La première protéine du cycle lytique identifiée comme cible des lymphocytes cytotoxiques a été la protéine codée par le gène ZEBRA [[Bogedain et al., 1995](#)]. C'est la protéine majeure de l'initiation du cycle lytique du virus. Les lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre cette protéine vont empêcher la réplication virale, la dissémination du virus et l'augmentation du « pool » de cellules infectées. D'autres protéines précoces ont été décrites comme jouant un rôle dans l'immunité cellulaire. Il s'agit des protéines codées par les gènes BRLF1, BMLF1 et BMRF1 [[Tsurumi et al., 2005](#)]. Les protéines structurales gp350 et gp85 sont la cible de la réponse cytotoxique, aussi bien chez les patients atteints de mononucléose infectieuse que chez les patients EBV séropositifs en infection latente [[Khanna et al., 1998](#)].



Les réponses contre les protéines de latence est essentielle pour la compréhension de l'immunité qui contrôle la prolifération des cellules infectées par EBV. Les protéines LMP-1, LMP-2 et EBNA-1 sont exprimées dans le carcinome nasopharyngé ainsi qu'au cours de la maladie d'Hodgkin. La protéine EBNA-1 est la seule protéine exprimée dans le lymphome de Burkitt [[Hammerschmidt and Sugden, 1988](#)]. Toutes ces protéines induisent une réponse immunitaire TCD8, à l'exception de la protéine EBNA-1. Les protéines EBNA n'ont pas toutes le même pouvoir immunogène. EBNA3A, 3B et 3C sont des protéines de latence pour lesquelles on observe les réponses cytotoxiques les plus fréquentes et d'intensité élevée [[Rickinson and Moss, 1997](#)].

### 3.8.2 Mécanismes d'échappement au système immunitaire

Dans ce qui suit nous verrons que la plupart des protéines codées par EBV sont destinées à déjouer la réponse immunitaire.

#### La protéine LMP

LMP-2A a la particularité d'être apprêtée et présentée par un processus indépendant des molécules TAP (transporter associated proteins) qui transportent les épitopes à travers le réticulum endoplasmique avant de les délivrer aux molécules de CMH I. Ce processus a vraisemblablement un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire ou dans l'induction d'une réponse immunitaire de faible intensité [[Khanna et al., 1996](#)].

Une réponse T cytotoxique contre les protéines LMP-1 et EBNA LP a été détectée dans quelques cas, mais les épitopes n'ont pas été tous identifiés [[Khanna et al., 1996](#)]. Deux épitopes de LMP-1 associés à l'antigène HLA A2 ont pu être isolés et caractérisés. Cependant, ces peptides induisent des réponses beaucoup plus faibles que celles des autres protéines de latence [[Khanna et al., 1998](#)].

#### La protéine EBNA-1

La région amino-terminale d'EBNA-1 est composée d'une répétition d'aa tels que la glycine et l'alanine (GAR, glycine alanine repeat) [[Pallier, 2003](#)]. La propriété du motif GAR répété est d'inhiber la dégradation de la protéine EBNA-1 par le protéasome. Cette répétition entraîne une augmentation de la demi-vie de la protéine. A l'inverse, sa délétion conduit à la présentation de la protéine. La région GAR empêche donc la présentation de ces peptides endogènes aux LT CD8+. Cependant, si ce seul mécanisme expliquait l'absence de réponse T, les cellules infectées par l'EBV devraient exprimer d'énormes quantités de protéine EBNA-1 puisque celle-ci n'est plus protéolysée [[Pallier, 2003](#)]. Or, ce n'est pas le cas, il est rarement possible de détecter cette protéine (EBNA-1) dans les cellules infectées. Ces cellules T peuvent reconnaître des molécules du CMH II associées à la pro-

téine EBNA-1, mais pas avec des molécules du CMH I [Blake et al., 2000]. Il est donc vrai que certaines questions restaient toutefois sans réponse.

Schwab et al. [2003] ont essayé de comprendre ce phénomène en utilisant des mutants (exprimant des GAR délétés). Leurs résultats montrent que la concentration de la protéine EBNA-1 dans les cellules sauvages (EBNA 1 wt) est inférieure à celle dans les cellules exprimant la protéine délétée (EBNA 1 GAR-), alors que le niveau de base et la stabilité des ARNm correspondants sont similaires. Ces auteurs ont ensuite montré que la traduction *in vitro* de l'ARNm codant EBNA 1 wt est 11 fois moins efficace que celle de l'ARNm codant EBNA 1 GAR-. Ils ont donc conclu que le GAR inhibe la traduction de l'ARNm codant EBNA 1 wt. Cette régulation semble contrôler à la fois l'activité des ribosomes et celle du protéasome [Yin et al., 2003].

### La protéine BARF-1

Les macrophages sécrètent une cytokine, CSF-1 ("*colony-stimulating factor*") dont la fonction est de stimuler les cellules souches hématopoïétiques à se différencier en macrophage. En outre, CSF-1 induit la sécrétion de l'interféron alpha par les monocytes différenciés. Or, la forme sécrétée de la protéine virale BARF-1 (appelée p29), forme un complexe avec CSF-1 et l'empêche d'exercer ses fonctions. Lors de l'infection par l'EBV, il y' aura une déplétion en monocytes et la sécrétion de l'interféron alpha est inhibée [Cohen and Lekstrom, 1999]. Ces observations montrent que p29 interviendrait dans l'immuno-modulation.

D'autre part, il a été montré par Tanner et al. [1997], que p29 est détectée par les NK après transfection des cellules Raji par BARF-1 et ce, en présence d'anticorps dirigés contre BARF-1.

### La protéine ZEBRA

Bien qu'elle enclenche le cycle virale lytique, la protéine ZEBRA peut renverser la réponse antivirale par l'induction de l'expression de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  [Mahot et al., 2003] ayant pour conséquence une baisse de l'expression du TNF- $\alpha$  et du récepteur de l'interféron IFN- $\gamma$  [Morrison et al., 2004]. Elle module négativement la réponse immunitaire à médiation cellulaire au profit de la réponse humorale, moins efficace contre les cellules tumorales. Elle est, par conséquent, impliquée dans de nombreuses pathologies tumorales associées à l'EBV.

---

---

## CHAPITRE 4

---

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 4.1 Matériel Biologique

Nous avons obtenu l'autorisation de mener l'investigation sur des échantillons humains selon les principes d'éthique mentionnés dans la déclaration d'Helsinki (53ème Assemblée générale de l'AMM, Washington DC, Etats Unis, Octobre 2002) par le conseil scientifique de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Sétif-1 (Réf : CSF/SNV/1-2013). Les patientes ont été sollicitées pour participer à l'étude et un consentement éclairé a été obtenu pour chacune d'elles.

Notre travail comporte 2 principaux volets :

- une étude de l'intérêt du tests HPV dans le dépistage portant sur 713 cas pour l'étude de l'infection par le papillomavirus et son implication dans le processus tumoral du col de l'utérus. Cette étude est consacrée à l'étude du rôle du test HPV dans le dépistage du cancer du col de l'utérus. Elle concerne le génotypage et le séquençage des HPV (figure 4.1).
- Étude de la coïnfection papillomavirus-Epstein-Barr Virus (EBV) dans les tissus cervicaux et rôle de l'EBV dans la carcinogenèse des cellules épithéliales cervicales. Cette étude a porté sur 109 prélèvements (frottis, grattages et biopsies cervicales).

L'ensemble des prélèvements a été colligé durant la période allant de 1997 à 2011. Les patientes ont été enrôlées au hasard dans le respect des exigences qualitatives et statistiques des études cas-témoins.

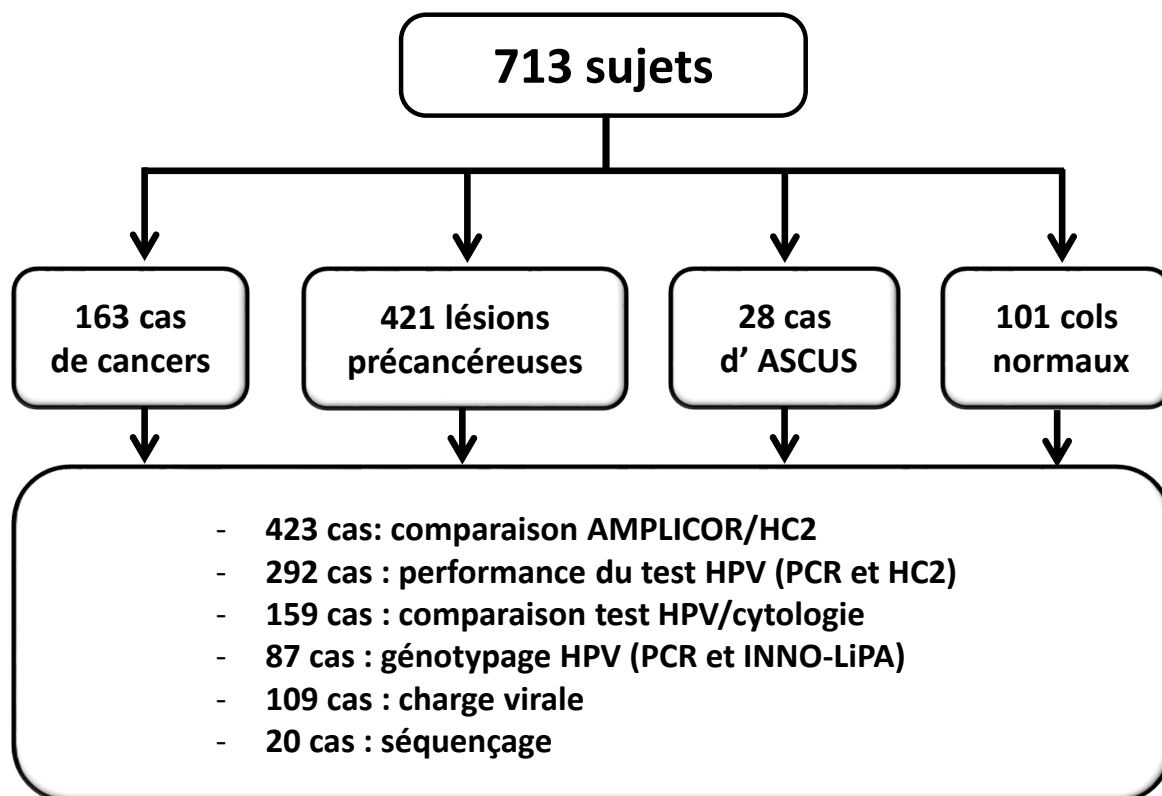


Figure 4.1 – Répartition des 713 prélèvements selon le but de l'étude.

#### 4.1.1 Étude l'intérêt du tests HPV dans le dépistage

Un nombre de 713 prélèvements du col utérin (grattage, frottis, biopsies) ont été effectués sur des lésions précancéreuses et cancéreuses et sur des cols normaux chez des femmes examinées au niveau des hôpitaux de Bainem et Zéralda. Ils répondent aux critères suivants :

- Pas d'antécédents de traitement pour une pathologie cervicale.
- Présence d'un examen colposcopique et autant que possible histologique.

Ces prélèvements ont subi les analyses suivantes :

- **Des colposcopies** effectuées au niveau des services de gynécologie par une équipe de spécialistes pour chacune des études.
- **Des examens cyto-histologiques** réalisés dans le service d'anatomopathologie d'un laboratoire de Bousmail (Dr D Hamladji), de Bainem (Dr H. Boudriche) et du CPMC (CHU Mustapha Bacha).

Accompagnés par tous les renseignements nécessaires à l'étude envisagée, ces prélèvements ont été reçus au niveau du laboratoire de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA) pour analyses.

### Lésions précancéreuses

L'étude des lésions précancéreuses a porté sur 449 frottis, grattages, et/ou biopsies dont 28 cas indéterminés (ASCUS). Les prélèvements ont été réalisés chez des patientes âgées de 27 à 60 ans (moyenne d'âge : 36 ans). Les échantillons ont été recueillis et transportés dans un milieu de conservation vers le laboratoire de virologie où ils ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

### Cas de cancers

163 prélèvements ont été réalisés chez des patientes âgées de 35 à 85 ans atteintes de cancer du col de l'utérus hospitalisées dans le service de :

- chirurgie spécialisée du CPMC (Pr Graba);
- gynécologie-obstétrique, hôpital de Zéralda (Pr Ayache, Dr Boudriche);
- gynécologie-obstétrique de l'hôpital de Bainem (Pr Djenaoui).
- gynécologie-obstétrique du CHU de Sétif (Pr Mahnane).

### Les témoins

Les cas témoins retenus pour la même période de l'étude sont constitués de frottis ou de grattages du col effectués chez 101 femmes examinées à l'hôpital de Bainem et Zéralda en vue d'une contraception. Pour des raisons évidentes d'éthique, aucune biopsie n'a été effectuée.

## 4.1.2 Coïnfection HPV-EBV

Les 109 échantillons cervicaux ont été prélevés sur des femmes au niveau des services de gynécologie de l'hôpital de Zéralda et du CPMC d'Alger. Les femmes enrôlées dans cette étude ont été partagées comme suit :

- **Groupe 1** : composé de 58 patientes présentant un carcinome épidermoïde du col de l'utérus invasif. Lorsque la tumeur devient évidente, des biopsies sont réalisées et les prélèvements obtenus sont immédiatement congelés dans l'azote liquide, transportés au laboratoire, puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Le stade histologique des tumeurs a été déterminé par des pathologistes du laboratoire d'anatomo-pathologie du CPMC, Alger. Chaque biopsie est répartie en 4 fractions ; destinées à l'analyse de l'ARN (étude de l'expression de l'EBV), de l'ADN (détection des 2 virus), des protéines virales et à l'étude immunohistochimique (figure 4.2).

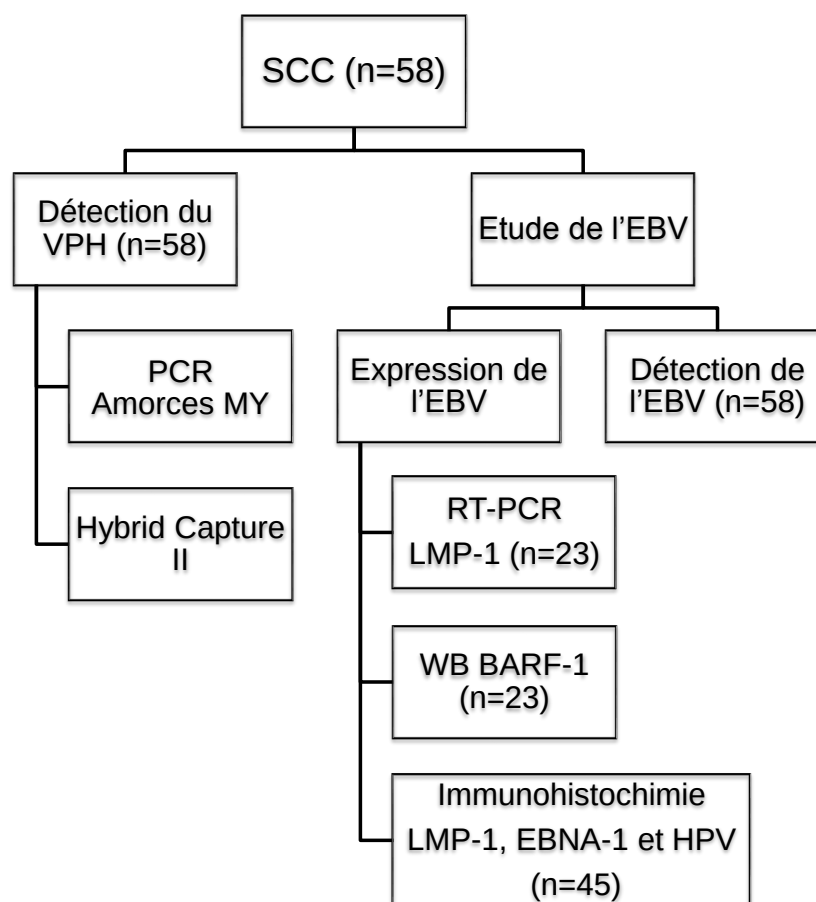
- **Groupe 2** : composé de 21 patientes ayant des lésions intra-épithéliales de haut grade (HSIL).

- **Groupe 3** : composé de 16 patientes ayant des lésions intraépithéliales cervicales de bas grade (LSIL : CIN 1, condylomes, cervicite).

Les échantillons des groupes 2 et 3 sont recueillies à partir de la zone apparemment maligne par une brosse conique (Digene Cervical <sup>TM</sup> cervical brush), tournée trois fois dans l'orifice cervical et ensuite placé dans un tube de 1 ml de milieu de transport (Vira-Pap/Viratype transport medium, (Digene, Silver Spring, MD), puis stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

- **Groupe 4** : composé de 14 femmes dont les cols étaient normaux. Ces femmes étaient en bonne santé, elles ont été prélevées pour faire un frottis cervical de routine ou de contraception.

**NB** La cytologie conventionnelle pour l'étude des frottis cervicaux utérins a été réalisée pour tous les groupes.



**Figure 4.2** – Etude de la coinfection HPV-EBV dans les 58 cas de cancers. L'étude de l'expression de l'Epstein-Barr virus est réalisée sur 23 cas par Western Blot (WB), par RT-PCR et par immunohistochimie.

## 4.2 Techniques utilisées

### 4.2.1 Extraction et purification de l'ADN

Les fractions de biopsies dédiées à l'étude de l'ADN sont découpées à l'aide de lames stériles dans un tampon de lyse (Tris 10 mM, pH 7,4, 50 mM EDTA, 150 mM de NaCl, 1% de Sarkosyl) et traitées par la RNase A (10 mg/ml) pendant 2 heures à 37°C. Après digestion par la protéinase K, l'ADN est extrait par la méthode phénol-chloroforme. Cet ADN est, ensuite, précipité par l'éthanol, puis solubilisé dans 20 microlitres de tampon TE (10 mM Tris -HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA). Le dosage des ADN extraits est réalisé par spectrophotométrie (NanoDrop<sup>TM</sup>1000, Thermo Scientific). La pureté de l'extrait est évaluée par le calcul du rapport des absorbances à 260nm et à 280nm.

Chez les patientes ayant des lésions précancéreuses un grattage est réalisé par la cyto-brosse (Cervical Brush, Digene), puis déchargée des cellules dans le milieu de transport (milieu STM Digene, Qiagen). Les acides nucléiques sont extraits par la méthode phénol-chloroforme, de la même manière que pour les biopsies.

### 4.2.2 PCR

Deux types de PCR (Polymerase chain reaction) ont été utilisés au cours de cette étude :

#### PCR conventionnelle

La PCR conventionnelle est appliquée pour les prélèvements de 1997 à 2003. Elle permet de détecter l'ADN des HPV et celui de la bêta-globine. Elle est réalisée dans un thermocycleur HYBED<sup>TM</sup>. Nous avons utilisé, à cet effet, les amorces consensus MY09/11 biotinylées qui permettent d'amplifier le gène L1 des HPV. Les séquences de ces amorces sont les suivantes :

- MY11 : 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'

- MY09 : 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'.

La réaction est réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 0,1 à 1,0 pg d'ADN de l'échantillon, 0,4 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chaque dNTP, un tampon de PCR 1X, et 0,5 U d'AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems, Roche). La dénaturation initiale est réalisée à 94°C pendant 10 min, suivie de 35 cycles chacun à 94°C pendant 30 s, 64°C pendant 30 s, 72°C pendant 1 minute. Une extension finale est réalisée à 72°C pendant 7 min. Cette réaction avec de telles amorces génère un amplicon de 450 pb.

En parallèle, une autre PCR a été réalisée avec des amorces amplifiant la bêta-globine pour témoigner de la présence d'ADN cellulaire.

### PCR AMPLICOR-HPV Roche

La PCR AMPLICOR est utilisée pour tester les prélèvements à partir de 2003. Les échantillons de cellules cervicales ont été prélevés par cytobrosse sur milieu thinPrep PreservCYT et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Le test a été effectué ensuite selon les instructions du fournisseur. Le test AMPLICOR HPV utilise des amorces biotinylées pour amplifier une région d'environ 165 pb de la séquence L1 à l'intérieur de la région polymorphe du génome du HPV. Les amorces introduites dans le mélange réactionnel de la PCR, permettent de détecter l'ADN viral de 13 génotypes d'HPV-HR. De la même manière que pour la technique conventionnelle, le mélange réactionnel de la PCR AMPLICOR renferme des amorces amplifiant le gène de  $\beta$ -globine (amplicon de 268 pb).

Les produits de PCR s'hybrident avec des sondes reconnaissant les séquences virales (HPV-HR) et cellulaires ( $\beta$ -globine). Les amplicons sont chimiquement dénaturés pour donner un ADN simple brin. Celui-ci est introduit dans des puits d'une plaque de microtitration revêtus soit avec des sondes spécifiques reconnaissant les HPV-RH ou la  $\beta$ -globine à la sonde oligonucléotidique. L'hybridation a été effectuée à 37°C/1h.

Après la réaction d'hybridation, la plaque est lavée pour éliminer les acides nucléiques non liés, puis un conjugué (peroxydase de raifort-avidine) a été ajouté dans chaque puit pour lier la biotine. La plaque est de nouveau lavée pour éliminer le conjugué non lié, et une solution de substrat contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène TMB (3,3', 5,5'-tétraméthyl benzidine) est ajouté. La réaction enzymatique dure 10 min à température ambiante à l'obscurité. Elle est ensuite stoppée par l'addition d'un acide faible. L'absorbance à 450 nm est immédiatement mesurée en utilisant un spectrophotomètre lecteur de microplaques.

Selon le fabricant, le test AMPLICOR®-HPV pourrait détecter les génotypes 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 56, et 68 à 100 copies/ml et les génotypes 31, 52, 58, et 59 à 240 copies/ml, avec un taux supérieur à 95% de positivité.

### 4.2.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

Un volume de 5  $\mu$ l de chaque produit de PCR, est mélangé avec un tampon de charge, puis soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. La concentration du gel varie, généralement de 0.8 à 1.2% selon la taille de l'ADN produit. Le bromure d'éthidium (Sigma) est utilisé pour révéler les spots. Le tampon de migration est constitué de TAE 1X, préparé à partir d'une solution concentrée 50 X (242 g Tris, 57.2 ml acide acétique et 100 ml EDTA 0.5 M pour un volume final de 1 litre). L'électrophorèse est effectuée dans une cuve horizontale (Biorad). Les échantillons d'ADN sont déposés dans les puits à l'aide d'une solution de chargement 1 X obtenue à partir de la solution 6 X (50% glycérol, 0.25% bleu de bromophénol, 0.25% xylène cyanol). La migration s'effectue à 100 volts et la révélation de l'ADN se fait par autoradiographie.



#### 4.2.4 INNO-LiPA HPV genotyping

L'INNO-LiPA HPV est une technique d'hybridation inverse qui permet la détermination individuelle des génotypes HPV. Elle est appliquée pour tester 87 prélèvements. La procédure débute par l'amplification partielle du gène L1 du HPV après avoir réalisé l'extraction de l'ADN à l'aide du kit «amplilute liquid medium extraction-Roche». Les amorces utilisées sont les oligonucleotides SPF10 qui permettent l'amplification d'un fragment de 85 pb. Selon le principe d'hybridation inverse, le système «INNO-LiPA HPV genotyping extra» (innogenetics, actuellement Fujirebio Europe N.V., Belgique) permet la détection de 28 types HPV. L'identification est possible grâce à 28 sondes fixées sur des bandelettes reconnaissant les génotypes d'HPV-HR : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82, des génotypes considérés comme probablement à haut risque : 26, 63, 66, les génotypes à risque indéterminé : 30, 34, 67, 69 et 85 et des génotypes d'HPV-BR : 6, 11, 40, 54, et 70.

#### 4.2.5 Hybrid Capture® 2

L'Hybrid Capture® 2 (HC2) est un dosage immuno-enzymatique basé sur une hybridation en phase liquide (type sandwich) suivie d'une réaction de chimiluminescence à la phosphatase alcaline. Le test HC2, standardisé et approuvé par la FDA, permet la mise en évidence d'au moins un des 13 types des HPV-HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) et/ou au moins un des 5 types des HPV-BR (6, 11, 42, 43, 44). Il permet de détecter environ 1 pg de génome de HPV par ml, soit environ 5000 copies/ml.

L'ADN de l'HPV est dénaturé puis hybridé avec des sondes d'ARN spécifiques des HPV-BR ou des HPV-HR. L'hybride ADN-ARN ainsi formé est capturé par un anticorps anti-hybride fixé au fond d'une cupule d'une microplaque. La présence de l'hybride est révélée par un anticorps anti-hybride secondaire couplé à une molécule de phosphatase alcaline. En présence d'ADN du HPV, le substrat de la phosphatase alcaline clivé, donne une molécule chimiluminescente qui pourra alors être détectée et quantifiée en unités relatives de lumière (RLU). Des contrôles positifs et négatifs sont incorporés à chaque série.

#### 4.2.6 Séquençage des produits de PCR MY et FAP

Le séquençage de 20 biopsies paraffinées prélevées à Sétif est réalisé au laboratoire de virologie à l'hôpital George Pompidou, Paris 15 (France). L'ADN de ces carcinomes épidermoïdes est extrait par le Kit de purification DNeasy blood and tissue (Qiagen, Valencia, CA). La PCR est réalisée à l'aide des amorces consensus MY09/11 (450bp) et FAP (230 bp).

Les produits de PCR sont purifiés par chromatographie d'exclusion sur gel de Sépharose G50. Une deuxième réaction PCR de séquençage est réalisée avec les mêmes amorces

en présence des didesoxyribonucléotides (ddNTP : 4.0  $\mu$ L Big-Dye Terminator RR Mix). vingt cycles de PCR sont réalisés. Une deuxième purification est effectuée pour enlever l'excès de ddNTP. Le produit de PCR de chaque échantillon est soumis à l'analyse avec le séquenceur PGM<sup>TM</sup>. Les séquences L1 obtenues ont été vérifiées à l'aide du logiciel d'analyse de séquence Sequencher 4.7.

Ces séquences sont ensuite comparées à des séquences de référence, disponibles dans le site NCBI (National Center for Biotechnology Information, URL : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) à l'aide du programme BLASTN 2.2.26. Un score de similarité avec la séquence déposée est donné pour chaque comparaison.

#### 4.2.7 Southern blot

L'infection à EBV est détectée par amplification du gène BALF-1 par l'usage des amorces ALF. Le volume réactionnel de 25  $\mu$ L contenant du tampon de la Taq DNA polymérase (10 mM Tris-HCl, pH 8,3 ; 50 mM KCl), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de chaque désoxyribonucléotique triphosphate, et 250 nM de chacune des amorces et de 0,1 à 1  $\mu$ g d'ADN de l'échantillon. Les séquences des deux amorces [Cabras et al., 2005] sont comme suit :

- ALF-1-sens : 5'-GGGGATCCAATGAACCTGGCCATTGCTCTG-3', située en amont à la position 165517 du génome de l'EBV
- ALF-1-antisens : 5'-CGGAATTCTTACAAAGATTTCAGGAAGTC-3', située en aval, à la position 164858 du génome de l'EBV.

Ces amorces ont permis l'amplification de la totalité du gène BALF-1 (660 pb). Après 10 min d'incubation à 94°C, la Taq DNA polymérase (Invitrogen, Life Technologies) est ajoutée. Chacun des 35 cycles de la réaction PCR comporte les incubations suivantes : 94°C (1 min), 55°C (1 min) et 72°C (2 min). Après le dernier cycle, les échantillons sont maintenus à 72°C pendant 7 min, puis refroidi à 4°C. Dix  $\mu$ L du fragment amplifié sont chargés sur un gel d'agarose à 1%, soumis à l'électrophorèse, puis révélé sous UV (Molecular Imager FX, Bio Rad) en présence de bromure d'éthidium. Les bandes d'ADN sont transférées sur des membranes de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Allemagne). Elles sont, ensuite, détectées par hybridation à l'aide de sondes marquée au <sup>32</sup>P préparées à l'aide du kit de marquage des sondes utilisant des amorces aléatoires (Stratagene). L'hybridation a été effectuée à 65°C pendant une nuit avec 106 cpm/ml de sonde spécifique au gène BALF1 marquée contenue dans une solution modifiée décrite par Ausubel et al. [1987]. Cette solution est composée du tampon SSC 6X, 0,5% de SDS, de la solution Denhart 3X et 200  $\mu$ g/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Le filtre est lavé 3 fois avec le tampon SSC 2X contenant 0,1% de SDS à température ambiante pendant 5 min, puis une fois avec la même solution à 1X pendant 15 min, et enfin 2 fois avec la même solution SSC à 0,1X contenant 0,1% SDS pendant 15 min.

#### 4.2.8 Dot blot

Pour quantifier l'ADN génomique de l'EBV, les tissus congelés sont hachés avec une lame de bistouri stérile, et incubés avec du tampon d'isolement d'ADN (Tris 10 mM-HCl, pH 8,0, EDTA 10 mM, et 0,5% de SDS) contenant 100 µg/ml protéinase K pendant une nuit à 42°C. A partir de ce lysat, l'ADN a été purifié par une extraction (phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25 :24 :1, v/v/v, pH 8,0), suivie d'une précipitation avec l'éthanol. L'ADN précipité est mis en suspension dans du tampon Tris-EDTA (Tris 10 mM-HCl, pH 8,0, 1 mM-EDTA). L'ADN purifié est quantifié par spectrophotométrie. La dénaturation se fait par incubation dans du NaOH 0,4N pendant 30 min dans la glace. La solution d'ADN est, ensuite, neutralisée par un volume égal de Tris-HCl 1M (pH 6,8). L'ADN simple brin ainsi obtenu est déposé sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Allemagne) puis fixé à l'aide des ultraviolets. L'hybridation avec la sonde radio-marquée au <sup>32</sup>P (106 cpm/ml) spécifique au gène BALF1, s'effectue à 65°C pendant une nuit, dans une solution [Ausubel et al. \[1987\]](#), composée du tampon SSC 6X, 0,5% de SDS, de la solution Denhart 3X et 200 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. La membrane est lavée 3 fois avec le tampon SSC 2X contenant 0,1% de SDS à température ambiante pendant 5 min, puis une fois avec la même solution à 1X pendant 15 min, et enfin 2 fois avec la même solution SSC à 0,1X contenant 0,1% SDS pendant 15 min. La lecture se fait à l'aide d'un compteur gamma.

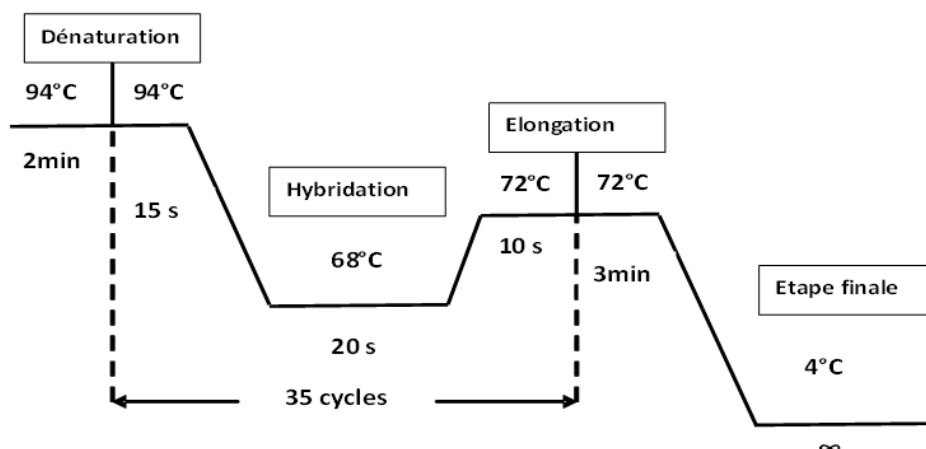
#### 4.2.9 RT-PCR

Pour détecter la transcription de l'oncogène LMP-1 de l'EBV, une RT-PCR (RetroTranscription suivie par PCR) est employée. Pour extraire les ARNm, les tissus tumoraux sont lysés par du Trizol (Invitrogen). Le mélange est homogénéisé pendant 10 min, puis incubé 5 min à température ambiante. L'ARN total est traité ou non avec de la DNase-I (Invitrogen). Un volume de 0,2 ml de chloroforme pour 1 ml de réactif Trizol est ajouté, le mélange est centrifugé (12000g/5 min) à 4°C. L'ARN est récupéré de la phase aqueuse par précipitation avec 0,5 ml d'isopropanol pour 1 ml de réactif Trizol (utilisé pour l'homogénéisation initiale). Les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 10 min, puis centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. L'ARN ainsi obtenu est dosé par spectrophotométrie (NanoDrop, Thermo™ 1000 Scientific).

Environ 10 ng d'ARN sont traités par transcriptase inverse (SuperScript, Invitrogen). Le mélange est porté à 70°C pendant 15 min, la polymérisation est bloquée par refroidissement à 4°C. L'ADN complémentaire est soumis à une PCR (Figure 4.3) pour amplifier l'oncogène LMP-1 de l'EBV en utilisant les amorces :

- CTGAGGATGGAACACGACCTTGAGA-3' (amorce externe)
- AGTAGATCCAGAGACCTAAGACAAGT-3' (amorce interne)

Les produits de la PCR sont visualisés par le bromure d'éthidium après séparation électrophorétique sur gel d'agarose à 1,5%.



**Figure 4.3** – Profil thermique de la PCR utilisée pour détecter les transcrits LMP-1 dans les biopsies cervicales

#### 4.2.10 Western blot

La technique du Western Blot est utilisée pour détecter l'oncogène BARF-1 de l'EBV. Les biopsies sont coupées puis lysées pendant 10 min dans du tampon RIPA (650 mM NaCl, 5 mM d'EDTA, 20 mM Tris pH 7,5, 1% de Triton X-100 et 0,1% de SDS) complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les lysats obtenus sont soumis à une sonication, le contenu protéique est déterminé par la méthode de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Une prise de 50  $\mu$ g de protéines totales est diluée dans un même volume de tampon de Laemmli (0,2% bleu de bromophénol, 4% de SDS, 200 mM DTT (dithiothréitol), 20% de glycérol, 125 mM Tris -HCl, pH 6,8). Le mélange est chauffé à 95°C pendant 5 min. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel dénaturants (SDS-PAGE) de 12%, à 20mA, puis transférées pendant 1 heure à 100V sur membrane de nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). La coloration se fait avec du rouge ponceau (Sigma). Le blocage des sites libres est réalisé par incubation dans du PBS contenant 1% de BSA. Les membranes sont, ensuite, incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps de lapin anti-BARF-1 (anti-Pep sérum 2A), dilué au 1 :1000. Après 3 rinçages avec du PBS Tween BSA, les membranes sont incubées avec le conjugué (anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase) dilué au 1/2000 pendant 1-2 heures. La révélation se fait par chimiluminescence (ECL, Amersham).

### 4.2.11 Immunohistochimie

Les marqueurs de l'infection et de la transcription de l'EBV sont également détectés par coloration immunohistochimique. Les biopsies ont été fixées au formol, déshydratées dans l'alcool et incluses dans la paraffine (partie réalisée au laboratoire d'anatomopathologie du centre Pierre et Marie Curie d'Alger). Une immuno-coloration par le système Biotine-Streptavidine-peroxydase est réalisée sur des sections histologiques de 4  $\mu$ m d'épaisseur. Trois anticorps monoclonaux ont été utilisés :

- anticorps anti-HPV qui reconnaît un épitope commun sur la protéine L1 de tous les HPV (Dako), dilué au 1/250,
- anticorps anti-LMP-1 (S12, BD Biosciences Pharmingen) dilué au 1/500,
- anticorps anti-EBNA-1 (SC-29, Santa Cruz, Allemagne) dilué au 1/100.

Les sections, montées sur des lames traitées au silane (Superfrost) sont étuvées 1 heure à 60°C ; ensuite elles sont déparaffinées dans du xylène, puis réhydratées par une série de 2 lavages dans de l'éthanol à 100%, puis à 80% et enfin à 50% pendant 5 min. Un dernier lavage de 5 min est effectué dans du PBS. Les sections sont, ensuite, bouillies 10 min au four micro-ondes dans de l'acide citrique (pH 6). Après un refroidissement de 30 min, les lames sont lavées 3 fois 5 min dans du PBS. Le blocage des sites libres est réalisé par incubation dans du PBS contenant 4% de BSA. Les anticorps primaires dilués dans du PBST / 1%BSA sont ajoutés et laissés incuber pendant une nuit à température ambiante. Les sections ont été lavées 3 fois 8 min dans du PBST avant mise en contact avec l'anticorps secondaire de chèvre, couplé à la biotine (Dako, Danemark) dilué au 1/200ème.

Un lavage (3 fois/8 min dans du PBS-Tween) élimine l'excès d'anticorps secondaire. Une incubation de 30 min avec la streptavidine conjuguée à la peroxydase diluée au 1/200ème dans du PBS est réalisée. L'excès est éliminé par 3 lavages avec du PBS (8 min) suivi d'un rinçage à l'eau pure. La révélation s'effectue avec le DAB (3,30 diaminobenzidine, Vektor) pendant 5 min. Les coupes histologiques sont contre-colorées avec de l'hématoxyline. Un examen histologique de routine (coloration à l'hématoxyline-éosine) est réalisé pour les mêmes échantillons. Après déshydratation complète, les lames sont traitées par la solution de montage (Eukitt) puis examinées au microscope optique.

### 4.2.12 RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

La technique RFLP permet de mettre en évidence la mutation *h-ras*. Après traitement du tissu tumoral à la protéinase K pendant une nuit, l'ADN génomique est extrait par la méthode phénol-chloroforme. L'ADN extrait subit une PCR en utilisant des amorces spécifiques pour amplifier la séquence contenant le codon 12 du gène *h-ras*. Cette PCR génère des fragments de 420 pb, de type sauvage ou muté. Les séquences de ces amorces sont les suivantes :

— *h-ras* sens : 5'-GACGGAATATAAGCTGGTGG-3'

— *h-ras* anti-sens 5'-AGGCACGTCTCCCCATCAAT-3'

Le mélange réactionnel de la PCR d'un volume total de 50  $\mu$ l contient 5  $\mu$ l de tampon PCR 10X, les différents dNTP (10 mM), les 2 amorces (concentration finale 40 pmoles chacune) et la Taq DNA polymérase (0,5 UI). L'amplification des fragments du gène *h-ras* a été effectuée selon le protocole de la PCR conventionnel. Le produit de PCR contenant le codon 12 de *h-ras* est digéré par l'endonucléase de restriction MspI. La digestion est effectuée dans un volume final de 30  $\mu$ l contenant 10  $\mu$ l d'amplicon et 10 UI de l'enzyme MspI. Le mélange est incubé pendant une nuit à 37°C. L'enzyme de restriction utilisée ne réagit qu'avec l'ADN sauvage, la présence de mutation sur ce codon 12 empêche cette coupure. Une électrophorèse à 200 V sur gel de polyacrylamide à 6% pendant une heure, suivie d'une révélation par le bromure d'éthidium permet d'identifier les différents fragments de la digestion.

---

## CHAPITRE 5

---

# RÉSULTATS ET DISCUSSION DE L'ÉTUDE : INTÉRÊT DU TEST HPV DANS LE DÉPISTAGE

### 5.1 Résultats

Seront successivement présentés :

- la détection des HPV dans les lésions du col utérin,
- les performances du test HPV au niveau des CIN2+
- la comparaison entre test HPV et la cytologie,
- le test HPV et tri des ASCUS, comparaison des tests HC2 et PCR,
- le génotypage des HPV
- le séquençage de 20 souches HPV-HR détectés.

#### 5.1.1 Détection des HPV dans les lésions précancéreuses du col

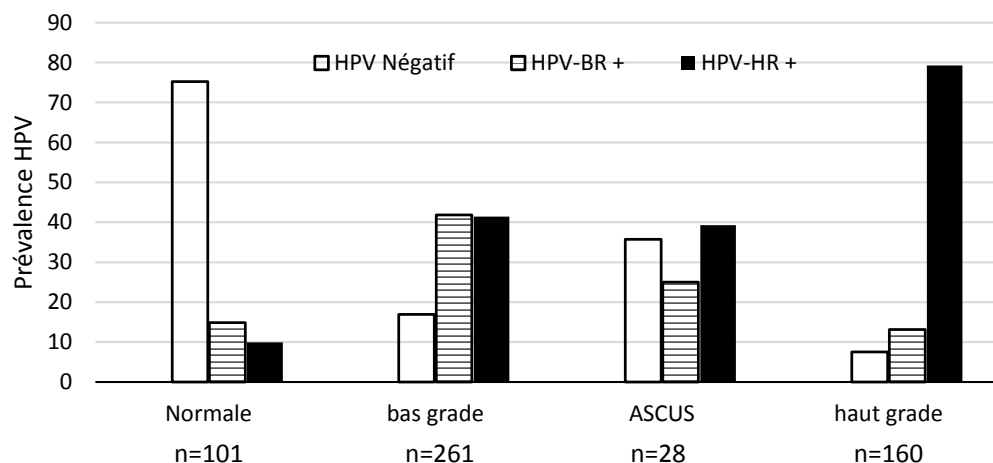
L'étude a porté sur 449 prélèvements dont 28 lésions indéterminées (ASCUS) prélevés sur des lésions précancéreuses du col (grattage ou biopsies) et 101 frottis sur des cols normaux. La détection des HPV est présentée en fonction du grade de la lésion du col tel qu'il est déterminé par la cytologie et/ou l'histologie. Le tableau 5.1 montre les résultats obtenus par PCR conventionnelle sur tous les prélèvements qui ont fait l'objet d'un examen cytologique, histologique et colposcopique.

Les HPV-BR sont plus abondants dans les lésions de bas grade (41,8%). Leur prévalence diminue au fur et à mesure que la lésion s'aggrave. L'inverse est observé pour les virus oncogènes (HPV-HR). Les lésions de haut grade abriterait plus d'HPV-HR (notamment 16

**Tableau 5.1** – Détection des HPV par PCR conventionnelle dans les lésions précancéreuses

| Effectif | HPV      | Etudes cytologique et/ou histologique |               |           |                |
|----------|----------|---------------------------------------|---------------|-----------|----------------|
|          |          | Normal (%)                            | Bas grade (%) | ASCUS (%) | Haut grade (%) |
| 550      | /        | n=101                                 | n=261         | n=28      | n=160          |
|          | Négatifs | 76 (75,2)                             | 44(16,9)      | 10 (35,7) | 12 (7,5)       |
|          | HPV-BR   | 15 (14,9)                             | 109 (41,8)    | 7 (25)    | 21 (13,1)      |
|          | HPV-HR   | 10 (9,9)                              | 108 (41,4)    | 11 (39,3) | 127 (79,3)     |

et 18). La prévalence de ces virus est de 79,3% dans les lésions de haut grade. Il faut souligner que les HPV-HR sont retrouvés respectivement dans 41,4% des lésions de bas grade et 39,3% des ASCUS. Les cols normaux sont porteurs de 10% de ces virus (figure 5.1). Il faut noter qu'environ 25% des femmes apparemment saines (cols normaux) portent des virus de haut ou de bas risque.



**Figure 5.1** – Détection des HPV par PCR conventionnelle dans les 449 lésions précancéreuses et les 101 cas témoins déterminées par cytologie et/ou histologie.

### 5.1.2 Performances du test HPV au niveau CIN2+

Les paramètres du test HPV par la technique PCR sont estimées par le calcul des différents paramètres entre les cas de lésions de haut grade par rapport au témoins normaux. Ces performances sont résumées ci-dessous :

- La **sensibilité** du test HPV est la probabilité que le virus oncogène (HPV-HR) soit détecté si la patiente porte la lésion de haut grade (CIN2+). L'exemple du tableau 5.1 montre que parmi les 160 cas de ces lésions, 127 se sont révélés positifs en HPV-HR. Parmi les 101 femmes à cols normaux, environ 76 se sont révélés négatifs en



HPV. Dans ce cas, la sensibilité est de 79,38%.

- La **spécificité** du test est la probabilité que le HPV-HR soit absent si la patiente ne présente pas de lésion de haut grade. Elle est dans cet exemple de 35,4%.
- La **valeur prédictive négative ou VPN** est de 90.9%. C'est la probabilité que le sujet soit indemne de la maladie si l'HPV-HR est absent.
- La **valeur prédictive positive (VPP)** du test HPV pour la détection des lésions de haut grade est la probabilité que la patiente présente une lésion si l'HPV-HR est détecté ; C'est le rapport entre les vrais positifs et la somme des vrais et des faux positifs. Dans ce cas, elle est de 92,7%.

### 5.1.3 Odd-Ratio HPV/cancer du col utérin

L'odd ratio est l'indice de dépendance entre l'apparition de la lésion de haut grade et la positivité du test HPV. Il y' a 29,25 fois (95% CI : 18,01 à 80,83) plus de patientes malades par rapport aux sujets sains HPV positifs que de patientes malades par rapport aux sujets sains HPV négatifs.

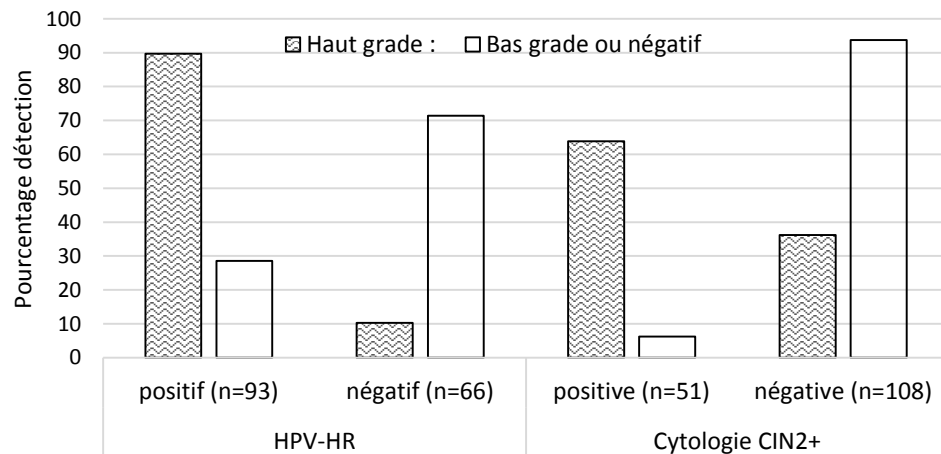
L'Odd-Ratio permet de déterminer si le statut HPV-positif est un facteur de risque pour le développement d'un cancer du col utérin. Pour une série de 160 patientes présentant des lésions de haut grade (CIN2+) ou des cancers du col utérin, ce rapport est calculé en prenant comme témoins les 101 femmes ayant des cols normaux. Ainsi, l'exposition à l'HPV est un facteur de risque cliniquement pertinent dans les cancers du col de l'utérus.

### 5.1.4 Comparaison entre test HPV et cytologie

Les résultats obtenus par le test HPV (PCR ou HC2) sont comparés à ceux obtenus par cytologie pour estimer la capacité des deux techniques à détecter les lésions précancéreuses. L'étude a porté sur 159 prélèvements du col utérin (frottis et grattages). Les résultats cytologiques positifs ont été confirmés par histologie.

La figure 5.2 met en évidence les différences de sensibilité entre les deux tests. La PCR (ou HC2) permet de détecter les HPV-HR dans 90% des lésions de haut grade. Par contre, la cytologie ne détecte ces lésions que dans 64,8% des cas (le taux de faux négatifs est de 35,1% *versus* 10,63 pour les tests HPV). Près de 94% des résultats négatifs par cytologie étaient confirmés négatifs par histologie. La sensibilité et la spécificité des deux techniques sont, dans ce cas, calculées :

- **la sensibilité**
  - du test HPV est de 89,4%,
  - de la cytologie est de 67,9% ;
- **la spécificité**
  - du test HPV est de 71,4%,
  - de la cytologie est de 92,3%.

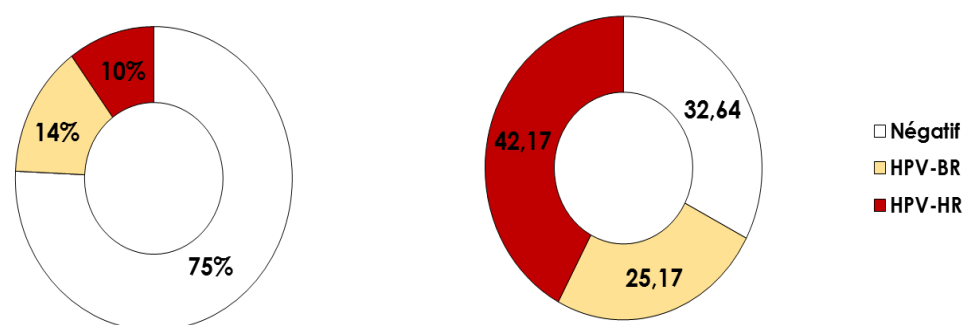


**Figure 5.2** – Comparaison des tests de dépistage du cancer du col utérin : Test HPV (PCR+HC2) versus cytologie testés sur 159 cas dont 28 cas témoins.

La comparaison des performances des deux tests fait apparaître une meilleure sensibilité du test HPV et une meilleure spécificité du frottis pour la détection des lésions CIN2+ (CIN2, CIN3, CIS).

### 5.1.5 Recherche des HPV dans les cas ASCUS

Le test HPV est également appliqué à un échantillon de 28 lésions classées comme étant des frottis cervico-utérins douteux (présence de cellules de signification indéterminée, connues sous le terme ASCUS) (figure 5.3). Des cas de cols normaux au nombre de 16 sont pris comme témoins.



**Figure 5.3** – Comparaison de la prévalence de l'infection HPV-HR entre les 28 cas ASCUS et les 16 témoins

Dans cet échantillon, près de la moitié (42,85%) des ASCUS se sont révélés positifs en HPV-HR (figure 5.3). Le reste de ces cas est soit HPV-BR positif (25%), soit totalement négatif (32,14%). La figure 5.3 montre que le pourcentage des cas HPV négatifs dans les cols révélés comme étant sains par cytologie et/ou histologie est plus important (75%).

### 5.1.6 Comparaisons des tests AMPLICOR-Roche et HC2

Un total de 423 frottis, grattages ou biopsies ont été prélevés chez des femmes âgées de 27 à 65 ans. Ils ont été étudiés simultanément par AMPLICOR-Roche et HC2 pour la détection des HPV à haut risque. La figure 5.4. montre que la PCR-AMPLICOR a révélé 58 cas positifs (13,71%) en HPV-HR. L'HC2 en a révélé un nombre très proche (56 cas), soit 13,24%. Les deux techniques permettent la détection des HPV avec une bonne sensibilité. Il n'y a pas de différence significative entre les seuils de détection des tests ( $p < 0,001$ ). Cependant quelques divergences mineures (6 cas) sont notées :

- Deux cas positifs (une lésion de haut grade et une lésion de bas grade persistante) avec le test AMPLICOR n'ont pas été détectés par HC2.
- Quatre cas de lésions bas grade (dont l'une est persistante) positifs avec le HC2 n'ont pas été détectés par le test PCR AMPLICOR.

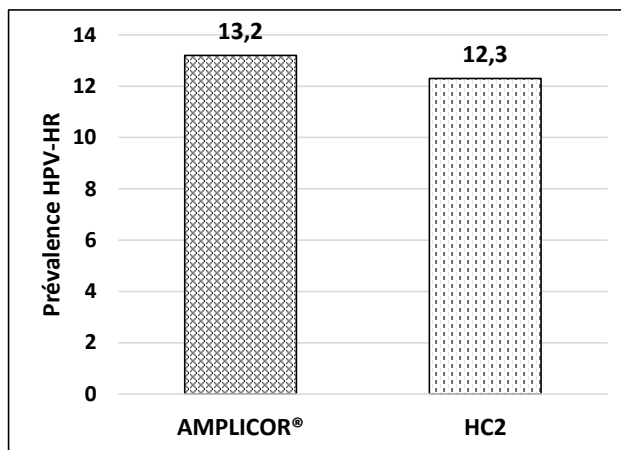


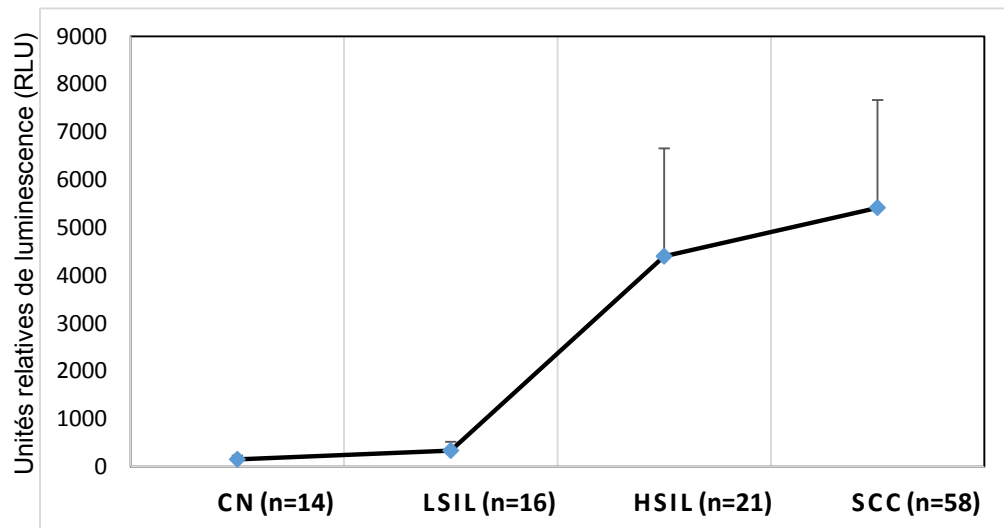
Figure 5.4 – Détection des HPV-HR dans les 423 prélèvements cervicaux : comparaison entre 2 tests utilisés (PCR-AMPLICOR et HC2)

### 5.1.7 Charge virale estimée par l'HC2

La charge en ADN des HPV dans les lésions est estimée par HC2. Ce test est semi-quantitatif, capable de fournir une estimation relative de la charge virale, calculée en unités relatives de luminescence (RLU). Dans cette étude, 109 échantillons cervicaux prélevés chez des femmes dont le col est lésé (lésions précancéreuses ou cancer invasif) ou non (cols normaux) sont utilisés. Les lésions sont, au préalable, détectées par cytologie, puis, en cas de nécessité, par histologie. Ces cas sont répartis comme suit :

- 14 cas de col normaux,
- 16 lésions de bas grade,
- 21 lésions de haut grade,
- 58 cas de carcinomes épidermoïdes.

Les résultats de la charge virale sont présentés sur la figure 5.5. La charge virale enregistrée dans les cas de cancer et dans les lésions de haut grade est d'au moins 15 fois plus élevée que celle des témoins. Les charges mesurées dans les cas normaux et les lésions de bas grade ne semblent pas différentes.



**Figure 5.5** – Estimation semi-quantitative de la charge virale en unité de luminescence dans les 109 prélèvements cervicaux selon les différents groupes de sujets. **CN** : col normaux, **LSIL** : lésions de bas grade, **HSIL** : lésions de haut grade, **SCC** : carcinome épidermoïde invasif

### 5.1.8 Génotypage des HPV-HR

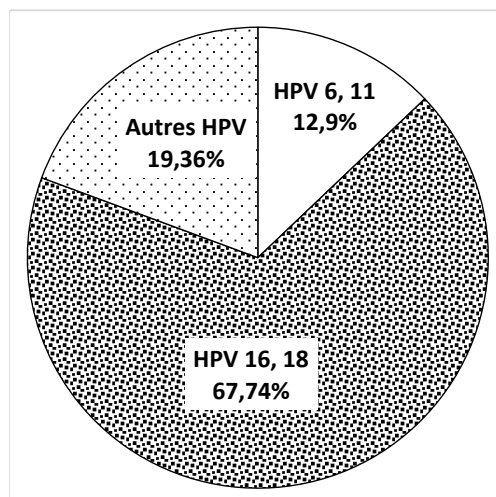
La détection des génotypes a concerné 87 biopsies recueillies de 2002 à 2011. Elle a été réalisée par PCR-AMPLICOR et la technique INNO-LiPA.

Les deux techniques utilisées sont les suivantes :

- La PCR AMPLICOR (Roche), suivie d'une hybridation par des sondes qui détectent 2 groupes de génotypes, les HPV de bas risque (HPV 6, 11...) et les HPV de haut risque (HPV 16, 18...). La figure 5.6 résume les résultats obtenus sur 31 biopsies de carcinomes épidermoïdes.

La technique AMPLICOR a permis de déterminer deux groupes d'HPV (haut risque et bas risque). Appliquée sur 31 biopsies, elle a révélé la présence d'HPV-HR (16 et/ou 18) dans 67,74% des cas. Environ le 1/5ème des biopsies sont positives en HPV-BR (HPV 6 et/ou 11). La technique utilisée ne détecte pas les autres génotypes.

- Le test INNO-LiPA, capable d'identifier un ou plusieurs génotypes d'HPV (25 génotypes au maximum), est appliquée sur 56 autres biopsies de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus.



**Figure 5.6** – Détection des génotypes d'HPV par PCR AMPLICOR dans 31 carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus par des sondes de groupe.

Le tableau 5.2 montre soit des infections uniques (mono-infection), soit des coinfections (association de deux ou plusieurs types d'HPV). L'HPV-HR a été détecté seul dans 32 biopsies soit dans 57,14% des cas. Une association de 2 à 4 génotypes a été observée dans 18 biopsies soit dans 42,86% des cas :

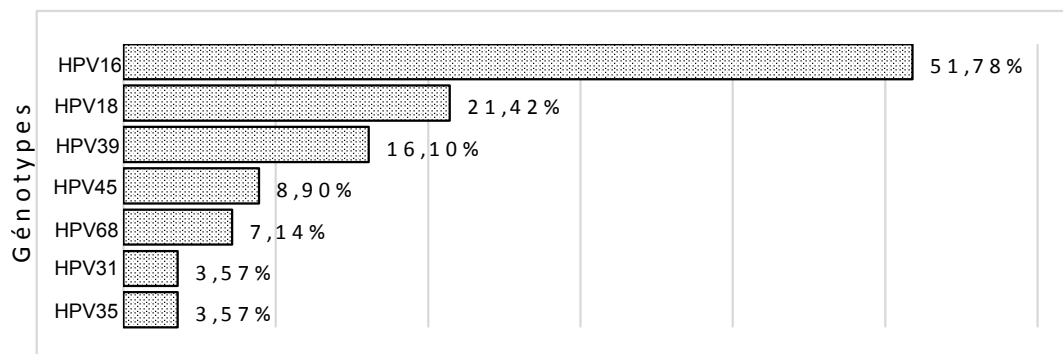
- 4 génotypes dans 1 biopsie,
- 3 génotypes dans 3 biopsies,
- 2 génotypes dans 14 biopsies.

Les 72 HPV ont été détectés dans 56 biopsies HPV-HR positives :

**Tableau 5.2** – Répartition selon les génotypes des 14 HPV-HR détectés dans 56 biopsies de cancer du col de l'utérus

| HPV          | Associés  | Seuls     | Total     |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| 16           | 19        | 10        | 29        |
| 18           | 8         | 4         | 12        |
| 39           | 5         | 4         | 9         |
| 45           | 1         | 4         | 5         |
| 68           | 0         | 4         | 4         |
| 31           | 1         | 1         | 2         |
| 35           | 1         | 1         | 2         |
| 33           | 2         | 0         | 2         |
| 52           | 2         | 0         | 2         |
| 25           | 1         | 0         | 1         |
| 51           | 0         | 1         | 1         |
| 56           | 0         | 1         | 1         |
| 58           | 0         | 1         | 1         |
| 59           | 0         | 1         | 1         |
| <b>Total</b> | <b>40</b> | <b>32</b> | <b>72</b> |

- L'HPV16 seuls ou associés est trouvé dans 51,78% des cas. L'HPV 18 est retrouvé dans 21,42% des cas. Les génotypes 16 et 18 sont donc présents dans 73,2% des cas (figure 5.7).
- L'HPV 39 est détecté seul ou associé 7 fois soit dans 16,1% des cas.



**Figure 5.7** – Pourcentage des différents génotypes d'HPV détectés par la technique INNO-LiPA dans les 87 biopsies du carcinome épidermoïde du col utérin.

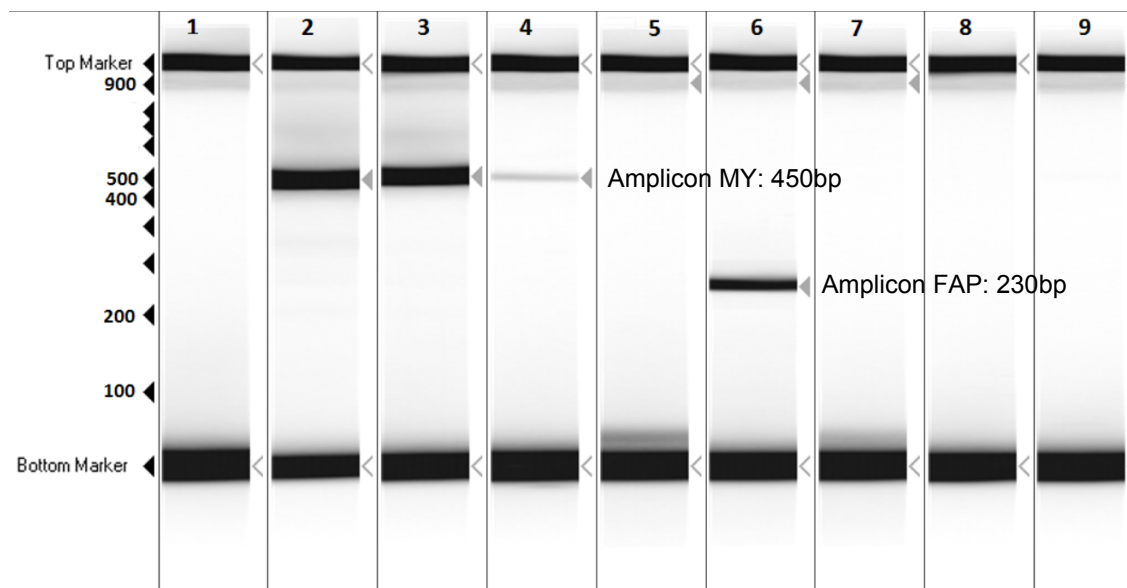
### 5.1.9 Séquençage de quelques souches détectées

Vingt biopsies paraffinées de carcinomes épidermoïdes du col de l'utérus prélevées au CHU de Sétif ont été étudiées. Les génotypes des HPV sont déterminés par hybridation INNO-LiPA. Les 20 biopsies examinées sont toutes HPV positives, dont 11 du type HPV16, parmi lesquelles 2 coïnfectées (HPV5 et HPV95). Quatre cas sont positives en HPV18 et 2 biopsies abritent l'HPV39. Les 3 cas restants sont respectivement positifs en HPV33, HPV25 et HPV52 (tableau 5.3).

**Tableau 5.3** – Génotypes des HPV-HR détectés dans 20 biopsies de cancer du col de l'utérus

| génotypes     | HPV16 | HPV16/5, 95 | HPV18 | HPV39 | HPV 33 | HPV25 | HPV52 |
|---------------|-------|-------------|-------|-------|--------|-------|-------|
| nombre de cas | 9     | 2           | 4     | 2     | 1      | 1     | 1     |

Les séquences L1 amplifiées sont d'abord séparées par électrophorèse capillaire pour visualiser les bandes d'amplification (figure 5.8). Les amplicons issus des amorces FAP sont de 230 pb environ, par contre les amorces MY donnent des amplicons de 450 pb.



**Figure 5.8** – Électrophorèse capillaire des séquences L1 destinées au séquençage. Les colonnes 2, 3 et 4 représentent des biopsies positives en ADN L1 amplifié par les amorces MY09/11. La colonne 6 montre un cas positif en ADN L1 amplifié par les amorces FAP. Les colonnes 1, 5, 7, 8 et 9 indiquent des résultats négatifs.

Les séquences nucléotidique et peptidique des régions amplifiées sont obtenues à l'aide du logiciel Sequencer 4.7 ; les résultats obtenus en utilisant les amorces FAP sont présentés sur la figure 5.9, tandis que ceux obtenus par les amorces MY09/11 sont indiqués dans la figure 5.10.

Les séquences nucléotidique et peptidique obtenues ont été comparées à des séquences de référence de la base de données Genbank au moyen du programme BLASTN 2.2.26, disponible sur le site de la NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le BLAST donne une séquence de référence avec un score de similarité. Le score obtenu est supérieur ou égal à 200 (figure 5.12), indiquant une similitude de 99%.

Séquence obtenue après traitement par Sequencher 4.7

**FAP**  
**Séquence en bases**  
 CTAGGTCTGCAGAAAACCTTTTCCTTTAAATTTACTTCCCAAAAAGTGTATTTT  
 TAAGGGGATCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTGTATGTTTCGACAAGCAATTGCC  
 TGGGATGTTACAAACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTG  
 TAGACCAAAATTCCAGTCTCCAAAATAGTGGAATTCATAGAATGTATGTATG  
 TCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTTTGCACAGTTGAAAAATAAACTGTAAA  
 TCATATTCTCCCATGTCGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTATATGTA  
 GTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTGTACTGCGTGTAGT  
 ATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCCAACAAATGC

**Séquence en acides aminés**  
 LGLQKTFPLNLLPKKCIF.GDLL.VLEVYVFDKQLPGMLQTYKYLLVCLLGEVVDQ  
 NSSPPK.WNS.NVCM.S.RLQLRLFCTVEK.TVNHIPPHVVGTP.S.YFYM.FLK.IWQHI  
 MTYLYCV.YQQQ.QIVGYPNKC

Figure 5.9 – Séquences nucléotidique et peptidique partielle du gène L1 amplifiée par les amorces FAP.

Séquence obtenue après traitement par Sequencher 4.7

**MY09/11**  
**Séquence en bases**  
 TTAACWGTGGGGCATCCKTATTTCAATGTATATAATAATACTGGTGATAAGCTTG  
 AGGTCCCTAAGGTTTCAGGAAATCAACACAGAGTATTTTCGCCTAAAATTACCAGA  
 TCCCAACAGATTTCATTAGCTGATATGTCTGTTTACAACCCTGACAAAAGAACGT  
 TTGGTTTGGGCTGTAGAGGCTTAGAAATAGGTAGGGGCCAGCCATTGGGTGTAT  
 TAAGTGTGGGGCATCCTTATTTCAATAAAGTAAAAGATACAGAAAAACAGTAATGC  
 ATACATAACATTTTCTAAAGATGACAGACAGAATACATCCTTTGATCCTAAACAA  
 ATCCAAATGTTTCATTGTAGGATGCACACCTTGCATAGGAGAGCATTGGGATAAAG  
 CTGTGCCTTGTGCAGAAAATGACCAGCAAATTGGCCTTTGTCCTCCTATTGAATTA  
 AAAAACACATATATAGAAGATGGCGACATGACAGATATWGGAAAAACAGTAATG  
 CATAACATAACATTTTCTAAAGATGACAGACAGAATACATCCTTTGATCCTAAACA  
 AATCCAAATGTTTCATTGTAGGATGCACACCTTGCATAGGAGAGCATTGGGATAAA  
 GCTGTGCCTTGTGCAGAAAATGACCAGCAAATTGGCCTTTGTCCTCCTATTGAATT  
 AAAAACACATATATAGAAGATGGCGACAT

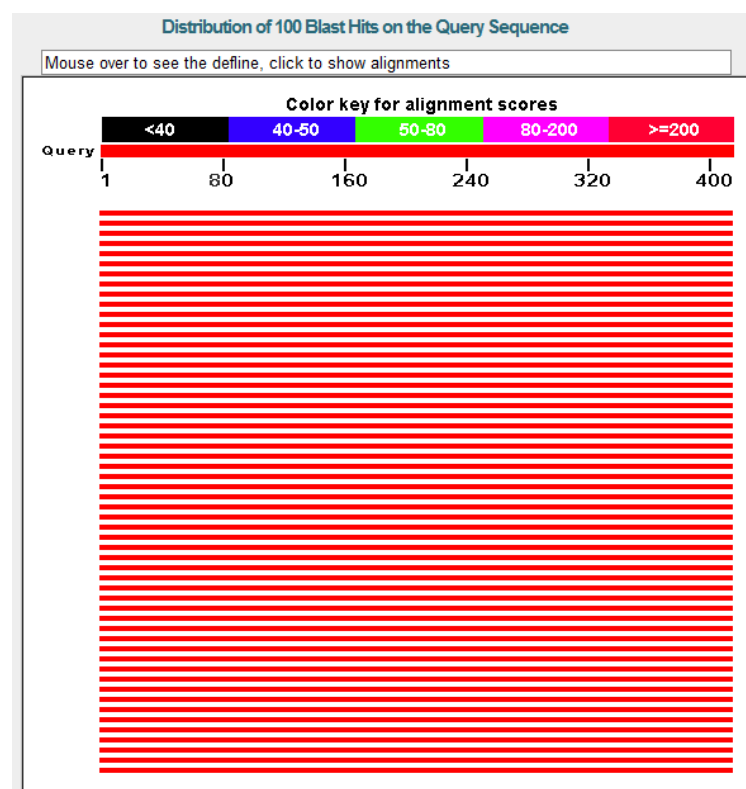
**Séquence en acides aminés**  
 LTVGHPYFNVYNNITGDKLEVPKVSGNQHRVFRLLKLPDPNRFALADMSVYNPDKERL  
 VWACRGLGIRGQPLGVLTGHPYFNKVKDTENSAYITFSKDDRQNTSFDPKQIQM  
 FIVGCTPCIGEHWDKAVPCAENDQQIGLCPPIELKNTYIEDGDMTDIGKQ.CIHNIF.R.Q  
 TEYIL.S.TNPNVHCRMHTLHRRALG.SCALCRK.PANWPLSSY.IKKHIYRRWRH

Figure 5.10 – Séquences nucléotidique et peptidique partielle du gène L1 amplifiée par les amorces MY09/11.



L'analyse BLASTN, a montré que la séquence nucléotidique de nos isolats présente une homologie de 99% comparées à celles des 108 isolats disponibles dans la base de données Genbank (figures 5.11, 5.12). Quelques exemples sont cités ci-dessous :

- la séquence italienne (JF728183.1)
- la séquence thaïlandaise (FJ610151)
- les séquences canadiennes (GQ4658980, GQ4658986, GQ4658988),
- la séquence mexicaine (FJ797055),
- la séquence chinoise (FJ006723)
- la séquence de la Serbie (FJ797055),
- la séquence d'Australie (DQ469930),
- la séquence des USA (AF534061),
- la séquence de l'Afrique du Sud (AY177679),
- la séquence du Japon (EU911665)



**Figure 5.11** – Rapport de taxonomie de l'HPV16 détecté. La séquence analysée est de 414 nucléotides de long. Le score de chaque alignement est divisé en 5 couleurs différentes, et les alignements sont placés dans l'ordre des meilleurs scores. La clé de couleur correspond au score d'alignement de la séquence nucléotidique avec les séquences de référence de la base de données (Genbank, NCBI) en utilisant une analyse BLASTN (les lignes rouges indiquent une similarité avec les souches de référence de près de 100%).

Cet alignement a permis de classer tous les HPV détectés dans le genre **alpha** :

- les génotypes -16, -33 et -35 dans le groupe  $\alpha$ -9 ,
- les génotypes -18, -39 et -59 dans le groupe  $\alpha$ -7.

|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------------------------------------------------|------|--|
| <a href="#">gb JF728183.1 </a> Human papillomavirus type 16 isolate MI_91_03 L1 protein gene, partial cds<br>Length=1318 |      |                                                              |      |  |
| Score = 760 bits (411), Expect = 0.0<br>Identities = 413/414 (99%), Gaps = 0/414 (0%)<br>Strand=Plus/Minus               |      |                                                              |      |  |
| Query                                                                                                                    | 1    | CTAGGTCTGCAGAAAACCTTTTCCTTTAAATTTACTTCCCAAAAAGTGATTTTTTAAGGG | 60   |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 1309 | CTAGGTCTGCAGAAAACCTTTTCCTTTAAATTTACTTCCCAAAAAGTGATTTTTTAAGGG | 1250 |  |
| Query                                                                                                                    | 61   | GATCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAA  | 120  |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 1249 | GATCTTCTTTAGGTGCTGGAGGTGTATGTTTTGACAAGCAATTGCCTGGGATGTTACAA  | 1190 |  |
| Query                                                                                                                    | 121  | ACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGACCAAAATTCAGTCCT  | 180  |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 1189 | ACCTATAAGTATCTTCTAGTGTGCCTCCTGGGGGAGGTTGTAGACCAAAATTCAGTCCT  | 1130 |  |
| Query                                                                                                                    | 181  | CCAAAATAGTGGAATTCATAGAATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTT | 240  |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 1129 | CCAAAATAGTGGAATTCATAGAATGTATGTATGTCATAACGTCTGCAGTTAAGGTTATTT | 1070 |  |
| Query                                                                                                                    | 241  | TGCACAGTTGAAAAATAAACTGTAAATCATATTCCTCCCATGTCGTAGGTACTCCTTAA  | 300  |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 1069 | TGCACAGTTGAAAAATAAACTGTAAATCATATTCCTCCCATGTCGTAGGTACTCCTTAA  | 1010 |  |
| Query                                                                                                                    | 301  | AGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTG | 360  |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 1009 | AGTTAGTATTTTTATATGTAGTTTCTGAAGTAGATATGGCAGCACATAATGACATATTTG | 950  |  |
| Query                                                                                                                    | 361  | TACTGCGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCCAACAAATGC       | 414  |  |
|                                                                                                                          |      |                                                              |      |  |
| Sbjct                                                                                                                    | 949  | TACTGCGTGTAGTATCAACAACAGTAACAAATAGTTGGTTACCCCAACAAATGC       | 896  |  |

**Figure 5.12** – Alignement de la séquence L1 du HPV16 avec une séquence de référence déposée dans la base de donnée "GenBank". La comparaison est effectuée par le logiciel BLASTN 2.2.26

## 5.2 Discussion de l'intérêt du tests HPV dans le dépistage

### 5.2.1 Dépistage du cancer du col de l'utérus en Algérie

Ce travail présente les données portant sur la prévalence, chez les femmes algériennes, de l'infection du col de l'utérus par les papillomavirus. Les résultats obtenus pourraient constituer une base pour le renforcement et l'amélioration de la prévention du cancer du col de l'utérus. L'Algérie n'a pu atteindre les résultats escomptés malgré la mise en place d'un programme national de dépistage des lésions cancéreuses et précancéreuses du col. Ce dépistage était basé jusqu'à ces dernières années sur l'étude cytologique du frottis cervico-utérin (FCU) réalisé à intervalle régulier dans la vie d'une femme. Ce programme a provoqué un recul important de l'incidence de la maladie dans les pays développés. Cependant, il s'est montré totalement inefficace dans les autres pays. Cet échec est dû à des raisons communes à tous les pays en voie de développement, en particulier :

- l'insuffisance de la couverture par le FCU,
- l'imperfection du test FCU utilisé pour le dépistage.

#### Insuffisance de la couverture de population cible en Algérie

Selon la direction de la santé et de la population au ministère de la santé (bilan 2001-2007), le dépistage n'atteint que 10,04 pour 100.000 femmes de la population cible, malgré la création depuis 2001 de 143 unités de cytodiagnostics et la formation de 290 cytotechniciens. En effet, 4 femmes décèdent chaque jour en Algérie du cancer du col de l'utérus. Au total, 1.600 cas sont enregistrés chaque année à travers le pays et entre 80 et 90% des femmes ont atteint un stade avancé de la maladie [Sadouki et al., 2010b]. En revanche, sur le plan des capacités de prise en charge de ces nombreux cas, il n'existe que 3 centres spécialisés pour tous les types de cancer, d'où l'insuffisance du suivi des cas avérés.

La plupart des cas incidents (90%) sont associés à l'absence du dépistage ou à un dépistage déficient. Chez la faible proportion des femmes dépistées, environ 25% d'échecs de dépistage sont dus à des défaillances dans le prélèvement ou à un frottis ininterprétable [Sadouki et al., 2010b].

Le même constat est observé dans les pays développés. En effet, l'étude de Sawaya and Grimes [1999] indique que 50% des 15.700 femmes américaines qui avaient développé en 1999 un cancer du col n'avaient pas bénéficié d'un test de dépistage et 10% n'avaient pas respecté l'intervalle de temps requis entre les dépistages. Dans une autre enquête réalisée dans le Bas-Rhin (France) 46% des carcinomes malpighiens étaient survenus chez des femmes non dépistées, 9,2% chez des femmes n'ayant pas respecté l'intervalle requis

et 20,7% chez des femmes ayant un frottis antérieur normal datant de moins de 3 ans [ANAES, 2004].

### Imperfection du test FCU

La qualité de ce test cytologique souffre de quelques anomalies dans sa réalisation, dans sa lecture, dans son interprétation ainsi que dans sa sensibilité.

- Anomalies dans la réalisation du frottis. Ces anomalies sont dues à la réalisation de prélèvements paucicellulaires, à la mauvaise fixation des cellules sur les lames de prélèvement ou à l'altération des cellules par des éléments inflammatoires ou hématiques. Le système de Bethesda exige que le compte rendu cytologique doit apporter l'appréciation sur la qualité du frottis qui peut être : de bonne qualité, ininterprétable, limite (satisfactory but limited) [Dachez and Lefot-Mosse, 2003]. Le rapport de la direction de la santé et de la population en Algérie indique que 75% de frottis sont de bonne qualité et 15,8% sont limites. Le taux de frottis ininterprétables est trop élevé (9%) ; il devrait être de 1 à 2% selon l'ANAES [2004].
- Erreurs de lecture ou d'interprétation. Les résultats ne sont souvent pas reproductibles en partie à cause de la subjectivité du cytologiste [Stoler and Schiffman, 2001]. Le pourcentage des faux-négatifs est dans 1/3 des cas dû à des erreurs de lecture ou d'interprétation [Autillo-Touati et al., 1992]. La différence de prévalence dans les résultats obtenus pourrait être due, en partie, à un sur-diagnostic cytologique et/ou colposcopique des lésions classées haut grade alors qu'elles ne sont peut-être que des lésions bas grade. Cette éventualité a été signalée par différents [ANAES, 2002, Monsonego, 2007].
- Manque de sensibilité du test. Selon la méta-analyse de Fahey et al. [1995] reprenant 62 études, la sensibilité du FCU dans le dépistage de première ligne des lésions cervicales n'excède pas 58%. Quant à Cuzick et al. [2006], dans sa méta-analyse sur les pays d'Europe et d'Amérique du Nord la sensibilité globale du FCU est de 53%. La sensibilité du frottis s'est avérée médiocre dans le suivi des femmes traitées pour CIN2/3, elle n'est que de 51% pour Jeronimo et al. [2014]. Ce test pose le problème des faux négatifs et laisse donc le processus tumoral actif se développer.

En 1998, l'ANAES a évalué les performances du frottis conventionnel à partir de l'analyse d'articles publiés entre 1992 et 1998 [Renshaw, 2003]. Les résultats de cette étude montrent que la sensibilité du frottis conventionnel varie de 32 à 73% s'il s'agit d'une dysplasie de bas grade (CIN 1) ; elle varie de 32 à 98% si la lésion détectée est de haut grade (CIN 3). En cas de dysplasie de bas grade la spécificité varie de 40 à 83% et de 57

à 82% en cas de dysplasie de haut grade. Il existe ainsi une fourchette de résultats assez large, ce qui pose le problème du contrôle de la qualité des résultats cytologiques. Différentes propositions ont été faites pour réduire ces valeurs : relecture de l'ensemble des frottis (trop de lectures!), relecture de 10% des frottis pris au hasard [Renshaw, 2003] relecture rapide de l'ensemble des frottis [Herbert et al., 2007] ou relecture ciblée d'une population à haut risque [Koss, 1993].

Les faux positifs sont évalués entre 2 et 8% [De May, 1997]. Ils sont plus faciles à déceler car ils peuvent être rattrapés par la colposcopie ou l'histologie. Cependant, ils nécessitent, la réalisation d'explorations complémentaires et parfois un traitement inadapté et plus agressif, ce qui génère souvent un stress important chez les patientes. Il a été proposé de réaliser une colposcopie en cas de frottis présentant une anomalie mais cette exploration a une faible spécificité ce qui limite son intérêt en cas des lésions mineures (CIN 1) car le diagnostic histologique est peu reproductible.

En Algérie, peu de données fiables portant sur la sensibilité du FCU sont disponibles. Une étude portant sur 37 cas de lésions haut grade histologiquement confirmés indique une sensibilité à détecter des lésions CIN2+ de 64,9% [Sadouki et al., 2010a,b]. L'étude de 465 biopsies prélevées à l'hôpital de Zéralda et diagnostiquées par histologie indique que le FCU n'a détecté que 52,2% des lésions de haut grade. Ces données doivent être prises avec beaucoup de prudence car il existe un biais dans la sélection hospitalière des patientes qui ont subi la biopsie [Boudriche, 2014]. Ce manque de sensibilité est pallié par la répétition des tests : deux tests avec un intervalle d'un an puis un test tous les trois ans. Cet intervalle entre les dépistages est peu respecté, particulièrement dans les pays en voie de développement. Il ressort du rapport de la Direction de la population que seules 15% des femmes algériennes testées la première fois reviennent effectuer le second test.

Beaucoup d'efforts ont été fournis pour améliorer le test cytologique. Le frottis en milieu liquide permettant d'avoir un nombre suffisant et homogène de cellules cervicales constituait un réel espoir. Cependant, la sensibilité obtenue n'a pas été meilleure que celle du frottis conventionnel [Reithmuller et al., 2008, Castle et al., 2011].

Il semble donc nécessaire d'élargir la stratégie du dépistage à la recherche du principal agent causal du cancer du col utérin : l'HPV-HR oncogène [Davey et al., 2014]. Bien que de nombreuses souches d'HPV-HR soient impliquées dans la genèse du cancer du col utérin, les souches 16 et 18 sont les plus intéressantes à rechercher car elles sont retrouvées dans plus de 70% des cancers invasifs et des lésions de haut grade. d'où l'intérêt de rechercher la présence de ce virus par un test biologique simple, fiable et reproductible, le test HPV [Winer et al., 2012].

Le développement de la tumeur cervicale n'est pas seulement dû à l'infection par les HPV-HR, mais à la persistance de ces virus [Monsonogo, 2007]. Le choix du test HPV devient une nécessité pour détecter cette persistance qui serait le facteur de risque le plus important de développer une lésion précancéreuse de haut grade [Stanley and Sterling,

2014].

### 5.2.2 Performances du test HPV

La sensibilité et la spécificité obtenus par les tests HPV (PCR ou HC2) à détecter les lésions de haut grade par rapport aux résultats cyto-histologiques seront discutés.

#### Sensibilité du test HPV

La sensibilité du test HPV (PCR ou HC2) appliqué aux frottis, grattages et biopsies sur les lésions précancéreuses du col diagnostiquées histologiquement est de 79,38%. Ces données sont particulièrement retrouvées dans les pays non industrialisés, où la sensibilité varie entre 30 à 80% [Seoud et al., 2009]. Cette sensibilité s'élève à 96% en Europe et aux USA [Bhatla and Moda, 2009]. Elle serait de 78,9% à 100% selon ANAES [2004] et de 68% à 95,5% selon Rousseau et al. [2000].

Les résultats concernant la sensibilité du FCU sont divergents et varient de 20% à 78% [Monsonogo, 2007, Cuzick et al., 2008]. Le test HPV reste le plus sensible à détecter les lésions de haut grade [Monsonogo, 2007, Cuzick et al., 2008, Lörincz and Richart, 2003].

Comparativement au test HPV (sensibilité=89,4%), le FCU réalisé dans notre étude a une sensibilité de 67,9%. Cette faible sensibilité a été rapportée par d'autres auteurs [Rousseau et al., 2000, Lörincz and Richart, 2003].

#### Spécificité du test HPV

La spécificité du test HPV est dans notre étude de 71,4% avec les tests PCR conventionnelle seule ou PCR-HC2 confondus. Par contre, le FCU semble plus spécifique (92,3%) à détecter une lésion précancéreuse. Sa spécificité est bien meilleure que celle du test HPV selon la majorité des études [Rousseau et al., 2000, Lörincz and Richart, 2003, Bhatla and Moda, 2009]. Cette spécificité va de 69 à 96% selon la revue de Rousseau et al. [2000]. Il existe des différences dans les résultats de la spécificité du test FCU [Cuzick et al., 2008, Bhatla and Moda, 2009]. Cette divergence dans les résultats pourrait être due à différents facteurs : âge des patientes, techniques utilisées, environnement.

#### Effet de l'âge des patientes

Le test HPV serait plus spécifique au delà de 30 ans chez les femmes infectées par les HPV-HR. En effet, Schiffman et al. [2000] relèvent une sensibilité et une spécificité plus élevées chez les femmes âgées de plus de 41 ans comparées aux plus jeunes (31-40 ans). Cuzick et al. [2008] retrouvent une spécificité plus élevée (94,6%) chez les femmes de plus de 35 ans par rapport à celle observée chez les femmes tout âge confondu (90,7%), tandis que la sensibilité reste la même.

En dehors de toutes pratiques cytologiques, un test HPV positif chez une femme de moins de 30 ans ne doit pas susciter immédiatement une colposcopie en raison de la forte prévalence de l'infection HPV chez les femmes jeunes. On admet que de 25 à 40% des femmes, âgées de 15 à 25 ans, sont porteuses d'HPV-HR sans forcément présenter des lésions sous-jacentes [[Halfon et al., 2013](#)].

Après l'âge de 30 ans, les patientes présentant les signes ci-dessous doivent être suivies de plus près :

- Persistance de l'infection à HPV-HR après 2 prélèvements à 9 ou 12 mois d'intervalle : la persistance de l'infection HPV-HR est considérée comme l'un des critères objectif et significatif permettant d'évaluer le risque de la patiente à avoir une lésion sous-jacente précancéreuse actuelle ou future [[Gosvig et al., 2013](#)].
- Charge virale pour l'ADN HPV-HR élevée : il est démontré que comparé aux cols normaux et après l'âge de 30 ans, la charge virale élevée est significativement corrélée aux lésions précancéreuses [[Theelen et al., 2013](#)].
- La présence de marqueurs viraux (en cours d'évaluation), en particulier les ARNm des HPV-HR, les oncoprotéines (E6 et E7), le dysfonctionnement de la p16 et la méthylation des promoteurs viraux ou cellulaires permettrait de mieux évaluer le risque chez les patientes présentant un HPV-HR positif [[Tornesello et al., 2013](#)].

La moyenne d'âge à laquelle est enregistrée la plus grande prévalence d'infection HPV se situe dans un intervalle de 15 à 30 ans. Le pic de fréquence des HPV oncogènes est variable selon les auteurs :

- 14,2% entre 15 et 20 ans d'après [Ludicke et al. \[2001\]](#) ;
- 24% entre 20 et 25 ans selon [Sellors et al. \[2000\]](#) ;
- 19,4% entre 25 et 29 ans dans la série de [Boulanger et al. \[2004\]](#).

La prévalence d'infection diminue progressivement avec l'âge. Au-delà de 35 ans, elle serait de 1,5% pour [Cox \[1996\]](#), de 4,8% pour [Meijer and Van den Brule \[1992\]](#) et de 9,6% pour [Sellors et al. \[2000\]](#). Dans l'étude de [Boulanger et al. \[2004\]](#), la diminution est beaucoup moins rapide et le portage reste aux alentours de 15% jusqu'à 40 ans, supérieur à 10% jusqu'à 55 ans et reste stable (8%) après cet âge.

L'infection par les HPV-HR étant moins fréquente chez les femmes de plus de 30 ans. Le test HPV, dans ce cas, aurait une meilleure spécificité. Ce test est, par conséquent, conseillé après cet âge. Il est moins conseillé pour les plus jeunes afin d'éviter le sur-diagnostic

#### **Influence de la technique utilisée sur la spécificité**

La détection de l'ADN viral est complexe en raison de la multiplicité des génotypes HPV infectant le col de l'utérus. Différentes techniques ont été mises au point au cours



des trois dernières décennies. Les techniques utilisées au niveau du laboratoire de l'IPA sont discutées.

**a) Southern-blot :** La technique du Southern-Blot a été utilisée par l'équipe du Professeur Bouguermouh pour la détection spécifique des génotypes 16, 18, 6, 11. Elle permet la détection de 0,1 copie virale par cellule. La révélation de l'intégration du génome du virus dans les chromosomes cellulaires est possible par cette technique. Ce résultat obtenu en 1989 reste jusqu'à présent d'actualité. [Meguenni et al. \[1992\]](#) ont montré que parmi 7 lésions cancéreuses étudiées, 5 révélaient une intégration probable du génome viral HPV16 dans le génome des cellules cervicales. Il est bien connu que l'intégration du génome viral soit un événement important dans la transformation et la cancérisation de la cellule, les oncogènes viraux (E6 et E7) ne sont plus réprimés dans ce cas. Bien qu'elle fournisse l'information d'un mauvais pronostic quant à l'évolution de la lésion, cette technique n'est plus utilisée pour le dépistage pratique car elle est lourde, complexe et nécessite une importante quantité d'ADN.

**b) PCR :** Différentes PCR ont été mis au point faisant appel à des amorces spécifiques communes aux différents HPV. Les PCR les plus fréquemment utilisées font appel aux amorces à large spectre. Elles permettent de répondre à la grande variété des génotypes HPV muqueux chez l'homme. Ces amorces ciblent une région très conservée (le gène L1, codant pour la protéine majeure de la capsid virale). Les amplicons obtenus sont de différentes tailles (figure 2.13) :

- 450pb (MY09/MY11), PGMY [[Saini et al., 2009](#)]
- 150 pb (GP5+/GP6+) [[Lörincz and Richart, 2003](#)]
- 65pb (SPF10) [[Cornall et al., 2014](#)]
- 230 pb FAP [[Lörincz and Richart, 2003](#)]
- 160 pb Roche HPV AMPLICOR

Dans ce travail, les PCR ont été utilisées avec les amorces MY9/MY11 qui, avec des nucléotides dégénérés, permettent de compenser les variations au site d'hybridation. Ce système donne toutefois des résultats susceptibles de varier d'un lot de fabrication à l'autre [[Gravitt et al., 2000](#)]. Il favoriserait en outre dans les infections multiples, la détection de certains génotypes aux dépens des autres [[Capovilla and Clavel, 2003](#)].

Les prévalences HPV-HR trouvées dans cette étude sont moins élevées comparative-ment à celles retrouvées en Europe et aux USA. Ceci pourrait être expliqué en partie par le système PCR-MY09/11 que nous avons utilisé et qui semble être moins sensible que le test GP5+/GP6+ [[Munoz et al., 2003](#), [Remmerbach et al., 2004](#)]. Par ailleurs, la complexité de la PCR conventionnelle rends plus difficile sa standardisation.

Le test HPV PCR-AMPLICOR détecte les mêmes génotypes d'HPV que le HC2. Il semble apporter une amélioration par rapport à la PCR conventionnelle. Relativement, relative-



ment plus simple dans son exécution, il génère un amplicon de 160 pb et renferme un contrôle ADN de la  $\beta$  globine susceptible de renseigner sur la qualité du prélèvement cellulaire. Sa sensibilité est de 100 copies/ml.

Les points suivants seront discutés :

- les performances de l'HC2
- les performances de la PCR conventionnelle
- les performances du test AMPLICOR et sa comparaison avec l'HC2
- La PCR spécifiques HPV 6-11 et 16-18 dans le suivi des lésions précancéreuses

c) **HC2** : est un test approuvé par la FDA (USA Food and Drug Administration). D'autres tests, comme le système Cobas 4800 de Roche, le test Cervista® HPV de HOLOGIC, ont, plus récemment, obtenu une validation FDA. D'autres tests émergeront sûrement dans l'avenir du fait des grandes avancées technologiques concernant la détection de ces virus.

Le test HC2 que nous avons utilisé permet la détection de 13 génotypes d'HPV-HR et de 5 génotypes d'HPV-BR dans les prélèvements cervicaux. Seul le test comprenant le cocktail des sondes HPV-HR est actuellement utilisé dans le laboratoire de l'IPA.

Bien qu'il soit encore utilisé dans les pays à ressources limitées, le test HC1 (Hybride Capture de première génération) semble être moins sensible que la PCR ou l'HC2. Des études au niveau de l'IPA avaient souligné sa faible sensibilité comparée à celle de la PCR (68,4% *versus* 82,2%). Cette plus faible sensibilité d'HC1 a été signalée depuis 1998 par [Clavel et al. \[1998\]](#).

La nouvelle génération HC2 est nettement plus sensible que le FCU (89,36% contre 63,82%). Quelques auteurs [[Depuydt et al., 2012](#), [Luu et al., 2013](#)] ont rapporté une meilleure sensibilité du test HC2 à détecter les lésions CIN2+ par rapport au frottis (96 à 100% avec l'HC2 contre 44 à 78% avec le FCU). La spécificité est par contre plus basse avec le test moléculaire comparé au FCU : 92% contre 97% respectivement [Cuzick et al. \[2008\]](#). [Levert et al. \[2000\]](#) avaient, également, décrits des résultats similaires où tous les cas de lésions de haut grade (100%) étaient associés à des HPV-HR, alors que le frottis n'a détecté que 85,9% de ces cas. Par contre, la spécificité du test HC2 est avérée inférieure à celle de la cytologie (86,3% contre 94% respectivement). Comparé au test de la PCR conventionnelle, l'HC2 a les performances égales, mais plus simple d'exécution. D'autres auteurs signalent un manque de sensibilité pour certains types HPV [[Walboomers et al., 1999](#), [Luu et al., 2013](#)].

La limite de détection moyenne est de 1,08 pg/ml pour les 13 génotypes d'HPV-HR ; le seuil de positivité le plus élevé est de 1,68 pg/ml pour l'HPV39 relativement fréquent dans notre étude. Le seuil proposé est fixé à 2 pg. La sensibilité du test s'améliore sans diminution notable de la spécificité. Le manque de spécificité peut être dû en partie au fait que ce test détecte certains types HPV dont l'oncogénicité est discutée (types 53, 54, 62, 83). De faibles réactions croisées sont décrites par le producteur du kit (Digene) lui-

même (6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66). Les patientes dont les échantillons contiennent un taux élevé de ces types peuvent être considérés à tort comme positifs [Ronco et al. \[2006\]](#).

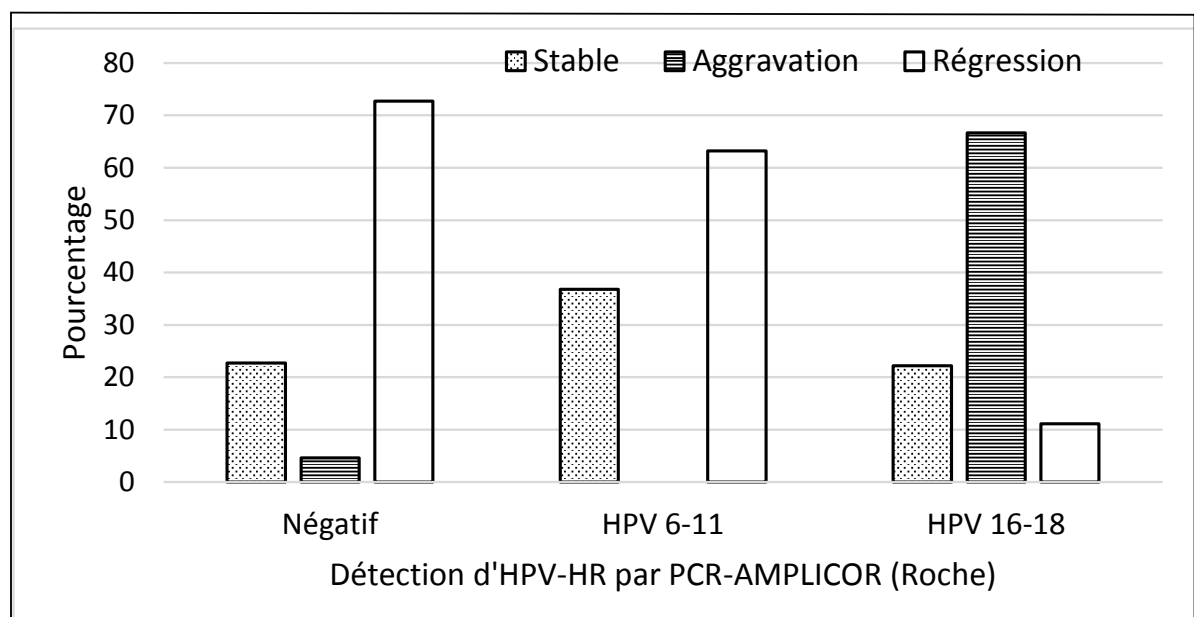
### Comparaison entre les tests AMPLICOR et HC2

Les résultats de l'étude comparative des tests AMPLICOR et HC2 ayant porté sur 423 prélèvements sont assez proches pour les deux tests. Les deux techniques ont des sensibilités comparables. La concordance reste élevée (98,5%). Des résultats similaires ont été décrits [[Mo et al., 2008](#), [De Francesco et al., 2008](#), [Tabrizi et al., 2012](#)].

Ces deux techniques semblent avoir les mêmes capacités à détecter les HPV-HR. Le dépistage du cancer du col de l'utérus peut utiliser l'une d'elles. Cependant, l'HC2 semble plus apte à être intégrée dans les laboratoires moins équipés vu sa simplicité et sa facilité d'exécution.

### 5.2.3 Test HPV et suivi des lésions

Une étude portant sur 143 patientes présentant des lésions de bas grade (CIN1) à été menée au niveau du service de gynécologie-obstétrique de l'hôpital de Zeralda. Elle consiste à suivre des patientes, à intervalle de temps, pendant 40 mois, par un test HPV. Les prélèvements correspondants ont été examinés par les techniques du FCU, de la PCR-AMPLICOR (sondes HPV 6-11 et 16-18) et de la colposcopie en cas de nécessité. Les résultats de cette surveillance ont été exprimés en termes de stabilité de la lésion, sa régression, ou son évolution vers le cancer invasif (figure 5.13).



**Figure 5.13** – Suivi de 143 patientes pendant 40 mois par le test HPV. Les résultats sont obtenus lors d'une étude collaborative entre le laboratoire de l'IPA et Hôpital de Zeralda, Dr Boudriche (Hôpital de Zeralda)

Une aggravation des lésions est notée dans 66,7% des cas associés aux génotypes 16/18 ( $p < 10^{-6}$ ). Par contre, une disparition des lésions est observée dans 11,1% des cas. Une disparition des lésions est retrouvée dans 63,2% des lésions ( $p < 10^{-6}$ ) associées aux génotypes 6/11. Aucune aggravation n'est notée avec les CIN1 associées aux types 6/11. Certaines lésions CIN1 sont restées stables. Cette stabilité est légèrement plus prononcée avec les HPV 6/11 ( $p < 0,01$ ). La majorité des lésions (72,7%) sans virus disparaissent. On note enfin l'apparition d'une lésion de bas grade chez une des 35 femmes, soit 2,9% de cas présentant au départ un col normal.

Cette étude montre l'importance de suivre les patientes infectées par certains génotypes, particulièrement les HPV 16 et 18 qui sont détectés (seuls ou associés) dans près de 74% des cas. Partout dans le monde, ces deux génotypes sont prédominants, ce qui justifie le choix d'introduire ces deux types d'HPV dans les vaccins, contre le cancer du col (actuellement commercialisés).

#### 5.2.4 Charge virale

La charge virale peut être déterminée de plusieurs manières. Le test HC2 (Digene) dont dispose le laboratoire de l'IPA permet une évaluation semi-quantitative de la charge virale [Lorincz et al., 2002]. Il s'agit d'une technique assez sensible puisqu'elle est basée sur l'amplification du signal. Le seuil de détection est de 1 pg/mL (soit 5000 copies d'HPV/ml). Le niveau de la charge virale peut être bas (1-10 pg/mL), intermédiaire (11-100 pg/mL) ou élevée ( $> 100$  pg/mL) [Dalstein et al., 2003]. Bien qu'il fournisse une évaluation semi-quantitative, le test HC2 permet une évaluation fiable de la charge virale [Pretet et al., 2004]. Cependant, il ne différencie pas entre les différents types d'HPV détectés. Il fournit une charge virale globale, potentiellement cumulée en cas d'infections multiples.

Les recherches concernant la charge en HPV et sa signification clinique sont discordantes. Dans notre série de 109 patientes, la charge virale la plus élevée est observée dans le cas des cancers invasifs (plus de 100 pg/mL). Ces prélèvements semblent être riches en génomes viraux. Ces résultats contredisent ceux de Schmitt et al. [2013] qui ont obtenu une charge virale significativement moins élevée chez les femmes cancéreuses par rapport à celles ayant une CIN1, une CIN2 ou une CIN3. Les femmes avec une cytologie négative ont les charges les plus faibles. Ces auteurs argumentent leurs résultats par le fait que dans les cas de cancer, le génome viral est souvent intégré dans celui de la cellule, et par conséquent se réplique moins. Selon Lombard et al. [1998], l'absence de l'HPV dans les cellules d'un cancer du col de l'utérus serait associée à un mauvais pronostic. Le test HPV négatif effectué sur une tumeur cervicale pourrait être expliqué soit par l'absence du virus dans le prélèvement, soit que le génome est indétectable à cause de son intégration dans le génome de l'hôte. Bien qu'il semble exister un lien entre la charge virale en

HPV et l'évolution des cancers du col de l'utérus, très peu d'études ont évalué l'impact de la charge virale en HPV sur le devenir et le pronostic des cancers du col [Wanram et al., 2009].

Nos résultats concordent avec ceux d'Edwards et al. [2013] qui ont montré que les cancers invasifs du col utérin hébergent une quantité importante d'épisomes viraux. Si dans notre étude la charge est plus élevée dans les cancers, ce résultat peut s'expliquer par le nombre élevé de cellules porteuses du génome HPV (intégré ou épisomique) qui ont proliféré de façon clonale.

Selon les résultats de Schmitt et al. [2013], les charges virales ne différaient pas entre CIN1 et CIN2+. Dans ce cas, la charge virale ne peut pas discriminer entre les lésions cervicales de bas et de haut grade. D'autres études n'ont pas montré de différence significative entre les lésions précancéreuses du col avec une charge virale élevée et les autres [Kim et al., 2008]. Selon de Boer et al. [2007], seule une forte expression de l'ARN messager des oncoprotéines E6 et E7 est prédictive d'une diminution de la survie des femmes ayant un cancer du col de stade précoce et ce indépendamment du statut ganglionnaire.

La charge virale peut être déterminée de manière plus précise par PCR en temps réel [Winer et al., 2014] qui permet de calculer le nombre de copies par cellule cervicale [Saulnier et al., 2008]. Cette évaluation cellulaire permet pour la PCR la validation de la qualité de l'échantillon testé. Elle semble utile pour renforcer le dépistage primaire.

### 5.2.5 Séquençage des souches HPV

La connaissance des séquences virales isolées fournit d'importantes informations sur les souches qui circulent dans un espace donné. La séquence L1 des isolats d'HPV16 que nous avons étudié est très conservée [Bernard et al., 2010]. En effet, comme le montre l'alignement des séquences nucléotidique et peptidique (figure 5.12) par rapport aux souches de références, des souches identiques à nos isolats sont présentes dans différentes régions du monde. Selon la bibliographie émanant de BLASTN (NCBI), l'analyse phylogénique des isolats HPV16, 18, 33, 35, 39 et 59 détectés n'a pas révélé de regroupements ethnique ou géographique. Des pourcentages de similitude de 99% sont obtenus. Ceci pourrait être expliqué par :

- l'utilisation de L1 qui est une séquence génétiquement très stable. La région LCR ou celle des gènes précoces serait plus variable [Canche et al., 2010];
  - la faible taille de notre échantillon ne permettrait pas de tirer une conclusion claire.
- La variabilité génétique dans le gène L1 du HPV est très rare [Frati et al., 2011, Gurgel et al., 2013]. Les études sur la variabilité du HPV16 doivent être basées principalement sur le séquençage de l'ADN des oncogènes viraux E6 et E7 pour pouvoir distinguer les différences génétiques entre les différents isolats dans le monde [Sabol et al., 2009].

Xi et al. [2006], de Araujo Souza et al. [2009], par contre, rapportent une distribution des variants d'HPV liée à la géographie ou aux races .

### 5.2.6 Stratégies de dépistage

- **triage secondaire** des frottis de bas grade et ambigus (border line ou ASCUS).
- Test HPV-HR en **dépistage primaire** des lésions de haut grade.

#### Triage secondaire

a) **Triage des frottis de haut grade** : La recherche du HPV-HR se fait à la suite d'une cytologie anormale qui demande une évaluation plus poussée. Celle-ci permettrait d'établir l'orientation de la patiente vers une colposcopie et éventuellement une biopsie ou vers un suivi moins interventionniste.

Les patientes présentant des lésions de haut grade doivent être adressées directement en colposcopie sans recherche préalable du HPV.

Il est aussi admis, comme nous le soulignerons plus bas, que les patientes présentant une cytologie ASCUS doivent subir un prélèvement pour une recherche de HPV-HR. Les avis sont partagés en ce qui concerne les femmes présentant une lésion cervicale de bas grade [Stoler and Schiffman, 2001, Saslow et al., 2012].

b) **Triage des frottis de bas grade** : Différentes études européennes et nord américaines ont indiqué que les lésions de bas grade étaient associées à un taux très élevé de HPV-HR et que le test HPV n'apportait pas une aide utile à l'orientation des patientes vers la colposcopie. L'étude ALT (ASCUS/LSIL Triage study) réalisée aux USA sur 3600 patientes ayant un diagnostic récent de lésions de bas grade a montré que ces lésions étaient associées dans 83% des cas à des HPV-HR. L'ASCCP ("American Society for Colposcopy and Cervical Pathology") recommande l'orientation des patientes présentant une lésion de bas grade directement vers un service de colposcopie [Saslow et al., 2012].

Les résultats de notre étude (figure 5.1) montrent une augmentation du taux de lésions HPV-HR positives en fonction du stade de ces lésions : 41,4% pour le bas grade, 79,3% pour les lésions de haut grade. Si ces données étaient confirmées, 33 des patientes n'auraient pas à subir une colposcopie dans notre pays où cet examen n'est pas toujours accessible. La conclusion de Rousseau et al. [2002] portant sur ces données nous paraît tout à fait appropriée (plusieurs facteurs limitent la généralisation des résultats obtenus dans les pays industrialisés aux pays non industrialisés). Les pays non industrialisés doivent mettre en œuvre les moyens disponibles pour le triage des femmes présentant des anomalies cytologiques et devraient initier la recherche clinique permettant de fournir des informations appropriées afin de mettre en place la meilleure stratégie de dépistage.

**c) Triage des frottis ASCUS :** Les frottis ASCUS correspondent à des atypies de cellules malpighiennes de significations indéterminées. Ce sont des altérations cellulaires peu marquées ou peu nombreuses pour être classées dans les lésions de bas grade. Leur fréquence est de 2,44% dans un rapport national (Direction de la famille Ministère de la Santé). [Boudriche \[2014\]](#) indique un taux de 7,67% sur 14863 FCU étudiés. Elle est de 4% environ selon [Rousseau et al. \[2002\]](#). Elles peuvent abriter dans 5 à 17% des cas des lésions de haut grade qu'il est important de diagnostiquer. Un suivi cytologique tous les 6 mois (cytologie de contrôle) doit être assuré selon les recommandations internationales [[ANAES, 2004](#)]. De 31 à 60% des ASCUS sont associées à des HPV-HR [[Bhatla and Moda, 2009](#)]. Nos résultats indiquent la présence de HPV-HR dans 42,85 des cas (figure 5.3).

Un test HPV pouvait être très utile pour l'orientation des patientes vers une colposcopie ou une prise en charge conservatrice (suivi cytologique) [[Bhatla and Moda, 2009](#)]. Les patientes porteuses d'un frottis ASCUS-HPV-HR négatif, 57,14% des cas, dans notre étude, n'ont pas besoin de subir une colposcopie. On n'adresse la patiente à la colposcopie que si ces résultats restaient identiques un mois à un an après. Cette stratégie d'abord adoptée aux USA est appliquée actuellement dans de nombreux pays européens [[ANAES, 2004](#)].

#### Dépistage primaire

**a) Détection des HPV-HR en première intention en association avec le FCU :** Le dépistage associant le test HPV et cytologie a une valeur pronostique négative (VPN) de près de 100%. De très nombreuses études de grande taille ont confirmé ces résultats chez les femmes âgées de plus de 30 ans [[Monsonogo, 2007](#), [Cuzick et al., 2008](#), [Bhatla and Moda, 2009](#)]. Cette stratégie est actuellement recommandée aux USA. Elle est mise à l'essai dans quelques régions européennes [[ANAES, 2004](#)]. Cette combinaison laisse espérer l'augmentation de l'intervalle de dépistage de 1-3 ans à 3-5 ans [[Bhatla and Moda, 2009](#)]. Le test HPV a une spécificité faible, son application est difficile voire impossible dans les pays à ressources limités en raison de son coût et des difficultés à sa mise en place.

**b) Détection du HPV-HR en première intention suivi d'un triage cytologique :** Le test HPV est plus sensible mais moins spécifique que le FCU. Il a une sensibilité moyenne de 25 à 30% plus élevée que la cytologie mais une spécificité moyenne de 8,5% plus faible que la cytologie à détecter les lésions CIN2 [[Monsonogo, 2007](#), [Bhatla and Moda, 2009](#)]. Ce test a une VPN proche de 100% dans les études européennes ; ce qui signifie qu'une femme négative a un risque extrêmement faible d'être atteinte de lésions de haut grade dans les trois à cinq ans qui suivent l'examen [[Monsonogo, 2007](#)]. On propose l'utiliser du test HPV en dépistage primaire exclusif et dans un deuxième temps un triage cytologique pour remédier à la spécificité relativement faible du test moléculaire. [Reithmuller et al.](#)



[2008] ont rapporté quelques-uns des résultats, notamment ceux de [Cuzick et al. \[2008\]](#) dont la sensibilité du test HPV à dépister une lésion de haut grade, serait de 96,1% contre 53% pour la cytologie. [Koliopoulos et al. \[2007\]](#) notent une sensibilité du test à 94,8%, [Clavel et al. \[1998\]](#) indiquent une sensibilité de 100%.

Nos résultats, indiquent une sensibilité de 89% quel que soit la technique employée pour la classification des grades de la lésion. La prévalence est en réalité de 79,3% sur des lésions histologiquement confirmées avec des tests possiblement plus sensibles. La VPN est d'environ 90%.

De 11 stratégies de dépistage proposées, [Naucler et al. \[2009\]](#) ont conclu que le test basé sur la détection en première intention de l'ADN HPV suivi d'un triage cytologique, avec répétition du test ADN pour les patientes ayant un test cytologique négatif est la meilleure stratégie de dépistage des lésions précancéreuses du col.

### 5.2.7 Test HPV et colposcopie

La confirmation d'un test HPV ou d'un FCU positif est faite par colposcopie. Le test HPV couplé au FCU, confère une sensibilité et une valeur prédictive négative pour les CIN de haut grade de près de 100%. L'inconvénient majeur de la colposcopie est la variabilité intra- et inter- observateurs. Cependant, elle reste une technique de référence car hautement sensible pour reconnaître les lésions de haut grade, bien que sa spécificité reste faible (inférieure à 50%) [[Mergui et al., 2008](#)]. Pour limiter les surdiagnostics liés à une évaluation faussement positive de la colposcopie ou encore aux faux positifs générés par les biopsies, en particulier les CIN1, et par conséquent les surtraitements, les patientes peuvent bénéficier d'un test HPV en dépistage primaire ou secondaire.

### 5.2.8 Prévalence des HPV

Le cancer du col fait suite à une infection persistante par des HPV- HR [[Ho et al., 1995](#), [Koshiol et al., 2008](#)]. Nos résultats indiquent que des HPV-HR sont retrouvés dans 142 biopsies de cancer sur les 163 étudiées soit dans 87,1% des cas. Dans les frottis-grattages recueillis chez des femmes témoins, les HPV-HR sont détectés dans 20% des cas. Ces derniers résultats sont comparables à ceux de [Munoz et al. \[2003\]](#).

Cette prévalence est inférieure à celle retrouvée aux USA et en Europe où le virus est détecté dans 97 à 99,7% des cancers invasifs du col [[Walboomers et al., 1999](#)]. Ces dernières données ne sont pas retrouvées dans toutes les études faites à travers le monde. En effet, [Katki et al. \[2011\]](#) estiment que l'ADN des HPV peut être détecté dans 90 à 100% des cas, contre 5 à 20% dans les prélèvements cervicaux des femmes identifiées comme témoins.

Cette association virus-cancer est signalée à un taux inférieur dans les pays émergents ou en voie de développement : elle serait de 80 à 88,4% en Afrique et de 45 à 65,6%

en Inde [[Sankararyanan et al., 2005](#), [Arbyn et al., 2006](#), [Koliopoulos et al., 2007](#)]. Une méta-analyse réalisée sur 85 études rapportée par [ANAES \[2004\]](#) donne une prévalence moyenne des HPV-HR de 86,4% (84,8 à 89,5%) dans les cancers du col à l'échelle internationale.

Les résultats obtenus en Algérie dans des études qui ont fait appel à des laboratoires étrangers sont discordants. Dans une étude sur la prévalence des HPV dans la région de Sétif, où les prélèvements ont été adressés par le service de prévention de Sétif (Dr Hamdi-Chérif) au laboratoire du CIRC, on retrouve une valeur de 75% [[Sadouki et al., 2010a](#)]. De sa part, [Hammouda et al. \[2011\]](#) ont adressé 171 biopsies, rigoureusement sélectionnées prélevées chez des patientes algériennes, à un laboratoire hollandais dans le cadre d'une étude cas témoins. Les résultats montrent que la prévalence des HPV est de 97,7% détectés par le test GP5+/6+. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer les variations de la prévalence :

- Variabilité géographique
- Test HPV utilisé

### Variabilité géographique

Plus de 100 génotypes de papillomavirus ont été détectés chez l'homme et il est fort possible que d'autres génotypes restent encore à découvrir. Quelques-uns seulement sont considérés comme potentiellement oncogènes. Leur classification fait l'objet de révisions régulières en raison de l'importance que ces données représentent pour le dépistage des lésions haut grade et la mise au point de vaccins appropriés.

Dans son rapport, L'agence internationale de recherche sur le cancer [[IARC, 2005, 2009](#)] donne une liste d'agents biologiques considérés comme carcinogènes ou probablement carcinogènes. Ils sont classés en quatre catégories (tableau 5.4).

Il faut souligner le fait que la classification des génotypes est basée principalement sur des données épidémiologiques. Peu de travaux expérimentaux ont été réalisés dans ce domaine [Schiffman et al. \[2009\]](#).

Les HPV carcinogènes appartiennent tous au genre alpha (alpha 5, 6, 7, 9 et 11). Les espèces HPV alpha 1-2-3-4-8-10-13-14-15 qui provoquent des affections sans lésions apparentes, (verrues cutanées et génitales, des atypies cytologiques mineures) ne sont pas représentées.

Il est à noter que les 13 génotypes reconnus comme «carcinogènes» ou «probablement carcinogènes» par le groupe de travail de février 2009 ont été détectés dans nos échantillons grâce au test INNO-LiPA utilisé dans cette étude.

On relève dans nos résultats l'absence du génotype 66 et la présence, dans 11% des cas, du génotype 68 alors qu'il n'est que de 0,61% dans la méta-analyse de [Schiffman et al. \[2009\]](#). Il faut surtout noter la présence de 9 cas de HPV39 sur les 56 biopsies étudiées (16%). Ce génotype est considéré comme étant relativement rare (1,29%) dans les études



**Tableau 5.4** – Classification des différents HPV-HR selon le pouvoir oncogène IARC [2009]

| Catégories | HPV                              | Commentaires                                                     |
|------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1          | 16                               | type HPV le plus puissant ; cause un cancer sur différents sites |
| 1          | 18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 | évidence suffisante pour un cancer cervical                      |
| 2A         | 68                               | Évidence limitée chez l'homme, forte évidence expérimentale      |
| 2B         | 26,53,66,67,70,73,82             | évidence limitée de cancer cervical chez l'homme                 |
| 3          | 6,11                             | (-)                                                              |

européennes [Schiffman et al., 2009]. Il est retrouvé dans 5% des cancers en Amérique centrale et en Amérique du Sud [Reithmuller et al., 2002]. Il est détecté chez 22% des femmes juives dans une consultation de colposcopie en Israël [Grisaru et al., 2008].

L'HPV16 est détecté dans 51,78% des cas dans notre travail. Munoz et al. [2003] sur la base de données provenant de 9 pays notent une prévalence moyenne de HPV 16 de 58,9%, allant de 43,9% (philippines) à 72,4% (Maroc). Mougin et al. [2001], dans une analyse de séries de cancers invasifs provenant de 22 pays (Amérique, Europe, Afrique, Asie) que le génotype HPV16 est le plus fréquemment détecté (51%) suivi du HPV18 (15%). Ils ont aussi trouvé des taux de 96% au Groenland et de 83% au Danemark. Les génotypes HPV 16 et 18 sont détectés seuls ou associés dans 73,2% des cas dans ce présent travail. Des résultats assez proches (72,7%) ont été déjà retrouvés au niveau du même laboratoire en 1996 par Djennaoui Sadouki et al. [2010b]. Deux études effectuées par Hammouda et al. [2011] à Alger avec l'aide de laboratoires européens notent la présence prédominante des HPV16/18 respectivement dans 77,9% et 74,8% des cas respectivement.

Ces données sont importantes, nous l'avons souligné, pour aider à la décision éventuelle d'introduire la vaccination contre le cancer du col dans un pays.

### Comparaison des tests HPV en fonction des amorces utilisées

De nombreux tests ont été développés dans le but d'améliorer la détection des HPV. Des amorces consensus ont été utilisées pour amplifier des régions très conservées de leurs génomes, parmi lesquelles MY09/11, GP5+/6+ ou SPF10 sont les plus employées [Saini et al., 2009]. Toutes ces amorces ciblent la région L1. Les produits d'amplification font l'objet soit d'un dépistage global des HPV-HR ou HPV-BR soit d'une détection spécifique de chacun des génotypes par l'usage de sondes spécifiques. Les PCR conventionnelles manquent de standardisation et sont de différentes sensibilités. Les oligonucleotides de MY09/MY11 sont dégénérés sur plusieurs sites et créent un amplicon de 450 pb, ils ne donnent pas toujours une sensibilité parfaite. le GP5+/6+ semble plus sensible et plus

reproductible que le MY09/11 [[Remmerbach et al., 2004](#)].

[Munoz et al. \[2003\]](#) dans une étude réalisée dans 9 pays chez 1918 femmes atteintes d'un cancer malpighiens ont constaté que la prévalence des cas positifs obtenue à partir de deux pays (Colombie et Espagne) était nettement inférieure (78,4 à 82,4%) à celle des 7 autres pays (Brésil, Mali, Maroc, Paraguay, Philippines, Thaïlande et Pérou) où la prévalence est de 95,3 à 97,1%. Ils estiment que la PCR employant les amorces MY09/11 utilisé en Espagne et en Colombie est considéré comme moins sensible que le test utilisant les amorces GP5+/6+ utilisé dans les 7 autres pays.

---

## CHAPITRE 6

---

# RÉSULTATS ET DISCUSSION DE LA COÏNFECTION EBV-HPV

### 6.1 Résultats de l'étude

Les 109 prélèvements cervicaux (14 cas cols normaux, 16 lésions cervicales de bas grade, 21 lésions de haut grade et 58 biopsies) ont fait l'objet d'une détection de l'EBV et du HPV. Du fait de l'abondance de cellules dans les biopsies, l'étude de l'expression de l'EBV n'a été réalisée que sur ces prélèvements (carcinomes épidermoïdes). Le plan de l'étude de la coïnfection ainsi que l'expression l'EBV est présenté dans la figure 4.2.

#### 6.1.1 Fréquences des HPV au niveau du col utérin

L'incidence la plus élevée (95,23%) en HPV-HR a été observée dans le groupe des lésions de haut grade. Elle est significativement plus importante que celle observée dans les lésions cervicales de bas grade (12,5%). Les femmes à cols normaux de notre étude n'étaient infectées par les HPV que dans 19,14% des cas, 7,14% étaient HPV-HR positives, tandis que 12% étaient HPV-BR positives.

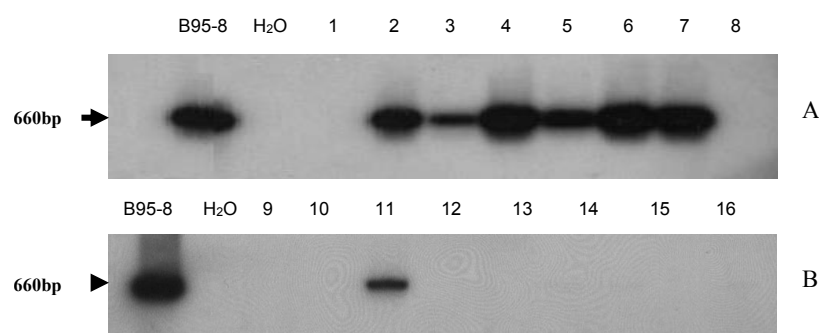
Un nombre de 58 biopsies classées histologiquement comme étant des carcinomes épidermoïdes (ou SCC pour "Squamous Cell Carcinoma") ont fait l'objet de recherche des HPV-BR et des HPV-HR par PCR et par Hybrid Capture 2 (HC2). Les résultats ont révélé que parmi les échantillons testés, 51 (88%) étaient positifs en souches HPV-HR (tableau 6.1). Les 7 cas restants (12%) étaient HPV-HR négatifs. Onze patientes parmi les 51 femmes HPV positives étaient coïnfectées par les HPV-HR et HPV-BR.

Dans les mêmes biopsies où nous avons détecté les HPV, le génome de l'EBV a été recherché par PCR. Le gène BALF-1 de ce virus était la cible de l'amplification. Le produit

**Tableau 6.1** – Détection des virus (EBV et HPV) par PCR dans les cancers, les lésions précancéreuses et les cols normaux

| Histo/cyto. (n=109) | HPV-HR positifs       | EBV                                    |             |
|---------------------|-----------------------|----------------------------------------|-------------|
|                     |                       | EBV positif<br>(% coïnfection EBV-HPV) | EBV négatif |
| SCC (n=58)          | HPV positifs (n = 51) | 39 (67,24%)                            | 12          |
|                     | HPV négatifs (n = 7)  | 1                                      | 6           |
| HSIL (n=21)         | HPV positifs (n = 20) | 8 (38,09%)                             | 12          |
|                     | HPV négatifs (n = 1)  | 0                                      | 1           |
| LSIL (n=16)         | HPV positifs (n = 12) | 2 (12,5%)                              | 10          |
|                     | HPV négatifs (n = 4)  | 0                                      | 4           |
| CN (n=14)           | HPV positive (n = 2)  | 1 (7,14%)                              | 1           |
|                     | HPV négatifs (n = 12) | 1                                      | 11          |

de PCR contenant 660 pb a été révélé par Southern Blot (figure 6.1).



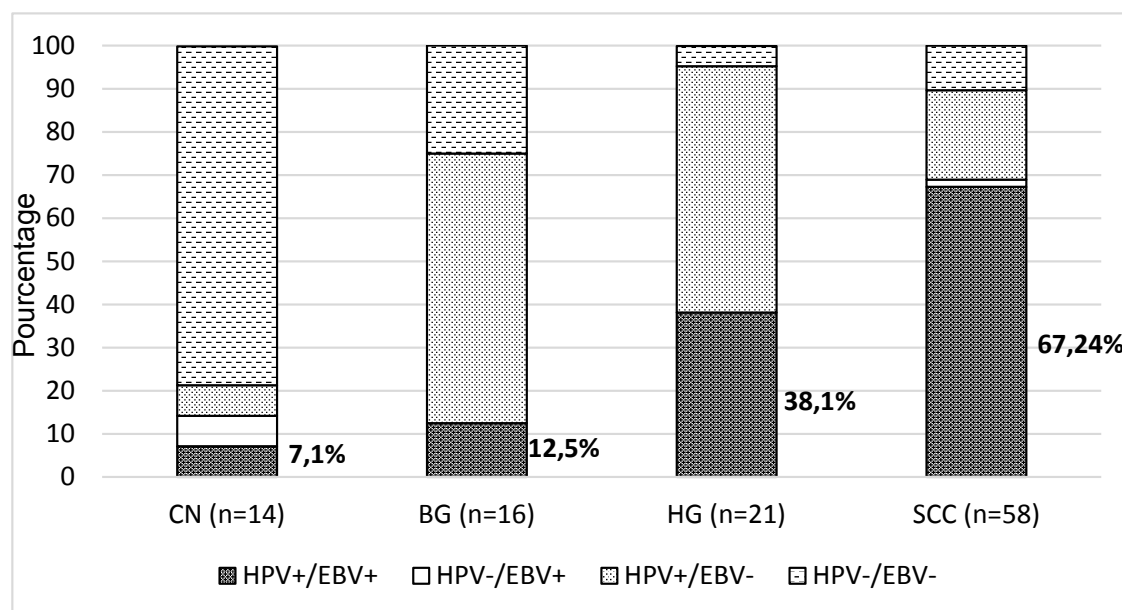
**Figure 6.1** – Southern blot pour détecter l’EBV (amplicons hybridés avec sonde marquée au <sup>32</sup>P). A : voies 1-8 certains parmi les 58 cas de cancer ; B : Voies 9-16 certains parmi les 37 lésions précancéreuses. L’ADN de la lignée cellulaire B95-8 et l’eau pure (H<sub>2</sub>O) ont été utilisés comme contrôles positifs et négatifs respectivement.

Le tableau 6.1 fait apparaître 69% des cas de carcinomes épidermoïdes (SCC) du col utérin comme porteurs d’EBV. Parmi ces cas, 76,5% sont co-infectés par les HPV-HR. Les 23,5% restantes sont infectées uniquement par les HPV-HR (tableau 6.1). Un seul cas des carcinomes est HPV-HR négatif, il porte uniquement l’EBV.

Dans le groupe de patientes avec des lésions de haut grade (HSIL), l’EBV a été détecté dans 38,1% de cas, toutes coïnfectées par les HPV-HR. Le seul cas HPV-HR négatif, était également négatif en EBV. Il y’a environ 2 fois plus de cas positifs en EBV dans les cas des carcinomes que dans le groupe des hauts grades (69% contre 38,1%). L’EBV est de moins en moins détecté dans les lésions de bas grade (12,5%) ou dans les cols normaux (7,14%).

Il ressort de la comparaison entre les 3 groupes de patientes et les femmes témoins, que la coïnfection par les deux virus HPV et EBV était significativement ( $p < 0,001$ ) plus fréquente chez les femmes avec un carcinome épidermoïde (SCC) et des lésions cervicales de haut grade (HSIL) que dans les cas de lésions de bas grade (LSIL) et des cols normaux

(CN) comme le montre la figure 6.2.



**Figure 6.2** – Détection de l’infection uniques (HPV ou EBV) ou de la coïnfection (HPV-EBV) chez les patientes et les sujets normaux : **SCC** (carcinome épidermoïde); **HG** (Lésions Haut grade); **BG** (Lésions Bas grade) et **CN** (Col normal).

### 6.1.2 Infection à EBV et aggravation des lésions

Les odds ratio calculés entre les différents groupes de femmes sont présentés dans le tableau 6.2. Si une patiente est infectée par l’EBV seul, le risque de développer le cancer du col utérin est double par rapport aux sujets sains. Dans cette étude l’infection par le seul HPV-HR fait augmenter le risque d’environ 5 fois. L’infection double (HPV+EBV) fait apparaître un odd ratio de 33,6 (IC : 7,7 - 146,3)

**Tableau 6.2** – Odds ratio infection, coinfection et aggravation

| HPV     | EBV            |                  |
|---------|----------------|------------------|
|         | Négatif        | Positif          |
| Négatif | 1              | 2.1 (0.1-39.1)   |
| Positif | 4.7 (1.5-14.7) | 33.6 (7.7-146.3) |

### 6.1.3 Expression de l’EBV dans les tissus cervicaux

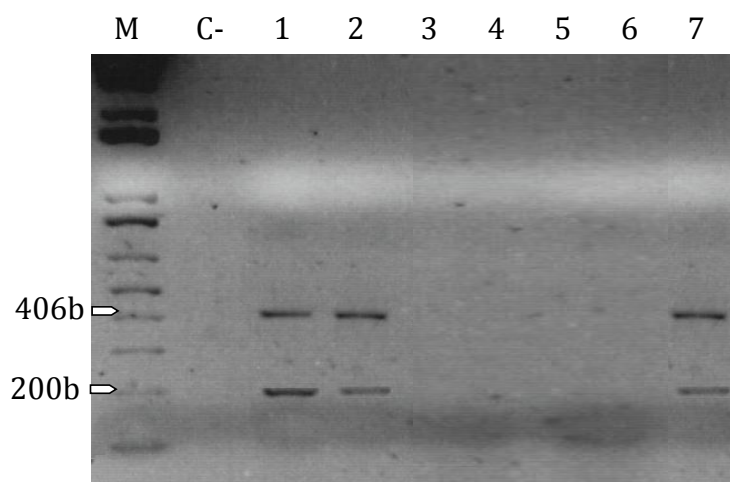
Plus de la moitié des échantillons tissulaires cervicaux ont été épuisés lors de leur utilisation dans la recherche de l’ADN des deux virus. Leurs quantités n’étaient pas assez suffisantes pour rechercher d’autres marqueurs comme les oncogènes protéiques viraux

et leurs messagers (ARNm). L'étude de ces marqueurs (ARNm de LMP- 1 par RT-PCR et l'antigène BARF-1 de l'EBV) n'a été possible que dans 23 cas parmi les 58 échantillons de départ. Par ailleurs, nous n'avions retrouvé que 45 biopsies enrobées dans la paraffine sur les 58 cas de carcinomes épidermoïde (SCC) de départ. Nous avons recherché dans ces blocs de tissus paraffinés, par immunohistochimie, trois antigènes de l'EBV (BARF-1, LMP-1 et EBNA-1) et un antigène L1 de l'HPV.

#### a) Recherche des messagers de LMP-1

L'ARNm de cet oncogène était d'environ 200 bases. Il a été transcrit à partir de la séquence du gène LMP-1 (ADN) comportant 406 paires de bases. Le premier de ces 2 fragments serait le produit de la réaction RT-PCR, tandis que le second serait le produit de PCR (figure 6.3). Leur amplification a été réalisée par les mêmes amorces.

Comme le montre le tableau 6.3, l'EBV a transcrit son oncogène LMP- 1 dans 30,43% des biopsies étudiées. Ces biopsies étaient toutes coïnfectées par les deux virus, HPV et EBV. Celles qui portaient seulement un des deux virus n'expriment pas de messagers de LMP-1, du moins par la méthode de RT-PCR.



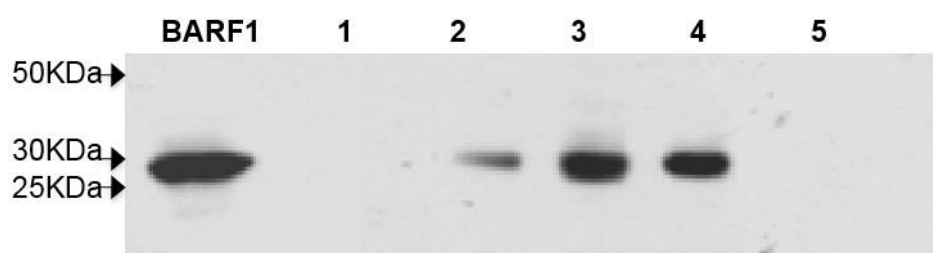
**Figure 6.3** – Détection de l'expression de LMP-1 dans 7 parmi les 23 carcinomes épidermoïdes. La RT-PCR a permis d'obtenir une bande de 406 pb amplifiée correspondant à l'ADN de LMP-1 et une bande de 200 pb correspondant à la séquence d'ARNm de LMP-1. M : fragments d'ADN de marqueurs moléculaires. C- : contrôle négatif (H<sub>2</sub>O).

#### b) Recherche de la protéine BARF-1 par Western Blot

Toutes les biopsies BARF-1 positives sont coïnfectées par les deux virus, HPV et EBV. Cette fois ci, l'oncogène a été détecté comme protéine par la méthode d'immunoblotting. Cette protéine BARF-1 a une taille de 29 KDa (figure 6.4). Les résultats de détection montrent que 21,74% des biopsies sont positives en BARF-1 (tableau 6.3).

**Tableau 6.3** – Relation entre la détection des oncoprotéines de l'EBV (LMP-1 and BARF-1) et la coïnfection (EBV-HPV) dans les biopsies du col de l'utérus

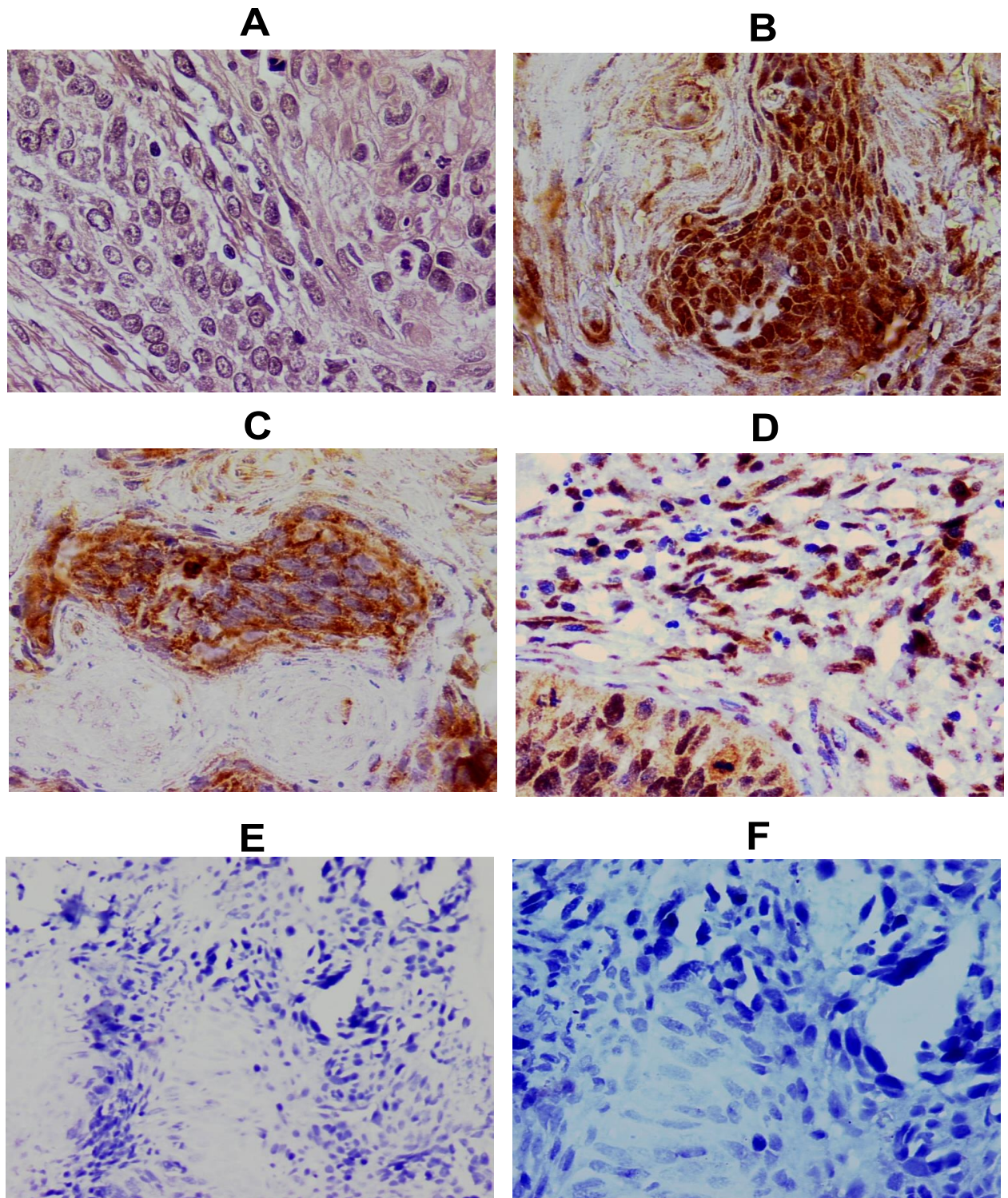
| Résultats PCR dans les biopsies (n=23) | Résultats RT-PCR (LMP-1) | Résultats immunoblotting BARF-1 |
|----------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| HPV+EBV+ (n=14)                        | 7 cas LMP1+              | 3 BARF1+                        |
|                                        | 7 cas LMP1-              | 2 BARF1+                        |
| HPV+EBV- (n= 8)                        | Tous négatifs            | Tous négatifs                   |
| HPV-EBV+ (n=1)                         | négatif                  | négatif                         |

**Figure 6.4** – Détection de BARF-1 par Western blot dans 5 biopsies du col utérin. La protéine BARF1 codant pour la protéine 29 kDa a été révélée par un antisérum anti-BARF-1 (PepIII) polyclonal de lapin. La protéine BARF1 produite par le système d'adénovirus recombinant a été utilisée comme contrôle positif.

#### 6.1.4 Immunohistochimie de marqueurs viraux

L'analyse des 45 biopsies (carcinomes épidermoïdes) par immunohistochimie (IHC) a permis la détection de la protéine capsidiale L1 du HPV dans 62% des cas. Cette protéine est mise en évidence par une coloration marron fluorescente au niveau du cytoplasme et du noyau des cellules tumorales (figure 6.5D). L'expression d'EBNA-1 est mise en évidence par une coloration du noyau en marron fluorescent (figure 6.5B), tandis que LMP-1 a montré une coloration membranaire (figure 6.5C). La protéine EBNA-1 est la plus détectée parmi les autres protéines de l'EBV recherchées par IHC. Elle représente 33,33% des cas, alors que la protéine LMP-1 représente 20% des cas. Des cellules de carcinome squameux négatives pour EBNA-1 et LMP-1 des protéines sont présentées sur la figure 6.5.





**Figure 6.5** – Détection des antigènes HPV et EBV par immunohistochimie sur des coupes de tissu du col de l’utérus inclus dans la paraffine. A : carcinome épidermoïde visualisé par coloration à l’héamatoxylin-éosine ; B : cellules de carcinome épidermoïde positives pour EBNA-1 ; C : cellules de carcinome épidermoïde positives en LMP-1 ; D : cellules positives en HPV ; E : carcinome épidermoïde négative en EBNA-1. F : carcinome épidermoïde négatif pour LMP-1.



## 6.2 Discussion de l'étude de la coïnfection EBV-HPV

### 6.2.1 Présence de l'EBV dans les biopsies du col utérin

Nos résultats indiquent qu'environ 80% des patientes atteintes de carcinome épidermoïde ou de lésions cervicales sont infectées par les HPV-HR. Nous avons constaté également une coïnfection EBV-HPV, détectée chez 67% des patientes impliquées dans cette étude. L'incidence générale de l'infection par l'EBV a été trouvée dans 69% de ces cas, ce qui pourrait suggérer son intervention possible dans le développement de ce type de tumeur. Bien que nos résultats soient en accord avec ceux de quelques travaux précédents [Nicholls et al., 1997, Landers et al., 1993, Sasagawa et al., 2000], ce type de coïnfection (HPV-EBV) n'est pas admis par tous les auteurs. Si Sasagawa et al. [2000] ont démontré, par hybridation d'ARN *in situ*, la présence de l'EBV et l'expression de ses gènes EBER-1, LMP-1 et EBNA, dans des biopsies cervicales. Taylor et al. [1994] et O'Leary et al. [1997], en utilisant l'hybridation *in situ*, n'ont pas trouvé le virus dans les tissus cervicaux analysés.

Dans notre étude, nous avons constaté le faible taux d'infection par l'EBV chez les femmes à col normal (7,1%). La prévalence est allée en augmentant avec l'évolution des lésions : bas grade (12,5%), haut grade (38,1%) et cancers invasif (69%). Cela suggère que l'EBV interviendrait tard dans le processus du développement du cancer du col de l'utérus. Une investigation plus approfondie est nécessaire pour déterminer si la présence de l'EBV est un mauvais pronostic pour le développement du cancer du col de l'utérus. L'EBV agirait comme un cofacteur avec un ou plusieurs agents carcinogènes, peut-être les papillomavirus humains, dans la progression finale du cancer invasif.

### 6.2.2 Expression de l'EBV dans les cellules cervicales

A notre connaissance, nous sommes les premiers à détecter des antigènes de l'EBV dans le tissu du col de l'utérus par immunohistochimie. Bien que cette technique soit moins sensible que la PCR, elle a permis de mettre en évidence certains antigènes viraux qui donnent d'importantes informations au sujet de la coïnfection et du rôle que pourrait jouer l'EBV dans le développement de la tumeur cervicale.

La différence de sensibilité des différentes techniques utilisées, la PCR, le Western blot et l'immunohistochimie a trois explications possibles :

- le procédé d'amplification de l'ADN par PCR rend cette technique plus sensible,
- le génome de l'EBV pourrait être présent (PCR+), mais ses gènes ne seraient pas ou peu exprimés dans les cellules infectées (Western blot négatif et IHC négatif) ,
- les lymphocytes B infiltrant le tissu conjonctif porteurs de l'EBV pourraient contaminer les cellules épithéliales. Donc, les résultats positifs obtenus par PCR comme

seul moyen de détection indiquent seulement la présence de l'EBV dans le tissu du col utérin, mais pas nécessairement dans les cellules épithéliales.

Il a, par conséquent, fallu rechercher les antigènes ou les transcrits (ARNm) de l'EBV dans les cellules épithéliales du col. L'IHC nous a paru un moyen adéquat à cette fin, puisqu'elle permet de détecter l'antigène par le complexe anticorps-antigène tout en visualisant et identifiant les cellules épithéliales par leur morphologie. En effet, quelques cellules carcinomateuses dans les tissus cervicaux apparaissent infectées par l'EBV. Elles portent la protéine LMP-1 et la protéine EBNA-1 de ce virus (figure 6.5). Ces résultats sont à considérer avec beaucoup de prudence car :

- rarement mentionné par la littérature mondiale,
- les résultats de [Sixbey et al. \[1983\]](#), depuis plus de 30 ans, concernant le pouvoir de l'EBV à infecter les cellules exfoliées du col de l'utérus n'ont jamais été reproduit jusqu'aujourd'hui.

Les rares études suggérant un rôle de ce virus laissent espérer que la coïnfection par l'EBV et les HPV-HR pourrait avoir une importante signification dans l'étiologie du cancer du col utérin. [Sixbey et al. \[1987\]](#) ont montré le pouvoir de l'EBV à infecter les cellules cervicales et son pouvoir à exprimer ses oncogènes dans les cellules épithéliales cervicales. Ce virus serait capable d'infecter des cellules ectocervicales en culture et exprimer ses antigènes suggérant une association entre la réplication de l'EBV et la différenciation des cellules épithéliales [[Young and Sixbey, 1988](#)]. En plus, des particules d'EBV infectieuses capables de transformer les lymphocytes B ont été isolées à partir de lavages du col de l'utérus chez des femmes convalescentes de la mononucléose (infection à EBV) ou chez des femmes EBV-séropositives sans infection aiguë.

Plusieurs études ont montré que l'EBV peut se transmettre par voie sexuelle [[Voog, 1996](#), [Voog et al., 1997](#)], puis cible le col utérin [[Naher et al., 1992](#), [Leigh and Nyirjesy, 2009](#), [Ida et al., 1991](#)].

Dans notre étude, les gènes latents de l'EBV ont été exprimés dans l'épithélium pavimenteux. Similaire au nasopharynx, le col peut être un site de portage chronique de ce virus. Il est bien admis que l'EBV infecte les lymphocytes B à travers les récepteur CD-21 (EBV/C3d). Ce récepteur est également présent dans les cellules du col utérin [[Young et al., 1989](#)]. La jonction pavimenteuse du col de l'utérus est la zone où se produisent fréquemment la réparation des tissus et l'inflammation, et où les tumeurs cervicales malignes associées à l'infection par l'HPV se développent, en plus de la cervicite chronique peuvent faciliter l'implantation et la persistance de l'EBV [[Silver et al., 2011](#)].

**Conclusion :** Les résultats obtenus conduisent à trois interrogations :

- est-il possible que l'infection par l'HPV-HR provoque avec l'évolution des lésions précancéreuses la réactivation de l'EBV ?
- L'EBV jouerait-il un rôle dans l'évolution des lésions de bas grade vers le cancer

invasif ?

- Pourrait-on utiliser la recherche de l'EBV comme test de pronostic de l'évolution des lésions vers la malignité ?

La coïnfection a récemment été signalée en Irlande, en Amérique du Nord, en Thaïlande et au Japon [Nicholls et al., 1997, Ekalaksananan et al., 2011]. De notre part, nous avons montré que la plupart des cancers (67,24%) chez les femmes algériennes étaient HPV-EBV coïnfectées. Un moindre degré de coïnfection a été observé dans les lésions précancéreuses du col utérin. Ceci suggère une assistance possible entre ces deux virus dans le développement de la tumeur du col. Cette hypothèse est renforcée par l'expression des oncogènes d'EBV dans les cellules épithéliales cervicales. Cependant, il est clair que la présence de l'EBV et sa relation avec l'HPV-HR dans l'oncogénèse du col de l'utérus doivent être plus profondément explorées.

**Absence de la mutation *h-ras*** Nous n'avons détecté aucune mutation dans la famille des gènes *h-ras* chez tout les groupes de patientes (58 cancers et 37 lésions cervicales). Ces données suggèrent que le développement de carcinomes épidermoïdes chez ces patientes ne dépend pas de l'activité de cet oncogène. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Helfrich et al. [2004] et de O'Leary et al. [1998] qui n'ont pas observé de mutation de ce gène dans les tumeurs cervical développées sur des souris transgéniques ou sur les lésions humaines de haut grade (CIN3) respectivement. D'autres études ont par contre rapporté cette mutation dans le cancer du col de l'utérus [Alonio et al., 2003, Robinson et al., 2003]. La protéine Ras mutée semble activer l'expression des oncoprotéines E6 et E7 [Medina-Martínez et al., 1997]. Elle semble également contribuer à la transformation cellulaire, en coopération avec E6 et E7 dans le modèle de la souris transgénique [Scheffner et al., 1990, Greenhalgh et al., 1994, Alonio et al., 2003].

---

## CHAPITRE 7

---

# CONCLUSION GÉNÉRALE

La prévalence des HPV dans le cancer du col chez la femme algérienne est intermédiaire entre ceux trouvés dans les pays industrialisés et ceux rapportés dans les pays en voie de développement. Les HPV sont les facteurs de risque les plus importants dans le développement du cancer du col de l'utérus. Nous disposons actuellement de preuves suffisantes pour considérer que le test HPV est une méthode efficace pour dépister les lésions précancéreuses de l'utérus et par conséquent, en réduire la mortalité.

D'autres cofacteurs semblent importants pour favoriser le développement de la tumeur cervicale. Dans le laboratoire de l'IPA nous avons étudié la possible implication de l'EBV dans la genèse de ce cancer. Nous avons choisi les démarches et les moyens disponibles pour donner les preuves de son implication. Les résultats obtenus sont encourageants, mais il faut les considérer avec beaucoup de précautions, car ce ne sont que des résultats primaires qui méritent d'être confirmés.

### Conclusions sur le test HPV

Même si le test HPV n'est pour l'instant pas introduit dans les politiques de dépistage dans le monde, à l'heure de la vaccination anti-HPV, la chute prévisible des performances de la cytologie conventionnelle imposera peu à peu le test HPV comme l'outil incontournable du dépistage du cancer du col utérin.

Utilisé pour le dépistage primaire du cancer du col de l'utérus, le test HPV a fait la preuve d'une meilleure sensibilité que le FCU, mais d'une spécificité plus faible. L'association du FCU avec le test HPV est un moyen de dépistage performant optimisé et plus rapide. Le schéma de dépistage idéal semble être la pratique du test HPV en dépistage primaire. Une étude coût-efficacité est nécessaire pour envisager cette approche en Algérie. Un test HPV positif nécessitera la réalisation d'un FCU et seules les patientes ayant un FCU anormal devraient bénéficier d'un examen colposcopiques. Les performances

d'un tel schéma permettraient de rallonger l'intervalle de temps entre deux dépistages de routine, limitant ainsi les surcoûts engendrés par la politique utilisant le FCU seul.

Il existe actuellement des tests de biologie moléculaire simples et sensibles. Faut-il les introduire en Algérie et sous quelle stratégie ? Il est difficile de donner une réponse certaine dans l'état actuel de nos connaissances. Il faudrait auparavant confirmer ou infirmer l'insuffisance de la sensibilité des tests de dépistage et étudier la meilleure stratégie à mettre en place. L'utilisation de ces tests moléculaires sera indispensable pour le suivi et l'évaluation de l'éventuelle vaccination contre les HPV 16 et 18.

La charge virale est proposée comme un moyen de discrimination des infections ayant une signification clinique des infections transitoires et sans conséquences. L'extrême variabilité des charges virales observées limite sa pertinence clinique et son utilisation n'est pour l'instant pas justifiée en pratique courante. Une charge virale élevée est prédictive de la persistance de l'infection à HPV et d'un risque accru de développer secondairement un CIN 2-3 ou un cancer infiltrant. L'observation ponctuelle d'une charge virale élevée ne serait assez concluante, c'est l'évolution et la cinétique de la charge virale qui seraient la plus prédictive de la persistance et de l'évolution de l'infection ou de sa clairance. Une charge virale élevée répétée doit être considérée comme un marqueur de risque de CIN 2-3 ou de cancer du col de l'utérus. Après le traitement d'un CIN 2-3, elle est également prédictive d'une infection à HPV persistante, d'une lésion résiduelle et/ou d'une récurrence post-thérapeutique. Confronté à une charge virale élevée, et ce même si le FCU est normal, le clinicien doit impérativement s'assurer de la normalité du col utérin par un examen colposcopique rigoureux visualisant la totalité de la zone de jonction. En l'absence de lésion cervicale avérée, une surveillance rapprochée reste indispensable. Il ne faut pas écarter la possibilité que les divergences observées dans notre travail puissent être dues en partie à la répartition géographique des géotypes et aux techniques de détection utilisées. Il serait utile de lancer à titre pilote au niveau de quelques régions du pays, le test de dépistage de l'ADN viral pour le triage des ASCUS dont la prévalence est relativement faible. L'utilisation du test HPV, en première intention dans le dépistage, pourrait être envisagée dans une de ces régions. Il est important de réfléchir sur la stratégie à adopter dans un environnement propre à l'Algérie afin d'en tirer la maximum de bénéfices. Il faut noter que quelle que soit la prévalence des géotypes, le couple HPV16-18 reste prédominant. Ces données sont importantes pour la mise en place éventuelle de la vaccination.

### **Coinfection HPV-EBV et sévérité des lésions**

La coinfection par les deux virus HPV et EBV est plus fréquente dans les cas des carcinomes épidermoïde (SCC) et des lésions cervicales de haut grade (HSIL) que dans les cas de lésions de bas grade (LSIL) et des cols normaux (CN). Cette coinfection a été retrouvée associée dans notre étude au risque de la progression de la tumeur cervicale à un taux 33

fois plus élevé par rapport aux témoins comme le montrent l'odd ratio entre les patientes. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre le groupe témoin et celui du bas grade (LSIL).

L'étude des marqueurs de l'EBV (LMP-1, BARF-1, EBNA-1) a révélé une expression active de ce virus dans le tissu cervical. Ce sont des arguments en faveur de son implication, mais des investigations supplémentaires devront avoir lieu pour éclairer son rôle dans le cancer du col de l'utérus. Si cette hypothèse venait à se vérifier, la coinfection aura une conséquence sur la vaccination contre ce cancer.

---

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALONIO, L., DALBERT, M., MURAL, D., BARTT, J., BAZAN, T., DOMINGUEZ, O., AND TEYSSIE, A. Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. *J Clin Virol* 27 (2003), 263–269.
- ANAE. Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal. Tech. rep., Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé, France, 2002.
- ANAE. Evaluation de l'intérêt de la recherche des papillomavirus humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Tech. rep., Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé, France, 2004.
- ANNELS, N., CALLAN, M., TAN, L., AND RICKINSON, A. Changing patterns of dominant TCR usage with maturation of an EBV-specific cytotoxic T cell response. *J Immunol* 165 (2000), 831–41.
- ANTINORE, MJ AN BIRRE, M., PATEL, D., NADER, L., AND MCCANCE, D. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J* 15 (1996), 1950–60.
- ARBYN, M., SASIENI, P., MEIJER, C., CLAVEL, C., KOLIPOULOS, G., AND DILLNER, J. Clinical applications of HPV testing : a summary of meta-analysis. *Vaccine* 24 (2006), 78–89.
- ARIAS-PULIDO, H., PEYTON, C., JOSTE, N., VARGAS, H., AND WHEELER, C. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 44 (2006), 1755–62.
- ARNHEIM DAHLSTRÖM, L., ANDERSSON, K., LUOSTARINEN, T., THORESEN, S., ÖGMUNDSDÓTTIR, H., TRYGGVADÓTTIR, L., WIKLUND, F., SKARE, G., EKLUND, C., SJÖLIN, K., JELLUM, E., KOSKELA, P., WADELL, G., LEHTINEN, M., AND DILLNER, J. Prospective seroepidemiologic

- study of human papillomavirus and other risk factors in cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20 (2011), 2541–50.
- ASHRAFI, G., BROWN, D., FIFE, K., AND CAMPO, M. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res* 120 (2006), 208–11.
- AUBIN, F., PRÉTET, J., JACQUARD, A., SAUNIER, M., CARCOPINO, X., JAROUD, F., PRADAT, P., SOUBEYRAND, B., LEOCMACH, Y., MOUGIN, C., RIETHMULLER, D., AND GROUP, E. S. Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata : a large french national study (EDiTH IV). *Clin Infect Dis* 47 (2008), 610–5.
- AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J., AND STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York, 1987.
- AUTILLO-TOUATI, A., BENMOURA, D., PALAZZI, D., ROBAGLIA, A., TASSO, F., BLANC, B., AND SEITE, R. Quatre années de dépistage sur frottis cervical des lésions du col utérin. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 21 (1992), 754–60.
- AZUMA, M., DANENBERG, K., IQBAL, S., EL-KHOUEIRY, A., ZHANG, W., YANG, D., KOIZUMI, W., SAIGENJI, K., DANENBERG, P., AND LENZ, H. Epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor receptor variant III gene expression in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6 (2006), 214–8.
- BABA, A., AND CÂTOI, C. *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest, 2007.
- BAER, R., BANKIER, A., BIGGIN, M., DEININGER, P., FARRELL, P., GIBSON, T., HATFULL, G., HUDSON, G., SATCHWELL, S., AND SÉGUIN, C. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310 (1984), 207–11.
- BAIOCCHI, R., WARD, J., CARRODEGUAS, L., EISENBEIS, C., PENG, R., ROYCHOWDHURY, S., VOURGANTI, S., SEKULA, T., O'BRIEN, M., MOESCHBERGER, M., AND CALIGIURI, M. GM-CSF and IL-2 induce specific cellular immunity and provide protection against Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorder. *J Clin Invest* 108 (2001), 801–2.
- BAKER, T., NEWCOMB, W., OLSON, N., COWSERT, L., OLSON, C., AND BROWN, J. Structures of bovine and human papillomaviruses. analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60 (1991), 1445–56.
- BARBOSA, M., LOWY, D., AND SCHILLER, J. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 63 (1989), 1404–7.



- BARLEV, N., LIU, L., CHEHAB, N., MANSFIELD, K., HARRIS, K., HALAZONETIS, T., AND BERGER, S. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8 (2001), 1243–54.
- BARNARD, P., AND McMILLAN, N. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259 (1999), 305–13.
- BEARD, J., AND ROUS, P. The characters of Kupffer cells living in vitro. *J Exp Med* 59 (1934), 593–607.
- BECK, A., PAZOLT, D., GRABENBAUER, G., NICHOLLS, J., HERBST, H., AND YOUNG, L. Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma : comparaison with hodgkin's disease. *J Pathol* 194 (2001), 145–51.
- BELL, A., GROVES, K., KELLY, G., CROOM-CARTER, D., HUI, E., CHAN, A., AND RICKINSON, A. Analysis of Epstein-Barr virus latent gene expression in endemic Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma tumour cells by using quantitative real-time PCR assays. *J Gen Virol* 87 (2006), 2885–90.
- BELNAP, D., OLSON, N., CLADEL, N., NEWCOMB, W., BROWN, J., KREIDER, J., CHRISTENSEN, N., AND BAKER, T. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol* 259 (1996), 249–63.
- BENOIT, L., WANG, X., PABST, H., DUTZ, J., AND TAN, R. Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J Immunology* 165 (2000), 3549–53.
- BERNARD, C., MOUGIN, C., LAURENT, R., AND LAB, M. Oncogene activation : an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. *Cancer Detect Prev.* 18 (1994), 273–82.
- BERNARD, H., BURK, R., CHEN, Z., VAN DOORSLAER, K., ZUR HAUSEN, H., AND DE VILLIERS, E. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401 (2010), 70–9.
- BHATLA, N., AND MODA, N. The clinical utility of HPV DNA testing in cervical cancer screening strategies. *Indian J Med Res* 130 (2009), 261–5.
- BIANCO, R., DAMIANO, V., GELARDI, T., DANIELE, G., CIARDIELLO, F., AND TORTORA, G. Rational combination of targeted therapies as a strategy to overcome the mechanisms of resistance to inhibitors of EGFR signaling. *Curr Pharm Des.* 13 (2007), 3358–67.
- BISHOP, B., DASGUPTA, J., AND CHEN, X. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1 : controlling particle assembly. *Virol J* 4 (2007), 3.

- BLAKE, N., HAIGH, T., SHAKAA, G., CROOM-CARTER, D., AND RICKINSON, A. The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response : lessons from the EBV nuclear antigen EBNA-1. *J Immunol* 165 (2000), 7078–87.
- BLEEKER, M., BERKHOF, J., HOGEWONING, C., VOORHORST, F., VAN DEN BRULE, A., STARINK, T., SNIJDERS, P., AND CJ., M. HPV type concordance in sexual couples determines the effect of condoms on regression of flat penile lesions. *Br J Cancer* 92 (2005), 1388–92.
- BLEEKER, M., HOGEWONING, C., BERKHOF, J., VOORHORST, F., HESSELINK, A., VAN DIEMEN, P., VAN DEN BRULE, A., SNIJDERS, P., AND MEIJER, C. Concordance of specific human papillomavirus types in sex partners is more prevalent than would be expected by chance and is associated with increased viral loads. *Clin Infect Dis* 41 (2005), 612–20.
- BOGEDAIN, C., WOLF, H., MODROW, S., STUBER, G., AND JILG, W. Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J Virol* 69 (1995), 4872–9.
- BORBELY, A., MURVAI, M., KONYA, J., BECK, Z., GERGELY, L., LI, F., AND VERESS, G. Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 87 (2006), 287–94.
- BOSCH, F., BROKER, T., FORMAN, D., MOSCICKI, A., GILLISON, M., DOORBAR, J., STERN, P., STANLEY, M., ARBYN, M., POLJAK, M., CUZICK, J., CASTLE, P., SCHILLER, J., MARKOWITZ, L., FISHER, W., CANFELL, K., DENNY, L., FRANCO, E., STEBEN, M., KANE, M., SCHIFFMAN, M., MEIJER, C., SANKARANARAYANAN, R., CASTELLSAGUÉ, X., KIM, J., BROTONS, M., ALEMANY, L., ALBERO, G., DIAZ, M., DE SANJOSÉ, S., OF THE ICO MONOGRAPH COMPREHENSIVE CONTROL OF HPV INFECTIONS, A., AND DISEASES, R. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine* 31 (2013), 1–31.
- BOSCH, F., AND DE SANJOSÉ, S. Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31 (2003), 3–13.
- BOUDRICHE, A. Dépistage du cancer du col de l’utérus à Alger. Annaba : 1res journées internationales sur le dépistage précoce des lésions précancéreuses, 24 mai 2014.
- BOULANGER, J., SEVESTRE, H., BAUVILLE, E., GHIGHI, C., HARLICOT, J., AND GONDRIY, J. Épidémiologie de l’infection à HPV. *Gynécol Obstét Fertil* 32 (2004), 218–23.
- BOYER, S., WAZER, D., AND BAND, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56 (1996), 4620–4.

- BREHM, A., NIELSEN, S., MISKA, E., MCCANCE, D., REID, J., BANNISTER, A., AND KOUZARIDES, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18 (1999), 2449–58.
- BROWN, H., SONG, M., DENG, H., WU, T., CHENG, G., AND SUN, R. NF-kappa B inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol* 77 (2003), 8532–40.
- BUCK, C., CHENG, N., THOMPSON, C., LOWY, D., STEVEN, A., SCHILLER, J., AND TRUS, B. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* 82 (2008), 190–7.
- BURK, R., AND DESALLE, R. The tango and tangle of human papillomavirus and the human genome. *J Natl Cancer Inst* 98 (2006), 1026–7.
- BUSSON, P., OOKA, T., AND CORBEX, M. Carcinomes nasopharyngés associés au virus d'Epstein-Barr : De l'épidémiologie à la thérapeutique et au dépistage. *Med Sci* 20 (2004), 453–7.
- CABRAS, G., DECAUSSIN, G., ZENG, Y., DJENNAOUI, D., MELOULI, H., BROULLY, P., BOUGUERMOUH, A., AND OOKA, T. Epstein-Barr virus encoded BALF1 gene is transcribed in Burkitt's lymphoma cell lines and in nasopharyngeal carcinoma's biopsies. *J Clin Virol* 34 (2005), 26–34.
- CALERO, L., AND BRUSIS, T. Laryngeal papillomatosis - first recognition in Germany as an occupational disease in an operating room nurse. *Laryngorhinootologie* 82(11) (2003), 790–3.
- CANCHE, J., LOPEZ, I., SUAREZ, N., ACOSTA, G., CONDE-FERROEZ, L., CETINA, T., AND MR, L. High prevalence and low E6 genetic variability of human papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursor lesions in Southeast Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 105 (2010), 144–148.
- CAPOVILLA, M., AND CLAVEL, C. *Détection des HPV et des lésions cervicales associées. Hybridation moléculaire. In "Papillomavirus humains. Biologie et pathologie tumorale" pp. 189-210, 2003. Editions Tec&Doc., 2003.*
- CASTELLSAGUÉ, X., DRUDIS, T., CAÑADAS, M., GONCÉ, A., ROS, R., PÉREZ, J., QUINTANA, M., MUÑOZ, J., ALBERO, G., DE SANJOSÉ, S., AND BOSCH, F. Human Papillomavirus (HPV) infection in pregnant women and mother-to-child transmission of genital HPV genotypes : a prospective study in Spain. *BMC Infect Dis* 9 (2009), 74.
- CASTLE, P., STOLER, M., WRIGHT, T., SHARMA, A., WRIGHT, T., AND BEHRENS, C. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older : a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol* 12 (2011), 880–90.

- CHAKRABARTI, ., AND KRISHNA, . Molecular interactions of 'high risk' human papilloma-viruses E6 and E7 oncoproteins : implications for tumour progression. *J Biosci* 28 : (2003), 337–48.
- CHAN, S., BERNARD, H., ONG, C., CHAN, S., HOFMANN, B., AND DELIUS, H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants : a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* 66 (1992), 5714–25.
- CHARBONNIER, A., KOHRGRUBER, N., KRIEHLER, E., STINGL, G., ROT, A., AND MAURER, D. Macrophage inflammatory protein alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J Exp Med* 190 (1999), 1755–68.
- CHARD, T., AND GRUDZINSKAS, J. *The Uterus*. Cambridge University Press, 1994.
- CHARLES, C., AND SIRE, D. Transmission of papovavirus by cryotherapy applicator. *JAMA*. 218(9) (1971), 1435.
- CIUFFO, G. Innesto positivo con filtrato di verruca vulgare (positive verruca vulgaris inoculation using a filtered inoculum). *G Ital Mal Venereol* 48 (1907), 12–17.
- CLARKE, M., WENTZENSEN, N., MIRABELLO, L., GHOSH, A., WACHOLDER, S., HARARI, A., LORINCZ, A., SCHIFFMAN, M., AND BURK, R. Human Papillomavirus DNA Methylation as a Potential Biomarker for Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21 (2012), 2125–37.
- CLAVEL, C., MASURE, M., PUTAUD, I., THOMAS, K., BORY, J., GABRIEL, R., QUEREUX, C., AND BIREMBAUT, P. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. *J Clin Pathol* 51 (1998), 737–40.
- CLEMENS, K., BRENT, R., GYURIS, J., AND MUNGER, K. Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* 214 (1995), 289–93.
- COHEN, J., AND LEKSTROM, K. Epstein-Barr virus BARF-1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *J Virol* 73 (1999), 7627–32.
- COOPER, M., FEHNIGER, T., AND CALIGIURI, M. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22 (2001), 633–640.
- CORNALL, A., QUINT, W., GARLAND, S., AND TABRIZI, S. Evaluation of an automated SPF10-LiPA25 assay for detection and typing of human papillomavirus in archival samples. *J Virol Methods* 199 (2014), 116–8.

- COUTURIER, J., SASTRE-GARAU, X., SCHNEIDER-MAUNOURY, S., LABIB, A., AND ORTH, G. Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol.* 65(8) (1991), 4534–8.
- Cox, T. Clinical role of HPV testing. *Obstet Gynecol Clin North Am* 23 (1996), 811–51.
- CULLEN, B. Epstein-Barr Virus, 2010.
- CULP, T., BUDGEON, L., AND CHRISTENSEN, N. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. *Virology* 347 (2006), 147–59.
- CUZICK, J., ARBYN, M., SANKARARAYANAN, R., TSU, U., RONCO, G., MAYRAND, M., DILLNER, J., AND MEIJER, J. Overview of human papillomavirus based and other novel option for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 265 (2008), K29–K41.
- CUZICK, J., CLAVEL, C., PETRY, K., MEIJER, C., HOYER, H., RATNAM, S., SZAREWSKI, A., BIREMBAUT, P., KULASINGAM, S., SASIENI, P., AND IFTNER, T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 119 (2006), 1095–101.
- CZEGLEDY, J. Sexual and non-sexual transmission of human papillomavirus. *Acta Microbiol Immunol Hung* 48 (2001), 511–517.
- DA SILVA, D., VELDEERS, M., NIELAND, J., SCHILLER, J., NICKOLOFF, B., AND KAST, W. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol* 13 (2001), 633–41.
- DACHEZ, R., AND LEFOT-MOSSE, E. *Cytologie cervico-utérine en milieu liquide. in F. Aubin, JL Prétet, Ch Mougin : papillomavirus humains : biologie et pathologie tumorale (p243-254). TEC ET DOC / EM INTER, 2003.*
- DALSTEIN, V., RIETHMULLER, D., PRÉTET, J., LE BAIL CARVAL, K., SAUTIÈRE, J., CARBILLET, JPAND KANTELIP, B., SCHAAL, J., AND C, M. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions : a longitudinal french cohort study. *Int J Cancer* 106 (2003), 396–403.
- DAVEY, D., GOULART, R., NAYAR, R., EDUCATION, C., AND (CETC), T. C. 2013 statement on human papillomavirus DNA test utilization. *Am J Clin Pathol* 141 (2014), 459–61.
- DE ARAUJO SOUZA, P., SICHERO, L., AND MACIA, P. Hpv variants and hla polymorphisms : the role of variability on the risk of cervical cancer. *Future Oncol* 5 (2009), 359–370.

- DE BOER, M., JORDANOVA, E., KENTER, G., PETERS, A., CORVER, W., AND TRIMBOS, J. High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 13 (2007), 132–8.
- DE FRANCESCO, M., GARGIULO, F., SCHREIBER, C., CIRAVOLO, G., SALINARO, F., AND MANCA, N. Comparison of the AMPLICOR human papillomavirus test and the hybrid capture 2 assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. *J Virol Methods* 147 (2008), 10–7.
- DE MAY, R. Common problems in Papanicolaou smear interpretation. *Arch Pathol Lab Med* 121 (1997), 229–38.
- DE THÉ, G., DAY, N., GESER, A., LAVOUÉ, M., HO, J., SIMONS, M., SOHIER, R., TUKEI, P., VONKA, V., AND ZAVADOVA, H. Sero-epidemiology of the Epstein-Barr virus : preliminary analysis of an international study - a review. *IARC Sci Publ* 11 (1975), 3–16.
- DE TURENNE-TESSIER, M., AND OOKA, T. Post-translational modifications of Epstein Barr virus BARF1 oncogene-encoded polypeptide. *J Gen Virol* 88 (2007), 2656–61.
- DE VILLIERS, E. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 63 (1989), 4898–903.
- DE VILLIERS, E., FAUQUET, C., BROKER, T., BERNARD, H., AND ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324 (2004), 17–27.
- DENNY, L., FRANCESCHI, S., DE SANJOSÉ, S., HEARD, I., MOSCICKI, A., AND PALEFSKY, J. Human papillomavirus, human immunodeficiency virus and immunosuppression. *Vaccine* 30 (2012), 168–174.
- DEPUYDT, CE AN BENOY, I., BEERT, J., CRIEL, A., BOGERS, J., AND ARBYN, M. Clinical validation of a type-specific real-time quantitative human papillomavirus PCR against the performance of hybrid capture 2 for the purpose of cervical cancer screening. *J Clin Microbiol* 50 (2012), 4073–7.
- DESAINTE, C., AND DEMERET, C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 7 (1996), 339–47.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110 (2006), 525–41.
- DOORBAR, J., CAMPBELL, D., GRAND, R., AND GALLIMORE, P. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J* 5 (1986), 355–62.

- DREYFUS, D., NAGASAWA, M., PRATT, J., KELLEHER, C., AND GELFAND, E. Inactivation of NF-kappaB by EBV BZLF-1-encoded ZEBRA protein in human T cells. *J Immunol* 163 (1999), 6261–8.
- DROLET, M., BOILY, M., GREENAWAY, C., DEEKS, S., BLANCHETTE, C., LAPRISE, J., AND BRISSON, M. Sociodemographic inequalities in sexual activity and cervical cancer screening : implications for the success of human papillomavirus vaccination. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22 (2013), 641–52.
- DUENSING, S., DUENSING, A., FLORES, E., DO, A., LAMBERT, P., AND MÜNGER, K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* 75 (2001), 7712–6.
- DUENSING, S., AND MUNGER, K. Centrosomes, genomic instability, and cervical carcinogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13 (2003), 9–23.
- DUENSING, S., AND MÜNGER, K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors : modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 21 (2002), 6241–8.
- DUNNE, E., UNGER, E., STERNBERG, M., MCQUILLAN, G., SWAN, D., PATEL, S., AND MARKOWITZ, L. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 297 (2007), 913–9.
- DYSON, N., GUIDA, P., K, M., AND HARLOW, E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* 66 (1992), 6893–902.
- DÜRST, M., CROCE, C., GISSMANN, L., SCHWARZ, E., AND HUEBNER, K. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), 1070–4.
- EDMONDS, C., AND VOUSDEN, K. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Virol* 63 (1989), 2650–6.
- EDWARDS, R., SITKI-GREEN, D., MOORE, D., AND RAAB-TRAUB, N. Potential selection of LMP-1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 78 (2004), 868–81.
- EDWARDS, T., HELMUS, M., KOELLER, K., BASHKIN, J., AND FISHER, C. Human papillomavirus episome stability is reduced by aphidicolin and controlled by DNA damage response pathways. *J Virol* 87 (2013), 3979–89.
- EKALAKSANANAN, T., AROMSEREE, S., PIENTONG, C., SUNTHAMALA, N., SWANGPHON, P., CHAIWONGKOT, A., KONGYINGYOE, B., PATARAPADUNGKIT, N., AND CHUMWORATHAYEE, B. Co-infection of Epstein-Barr Virus (EBV) with High Risk Human Papillomavirus (HR-HPV) is

- a Significant Risk of Cervical Cancer. (Abstract) 27th International Papillomavirus conference. Clinical workshop, Berlin, Germany. Abstract book 2, page 68, 2011.*
- EPSTEIN, M. A., ACHONG, B., AND BARR, Y. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1 (1964), 702–3.
- EWEN, M. The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev* 13 (1994), 45–66.
- FAHEY, M., IRWIG, L., AND MACASKILL, P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 141 (1995), 680–9.
- FERBER, M., THORLAND, E., BRINK, A., RAPP, A., PHILLIPS, L., MCGOVERN, R., GOSTOUT, B., CHEUNG, T., CHUNG, T., FU, W., AND SMITH, D. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22 (2003), 7233–42.
- FERENCZY, A., BERGERON, C., AND RICHART, R. Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections. *Obstet Gynecol* 74 (1989), 950–4.
- FERLAY, J., SHIN, H., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C., AND PARKIN, D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 127 (12) (2010), 2893–917.
- FERLAY, J., STELIAROVA-FOUCHER, E., LORTET-TIEULENT, J., ROSSO, S., COEBERGH, J., COMBER, H., FORMAN, D., AND BRAY, B. Cancer incidence and mortality patterns in Europe : Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Can* 49 (2013), 1374–1403.
- FILIPPOVA, M., PARKHURST, L., AND DUERKSEN-HUGHES, P. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279 (2004), 25729–44.
- FILIPPOVA, M., SONG, H., CONNOLLY, J., DERMODY, T., AND DUERKSEN-HUGHES, P. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277 (2002), 21730–9.
- FORD, H., SCALAFANI, R., AND DEGREGORI, J. *Growth control : Biomolecular regulation and cancer. Second edition.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004.
- FRATI, E., BIANCHI, S., COLZANI, D., ZAPPA, A., ORLANDO, G., AND TANZI, E. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). *Infect Genet Evol* 11 (2011), 2119–24.



- FRAZER, I., THOMAS, R., ZHOU, J., LEGGATT, G., DUNN, L., McMILLAN, N., TINDLE, R., FILGUEIRA, L., MANDERS, P., BARNARD, P., AND SHARKEY, M. Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev* 168 (1999), 131–42.
- GARCIA-CLOSAS, R., CASTELLSAGUÉ, X., BOSCH, X., AND GONZALEZ, C. A. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis : A review of recent evidence. *Int J Cancer* 117 (2005), 629–37.
- GARNETT, T., FILIPPOVA, M., AND DUERKSEN-HUGHES, P. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 13 (2006), 1915–26.
- GAVILLON, N., VERVAET, H., DERNIAUX, E., TERROSI, P., GRAESSLIN, O., AND QUEREUX, C. How did I contract human Papillomavirus (HPV)? *Gynecol Obstet Fertil* 38 (2010), 199–204.
- GENTHER WILLIAMS, S., DISBROW, G., SCHLEGEL, R., LEE, D., THREADGILL, D., AND LAMBERT, P. Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene. *Cancer Res* 65 (2005), 6534–42.
- GEWIN, L., MYERS, H., KIYONO, T., AND GALLOWAY, D. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18 (2004), 2269–82.
- GIROGLOU, T., FLORIN, L., SCHÄFER, F., STREECK, R., AND SAPP, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75 (2001), 1565–70.
- GIULIANO, A., ANIC, G., AND NYITRAY, A. Epidemiology and pathology of HPV disease in males. *Gynecol Oncol* 117 (2010), 15–9.
- GLAHDER, J., HANSEN, C., VINTHER, J., MADSEN, B., AND NORRILD, B. A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA. *J Gen Virol* 84 (2003), 3429–41.
- GONZALEZ, S., STREMLAU, M., HE, X., BASILE, J., AND MUNGER, K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75 (2001), 7583–91.
- GOSSELIN, J., TOMOIU, A., GALLO, R., AND FLAMAND, L. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood* 94 (1999), 4210–9.
- GOSVIG, C., HUUSOM, L., ANDERSEN, K., IFTNER, A., CEDERKVIST, L., SVARE, E., IFTNER, T., AND KJAER, S. Persistence and reappearance of high-risk human papillomavirus after conization. *Gynecol Oncol* 131 (2013), 661–6.

- GRAVITT, P., PEYTON, C., ALESSI, T., WHEELER, C., COUTLÉE, F., HILDESHEIM, A., SCHIFFMAN, M., SCOTT, D., AND APPLE, R. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38 (2000), 357–61.
- GREENHALGH, D. A., WANG, X., JA ROTHNAGE, L., ECKHARDT, J., QUINTANILLA, M., BARBER, J., BUNDMAN, D., LONGLEY, M., SCHLEGEL, R., AND ROOP, D. Transgenic mice expressing targeted HPV-18 E6 and E7 oncogenes in the epidermis develop verrucous lesions and spontaneous, Ha-ras-activated papillomas. *Cell Growth Differ* 5 (1994), 667–675.
- GREGORY, C., ROWE, M., AND RICKINSON, A. Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol* 71 (1990), 1481–95.
- GRISARU, D., AVIDOR, B., NIV, J., MARMOR, S., ALMOG, B., LEIBOWITZ, C., GRAIDI, M., AND GILEDI, M. Pilot study of prevalence of high-risk human papillomavirus genotypes in israeli jewish women referred for colposcopic examination. *J Clin Microbiol* 46 (2008), 1660–8.
- GROSSMAN, SR AND LAIMINS, . E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene* 4 (1989), 1089–93.
- GURGEL, A., CHAGAS, B., DO AMARAL, C., ALBUQUERQUE, E., SERRA, I., SILVA NETO JDA, C., MUNIZ, M., AND DE FREITAS, A. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. *Biomed Res Int* 2013 (2013), 546354.
- HADDAD, R., CRUM, C., CHEN, Z., KRANE, J., POSNER, M., LI, Y., AND R, B. HPV16 transmission between a couple with HPV-related head and neck cancer. *Oral Oncol* 44 (2008), 812–5.
- HAINAUT, P., HERNANDEZ, T., ROBINSON, A., RODRIGUEZ-TOME, P., FLORES, T., HOLLSTEIN, M., HARRIS, C., AND MONTESANO, R. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines : updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26 (1998), 205–13.
- HALFON, P., LINDEMANN, M., RAIMONDO, A., RAVET, S., CAMUS, C., KHIRI, H., PÉNARANDA, G., SIDERI, M., AND SANDRI, M. HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia using the Digene HPV genotyping LQ test. *Arch Virol* 158 (2013), 1143–9.
- HAMDİ CHERIF, M. Enregistrement du cancer en algérie : Contexte et évolution. In *Journées Francophones de Lutte Contre le Cancer pour les pays en voie de développement*, Montpellier 8-9 avril (2010).

- HAMMERSCHMIDT, W., AND SUGDEN, B. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55 (1988), 427–33.
- HAMMOUDA, D., AÏT-HAMADOUCHE, N., AFIANE, M., AND BOUHADEF, A. Enquête nationale sur l'incidence et la prévalence des cancers. INSP, Ministère de la santé et de la population, Alger 2002, 2002.
- HAMMOUDA, D., CLIFFORD, G., PALLARDY, S., AYYACH, G., CHEŽKIRI, A., BOUDRICH, A., SNIJ-  
DERS, P., VAN KEMENADE, F., MEIJER, C., BOUHADEF, A., ZITOUNI, Z., HABIB, D., IKEZAREN,  
I., AND FRANCESCHI, S. Human papillomavirus infection in a population-based sample  
of women in Algiers, Algeria. *Int J Cancer* 128 (2011), 2224–9.
- HANSAN, J. Searching for confidence in an era of uncertainty : a ten-year journey with  
Doctor Robert Morris. *J Aging Soc Policy* 19 (2007), 147–58.
- HARTLEY, K., AND ALEXANDER, K. Human TATA binding protein inhibits human papillo-  
mavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation  
on the viral origin of replication. *J Virol* 76 (2002), 5014–23.
- HEBNER, C., LASANEN, J., BATTLE, S., AND AIYAR, A. The spacing between adjacent binding  
sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in  
transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology* 311 (2003), 263–74.
- HEINZEL, P., CHAN, S., HO, L., O'CONNOR, M., BALARAM, P., CAMPO, M., FUJINAGA, K., KI-  
VIAT, N., KUYPERS, J., AND PFISTER, H. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-  
6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 33 (1995),  
1746–54.
- HELFRICH, I., CHEN, M., SCHMIDT, R., FÜRSTENBERGER, G., KOPP-SCHNEIDER, A., TRICK, D.,  
GRÖNE, H., ZUR HAUSEN, H., AND RÖSL, F. Increased incidence of squamous cell carcino-  
mas in *Mastomys natalensis* papillomavirus E6 transgenic mice during two-stage skin  
carcinogenesis. *J Virol* 78 (2004), 4797–805.
- HENLE, W., AND HENLE, G. Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lym-  
phoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol* 36 (1970), 706–13.
- HERBERT, A., BERGERON, C., WIENER, H., SCHENCK, U., KLINKHAMER, P., BULTEN, J., AND  
ARBYN, M. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening :  
recommendations for cervical cytology terminology. *Cytopathology* 18 (2007), 213–9.
- HERRICK, J., CONTI, C., TEISSIER, S., THIERRY, F., COUTURIER, J., SASTRE-GARAU, X., FAVRE,  
M., ORTH, G., AND BENSIMON, A. Genomic organization of amplified myc genes suggests  
distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 65 (2005), 1174–9.

- HILDESHEIM, A., MANN, V., BRINTON, L. A., SZKLO, M., REEVES, W. C., AND RAWLS, W. E. Herpes simplex virus type 2 : A possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in the development of invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 49 (1991), 335–340.
- HINKULA, M., PUKKALA, E., KYRÖNEN, P AND LAUKKANEN, P., KOSKELA, P., PAAVONEN, J., LEHTINEN, M., AND KAUPPILA, A. A population-based study on the risk of cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia among grand multiparous women in Finland. *Br J Cancer* 90 (2004), 1025–9.
- HJARTÅKER, A., MEO, M., AND WEIDERPASS, E. Alcohol and gynecological cancers : an overview. *Eur J Cancer Prev* 19 (2010), 1–10.
- HO, G., BURK, R., KLEIN, S., KADISH, A., CHANG, C., PALAN, P., BASU, J., TACHEZY, R., LEWIS, R., AND ROMNEY, S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995), 1365–71.
- HO, L., CHAN, S., CHOW, V., CHONG, T., TAY, S., VILLA, L., AND BERNARD, H. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 29 (1991), 1765–72.
- HOCHBERG, D., SOUZA, T., CATALINA, M., SULLIVAN, J., LUZURIAGA, K., AND THORLEY-LAWSON, D. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol* 78 (2004), 5194–204.
- HOELZER, K., SHACKELTON, L., AND PARRISH, C. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Res* 36 (2008), 2852–937.
- HOFFMANN, I. *Protein Kinases Involved in Mitotic Spindle Checkpoint Regulation. In Cell Cycle Regulation (Kaldis P Ed.)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- HUANG, Y., SHEEN, T., CHEN, C., LU, J., CHANG, Y., AND CHEN, J. Profile of cytokine expression in nasopharyngeal carcinoma a distinct expression of interleukin 1 in tumor and CD4+ cells. *Cancer Res* 59 (1999), 1599–605.
- HUH, K., ZHOU, X., HAYAKAWA, H., CHO, J., LIBERMANN, T., JIN, J., HARPER, J., AND MUNGER, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* 81 (2007), 9737–47.
- HUIBREGTSE, J., SCHEFFNER, M., AND HOWLEY, P. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* 10 (1991), 4129–35.

- HUMPHREY, T., AND PEARCE, A. *Cell Cycle Molecules and Mechanisms of the Budding and Fission Yeasts*. In Humphrey, T. and Brooks, G eds "Cell cycle control : Mechanisms and protocols", vol. 296. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005.
- IARC. *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Human papillomaviruses*, vol. 64. IARC Press, OMS, 1995.
- IARC. *IARC, Handbooks of Cancer Prevention : Cervix Cancer Screening*. IARC Press, 2005.
- IARC. De l'étiologie à la prévention : le cas du cancer du col de l'utérus. In *Journée du CIRC, Mercredi 13 mai 2009* (2009).
- IARC. Dernières statistiques mondiales sur le cancer. *IARC Monographs* 223 (2013), 1–3.
- IDA, K., TOKUDA, H., KANAOKA, T., KANZAKI, H., NODA, Y., YOSHIDA, O., ITO, Y., AND MORI, T. Epstein-Barr virus activating principle in husbands' semen of cervical cancer patients. *Am J Reprod Immunol* 26 (1991), 89–92.
- INMAN, G., AND FARRELL, P. Epstein-Barr virus EBNA-LP and transcription regulation properties of pRB, p107 and p53 in transfection assays. *J Gen Virol* 76 (1995), 2141–9.
- JAMES, M., LEE, J., AND KLINGELHUTZ, A. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. *J Virol* 80 (2006), 5301–7.
- JENSON, A., ROSENTHAL, J., OLSON, C., PASS, F., LANCASTER, W., AND SHAH, K. Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. *J Natl Cancer Inst* 64 (1980), 495–500.
- JEON, S., ALLEN-HOFFMANN, B., AND LAMBERT, P. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69 (1995), 2989–97.
- JEON, S., AND LAMBERT, P. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs : implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), 1654–8.
- JERONIMO, J., BANSIL, P., LIM, J., PECK, R., PAUL, P., AMADOR, J., MIREMBE, F., BYAMUGISHA, J., POLI, U., SATYANARAYANA, L., ASTHANA, S., AND GROUP, S.-U. S. A multicountry evaluation of careHPV testing, visual inspection with acetic acid, and papanicolaou testing for the detection of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 24 (2014), 576–85.
- JIANG, W., SZEKELY, L., WENDEL-HANSEN, V., RINGERTZ, N., KLEIN, G., AND ROSÉN, A. Co-localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp Cell Res* 197 (1991), 314–8.

- JOHANNSEN, E., AND LAMBERT, P. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology* 445 (2013), 205–12.
- KADAJA, M., SILLA, T., USTAV, E., AND USTAV, M. Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384 (2009), 360–8.
- KALANTARI, M., LEE, D., CALLEJA-MACIAS, I., LAMBERT, P., AND BERNARD, H. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. *Virology* 374 (2008), 292–303.
- KASHUBA, E., MATTSSON, K., KLEIN, G., AND SZEKELY, L. p14ARF induces the relocation of HDM2 and p53 to extranucleolar sites that are targeted by PML bodies and proteasomes. *Mol Cancer* 2 (2003), 18.
- KATKI, H., KINNEY, W., FETTERMAN, B., LOREY, T., POITRAS, N., CHEUNG, L., DEMUTH, F., SCHIFFMAN, M., WACHOLDER, S., AND CASTLE, P. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology : a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol* 12 (2011), 663–72.
- KENNEDY, G., KOMANO, J., AND SUGDEN, B. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), 14269–74.
- KHANNA, R., BURROWS, S., MOSS, D., AND SILINS, S. Peptide transporter (TAP-1 and TAP-2)-independent endogenous processing of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A : implications for cytotoxic T-lymphocyte control of EBV associated malignancies. *J Virol* 70 (1996), 5357–62.
- KHANNA, R., BURROWS, S., NICHOLLS, J., , AND POULSEN, L. Identification of cytotoxic t cell épitopes within epstein-barr virus (ebv) oncogene latent membrane protein 1 (lmp1) : evidence for hla a2 supertype-restricted immune recognition of ebv-infected cells by lmp1-specific cytotoxic t lymphocytes. *Eur J Immunol* 28 (1998), 451–8.
- KHYATTI, M., PATE, P., STEFANESCU, I., AND MENEZES, J. Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein gp350 expressed on transfected cells resistant to natural killer cell activity serves as a target antigen for EBV-specific antibody-dependent cellular CD8 cytotoxicity. *J Virol* 65 (1991), 996–1001.
- KIM, K., YOON, D., MOON, Y., AND KIM, Y. Expression and localization of human papillomavirus type 16 E6 and E7 open reading frame proteins in human epidermal keratinocyte. *Yonsei Med J* 35 (1994), 1–9.

- KIM, Y., PARK, J., LEE, K., KONG, T., YOO, S., KIM, W., YOON, J., CHANG, S., CHANG, K., AND RYU, H. Does pretreatment HPV viral load correlate with prognosis in patients with early stage cervical carcinoma? *J Gynecol Oncol* 19 (2008), 113–6.
- KIMURA, H. Pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection : Is this an infectious disease, lymphoproliferative disorder, or immunodeficiency? *Rev Med Virol* 16 (2006), 251–61.
- KIRNBAUER, R., BOOY, F., CHENG, N., LOWY, D., AND SCHILLER, J. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), 12180–4.
- KITAMURA, R., SEKIMOTO, T., ITO, S., HARADA, S., YAMAGATA, H., MASAI, H., YONEDA, Y., AND YANAGI, K. Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J Virol* 80 (2006), 1979–91.
- KITAY, M., AND ROWE, D. Cell cycle stage-specific phosphorylation of the Epstein-Barr virus immortalization protein EBNA-LP. *J Virol* 70 (1996), 7885–93.
- KIVI, N., GRECO, D., AUVINEN, P., AND AUVINEN, E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 27 (2008), 2532–41.
- KLINGELHUTZ, A., FOSTER, S., AND McDUGALL, J. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380 (1996), 79–82.
- KOLIOPOULOS, G., ARBYN, M., MARTIN-HIRSCH, P., KYRGIU, M., PRENDIVILLE, W., AND PRASKEVAIDIS, E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening. A systematic review and meta-analysis of non-randomized study. *Gynecol Oncol* 104 (2007), 232–46.
- KOSHIOL, J., LINDSAY, L., PIMENTA, J., POOLE, C., JENKINS, D., AND SMITH, J. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia : a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 168 (2008), 123–37.
- KOSKELA, P., ANTILA, T., BJORGE, T., BRUNSVIG, A., DILLNER, J., HAKAMA, M., HAKULINEN, T., JELLUM, E., LEHTINEN, M., LENNER, P., LUOSTARINEN, T., PUKKALA, E., SAIKKU, P., THORESEN, S., YOUNGMAN, L., AND PAAVONEN, J. Chlamydia trachomatis infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 85 (2000), 35–39.
- Koss, L. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 261 (1989), 737–43.

- Koss, L. Cervical pap smear : News directions. *cancer* 71 (1993), 1406–12.
- Koss, L., AND DURFEE, G. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix : cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci* 63 (1956), 1245–61.
- KRAUER, K., BELZER, D., LIASKOU, D., BUCK, M., CROSS, S., HONJO, T., AND SCULLEY, T. Regulation of interleukin-1beta transcription by Epstein-Barr virus involves a number of latent proteins via their interaction with RBP. *Virology* 252 (1998), 418–30.
- KUMAR, A., ZHAO, Y., MENG, G., ZENG, M., SRINIVASAN, S., DELMOLINO, L., GAO, Q., DIMRI, G., WEBER, G., WAZER, D., BAND, H., AND BAND, V. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22 (2002), 5801–12.
- KUSANO, S., AND RAAB-TRAUB, N. An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol* 75 (2001), 384–95.
- KYO, S., INOUE, M., KOYAMA, M., FUJITA, M., TANIZAWA, O., AND HAKURA, A. Detection of high-risk human papillomavirus in the cervix and semen of sex partners. *J Infect Dis* 170 (1994), 682–5.
- LANCASTER, W., AND OLSON, C. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev* 46 (1982), 191–207.
- LANDERS, R. J., O’LEARY, J., CROWLEY, M., HEALY, I., ANNIS, P., BURKE, L., O’BRIEN, D., HOGAN, J., KEALY, W. F., LEWIS, F. A., AND DOYLE, C. T. Epstein-Barr virus in normal, pre-malignant, and malignant lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 46 (1993), 931–935.
- LEIGH, R., AND NYIRJESY, P. Genitourinary manifestations of Epstein-Barr virus infections. *Curr Infect Dis Rep* 11 (2009), 449–56.
- LENZ, P., DAY, P., PANG, Y., FRYE, S., JENSEN, P., LOWY, D., AND SCHILLER, J. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 166 (2001), 5346–55.
- LEVERT, M., CLAVEL, C., GRAESSLIN, O., MASURE, M., BIREMBAUT, P., QUEREUX, C., AND GABRIEL, R. Typage des Papillomavirus humains dans les frottis cervicaux de routine. Résultats sur une série de 3 778 patientes. *Gynécol Obstét et Fertil* 28 (2000), 722–8.
- LEVINE, A. The common mechanisms of transformation by the small dna tumor viruses : The inactivation of tumor suppressor gene products : p53. *Virology* 384 (2009), 285–93.



- LEYKAUF, K., SALEK, M., SCHLÜTER, H., LEHMANN, W., AND ALONSO, A. Identification of membrane proteins differentially expressed in human papillomavirus type 16 E5-transfected human keratinocytes by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *J Gen Virol* 85 (2004), 1427–31.
- LICCARDI, G., HARTLEY, J., AND HOCHHAUSER, D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res* 71 (2011), 1103–14.
- LIN, J., JOHANNSEN, E., ROBERTSON, E., AND KIEFF, E. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol* 76 (2002), 232–42.
- LING, P., PENG, R., NAKAJIMA, A., YU, J., TAN, J., MOSES, S., YANG, W., ZHAO, B., KIEFF, E., BLOCH, K., AND BLOCH, D. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J* 24 (2005), 3565–75.
- LIU, F., , AND ZHOU, Z. *Comparative virion structures of human herpesviruses*, In Arvin, A and Campadelli-fiume, G and Mocarski, E and Moore, P and Roizman, B and Whitley, R and Yamanishi, K EDS 'Human herpesviruses". Cambridge University Press, 2007.
- LIU, M., AND YEH, C. Prognostic value of anti-Epstein-Barr virus antibodies in nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Radiat Med* 16 (1998), 113–7.
- LIU, X., CLEMENTS, A., ZHAO, K., AND MARMORSTEIN, R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* 281 (2006), 578–86.
- LIU, Y., CHEN, J., GAO, Q., DALAL, S., HONG, Y., MANSUR, C., BAND, V., AND ANDROPHY, E. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol* 73 (1999), 7297–307.
- LO, H. Nuclear mode of the EGFR signaling network : biology, prognostic value, and therapeutic implications. *Discov Med* 10 (2010), 44–51.
- LO, H., XIA, W., WEI, Y., ALI-SEYED, M., HUANG, S., AND HUNG, M. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res* 65 (2005), 338–48.
- LOMBARD, I., VINCENT-SALOMON, A., VALIDIRE, P., ZAFRANI, B., DE LA ROCHEFORDIÈRE, A., CLOUGH, K., FAVRE, M., POUILLART, P., AND SASTRE-GARAU, X. Human papillomavirus genotype as a major determinant of the course of cervical cancer. *J Clin Oncol* 16 (1998), 2613–9.

- LORINCZ, A., CASTLE, P., SHERMAN, M., SCOTT, D., GLASS, A., WACHOLDER, S., RUSH, B., GRAVITT, P., SCHUSSLER, J., AND SCHIFFMAN, M. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 360 (2002), 228–9.
- LUDICKE, F., STALBERG, A., VASSILAKOS, P., MAJOR, A., AND CAMPANA, A. High-and intermediate-risk human papillomavirus infection in sexually active adolescent females. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 14 (2001), 171–4.
- LUHNA, P., WALKER, J., SCHIFFMAN, M., ZUNA, R., DUNNE, S., GOLD, M., SMITH, K., MATHEWS, C., ALLEN, R., ZHANG, R., AND WANG, S AND WENTZENSEN, N. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 128 (2013), 265–70.
- LUNA, J., PLATA, M., GONZALEZ, M., CORREA, A., MALDONADO, I., NOSSA, C., RADLEY, D., VUOCOLO, S., HAUPT, R., AND SAAH, A. Long-term Follow-up Observation Of The Safety, Immunogenicity, And Effectiveness Of GARDASIL in Adult Women. *PLoS One* 8 (2013), 83431.
- LUU, HN AN ADLER-STORHYZ, K., DILLON, L., FOLLEN, M., AND SCHEURER, M. Comparing the Performance of Hybrid Capture II and Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Identification of Cervical Dysplasia in the Screening and Diagnostic Settings. *Clin Med Insights Oncol* 25 (2013), 247–55.
- LÖRINCZ, A., AND RICHART, R. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 127 (2003), 959–68.
- MACSWEEN, K., AND CRAWFORD, D. Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis* 3 (2003), 131–40.
- MAHOT, S., SERGEANT, A., DROUET, E., AND GRUFFAT, H. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta : induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol* 84 (2003), 965–74.
- MANTOVANI, F., AND BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20 (2001), 7874–87.
- MARÉCHAL, V., AND PIOLOT, T. Lytic infection by double-strand DNA viruses and cell cycle alterations. *Pathol. Biol. (Paris)* 48 (2000), 289–300.
- MASY, E., ADRIAENSSSENS, E., MONTPELLIER, C., CRÉPIEUX, P., MOUGEL, A., QUATANNENS, B., GOORMACHTIGH, G., FAUMONT, N., MEGGETTO, F., AURIAULT, C., GROUX, H., AND COLL, J. Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *J Virol* 76 (2002), 6460–72.

- McGEOCH, D., COOK, S., DOLAN, A., JAMIESON, F., AND TELFORD, E. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* 247 (1995), 443–58.
- McLAUGHLIN-DRUBIN, M., AND MUNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384 (2009), 335–44.
- MEDINA-MARTÍNEZ, O., VALLEJO, V., GUIDO, M., AND GARCÍA-CARRANCÁ, A. Ha-ras oncogene-induced transcription of human papillomavirus type 18 E6 and E7 oncogenes. *Mol Carcinog* 19 (1997), 83–90.
- MEGUENNI, S., EL-MEHDAOUI, S., BANDOUI, D., BOUGUERMOUH, A., ALLOUACHE, A., BENDIB, A., CHOUIER, A., DJENNAOUI, T., LALIAM, N., BOUHADEF, A., AND BOUHADJAR, H. Détection du DNA des virus du papillome humain (HPV) dans les lésions génitales par hybridation moléculaire. *Arch Inst Pasteur Algérie* 58 (1992), 291–7.
- MEIJER, C., AND VAN DEN BRULE, A. Detection of human papillomavirus in cervical scrapes by the PCR in relation to cytology : possible implications for the cervical screening. *IARC Scientific Publications* 1992 (1992), 271–82.
- MERCHANT, M., SWART, R., KATZMAN, R., IKEDA, M., IKEDA, A., LONGNECKER, R., DYKSTRA, M., AND PIERCE, S. The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* 20 (2001), 805–35.
- MERGUI, J., POLENA, V., DAVID-MONTEFIORE, E., AND UZAN, S. Recommandations pour la surveillance des patientes traitées pour des lésions de haut grade du col utérin. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 37 (2008), S121–30.
- MIDDELDORP, J., BRINK, A., VAN DEN BRULE, A., AND MEIJER, C. Pathogenic roles for Epstein-/Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 45 (2003), 1–36.
- MITSUISHI, T., OHSAWA, I., KATO, T., EGAWA, N., AND KIYONO, T. Molecular Cloning and Characterisation of a Novel Type of Human Papillomavirus 160 Isolated from a Flat Wart of an Immunocompetent Patient. *PLOS One* 8 (2013), e79592.
- MIYAGI, E., SUKEGAWA, A., MOTOKI, Y., KANEKO, T., MARUYAMA, Y., ASAI-SATO, M., NUMAZAKI, R., MIZUSHIMA, S., AND HIRAHARA, F. Attitudes toward cervical cancer screening among women receiving human papillomavirus vaccination in a university-hospital-based community : Interim 2-year follow-up results. *J Obstet Gynaecol Res* 40 (2014), 1105–13.
- MO, L., MONNIER-BENOIT, S., KANTELIP, B., PETITJEAN, A., RIETHMULLER, D., PRÉTET, J., AND MOUGIN, C. Comparison of AMPLICOR and Hybrid Capture II assays for high risk

- HPV detection in normal and abnormal liquid-based cytology : use of INNO-LiPA Genotyping assay to screen the discordant results. *J Clin Virol* 41 (2008), 104–10.
- MODIS, Y., TRUS, B., AND HARRISON, S. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J* 21 (2002), 4754–62.
- MONSONEGO, J. *Traité des infections et pathologies génitales à papillomavirus*. Springer-Verlag Paris, France, 2007.
- MONSONÉGO, J. *Dysplasies du col utérin et papillomavirus humains*. Maloine, 1988.
- MOORE, P., GAO, S., DOMINGUEZ, G., CESARMAN, E., LUNGU, O., KNOWLES, D., GARBER, R., PELLETT, P., MCGEOCH, D., AND CHANG, Y. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma. *J Virol* 70 (1996), 549–58.
- MORRISON, J., AND RAAB-TRAUB, N. Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of beta-catenin signaling. *J Virol* 79 (2005), 2375–82.
- MORRISON, T., MAUSER, A., KLINGELHUTZ, A., AND KENNEY, S. Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J Virol* 78 (2004), 544–9.
- MOSCICKI, A., M, S., A, B., G, A., AR, G., MT, G., SK, K., AND PALEFSKY, J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine* 30 (2012), 24–33.
- MOUGIN, C., BOURGAULT-VILLADA, I., AND COURSAGET, P. Vaccination anti-HPV pour la prévention du cancer du col de l'utérus. *La presse médicale* 38 (2009), 1750–68.
- MOUGIN, C., DALSTEIN, V., PRÉTET, J., GAY, C., SCHAAL, J., AND RIETHMULLER, D. Epidémiologie des infections cervicales à papillomavirus. *Presse Med* 9 (2001), 3.
- MOUGIN, C., NICOLIERA, M., AND DECRION-BARTHODA, A. HPV et cancers : mécanismes de l'oncogenèse. *Rev Franco Lab* 405 (2008), 23–42.
- MOUNTS, P., SHAH, K. V., AND KASHIMAN, H. Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982), 5425–9.
- MOY, R., ELIEZRI, Y., NUOVO, G., ZITELLI, J., BENNETT, R., AND SILVERSTEIN, S. Human papillomavirus type 16 DNA in periungual squamous cell carcinomas. *JAMA* 261 (1989), 2669–73.

- MUNGER, K., WERNESSE, B., DYSON, N., PHELPS, W., HARLOW, E., AND HOWLEY, P. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 8 (1989), 4099–105.
- MUNOZ, M., CAMARGO, M., SOTO-DE LEON, S., SANCHEZ, R., PARRA, D., PINEDA, A., SUSSMANN, O., PEREZ-PRADOS, A., PATARROYO, M., AND PATARROYO, M. Human papillomavirus detection from human immunodeficiency virus-infected Colombian women's paired urine and cervical samples. *PLoS One* 8 (2013), e56509.
- MUNOZ, N., BOSCH, F., DE SANJOSÉ, S., HERRERO, R., CASTELLSAGUÉ, X., SHAH, K., SNIJDERS, P., MEIJER, C., AND FOR RESEARCH ON CANCER MULTICENTER CERVICAL CANCER STUDY GROUP, I. A. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348 (2003), 518–27.
- MURAKAMI, I., FUJII, T., DAN, K., SAITO, M., OHNO, A., IWATA, T., AND AOKI, D. Methylation of human papillomavirus-52 and -58 is a candidate biomarker in cervical neoplasia. *J Clin Virol* 58 (2013), 149–54.
- MURRAY, R., KURILLA, M., GRIFFIN, H., BROOKS, J., MACKETT, M., ARRAND, J., ROWE, M., BURROWS, S., MOSS, D., AND KIEFF, E. Human cytotoxic T cell responses against Epstein-Barr virus nuclear antigens demonstrated by using recombinant vaccinia viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), 2906–10.
- MÜNGER, K., BALDWIN, A., EDWARDS, K., HAYAKAWA, H., NGUYEN, C., OWENS, M., GRACE, M., AND HUH, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78 (2004), 11451–60.
- NAHER, H., GISSMANN, L., FREESE, U., PETZOLDT, D., AND HELFRIC, S. Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female genital tract : Indication for sexual transmission. *J Invest Dermatol* 98 (1992), 791–3.
- NAUCLER, P., RYD, W., TÖRNBERG, S., STRAND, A., WADELL, G., ELFGREN, K., RÅDBERG, T., STRANDER, B., FORSLUND, O., HANSSON, B., HAGMAR, B., JOHANSSON, B., RYLANDER, E., AND DILLNER, J. Efficacy of HPV DNA testing with cytology triage and/or repeat HPV DNA testing in primary cervical cancer screening. *J Natl Cancer Inst* 101 (2009), 88–99.
- NETO, C., AND VINSON, J. *Cranberry. In Herbal Medicine : Biomolecular and Clinical Aspects (Benzie, IFF and Wachtel-Galor, S Eds).* CRC Press, 2nd edition., 2011.
- NICHOLAS, J., RUVOLO, V., BURNS, W., SANDFORD, G., WAN, X., CIUFO, D., HENDRICKSON, S., GUO, H., HAYWARD, G., AND REITZ, M. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat Med* 3 (1997), 287–92.

- NICHOLLS, J., AGATHANGGELOU, A., FUNG, K., ZENG, X., AND NIEDOBITEK, G. The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol* 183 (1997), 164–8.
- NICHOLLS, P., AND STANLEY, M. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 73 (2000), 101–27.
- NINDL, I., LOTZ, B., KÜHNE-HEID, R., ENDISCH, U., AND SCHNEIDER, A. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 52 (1999), 17–22.
- NINDL, I., RINDFLEISCH, K., LOTZ, B., SCHNEIDER, A., AND M, D. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 82 (1999), 203–7.
- NOMINE, Y., MASSON, M., CHARBONNIER, S., ZANIER, K., RISTRIANI, T., DERYCKERE, F., SIBLER, A., DESPLANCQ, D., ATKINSON, R., WEISS, E., ORFANOUDAKIS, G., KIEFFER, B., AND TRAVE, G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein : insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol Cell* 21 (2006), 665–78.
- NYITRAY, A., LIN, H., FULP, W., CHANG, M., MENEZES, L., LU, B., ABRAHAMSEN, M., PAPENFUSS, M., GAGE, C., GALINDO, C., AND GIULIANO, A. The Role of Monogamy and Duration of Heterosexual Relationships in Human Papillomavirus Transmission. *J Infect Dis* 209 (2013), 1007–15.
- OGINO, T., MORIAI, S., AND ISHIDA, Y. Association of immunoescape mechanisms with Epstein-Barr infection in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 120 (2007), 2401–10.
- OHLENSCHLAGER, O., SEIBOTH, T., ZENGERLING, H., BRIESE, L., MARCHANKA, A., RAMACHANDRAN, R., BAUM, M., KORBAS, M., MEYER-KLAUCKE, W., DURST, M., AND GORLACH, M. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene* 25 (2006), 5953–9.
- O'LEARY, J., LANDERS, R., CROWLEY, M., HEALY, I., KEALY, W., HOGAN, J., CULLINANE, C KELEHAN, P., AND DOYLE, C. Genotypic mapping of HPV and assessment of EBV prevalence in endocervical lesions. *J Clin Pathol* 50 (1997), 904–10.
- O'LEARY, J., LANDERS, R., SILVA, I., UHLMANN, V., CROWLEY, M., HEALY, I., AND LUTTICH, K. Molecular analysis of ras oncogenes in CIN III and in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 51 (1998), 576–82.
- OMS. WHO consultation on human : papillomavirus vaccines. *Weekly epidemiological record* 80 (2005), 297–304.

- ORAZI, A., HROMAS, R., NEIMAN, R., GREINER, T., LEE, C., RUBIN, L., HASKINS, S., HEEREMA, N., GHARPURE, V., ABONOUR, R., SROUR, E., AND CORNETTA, K. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. *Am J Clin Pathol* 107 (1997), 419–29.
- PALLIER, C. Comment le virus d'Epstein-Barr parvient-il à échapper au système immunitaire de l'hôte. *Virology* 7 (2003), 470.
- PAN, H., AND GRIEP, A. Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* 9 (1995), 2157–69.
- PANG, M., LIN, K., AND PEH, S. The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell Mol Biol Lett* 14 (2009), 222–47.
- PARK, H., LEE, S., LEE, I., RYU, H., CHO, A., KANG, Y., HONG, S., KIM, S., SEONG, S., SHIN, S., AND KIM, T. Rate of vertical transmission of human papillomavirus from mothers to infants : relationship between infection rate and mode of delivery. *Virol J* 12 (2012), 9–80.
- PARK, J., BOYER, S., MITCHELL, K., GILFOR, D., BIRRER, M., DARLINGTON, G., EL DEIRY, W., FIRESTONE, G., MUNGER, K., BAND, V., FISHER, P., AND DENT, P. Expression of human papilloma virus E7 protein causes apoptosis and inhibits DNA synthesis in primary hepatocytes via increased expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6). *J Biol Chem* 275 (2000), 18–28.
- PARKIN, D., AND BRAY, F. Chapter 2 : The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 (2006), S3–S25.
- PATEL, D., HUANG, S., BAGLIA, L., AND McCANCE, D. The E6 protein of human papilloma-virus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J* 18 (1999), 5061–72.
- PATRICK, D., OLIFF, A., AND HEIMBROOK, D. Identification of a novel retinoblastoma gene product binding site on human papillomavirus type 16 E7 protein. *J Biol Chem* 269 (1994), 6842–50.
- PEGTEL, D., SUBRAMANIAN, A., SHEEN, T., TSAI, C., GOLUB, T., AND THORLEY-LAWSON, D. Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion : possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *J Virol* 79 (2005), 15430–42.

- PEITSARO, P., JOHANSSON, B., AND SYRJÄNEN, S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40 (2002), 886–91.
- PENG, R., MOSES, S., TAN, J., KREMMER, E., AND LING, P. The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol* 79 (2005), 4492–505.
- PEREIRA, R., HITZEROTH, I., AND RYBICKI, E. Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. *Arch Virol* 154 (2009), 187–97.
- PERSSON, M., BRISMAR WENDEL, S., LJUNGBLAD, L., JOHANSSON, B., WEIDERPASS, E., AND ANDERSSON, S. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA and L1 DNA as markers of residual/recurrent cervical intraepithelial neoplasia. *Oncol Rep* 28 (2012), 346–52.
- PETER, M., ROSTY, C., COUTURIER, J., RADVANYI, F., TESHIMA, H., AND SASTRE-GARAU, X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 25 (2006), 5985–93.
- PIYATHILAKE, C., MACALUSO, M., ALVAREZ, R., CHEN, M., BADIGA, S., EDBERG, J., PARTRIDGE, E., AND JOHANNING, G. A higher degree of methylation of the HPV 16 E6 gene is associated with a lower likelihood of being diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 117 (2011), 957–63.
- PORTARI, E., RUSSOMANO, F., DE CAMARGO, M., MACHADO GAYER, C., DA ROCHA GUILLOBEL, H., SANTOS-REBOUÇAS, C., AND BRITO MACEDO, J. Immunohistochemical expression of cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 correlates with the severity of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 32 (2013), 501–8.
- PRETET, J., DALSTEIN, V., MONNIER-BENOIT, S., DELPEUT, S., AND MOUGIN, C. High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women. *J Clin Virol* 31 (2004), 140–7.
- PRICE, A., CUMBERBATCH, M., KIMBER, I., AND AGER, A. Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration. *Adv Exp Med Biol* 417 (1997), 129–32.
- REITHMULLER, D., RAMANAH, R., PRETET, J., AND MOUGIN, J. Intégration du test HPV dans le dépistage primaire. *Gynecol Obstet Biol Reprod* 37S (2008), S139–S151.
- REITHMULLER, D., SCHAAL, J., AND MOUGIN, C. Epidémiologie et histoire naturelle de l'infection génitale à papillomavirus humain. *Gynecol Obstet Fertil* 30 (2002), 139–46.
- REMMERBACH, T., BRINCKMANN, U., HEMPRICH, A., CHEKOL, M., KÜHNDEL, K., AND LIEBERT, U. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa : comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 30 (2004), 302–8.



- RENSHAW, A. Rescreening in cervical cytology for quality control. *Clin Lab Med* 23 (2003), 695–708.
- RICKINSON, A., AND MOSS, D. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Ann Rev Immunol* 15 (1997), 405–31.
- RIETHMULLER, D., RAMANAH, R., PRETET, J., AND MOUGIN, C. Intégration du test HPV dans le dépistage primaire. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 37 (2008), S139–51.
- RISTRIANI, T., MASSON, M., NOMINE, Y., LAURENT, C., LEFEVRE, J., WEISS, E., AND TRAVE, G. HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions. *J Mol Biol* 296 (2000), 1189–203.
- ROBERTS, J., AND EKMAN, D. The reporting of anal cytology and histology samples : establishing terminology and criteria. *Sex Health* 9 (2012), 562–7.
- ROBINSON, C., STONE, A., SHIELDS, J., HUNTLEY, I., PATERSON, C., AND PRIME, S. Functional significance of MMP-2 and MMP-9 expression by human malignant oral keratinocyte cell lines. *Arch Oral Biol* 48 (2003), 779–86.
- RODEN, R., AND WU, T. How will HPV vaccines affect cervical cancer ? *Nat Rev Cancer* 6 (2006), 753–63.
- ROHRMANN, G. *Baculovirus infection : The cell cycle and apoptosis (Chapter 7)*, in *Baculovirus Molecular Biology*. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, Bethesda, 2013.
- ROMANCZUK, H., AND HOWLEY, P. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), 3159–63.
- ROMBALDI, R., SERAFINI, E., MANDELLI, J., ZIMMERMANN, E., AND LOSQUIAVO, K. Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Viol J* 5 (2008), 106.
- RONCO, G., SEGNAN, N., GIORGI-ROSSI, P., ZAPPA, M., CASADEI, G., CAROZZI, F., DALLA PALMA, P., DEL MISTRO, A., FOLICALDI, S., GILLIO-TOS, A., NARDO, G., NALDONI, C., SCHINCAGLIA, P., ZORZI, M., CONFORTINI, M., CUZICK, J., AND FOR CERVICAL CANCER WORKING GROUP, N. T. Human papillomavirus testing and liquid-based cytology : results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 98 (2006), 765–74.
- RONCO, L., KARPOVA, A., VIDAL, M., AND HOWLEY, P. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12 (1998), 2061–72.

- ROUSSEAU, A., BOHET, P., MERLIÈRE, J., TREPPOZ, H., HEULES-BERNIN, B., AND ANCELLE-PARK, R. Évaluation du dépistage organisé et du dépistage individuel du cancer du col de l'utérus : utilité des données de l'assurance maladie. *BEH* 19 (2002), 81–3.
- ROUSSEAU, M., FRANCO, E., VILLA, L., SOBRINHO, J., TERMINI, L., PRADO, J., AND ROHAN, T. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (2000), 469–76.
- SABOL, I., CRETNIK, M., HADZISEJDI, I., SI-MOHAMED, A., MATOVINA, M., GRAHOVAC, B., LEVANAT, S., AND GRCE, M. A new approach for the evaluation of the human papillomavirus type 16 variability with high resolution melting analysis. *J Virol Methods* 162 (2009), 142–7.
- SADOUKI, N., BOUDRICHE, A., KHENCHOUCHE, A., BANDOUI, D., HARROUZ, F., TIDADINI, D., DJENAOUI, T., DJEDIAT, B., KHIDRI, A., AYACHE, G., GRABA, A., AND BOUGUERMOUH, A. Prévalence des papillomavirus à haut risque (HPV-HR) dans le cancer du col : Etude en Algérie. *Arch Inst Pasteur Alger T* 67 (2010), 199–217.
- SADOUKI, N., BOUDRICHE, A., KHENCHOUCHE, A., BENYACOB, D., DJENAOUI, T., BOUDRICHE, H., BANDOUI, D., HARROUZ, F AND HAMLADJI, L., AYACHE, G., KEDDAD, N., AND BOUGUERMOUH, A. Détection des papillomavirus à haut risque dans les lésions précancéreuses du col en Algérie ; état des lieux et perspective. *Arch Inst Pasteur Alger T* 67 (2010), 53–82.
- SAHEBJAMEE, M., BOORGHANI, M., GHAFARI, S., ATARBASHIMOGHADAM, F., AND KEYHANI, A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 14 (2009), e525–8.
- SAINI, R., SANTHANAM, J., OTHMAN, N., SAINI, D., AND TANG, T. Single-tube seminested PCR assay for detecting human papillomavirus in clinical samples. *Open Microbiol J* 3 (2009), 106–12.
- SANKARARYANAN, R., GAFFILKIN, L., JACOB, M., SELLORS, J., AND ROBLES, S. A critical assessment of screening methods for cervical neoplasia. *Int. J. Gynaecol. Obstet Suppl.* 2 (2005), S4–S12.
- SASAGAWA, T., SHIMAKAGE, M., NAKAMURA, M., SAKAIKE, J., ISHIKAWA, H., AND AKI INOUE, M. Epstein-Barr Virus (EBV) Genes Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer : A Comparative Study With Human Papillomavirus (HPV) Infection. *Hum Pathol* 31 (2000), 318–26.

- SASLOW, D., SOLOMON, D., LAWSON, H., KILLACKEY, M., KULASINGAM, S., CAIN, J., GARCIA, F., MORIARTY, A., WAXMAN, I., WILBUR, D., WENTZENSEN, N., DOWNS, L., SPITZER, M., BARBARA MOSCICKI, A., FRANCO, ELAND STOLER, M., SCHIFFMAN, M., AND CASTLE, PEAND MYERS, E. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *J Lower Genit Tra Dis* 16 (2012), 1–29.
- SASTRE-GARAU, X., COUTURIER, J., FAVRE, M., AND ORTH, G. A recurrent human papillomavirus integration site at chromosome region 12q14-q15 in SW756 and SK-v cell lines derived from genital tumors. *C R Acad Sci III* 318 (1995), 475–8.
- SASTRE-GARAU, X., FAVRE, M., COUTURIER, J., AND ORTH, G. Distinct patterns of alteration of myc genes associated with integration of human papillomavirus type 16 or type 45 DNA in two genital tumours. *J Gen Virol* 81 (2000), 1983–93.
- SAUNIER, M., MONNIER-BENOIT, S., MAUNY, F., DALSTEIN, V., BRIOLAT, J., RIETHMULLER, D., KANTELIP, B., SCHWARZ, E., MOUGIN, C., AND PRÉTET, J. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 46 (2008), 3678–85.
- SAWAYA, G., AND GRIMES, D. New technologies in cervical cytology screening : a word of caution. *Obstet Gynecol* 94 (1999), 307–10.
- SCHAEFER, B., STROMINGER, J., AND SPECK, S. Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol* 17 (1997), 364–77.
- SCHEFFNER, M., HUIBREGTSE, J., VIERSTRA, R., AND HOWLEY, P. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75 (1993), 495–505.
- SCHEFFNER, M., WERNES, B., HUIBREGTSE, J., LEVINE, A., AND HOWLEY, P. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (1990), 1129–1136.
- SCHIFFMAN, M., CLIFFORD, G., AND BUONAGURO, F. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types : addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer* 4 (2009), 8.
- SCHIFFMAN, M., HERRERO, R., HILDESHEIM, A., SHERMAN, M., BRATTI, M., WACHOLDER, S., ALFARO, M., HUTCHINSON, M., MORALES, J., GREENBERG, M., AND AT, L. HPV DNA testing in cervical cancer screening : results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA* 283 (2000), 87–93.

- SCHLEGEL, R., WADE-GLASS, M., RABSON, M., AND YANG, Y. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science* 233 (1986), 464–7.
- SCHMITT, M., DEPUYDT, C., BENOY, I., BOGERS, J., ANTOINE, J., PAWLITA, M., ARBYN, M., AND STUDY GROUP, V. Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22 (2013), 406–14.
- SCHWAB, S., LI, K., AND KANG, C. Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science* 301 (2003), 1367–71.
- SELINKA, H., GIROGLOU, T., AND SAPP, M. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 299 (2002), 279–87.
- SELLORS, J., MAHONY, J., KACZOROWSKI, J., LYTWYN, A., BANGURA, H., AND CHONG, S. Prevalence and predictors of human papilloma virus infection in women in Ontario, Canada. *CMAJ* 163 (2000), 503–8.
- SEOUD, MA AND SEOUD, M., LINDSLY, S., AND ANIS, S. Human papillomavirus (HPV) burden of the disease in cervical cancer in the Extended Middle East and North Africa (EMENA). A comprehensive review. *J Clinical oncology* 27 (2009), a 16577.
- SHARP, T., RAINE, D., GEWERT, D., JOSHI, B., JAGUS, R., AND CLEMENS, M. Activation of the interferon-inducible (2'-5') oligoadenylate synthetase by the Epstein-Barr virus RNA, EBNA1. *Virology* 257 (1999), 303–13.
- SHEU, L., CHEN, A., MENG, C., HO, KC AND LEE, W., LEU, F., AND CHAO, C. Enhanced malignant progression of nasopharyngeal carcinoma cells mediated by the expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in vivo. *J Pathol* 180 (1996), 243–8.
- SHIRE, K., KAPOOR, P., JIANG, K., HING, M., SIVACHANDRAN, N., AND NGUYEN, T FRAPPIER, L. Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation. *J Virol* 80 (2006), 5261–72.
- SHUKLA, S., BHARTI, A., MAHATA, S., HUSSAIN, S., HEDAU, S., SHARMA, R., PILLAI, M., KRISHNA, S., CHIPLUNKAR, S., TONGAONKAR, H., AND DAS, B. Application of a multiplex PCR to cervical cells collected by a paper smear for the simultaneous detection of all mucosal human papillomaviruses (HPVs) and typing of high-risk HPV types 16 and 18. *J Med Microbiol* 59 (2010), 1303–10.
- SIEGEL, C., ANDREOTTI, R., CARDENES, H., BROWN, D., GAFFNEY, D., HOROWITZ, N., JAVITT, M., LEE, S., MITCHELL, D., MOORE, D., RAO, G., ROYAL, H., SMALL, W. J., VARIA, M., YA-

- SHAR, C., AND OF RADIOLOGY, A. C. ACR Appropriateness Criteria® pretreatment planning of invasive cancer of the cervix. *J Am Coll Radiol* 9 (2012), 395–402.
- SILVER, M., PAUL, P., SOWJANYA, P., RAMAKRISHNA, G., VEDANTHAM, H., KALPANA, B., SHAH, K., AND GRAVITT, P. Shedding of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus from the genital tract of women in a periurban community in Andhra Pradesh, India. *J Clin Microbiol* 49 (2011), 2435–9.
- SILVERBERG, M., THORSEN, P., LINDEBERG, H., GRANT, L., AND SHAH, K. Condyloma in pregnancy is strongly predictive of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 101 (2003), 645–52.
- SINCLAIR, A., PALMERO, I., PETERS, G., AND FARRELL, P. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J* 13 (1994), 3321–8.
- SINGER, A., AND JORDAN, J. *The functional anatomy of the cervix, the cervical epithelium and the stroma*. In *The cervix*, second edition ed. Blackwell Publishing Ltd, 2006.
- SIXBEY, J., DAVIS, D., YOUNG, L., HUTT-FLETCHER, L., TEDDER, T., AND RICKINSON, A. Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor. *J Gen Virol* 68 (1987), 805–11.
- SIXBEY, J., VESTERINEN, E., NEDRUD, J., RAAB-TRAUB, N., WALTON, L., AND PAGANO, J. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 306 (1983), 480–3.
- SOHLBERG, E., SAGHAFIAN-HEDENGREN, S., RASUL, E., MARCHINI, G., NILSSON, C., KLEIN, E., NAGY, N., AND SVERREMARK-EKSTRÖM, E. Cytomegalovirus-seropositive children show inhibition of in vitro EBV infection that is associated with CD8+CD57+ T cell enrichment and IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 191 (2013), 5669–76.
- SONG, H., MOSELEY, P., LOWE, S., AND OZBUN, M. Inducible heat shock protein 70 enhances HPV31 viral genome replication and virion production during the differentiation-dependent life cycle in human keratinocytes. *Virus Res* 147 (2010), 113–22.
- SPINDLER, K., LINDEBERG, J., NIELSEN, J., OLSEN, D., BISGÅRD, C., BRANDSLUND, I., AND JAKOBSEN, A. Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer : a comparison of methods. *Int J Oncol* 29 (2006), 1159–65.
- STANLEY, M., AND STERLING, J. Host responses to infection with human papillomavirus. *Curr Probl Dermatol* 45 (2014), 58–74.

- STEENBERGEN, R., KRAMER, D., BRAAKHUIS, B., STERN, P., VERHEIJEN, R., MEIJER, C., AND SNIJDERS, P. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 96 (2004), 294–305.
- STOLER, M., AND SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations . Realistic estimation from the ASCUS-LSIL Triage study. *JAMA* 285 (2001), 1500–5.
- STRANG, G., AND RICKINSON, A. In vitro expansion of Epstein-Barr virus-specific HLA-restricted cytotoxic T cells direct from the blood of infectious mononucleosis patients. *Immunology* 62 (1997), 647–54.
- STRAUSS, M., BUNTING, H., AND MELNICK, J. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. *J Invest Dermatol* 15 (1950), 433–43.
- STRAUSS, S., SASTRY, P., SONNEX, C., EDWARDS, S., AND GRAY, J. Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm Infect* 78 (2002), 135–8.
- STÜNKEL, W., AND BERNARD, H. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol* 73 (1999), 1918–30.
- SUN, C., REIMERS, L., AND BURK, R. Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol* 121 (2011), 59–63.
- SWINNEN, L. Overview of posttransplant B-cell lymphoproliferative disorders. *Semin Oncol* 26 (1999), 21–5.
- SYRJÄNEN, S., AND SYRJÄNEN, K. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* 31 (1999), 175–87.
- SZEKELY, L., SELIVANOVA, G., MAGNUSSON, K., KLEIN, G., AND WIMAN, K. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), 5455–9.
- TABRIZI, S., STEVENS, M., KHAN, Z., CHOW, C., DEVITT, M., AND GARLAND, S. Comparison of PapType to Digene Hybrid Capture 2, Roche linear array, and Amplicor for detection of high-risk human papillomavirus genotypes in women with previous abnormal pap smears. *J Clin Microbiol* 50 (2012), 2796–8.
- TANG, Z., SUN, F., TIAN, J., YE, S., LIU, Y., LIU, K., XUE, Q., CHEN, J., XIA, J., QIN, L., SUN, S., WANG, L., ZHOU, J., LI, Y., MA, Z., ZHOU, X., WU, Z., LIN, Z., AND YANG, B. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 7 (2001), 597–601.

- TANNER, J., WEI, M., AND ALFIERI, C. Antibody and antibody-dependent cellular cytotoxicity responses against the BamHI A rightward open-reading frame-1 protein of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated disorders. *J Infect Dis* 175 (1997), 38–46.
- TAYLOR, Y., MELVIN, W. T., SEWELL, H. F., FLANNELLY, G., AND WALKER, F. Prevalence of Epstein-Barr virus in the cervix. *J Clin Pathol* 47 (1994), 92–3.
- THEELEN, W., LITJENS, R., VINOKUROVA, S., HAESEVOETS, A., REIJANS, M., SIMONS, G., SMEDTS, F., HERRINGTON, C., RAMAEKERS, F., VON KNEBEL DOEBERITZ, M., SPEEL, E., AND HOPMAN, A. Human papillomavirus multiplex ligation-dependent probe amplification assay for the assessment of viral load, integration, and gain of telomerase-related genes in cervical malignancies. *Hum Pathol* 44 (2013), 2410–8.
- THOMAS, M., MASSIMI, P., JENKINS, J., AND BANKS, L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene* 10 (1995), 261–8.
- TOMKINSON, B., AND KIEFF, E. Second-site homologous recombination in Epstein-Barr virus : insertion of type 1 EBNA 3 genes in place of type 2 has no effect on in vitro infection. *J Virol* 66 (1992), 780–9.
- TOMKINSON, B., ROBERTSON, T., YALAMANCHILI, R., LONGNECKER, R., AND KIEFF, E. Epstein-Barr virus recombinants from overlapping cosmid fragments. *J Virol* 67 (1993), 7298–306.
- TORNESELLO, M., BUONAGURO, L., GIORGI-ROSSI, P., AND BUONAGURO, F. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Biomed Res Int* 2013 (2013), 519619.
- TSAL, T., AND CHEN, S. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 148 (2003), 1445–53.
- TSURUMI, T., FUJITA, M., AND KUDOH, A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15 (2005), 3–15.
- USTAV, M., USTAV, E., SZYMANSKI, P., AND STENLUND, A. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* 10 (1991), 4321–9.
- VAN DOORSLAER, K., BERNARD, H., CHEN, Z., DE VILLIERS, E., ZUR HAUSEN, AND H, BURK, R. Papillomaviruses : Evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trends Microbiol* 19 (2011), 49–50.

- VAN RANST, M., TACHEZY, R., AND PRUSS, J ANDX BURK, R. Primary structure of the E6 protein of *Micromys minutus* papillomavirus and *Mastomys natalensis* papillomavirus. *Nucleic Acids Res* 20 (1992), 2889.
- VANDERMARK, E., DELUCA, K., GARDNER, C., MARKER, D., SCHREINER, C., STRICKLAND, D., WILTON, K., MONDAL, S., AND WOODWORTH, C. Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- $\kappa$ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- $\kappa$ B promotes cell growth and immortalization. *Virology* 425 (2012), 53–60.
- VELDMAN, T., LIU, XAND YUAN, H., AND SCHLEGEL, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *PNAS* 100 (2003), 8211–6.
- VINOKUROVA, S., WENTZENSEN, N., AND VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Analysis of p16INK4a and integrated HPV genomes as progression markers. *Methods Mol Med* 119 (2005), 73–83.
- VON KNEBEL, D. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 38 (2002), 2229–42.
- VOOG, E. Genital viral infections. Studies on human papillomavirus and Epstein-Barr virus. *Acta Derm Venereol* 198 (1996), 1–55.
- VOOG, E., RICKSTEN, A., STENGLEIN, M., JONASSEN, F., TERNESTEN, A., RYD, W., AND LOWHAGEN, G. Are acetowhite lesions of the cervix correlated to the presence of Epstein-Barr virus DNA? *Int J STD AIDS* 8 (1997), 432–6.
- WADE, M., AND ALLDAY, M. Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. *Mol Cell Biol* 20 (2000), 1344–60.
- WAKIGUCHI, H., FUJIEDA, M., MATSUMOTO, K., OHARA, Y., WAKIGUCHI, A., AND KURASHIGE, T. Defective immune response to Epstein-Barr virus in patients with acute lymphocytic leukemia. *Acta Paediatr Jpn* 31 (1989), 144–9.
- WALBOOMERS, J., JACOBS, M., MANOS, M., BOSCH, F., KUMMER, J., SHAH, K., SNIJDERS, P., PETO, J., MEIJER, C., AND MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189 (1999), 12–9.
- WANG, L., DAI, S., CHU, H., CUI, H., AND XU, X. Integration sites and genotype distributions of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. *Asian Pac J Cancer Prev* 14 (2013), 3837–41.
- WANRAM, S., LIMPAIBOON, T., LEELAYUWAT, C., YUENYAO, P., GUINEY, D., LULITANOND, V., AND JEARANAICON, P. The use of viral load as a surrogate marker in predicting disease



- progression for patients with early invasive cervical cancer with integrated human papillomavirus type 16. *Am J Obstet Gynecol* 201 (2009), 79 e1–7.
- WENTZENSEN, N., VINOKUROVA, S., AND VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64 (2004), 3878–84.
- WILLIAMS, H., MCAULAY, K., MACSWEEN, K., GALLACHER, N., HIGGINS, C., HARRISON, N., SWERDLOW, A., AND CRAWFORD, D. The immune response to primary EBV infection : a role for natural killer cells. *British Journal of Haematology* 129 (2005), 266–74.
- WILSON, J., BELL, J., AND LEVINE, A. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J* 15 (1996), 3117–26.
- WINBERG, G., MATSKOVA, L., CHEN, F., PLANT, P., ROTIN, D., GISH, G., INGHAM, R ERNBERG, I., AND PAWSON, T. Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 20 (2000), 8526–35.
- WINER, R., HUGHES, J., FENG, Q., XI, L., LEE, S., O'REILLY, S., KIVIAT, N., AND KOUTSKY, L. Prevalence and risk factors for oncogenic human papillomavirus infections in high-risk mid-adult women. *Sex Transm Dis* 39 (2012), 848–56.
- WINER, R., LEE, S., HUGHES, J., ADAM, D., KIVIAT, N., AND KOUTSKY, L. Genital human papillomavirus infection : incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* 157 (2003), 218–26.
- WINER, R., XI, L., SHEN, Z., STERN, J., NEWMAN, L., FENG, Q., HUGHES, J., AND KOUTSKY, L. Viral load and short-term natural history of type-specific oncogenic human papillomavirus infections in a high-risk cohort of midadult women. *Int J Cancer* 134 (2014), 1889–98.
- WOLFGANG, A., AND FARRELL, P. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15 (2005), 149–56.
- WU, H., KAPOOR, P., AND FRAPPIER, L. Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol* 76 (2002), 2480–90.
- XI, L., KIVIAT, N., HILDESHEIM, A., GALLOWAY, D., WHEELER, C., HO, J., AND KOUTSKY, L. Human papillomavirus type 16 and 18 variants : race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* 98 (2006), 1045–52.

- XU, B., CHOTEWUTMONTRI, S., WOLF, S., KLOS, U., SCHMITZ, M., DUÜRST, M., AND SCHWARZ, E. Multiplex Identification of Human Papillomavirus 16 DNA Integration Sites in Cervical Carcinomas. *PLOS One* 8 (2013), e66693.
- YAMADA, T., MANOS, M., PETO, J., GREER, C., MUNOZ, N., BOSCH, F., AND WHEELER, C. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers : a worldwide perspective. *J Virol* 71 (1997), 2463–72.
- YAMAMOTO, N., TAKIZAWA, T., IWANAGA, Y., SHIMIZU, N., AND YAMAMOTO, N. Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett* 484 (2000), 153–8.
- YAO, G., ROWE, M., MORGAN, A., SAM, C., PRASAD, U., DANG, H., ZENG, Y., AND RICKINSON, A. Salivary and serum IgA antibodies to the Epstein-Barr virus glycoprotein gp340 : incidence and potential for virus neutralization. *Int J Cancer* 48 (1991), 45–50.
- YIN, Y., MANOURY, B., AND FAHRAEUS, R. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr Virus-encoded EBNA-1. *Science* 301 (2003), 1371–4.
- YOON, C., KIM, K., PARK, S., AND CHEONG, S.  $\alpha(6)$  Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun* 283 (2001), 668–73.
- YOUNG, L. *Epstein-Barr Virus : General Features*. In : *Encyclopedia of Virology*. Oxford Academic Press, 2008.
- YOUNG, L., DAWSON, C., BROWN, K., AND RICKINSON, A. Identification of a human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes. *Int J Cancer* 43 (1989), 786–94.
- YOUNG, L., DAWSON, C., AND ELIOPOULOS, A. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* 53 (2000), 238–47.
- YOUNG, L., AND RICKINSON, A. Epstein-Barr virus : 40 years on. *Nature Reviews Cancer* 4 (2004), 757–68.
- YOUNG, L., AND SIXBEY, J. Epstein-Barr virus and epithelial cells : a possible role for the virus in the development of cervical carcinoma. *Cancer Surv* 7 (1988), 507–18.
- YUE, W., SHACKELFORD, J., AND PAGANO, J. cdc2/cyclin B1-dependent phosphorylation of EBNA2 at Ser243 regulates its function in mitosis. *J Virol* 80 (2006), 2045–50.
- ZENG, X., XIONG, P., WANG, F., LI, C., YAO, J., AND GUO, Y. Passive Smoking and Cervical Cancer Risk : A Meta-analysis Based on 3,230 Cases and 2,982 Controls. *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (2012), 2687–94.

- ZHANG, B., SRIRANGAM, A., POTTER, D., AND ROMAN, A. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene* 24 (2005), 2585–8.
- ZHANG, J., CHEN, H., WEINMASTER, G., AND HAYWARD, S. Epstein-Barr virus BamHI-a rightward transcript-encoded RPMS protein interacts with the CBF1-associated corepressor CIR to negatively regulate the activity of EBNA2 and NotchIC. *J Virol* 75 (2001), 2946–56.
- ZHAO, M., ROSENBAUM, E., CARVALHO, A., KOCH, W., JIANG, W., SIDRANSKY, D., AND CALIFANO, J. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer* 117 (2005), 605–10.
- ZHAO, W., NOYA, F., CHEN, W., TOWNES, T., CHOW, L., AND BROKER, T. Trichostatin a up-regulates human papillomavirus type 11 upstream regulatory region-E6 promoter activity in undifferentiated primary human keratinocytes. *J Virol* 73 (1999), 5026–33.
- ZIMMER-STROBL, U., AND STROBL, L. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* 11 (2001), 423–34.
- ZUR HAUSEN, A., BRINK, A., CRAANEN, M., MIDDELDORP, J., MEIJER, C., AND VAN DEN BRULE, A. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinoma : expression of the transforming BARF-1 gene. *Cancer Res* 60 (2000), 2745–8.
- ZUR HAUSEN, H., MEINHOF, W., SCHEIBER, W., AND BORNKAMM, G. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13 (1974), 650–6.