

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANÇON  
Année Universitaire 2006 - 2007

**THESE**

Pour l'obtention  
du diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté  
**Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé**

Présentée et soutenue publiquement le  
30 mai 2007, par  
Sylvain MONNIER-BENOIT  
Né le 18 décembre 1977 à Besançon (Doubs)

**Statut viral et Immunité muqueuse :  
des marqueurs prédictifs de l'histoire naturelle des lésions cervicales  
associées aux HPV**

**Composition du jury :**

Directeur du thèse :	Dr. Jean-Luc PRÉTET	Université de Franche-Comté (Besançon)
Rapporteurs :	Pr. Philippe BIREMBAUT	Université de Champagne-Ardenne (Reims)
	Dr. Antoine TOUZÉ	Université François-Rabelais (Tours)
Examineurs :	Pr. Estelle SEILLÈS	Université de Franche-Comté (Besançon)
	Pr. Didier RIETHMULLER	Gynécologie Obstétrique (CHU Besançon)
	Dr. Yann LEOCMACH	SANOFI-PASTEUR MSD (Lyon)



## Résumé

Le cancer du col de l'utérus demeure un problème majeur de santé publique, car il est le second cancer féminin au monde. Ce sont des virus, les papillomavirus humains (HPV) – et en particulier ceux appartenant aux génotypes à haut risque – qui sont responsables de l'apparition des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin. Depuis la fin des années 80, le développement de la biologie moléculaire a permis la détection et l'étude de ce virus, apportant une approche supplémentaire dans la prévention de cette pathologie. La détection de cette infection à l'aide de tests validés cliniquement, est une méthode plus sensible et plus reproductible que la cytologie cervico-utérine dans le cadre du dépistage. Si la présence du virus est nécessaire, elle n'est pas suffisante au développement d'un cancer, et de nombreux facteurs liés à l'environnement, à l'hôte ou au virus vont influencer la persistance d'HPV au sein de la cellule. De ce fait, l'histoire naturelle de l'infection est aujourd'hui encore décrite de façon limitée et les relations entre l'hôte et le pathogène ne sont pas clairement comprises et c'est dans ce contexte que mon travail de thèse s'inscrit.

Nous avons montré la nécessité de la validation des performances d'un test de détection des HPV afin de proposer un outil supplémentaire pour le dépistage des lésions cervicales précancéreuses. Nous avons ensuite étudié des facteurs viraux influençant la persistance de l'infection. Après le développement de technique de quantification de l'HPV16 par PCR en temps réel, nous avons confirmé que le test de routine Hybrid Capture® II fournissait des résultats pouvant être considéré comme quantitatifs. Par ailleurs, nous avons défini une valeur seuil de charge virale HPV16 de 200 copies pour 1 000 cellules comme étant cliniquement relevante, et nous avons aussi montré que l'évolution de la charge virale entre deux points de suivi pouvait constituer un élément prédictif de l'apparition des lésions précurseurs. Ces résultats nous ont permis de caractériser les infections relevantes des infections non relevantes sans pour autant connaître à quel instant de l'histoire naturelle de la pathologie se trouvaient les patientes. Nous avons montré aussi que le taux d'intégration du génome d'HPV16 dans celui de la cellule hôte constitue un marqueur de malignité de la lésion, car une augmentation de ce taux est observée avec l'augmentation du grade des lésions. De plus, des profils de taux d'intégration en fonction de la charge virale sont caractéristiques des lésions, ce qui semble montrer le lien entre ces deux facteurs et que de fortes CV pourraient induire une plus forte probabilité d'intégration. Le facteur immunitaire s'avère déterminant dans l'évolution de ces infections, et nous avons montré qu'une accumulation de cellules immunitaires de type CD4+ accompagne la régression des lésions. Inversement, la diminution du ratio CD4+/CD8+ pourrait constituer un marqueur de mauvais pronostic. Ces résultats suggèrent une défaillance probable de la réponse cellulaire dans les cancers. En revanche, l'induction d'une réponse humorale par la vaccination prophylactique anti-HPV est efficace contre le développement des lésions précurseurs, et nous avons montré qu'un vaccin dirigé contre les types 16 et 18 pourrait cibler près de 70% des lésions précurseurs et de plus de 80% des cancers en France.

La mise en évidence et l'étude de ces facteurs restent actuellement les meilleurs moyens de comprendre cette pathologie complexe qu'est le cancer du col de l'utérus, et d'améliorer ainsi la prise en charge des patientes qui échapperont à la vaccination prophylactique.

## Abstract

Cervical cancer remains a major problem of public health, because it is the second female cancer. Human papillomavirus (HPV) – and in particular from high risk genotypes - are responsible for the appearance of the precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. Since the end of the Eighties, the development of molecular biology allowed the detection and the study of these viruses, providing an additional approach for the prevention of this pathology. Detection of this infection with clinically valid test is a more sensitive and a more reproducible method than cytology for the screening. If HPV are necessary, they are not sufficient to induce cervical cancer development, and many factors related to the environment, the host or the virus will influence the persistence of HPV infection. So the natural history of the infection is still today described in a limited way and the relations between the host and the pathogenic are not clearly understood, and it is in this context that my PhD is registered.

We showed the necessity to validate performances of an HPV detection test in order to propose an additional tool for the screening of cervical precancerous lesions. Using adapted methodologies, we studied viral factors influencing persistence of the infection. We defined a HPV16 viral load threshold value of 200 copies for 1 000 cells and we showed this value was clinically relevant. Moreover, the viral load evolution between two points of follow-up could constitute a predictive factor for the appearance of precursor lesions. These results enabled us to characterize relevant and no relevant infections. We also showed that the viral genome integration percentage constitutes a marker of malignity. Indeed, an increase in this rate is linked to the grade of the lesion. Moreover, profiles of integration percentage according to the viral load are characteristics of the lesions, and seem to show the link between these two factors. Thus, we hypothesized that high viral loads could induce a stronger probability of integration. The immune response proves to be determining for the infection evolution, and we showed an accumulation of CD4+ immune cells accompanying lesions with a potential of regression. Conversely, the decrease of the CD4+/CD8+ ratio could constitute a bad prognostic marker. These results suggest a probable failure of the cellular immune response in cancers. On the other hand, the induction of a humoral response by anti-HPV prophylactic vaccination is efficient against the development of the precursor lesions, and we showed that a vaccine directed against types 16 and 18 could target near 70% of precursors lesions and more than 80% of cancers in France.

The description and the study of these factors remain currently the best means of understanding this complex pathology, and improving the management of the patients who will escape prophylactic vaccination.

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe d'accueil EA3181 « Carcinogenèse Epithéliale ; Facteurs Prédicatifs et Pronostiques » (Université de Franche-Comté et IFR133 « Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire ») dirigée par le Professeur Christiane Mougin. Je la remercie vivement pour m'avoir fait confiance et donné la chance de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions. Merci de m'avoir si bien encadré et formé, ainsi que d'avoir toujours si justement su me re-motiver quand cela était nécessaire.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Jean-Luc Prétet, pour m'avoir accueilli, formé et dirigé, pour avoir toujours été présent dans les bons et les moins bons moments rythmant ces années. Je tiens à lui présenter mon respect et ma gratitude pour m'avoir permis de développer mon esprit critique et constructif, et pour m'avoir transmis une partie de son immense passion pour la science.

Parce que ce travail n'aurait jamais pu être réalisé sans eux, je souhaite exprimer mes profonds remerciements au Pr. Estelle Seillès qui m'a dirigé et conseillé en ce qui concerne les aspects immunitaires de ce travail, et au Pr. Didier Riethmuller pour avoir permis l'accès au service de gynécologie-obstétrique du CHU de Besançon nécessaire à la mise en place des études cliniques.

Pour la lecture, l'analyse et la critique de ce travail, je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à  
Monsieur le Professeur Philippe Birembaut, rapporteur  
Monsieur le Docteur Antoine Touzé, rapporteur  
Monsieur le Docteur Yann Leocmach, examinateur

Je remercie toutes les personnes (personnel et étudiants) de l'EA 3181, du bâtiment IBCT et de l'UF de Biologie Cellulaire et Moléculaire (CHU), qui m'ont aidé et supporté durant ces années.

Et notamment Sylvianne (pour toutes les techniques que tu m'as enseignées et pour tes excellents plats !), Sabeha, Laurence, Evelyne, Maëlle (tu prends la suite...), LingZhao, Véronique, Claudine (technicienne « de pointe(s) » puis Madame « 'ingénieur h&s » des Hauts de Chazal, tu as fini par devoir me supporter, après m'avoir si longtemps martyrisé !).

Je salue particulièrement Jeff/Goran, Jean-Seb et Zélie pour avoir partagé ensemble le même bureau et mes humeurs !

Salut à toi, Zohair ! Mes « Goldorak » du hand vont te manquer, j'en suis sûr !

Enfin, un immense Merci aux personnes qui partagent ma vie, Coralie, Aloïs, Victoire et Timothée ; ainsi qu'à mes parents et mes frères.

Cette thèse, c'est aussi grâce à vous...



# SOMMAIRE

<b>I. PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE.....</b>	<b>9</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>11</b>
<b>1. PAPILLOMAVIRUS HUMAINS ET LESIONS DU COL DE L'UTERUS .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. PRESENTATION DES HPV .....</b>	<b>13</b>
1.1.1. Diversité génétique des HPV .....	13
1.1.2. Tropisme des HPV et tissus cibles .....	14
1.1.3. Organisation structurale et génomique des HPV .....	14
1.1.4. Entrée dans la cellule et le cycle viral .....	16
1.1.5. Intégration et carcinogenèse des HPV HR .....	19
1.1.5.1. Intégration du génome viral.....	19
1.1.5.2. Propriétés d'immortalisation et de transformation des protéines E6 et E7 .....	20
<b>1.2. CAUSALITE ENTRE INFECTION PAR UN HPV ET CANCER DU COL DE L'UTERUS .....</b>	<b>24</b>
1.2.1. Causalité.....	24
1.2.2. Epidémiologie .....	24
1.2.3. Facteurs de risque .....	27
<b>1.3. PATHOLOGIES DU COL UTERIN ASSOCIEES AUX HPV .....</b>	<b>28</b>
1.3.1. Col de l'utérus, description anatomo-histologique .....	28
1.3.2. Lésions HPV induites du col utérin .....	29
1.3.3. Contamination et transmission.....	30
1.3.3.1. Comportements sexuels à risque.....	30
1.3.3.2. Rôle du partenaire masculin .....	31
1.3.3.3. Transmission verticale mère/fœtus .....	31
1.3.4. Histoire naturelle et détection des lésions associées à HPV .....	32
1.3.4.1. Détection des lésions.....	33
1.3.4.2. Histoire naturelle des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin, induites par HPV .....	35
<b>1.4. DETECTION DES HPV.....</b>	<b>37</b>
1.4.1. Hybridation <i>in situ</i> .....	37
1.4.2. Techniques de PCR conventionnelles .....	38
1.4.2.1. Couples d'amorces spécifiques .....	38
1.4.2.2. Couples d'amorces consensus .....	39
1.4.3. Génotypage .....	40
1.4.4. PCR quantitative en temps réel : détermination d'une charge virale HPV .....	41
1.4.4.1. Principes de la PCR en temps réel .....	41
1.4.4.2. Stratégies de quantification.....	42
1.4.4.3. Sondes fluorescentes utilisées en PCR temps réel .....	44
1.4.5. Technique d'hybridation en phase liquide : le test Hybrid Capture® II (Digene).....	48
1.4.6. Apport de la détection des HPV dans le dépistage.....	49

1.4.6.1. Dépistage primaire .....	50
1.4.6.2. Triage secondaire .....	52
1.4.6.3. Suivi post-traitement .....	53
<b>2. FACTEURS VIRAUX INFLUENÇANT L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS ASSOCIÉES AUX HPV .....</b>	<b>55</b>
<b>2.1. PERSISTANCE ET CLAIRANCE DE L'INFECTION HPV .....</b>	<b>55</b>
<b>2.2. GENOTYPES D'HPV ET VARIANTS .....</b>	<b>56</b>
2.2.1. Distribution des génotypes d'HPV dans les cancers invasifs .....	56
2.2.2. Distribution des génotypes d'HPV dans les HGSIL .....	57
2.2.3. Distribution des génotypes d'HPV dans les LGSIL .....	58
2.2.4. Distribution des génotypes d'HPV dans les ASCUS .....	58
2.2.5. Distribution des génotypes d'HPV dans les cytologies normales .....	59
2.2.6. Génotypes d'HPV et risque de développer des lésions .....	59
2.2.7. Cas des infections multiples .....	60
2.2.8. Variants HPV .....	60
<b>2.3. CHARGE VIRALE.....</b>	<b>61</b>
2.3.1 Aspects semi quantitatif et quantitatif de la charge virale (CV) .....	61
2.3.2. Apport de la PCR en temps réel dans la mesure de la charge virale.....	63
2.3.3. Applications de la mesure de la charge virale.....	64
<b>2.4. INTÉGRATION VIRALE .....</b>	<b>65</b>
2.4.1. Premières approches de l'étude de l'intégration virale .....	65
2.4.2. Apport de la PCR en temps réel dans la mesure de l'intégration virale .....	68
2.4.3. Intégration virale et quantification des ARNm.....	69
<b>3. IMMUNITÉ MUQUEUSE DANS LES INFECTIONS ET LÉSIONS ASSOCIÉES AUX HPV.....</b>	<b>71</b>
<b>3.1. ÉTAT IMMUNITAIRE ET INFECTION HPV .....</b>	<b>71</b>
<b>3.2. INITIATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE .....</b>	<b>72</b>
3.2.1. Système Immunitaire Commun des Muqueuses (SICM) .....	72
3.2.2. Système inducteur de la réponse immunitaire .....	73
3.2.3. Sécrétions des muqueuses du tractus génital .....	74
3.2.4. Coopération cellulaire et initiation de la réponse immunitaire muqueuse .....	74
<b>3.3. RÉPONSE IMMUNITAIRE COMME MARQUEUR D'ÉVOLUTION DES LÉSIONS .....</b>	<b>76</b>
3.3.1. Immunité périphérique humorale .....	76
3.3.2. Immunité périphérique cellulaire .....	78
3.3.3. Immunité locale humorale.....	79
3.3.4. Immunité locale cellulaire.....	80
<b>4. OBJECTIFS.....</b>	<b>82</b>
 <b>II. DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS .....</b>	<b>83</b>



1. PERFORMANCES D'UN TEST DE DETECTION DES HPV : LE TEST ROCHE AMPLICOR® HPV	
MWP .....	85
2. COMPARAISON DES VALEURS DE CHARGE VIRALE HPV MESUREES PAR HCII® ET PCR EN	
TEMPS REEL.....	91
3. EVOLUTION DE LA CHARGE VIRALE HPV16 AU COURS DE L'HISTOIRE NATURELLE DES LESIONS	
DU COL UTERIN .....	103
4. INTEGRATION D'HPV16 DANS LES LESIONS DU COL UTERIN.....	115
5. PROFILS IMMUNITAIRES EN FONCTION DU POTENTIEL EVOLUTIF DES LESIONS .....	121
6. DISTRIBUTION DES HPV DANS LES HGSIL EN FRANCE .....	135
 III. TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION .....	155
 LA VALIDATION D'AMPLICOR® .....	158
LA CHARGE VIRALE.....	159
L'INTEGRATION VIRALE.....	164
L'IMMUNITE CELLULAIRE LOCALE .....	167
LA VACCINATION ANTI-HPV .....	170
CONCLUSION .....	172
 IV. BIBLIOGRAPHIE .....	175
 V. ANNEXES.....	215

## FIGURES

<b>Figure 1.</b> Organisation génomique des HPV .....	15
<b>Figure 2.</b> Intégration des hpv à haut risque et mécanismes d'immortalisation et de transformation.....	19
<b>Figure 3.</b> Interactions des protéines E7 et E6 des HPV HR avec les protéines régulant le cycle cellulaire .....	23
<b>Figure 4.</b> Incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde .....	26
<b>Figure 5.</b> Incidence et mortalité du cancer du col de l'utérus en France.....	27
<b>Figure 6.</b> Représentation schématique et histologie de la zone de jonction pavimento-cylindrique .....	29
<b>Figure 7.</b> Classification cytologique de Bethesda (2001) et classification histologique de Richart (1973) .....	35
<b>Figure 8.</b> Histoire naturelle de l'infection HPV et des lésions cervicales précancéreuses et cancéreuses .....	37
<b>Figure 9.</b> Représentation graphique de la PCR en temps réel .....	43
<b>Figure 10.</b> Principe du quenching par FRET.....	46
<b>Figure 11.</b> Le principe des sondes d'hydrolyse TaqMan™.....	47
<b>Figure 12.</b> Fréquence des génotypes d'HPV retrouvés dans les cancers du col de l'utérus au niveau mondial ...	57
<b>Figure 13.</b> Le Système Immunitaire Commun des Muqueuses (SICM).....	73
<b>Figure 14.</b> Réponse immunitaire Th1 / Th2 .....	76
<b>Figure 15.</b> Taux d'intégrations expérimentaux en fonction des taux d'intégrations théoriques .....	117
<b>Figure 16.</b> Charge virale en fonction du diagnostic cytologique.....	118
<b>Figure 17.</b> Distribution des formes du génome d'HPV16 (formes intégrées seules, épisomales seules ou mixtes) en fonction des anomalies cytologiques .....	118
<b>Figure 18.</b> Taux d'intégration en fonction du grade des lésions.....	119
<b>Figure 19.</b> Distribution de la charge virale en fonction du taux d'intégration, pour chaque prélèvement provenant d'échantillons normaux ou avec des anomalies cytologiques .....	119
<b>Figure 20.</b> Histoire naturelle de l'infection par HPV et des lésions génitales associées .....	173

## TABLES

<b>Table 1.</b> Comparaisons des performances cliniques de la cytologie et de la détection d'HPV .....	50
<b>Table 2.</b> Comparaison des résultats obtenus avec le test AMPLICOR® et le test HCII® pour la détection d'HPV HR dans 470 échantillons de cytologie liquide .....	87
<b>Table 3.</b> Echantillons présentant des résultats discordants entre le test AMPLICOR® et le test HCII® .....	88
<b>Table 4.</b> Comparaison des performances (sensibilité et spécificité analytiques) des tests AMPLICOR® et HCII® .....	88

## ABREVIATIONS

### A.

ADC : « ADenoCarcinoma » ou ADénoCarcinome  
 AIS : Adénocarcinome *In Situ*  
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
 AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des  
 Produits de la Santé  
 ALTS : Ascus/Lgsil Triage Study  
 AMPLICOR® : « AMPLICOR® HPV MWP Test »  
 ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d' Evaluation  
 en Santé  
 AP1 : « Activator Protein 1 »  
 Arf : « ADP-ribosylation factor »  
 ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
 ASC : « Atypia of Squamous Cells »  
 ASC-H : ASC ne pouvant exclure une HGSIL  
 ASC-US : « ASC-Unknown Significance »

### B.

BALT : « Bronchus Associated Lymphoid Tissue »  
 BHQ™ : « Black Hole Quencher™ »  
 BPV : « Bovine PapillomaVirus »

### C.

CD : « Cluster of Differentiation »  
 CDK : « Cyclin Dependent Kinase »  
 CFS : « Common Fragile Sites »  
 CIN : « Cervical Intraepithelial Neoplasia »  
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
 CMSP : Cellules Mononuclées du Sang Périphérique  
 CoPV : « Canine orale PapillomaVirus »  
 Cp : « Crossing Point »  
 CPA : Cellules Présentatrices d'Antigène  
 CR : « Conserved Region »  
 CRPV : « Cottontail Rabbit PapillomaVirus »  
 Ct : « threshold Cycle »  
 CV : Charge Virale

### D.

dUTP : désoxyUracile Tri Phosphate  
 dNTP : désoxyNucléosides Tri Phosphate

### E.

E6AP : « E6-Associated Protein »  
 E.D.I.T.H : Etude de la DisTribution des génotypes d'HPV  
 dans les HGSIL et les cancers du col de l'utérus en  
 France  
 EGF : « Epidermal Growth Factor »  
 EIA : « Enzyme-Linked Immunoassay »  
 ELISA : « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »  
 EUROGIN : « European Research Organization on  
 Genital Infection and Neoplasia »

### F.

FDA : « Food and Drug Administration »  
 FISH : « Fluorescente *In Situ* Hybridization »  
 FRET : « Fluorescence Resonance Energy Transfert »

### G.

GAG : GlycosAminoGlycane  
 GALT : « Gut Associated Lymphoid Tissue »  
 GAPDH : GlycerAldéhyde-3-Phosphate DesHydrogénase

### H.

HCI® : « Hybrid Capture® II Test »  
 HGSIL : « High Grade Squamous Intrepthelial Lesion »  
 HIS : Hybridation *in situ*  
 HLA : « Human Leucocyte Antigen »  
 HPV : « Human PapillomaVirus »  
 HPV BR : HPV à Bas Risque  
 HPV HR : HPV à Haut Risque  
 HRP : HorseRadish Peroxidase  
 hTERT : « human TElomerase Reverse Transcriptase »  
 H RTP : Hypoxanthine RibosylTransférase Phosphate

### I.

IARC : « International Agency for Research on Cancer »  
 IgA : Immunoglobuline A  
 IgA-S : Immunoglobuline A sécrétoire  
 IgG : Immunoglobuline G  
 IgE : Immunoglobuline E  
 IL- : InterLeukine-  
 INF $\gamma$  : Interféron $\gamma$   
 InVS : Institut de Veille Sanitaire  
 IST : Infection Sexuellement Transmissible

**L.**

LB : Lymphocyte B

LCR : « Long Control Region »

LGSIL : « Low Grade Squamous Intreepithelial Lesion »

LIEBG : Lésions Intraépithéliales Epidermoïdes de Bas Grade

LIEHG : Lésions Intraépithéliales Epidermoïdes de Haut Grade

LTC = Lymphocyte T Cytotoxique

**M.**

MALT : « Mucosal-Associated Lymphoid Tissue »

mdm2 : « Mouse Double Minute-2 »

MGB : « Minor Groove Binder »

MIP : « Macrophage Inflammatory Protein »

MST : Maladie Sexuellement Transmissible

**N.**

NALT : « Nasal Associated Lymphoid Tissue »

NBT/BCIP : Bromo Chloro IndolylPhosphate et NitroBlue Tetrazolium

NF1 : « NeuroFibromin 1 »

NK : « Natural Killer »

**O.**

OCT1 : « Organic Cation Transporter 1 »

**P.**

PA : Phosphatase Alcaline

Pap : Papanicolaou

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

PDGF : « Platelet Derived Growth Factor »

PNA : « Peptide Nucleic Acids »

POL : Phase Ouverte de Lecture

pRb : « RetinoBlastoma tumor suppressor Protein »

**R.**

RFLP : « Restriction Fragment Length Polymorphism »

RFU : « Relative Fluorescence Unit »

RLB : « Reverse Line Blotting »

RLU : « Relative Light Unit »

RT-PCR : « Reverse Transcriptase-PCR »

**S.**

SCC : « Squamous-Cell Carcinoma »

SFCPCV : Société Française de Colposcopie et de Pathologie Cervico-Vaginale

SSCP : « Single-Stranded Conformation Polymorphism »

SICM : Système Immunitaire Commun des Muqueuses

STM : « Specific Transport medium »

**T.**

TAG : grade de transformations atypiques

TAP : « Transporter Association Protein »

TBP : « Tata box Binding Protein »

TGF $\beta$  : « Tumor Growth Factor  $\beta$  »

Th1 : T helper 1

Th2 : T helper 2

TIL : « Tumor Infiltrating Lymphocyte »

Tm : « melting Temperature »

TMB : TetraMethylBenzidine

TNF $\alpha$  : « Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  »

**U.**

UNG : « Uracyl-N-Glycosylase »

**V.**

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIN : « Vulvar Intraepithelial Neoplasia »

VLP : « Virus Like-Particle »

**Y.**

YY1 : « Yin Yang 1 »



## PREAMBULE

Les papillomavirus humains (HPV) jouent un rôle étiologique dans le développement des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Le lien entre les HPV et ce cancer a été supposé la première fois en 1976 par zur Hausen (zur Hausen *et al.*, 1975). Le développement de la biologie moléculaire a permis de mettre au point des outils de plus en plus performants sur le plan de la sensibilité analytique, et de confirmer le lien entre HPV et cancer du col de l'utérus (Bosch *et al.*, 1995, Munoz *et al.*, 1992, Walboomers *et al.*, 1999). Cette découverte a été un évènement majeur dans la recherche de l'étiologie des cancers humains : le cancer du col de l'utérus est le premier cancer nécessairement viro-induit jamais identifié.

L'efficacité du frottis cervico-utérin dans le dépistage des lésions cervicales n'est plus à prouver et cette technique a permis une forte diminution de l'incidence relative du cancer du col utérin depuis les années 1950. Mais les limites de cette technique restent importantes, notamment de par une sensibilité clinique et une reproductibilité inter-laboratoire insuffisantes (Stoler & Schiffman, 2001). Ainsi, la possibilité de détecter les HPV dans les cellules cervicales par des méthodes de biologie moléculaire, dont certaines sont aujourd'hui standardisées, a permis une approche supplémentaire dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses. Les performances diagnostiques de ces méthodes sont intéressantes, aussi bien sur le plan de la sensibilité que de la reproductibilité.

Il a été prouvé que l'infection par HPV était l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente dans le monde. En opposition à ce fait, la faible incidence du cancer du col de l'utérus (inférieur à 10 pour 100 000 en moyenne, au niveau mondial) montre que cette pathologie est une conséquence rare de l'infection par les HPV (Helmerhorst & Meijer, 2002). La présence d'HPV est la cause nécessaire mais pas suffisante au développement de ce cancer. Effectivement, de nombreux facteurs liés à l'environnement, liés à l'hôte – telles les réponses immunitaires – ou bien encore liés au virus – telle la persistance virale – vont influencer l'évolution des lésions précancéreuses. Le développement des outils techniques permettant l'étude de ces facteurs a permis de mettre à jour différentes applications préventives découlant de la relation HPV / cancer du col utérin et de mieux connaître ainsi l'histoire naturelle de l'infection et de la pathologie. Car malgré tout la mise en évidence et l'étude de nouveaux marqueurs, restent les meilleurs moyens de comprendre cette pathologie relativement complexe et d'améliorer la prise en charge des malades, afin de réserver le traitement chirurgical seulement aux cas nécessaires.

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier certains facteurs jouant un rôle important dans l'évolution des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Nous nous sommes intéressé aux facteurs liés aux virus, et nous avons décrit la charge virale, l'intégration virale et la répartition des génotypes HPV dans les lésions. Nous avons étudié aussi un facteur lié à l'hôte actuellement peu décrit : la réponse immunitaire locale, et en particulier, la composante cellulaire de l'immunité muqueuse. Ce manuscrit rapporte mon travail de thèse en 3 parties :

- **La première partie est une revue bibliographique** présentant des généralités sur la biologie des HPV et les connaissances actuelles des aspects techniques de la détection des HPV au travers de l'histoire naturelle de l'infection HPV et des lésions du col utérin associées.

- **La seconde partie présente les résultats de travaux réalisés au cours de ma thèse, sous forme de publications et de résultats non publiés.**

- I) Les résultats d'une étude comparative des performances analytiques d'un nouveau test de détection de l'HPV – le test Roche AMPLICOR® HPV MWP – et des performances du test Hybrid Capture II®.
- II) Un travail traitant de la mise au point et de la validation d'une technique de PCR quantitative en temps réel ciblant le gène E6 d'HPV16 afin de valider l'aspect quantitatif du test Hybrid Capture II®.
- III) Une étude portant sur la cinétique de charge virale de l'HPV de type 16 au cours de l'histoire naturelle des lésions cervicales.
- IV) Des données préliminaires d'une étude sur l'intégration d'HPV16 dans les lésions du col de l'utérus.
- V) Une observation de la distribution de populations de cellules immunitaires dans des lésions cervicales représentatives de l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus.
- VI) Enfin, des résultats préliminaires d'une étude multicentrique portant sur la répartition des différents géotypes d'HPV dans les lésions précancéreuses du col de l'utérus en France.

- **Pour finir, la troisième partie de ce manuscrit est une discussion générale de mon travail**, proposant les perspectives des différents programmes de recherche en cours.



# 1. PAPILLOMAVIRUS HUMAINS ET LESIONS DU COL DE L'UTERUS

## 1.1. PRESENTATION DES HPV

### 1.1.1. Diversité génétique des HPV

Les papillomavirus sont des virus très anciens qui restent particulièrement stables au cours de l'évolution. A ce jour, 118 papillomavirus ont été décrits, et classés dans la famille des *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004). On les trouve dans de nombreuses espèces animales dont les vertébrés supérieurs (murins, lapins, ovins, bovins, équidés, cervidés, canidés, primates, oiseaux), chez lesquels ils induisent des papillomes ou des fibropapillomes (tumeurs bénignes et régressives) (Nicholls & Stanley, 2000). Les papillomavirus sont spécifiques de leur hôte : il n'existe pas d'exemple de transmission croisée entre espèces (Jenson *et al.*, 1980).

La classification des différents papillomavirus est basée sur leurs différences génétiques (de Villiers *et al.*, 2004). La POL (Phase Ouverte de Lecture) L1 est la séquence génomique la plus conservée entre tous les papillomavirus et les spécialistes se sont basés sur l'étude des identités rencontrées au niveau de cette séquence pour définir une classification des papillomavirus. La rapide augmentation du nombre de types de papillomavirus isolés a incité les taxonomistes à modifier la classification préalablement établie et à créer la famille *Papillomaviridae*, dans le but de répondre à trois objectifs importants : i) établir des relations entre les types de papillomavirus ; ii) intégrer les termes « genres » et « espèces », utilisés systématiquement dans la classification des organismes biologiques et fréquemment appliqués à la virologie ; iii) et permettre de mieux distinguer les relations entre la taxonomie et les propriétés biologiques et pathologiques des virus. Ainsi, un « genre » regroupe des papillomavirus présentant entre 45 et 60% d'identité génétique au niveau de la séquence de la POL L1 et une « espèce » regroupe des papillomavirus présentant entre 60 et 70% d'identité de séquence de la POL L1. Un nouveau « type » de papillomavirus est reconnu quand la séquence nucléotidique diffère de plus de 10% des autres types. Quand cette différence est comprise entre 10 et 2%, ceci définit un « sous-type » et en dessous de 2% de différence, ceci définit un « variant ».

A ce jour, nous considérons un groupe de 96 papillomavirus spécifiques de l'homme (« Human Papillomavirus » ou HPV) et appartenant aux espèces alpha-papillomavirus, beta-papillomavirus, gamma-papillomavirus, mu-papillomavirus et nu-papillomavirus (de Villiers *et al.*, 2004).

L'étude de la diversité génétique des papillomavirus a permis de révéler l'existence de nombreux variants, et notamment du type 16. Ces variants sont bien répertoriés et regroupés géographiquement, suggérant que le virus et l'hôte ont co-évolué (Burk & DeSalle, 2006, Heinzl *et al.*, 1995, Yamada *et al.*, 1997). Les variants HPV16 sont regroupés et classifiés en fonction de leur origine géographique suspectée. Ainsi, il a été défini des variants européens (E), asiatiques (As), asiatico-américains (AA), nord américains (NA), africains 1 (Af1) et africains 2 (Af2) (Nindl *et al.*, 1999a, Nindl *et al.*, 1999b). Cette classification phylogénique est basée sur les différences

nucléotidiques au niveau d'une région non codante ou LCR (« Long Control Region ») du génome de ces HPV (Chan *et al.*, 1992a, Chan *et al.*, 1992b, Ho *et al.*, 1991).

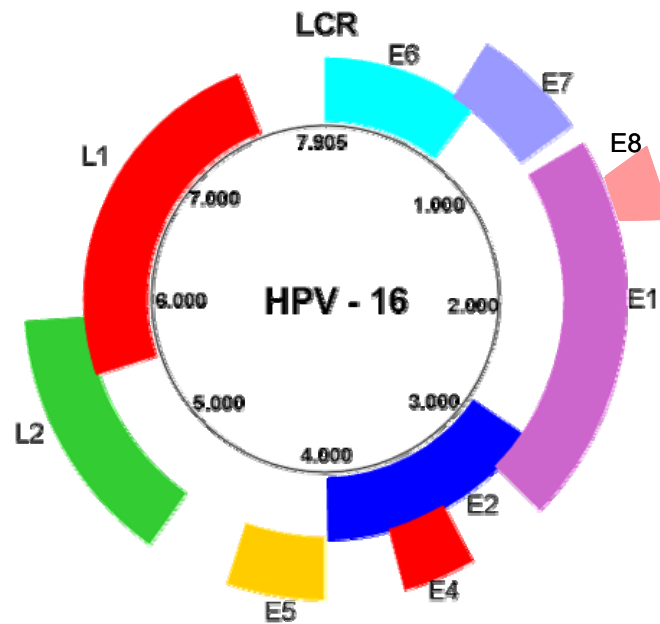
### 1.1.2. Tropisme des HPV et tissus cibles

Les HPV ont un tropisme pour les cellules épithéliales des épithéliums malpighiens pluristratifiés de l'épiderme et des muqueuses (Cheah & Looi, 1998, de Villiers *et al.*, 2004, Narechania *et al.*, 2005, Syrjanen, 2003), mais il semblerait que l'on retrouve également des HPV au niveau de certains épithéliums unistratifiés. Il a été défini des HPV infectant les épithéliums cutanés (HPV cutanés) et appartenant principalement aux genres bêta-, gamma-, mu- (notamment l'HPV1, responsable des verrues plantaires et palmaires) et nu-papillomavirus (HPV41) ainsi que des HPV infectant les épithéliums muqueux (HPV muqueux) et appartenant essentiellement au genre alpha-papillomavirus (de Villiers *et al.*, 2004). Or il n'est pas rare de trouver des HPV dits « muqueux » au niveau de l'épithélium cutané et des HPV dits « cutanés » au niveau des muqueuses (Akgul *et al.*, 2006, Cairey-Remonnay *et al.*, 2002, Hebner & Laimins, 2006, Humbey *et al.*, 2003, Pfister, 2003). La spécificité tissulaire pourrait être contrôlée par les étapes transcriptionnelles et répliquatives du virus (Muller *et al.*, 1995a), mais n'est pas à ce jour parfaitement définie.

Parmi les HPV muqueux, certains types dits à bas risque (ou HPV BR, faible potentiel oncogénique, tel que HPV6, 11) peuvent être séparés d'autres types dits à haut risque (ou HPV HR, fort potentiel oncogénique, tel que HPV16, 18). D'autres types sont classés comme à risque intermédiaire (par exemple l'HPV53) (de Villiers *et al.*, 2004, Munoz *et al.*, 2003). Historiquement, le premier site dans lequel les HPV ont été mis en évidence (par hybridation *in situ*) a été la muqueuse du col utérin (Meisels, 1976, Puroila & Savia, 1977). En réalité, les HPV infectent plusieurs muqueuses génitales (vagin, vulve chez la femme, également pénis chez l'homme), ainsi que la marge anale, et la muqueuse du canal anal. Finalement, à ce jour des HPV ont été détectés dans beaucoup d'organes comportant des épithéliums muqueux – muqueuse buccale, du larynx, de la trachée, des sinus, muqueuse conjonctivale, bronchique, oesophagienne – et des épithéliums cutanés (Gillison & Shah, 2003, Hebner & Laimins, 2006, Syrjanen, 2003).

### 1.1.3. Organisation structurale et génomique des HPV

Les HPV sont de petits virus (50 à 55 nm de diamètre) non enveloppés dont la capsidie comporte 72 capsomères, disposés selon une symétrie icosaédrique (Brentjens *et al.*, 2002, Huibregtse & Beaudenon, 1996, Zheng & Baker, 2006). Le génome des HPV est constitué d'une molécule d'ADN double brin d'environ 8000 paires de bases. Un seul brin est codant et les phases ouvertes de lecture (POL) sont regroupées en 2 régions : E (Early) et L (Late). La région non codante est appelée LCR (Figure 1).



**Figure 1.** Organisation génomique des HPV

Exemple de l'HPV16

La région E représente 50% de la taille du génome et code des protéines exprimées précocement.

- **La protéine E1** est une hélicase nécessaire à la réplication virale et au contrôle de la transcription des gènes. Cette protéine est extrêmement conservée parmi les différents types d'HPV.

- **La protéine E2** est une protéine qui joue un rôle important dans la réplication virale et dans le contrôle de la transcription des gènes E6 et E7. Elle possède 3 domaines distincts répartis sur environ 400 acides aminés. La séquence primaire de cette protéine présente une identité nucléotidique de 35% entre les domaines conservés de toutes les protéines E2 d'HPV séquencées. Le domaine aminoterminal, contenant environ 200 acides aminés, est le domaine transactivateur de la protéine. Le domaine carboxyterminal, contenant 90 acides aminés est le domaine de fixation à l'ADN. Enfin un domaine flexible (peu conservé parmi les différentes protéines E2) tient le rôle d'une charnière entre les deux domaines fonctionnels (Dostatni *et al.*, 1988, McBride & Howley, 1991, McBride *et al.*, 1991). La protéine E2 se fixe de façon hautement spécifique sur un site palindromique ACCGNNNNCGGT, présent en nombre variable de copies dans la LCR de tous les papillomavirus (Zheng & Baker, 2006). Elle intervient aussi dans le processus de ségrégation du génome et dans l'encapsidation (McBride *et al.*, 1991).

Des études ont montré que la protéine E2 présentait des propriétés antiprolifératives. La réintroduction de E2 dans des cellules de carcinome cervical entraîne une modification physiologique de ces cellules, qui présentent alors un phénotype d'arrêt du cycle en G1 (Demeret *et al.*, 1997, Desaintes *et al.*, 1997, Dowhanick *et al.*, 1995). L'expression prolongée de E2 dans ces cellules entraîne une sénescence (Goodwin & DiMaio, 2000, Wells *et al.*, 2000). Ces phénotypes d'arrêt du cycle et de sénescence sont directement liés à la répression transcriptionnelle des oncogènes E6 et E7.

- La **protéine E3** n'est pas présente dans tous les papillomavirus et ses fonctions sont à ce jour encore inconnues (Kuhne & Banks, 1998).

- La **protéine de fusion E4<sup>A</sup>E1** interagit le cytosquelette de la cellule afin de permettre le transport des particules virales. Elle joue aussi un rôle dans la réplication du génome viral (Doorbar *et al.*, 2000, Doorbar *et al.*, 1991, Fang *et al.*, 2006, Wilson *et al.*, 2005).

- Les **protéines E5, E6 et E7** interviennent dans le dérèglement du cycle cellulaire et en ce qui concerne les HPV-HR, dans l'immortalisation et la transformation de la cellule infectée ; E5 interagit avec les récepteurs à l'EGF (« Epidermal Growth Factor ») et au PDGF (« Platelet Derived Growth Factor ») et participe à leur recyclage au niveau de la membrane plasmique. Les propriétés des protéines E6 et E7 des HPV HR seront décrites dans le chapitre « 1.1.5.2. *Propriétés d'immortalisation et de transformation des protéines E6 et E7* ».

- Enfin, un **transcrit E8<sup>A</sup>E2C** résultant de la fusion entre le produit de la petite POL E8 et d'une partie de la POL E2 a été décrit pour les HPV6, 11, 16, 31 et BPV1 (« Bovin Papillomavirus ») (Stubenrauch & Laimins, 1999). Après clonage des ces ARNm et expression *in vitro* de formes mutées, les auteurs ont montré que la protéine de fusion est capable de réprimer la réplication de l'ADN viral ainsi que la transcription virale. Il est probable que cette protéine puisse jouer un rôle majeur dans le maintien de la phase de latence observée dans les cellules basales de l'épithélium infecté (Stubenrauch *et al.*, 2000, Stubenrauch & Laimins, 1999, Stubenrauch *et al.*, 2001).

La région L code les deux protéines tardives, la protéine majeure L1 et mineure L2, composant la capside virale. Ces protéines sont produites seulement lors des infections productives.

La LCR est comprise entre les séquences POL L1 et POL E6/E7. Elle comprend 400 à 1000 nucléotides selon les génotypes d'HPV et abrite les promoteurs des gènes précoces et des séquences de régulation de la réplication et de la transcription de l'ADN viral. Ces séquences régulatrices permettent la fixation spécifique de facteurs cellulaires trans-régulateurs. Certains de ces facteurs tels que AP1 (« Activator Protein 1 »), NF1 (« NeuroFibromin 1 »), Sp1 activent la transcription des gènes viraux précoces, alors que d'autres, p53, YY1 (« Yin Yang 1 »), Oct1 (« Organic cation transporter 1 ») et les récepteurs de l'acide rétinoïque, inhibent la transcription des gènes viraux précoces. Nous verrons dans le chapitre « 1.1.5. *Intégration et carcinogenèse des HPV HR* » que la transcription de certains gènes viraux est aussi régulée par les protéines virales E1 et E2.

#### 1.1.4. Entrée dans la cellule et le cycle viral

L'absence de réplication de la plupart des papillomavirus dans des systèmes de culture simple est à l'origine des difficultés de l'étude de la biologie de ces virus et de leurs interactions avec différentes cibles cellulaires. Néanmoins, les papillomavirus ciblent les cellules épithéliales basales du col de l'utérus, et deux hypothèses peuvent être formulées, concernant l'accès aux cellules cibles, qui sont des cellules souches (Doorbar, 2005).

- La première suppose une interaction directe entre le virus et les cellules basales de l'épithélium, au niveau de la **zone de jonction pavimento-cylindrique**, entre l'épithélium pluristratifié de l'exocol et

l'épithélium unistratifié de l'endocol (*voir le chapitre « 1.3.1. Col de l'utérus, description anatomo-histologique »*)

- La seconde suppose que le virus accède aux cellules basales par **des microlésions** de la muqueuse du col utérin (Cheah & Looi, 1998, Orth & Favre, 1985).

Les mécanismes d'entrée des HPV dans la cellule sont de mieux en mieux décrits grâce notamment à l'utilisation de particules apparentées à des virus ou VLP (« Virus-like Particle ») dans l'étude de ce processus (Kirnbauer *et al.*, 1992, Kirnbauer *et al.*, 1993, Rose *et al.*, 1994b, Touze & Coursaget, 1998, Touze *et al.*, 1998a, Touze *et al.*, 1998b, Volpers *et al.*, 1995, Zhou *et al.*, 1992). Les papillomavirus sont capables de se fixer à la surface de plusieurs types cellulaires (Bousarghin *et al.*, 2003b, Bousarghin *et al.*, 2004). En ce qui concerne l'HPV6, le récepteur est vraisemblablement un récepteur de type intégrine situé sur la cellule cible : l' $\alpha 6$ -intégrine, et plus précisément un dimère d'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  ou  $\alpha 6\beta 4$  (McMillan *et al.*, 1999). Néanmoins, d'autres récepteurs ont été décrits permettant l'entrée du virus dans la cellule, notamment pour les types 11, 16, 31, 33 et 45 : les glycosaminoglycanes (GAG) (Combita *et al.*, 2001, Giroglou *et al.*, 2001, Joyce *et al.*, 1999) dont la fixation est liée à la présence de motifs chargés positivement au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine L1 (Bousarghin *et al.*, 2003a, Bousarghin *et al.*, 2004, Touze *et al.*, 2000). Les GAG sont répartis en plusieurs groupes en fonction de la composition de leur partie glucidique : les héparanes sulfates, dermatanes sulfates et chondroïtines sulfates. En ce qui concerne la composition de leur partie d'ancrage, les GAG sont séparés en 3 groupes : les syndécanes, les glypicanes et les bétaglycanes. Des travaux ont montré que l'HPV16 utiliserait un récepteur de type GAG syndécane-1 pour se fixer sur la cellule cible (Shafti-Keramat *et al.*, 2003). La liaison aux GAG permettrait la fixation d'un second récepteur qui favoriserait l'internalisation. Il semblerait que l'entrée des HPV puisse aussi se faire par l'intermédiaire des héparanes sulfates, puis d'un second récepteur (qui serait l' $\alpha 6$ -intégrine pour l'HPV6), qui permettrait l'entrée dans la cellule cible (Bousarghin *et al.*, 2005). Il semblerait également que les kératinocytes puissent synthétiser la laminine 5 ayant une fonction de récepteur pour l'accès des virus aux cellules (Culp *et al.*, 2006).

Il s'en suit une internalisation des virions *via* des voies d'endocytoses. Deux systèmes d'endocytoses ont été décrits pour les HPV : la voie dépendante des clathrines et la voie dépendante des cavéoles.

- **Voie dépendante des clathrines** : au cours de ce processus d'endocytose, des vésicules hérissées se forment par intériorisation de la membrane plasmique. De nombreuses molécules fibrillaires de clathrine se fixent à la surface de ces vésicules donnant cet aspect hérissé. Après endocytose, les vésicules fusionnent avec des endosomes à pH acide. Les virions sont alors libérés dans le cytosol. Cette voie est empruntée par les HPV16 et 58 notamment (Bousarghin *et al.*, 2003b) et également le BPV1 (Zhou *et al.*, 1995).

- **Voie dépendante des cavéoles** : les cavéoles correspondent à des invaginations lisses de la membrane plasmique. Ces cavéoles se forment au niveau des microdomaines lipidiques présentant des concentrations élevées en cholestérol et en sphingomyéline. Les cavéoles vont fusionner avec des cavéosomes et vont alors libérer les virions vers divers compartiments cellulaires. Cette voie est empruntée par les HPV31 et 33 (Selinka *et al.*, 2002).

Après endocytose, les particules virales, grâce à des interactions entre les protéines E4, E1 et celles composant les microtubules et les microfilaments d'actine du cytosquelette, vont atteindre le noyau de la cellule (Doorbar *et al.*, 1991). L'absence de virions dans le noyau des cellules infectées suggère qu'il y a désassemblage de la capside au niveau des pores nucléaires (Nelson *et al.*, 2000, Nelson *et al.*, 2003). Le transport nucléaire du génome viral est possible également grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire sur les protéines L1 (Bousarghin *et al.*, 2003b, Bousarghin *et al.*, 2004, El Mehdaoui *et al.*, 2000, Touze *et al.*, 2000, Zhou *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 1994). Ces virus vont se multiplier au rythme des divisions successives et de la maturation de la cellule hôte.

La réplication du génome des HPV se fait en même temps que celui de l'ADN de la cellule hôte. Trois étapes successives caractérisent la réplication virale : établissement, maintenance et amplification.

- **La phase d'établissement est non productive.** Elle se déroule dans les couches basales de l'épithélium. L'ADN viral, sous forme épisomale, se réplique de façon limitée jusqu'à 50 à 100 copies par cellule. L'activation de la réplication implique une interaction en tandem de la protéine E2 avec la protéine E1 qui se fixe sur une séquence représentant une origine de réplication nécessaire et suffisante à la réplication d'un ADN dans les cellules en culture (Demeret *et al.*, 1994). La fixation de E2 aux sites proximaux du promoteur précoce réprime la transcription des gènes E6 et E7 par encombrement stérique, en empêchant la fixation de facteurs de transcription cellulaires essentiels à la formation du complexe de pré-initiation de la transcription, tels que les facteurs Sp1 et TBP (« Tata box Binding Protein ») (Demeret *et al.*, 1997, Demeret *et al.*, 1998, Demeret *et al.*, 1994, Dong *et al.*, 1994, Tan *et al.*, 1992).

- **La seconde étape est la phase de maintien.** Elle a lieu dans les couches basales et suprabasales. Le nombre de copies d'ADN d'HPV reste stable dans les cellules en division. A ce stade il n'y a toujours pas de production de virion. Seules les protéines précoces sont exprimées.

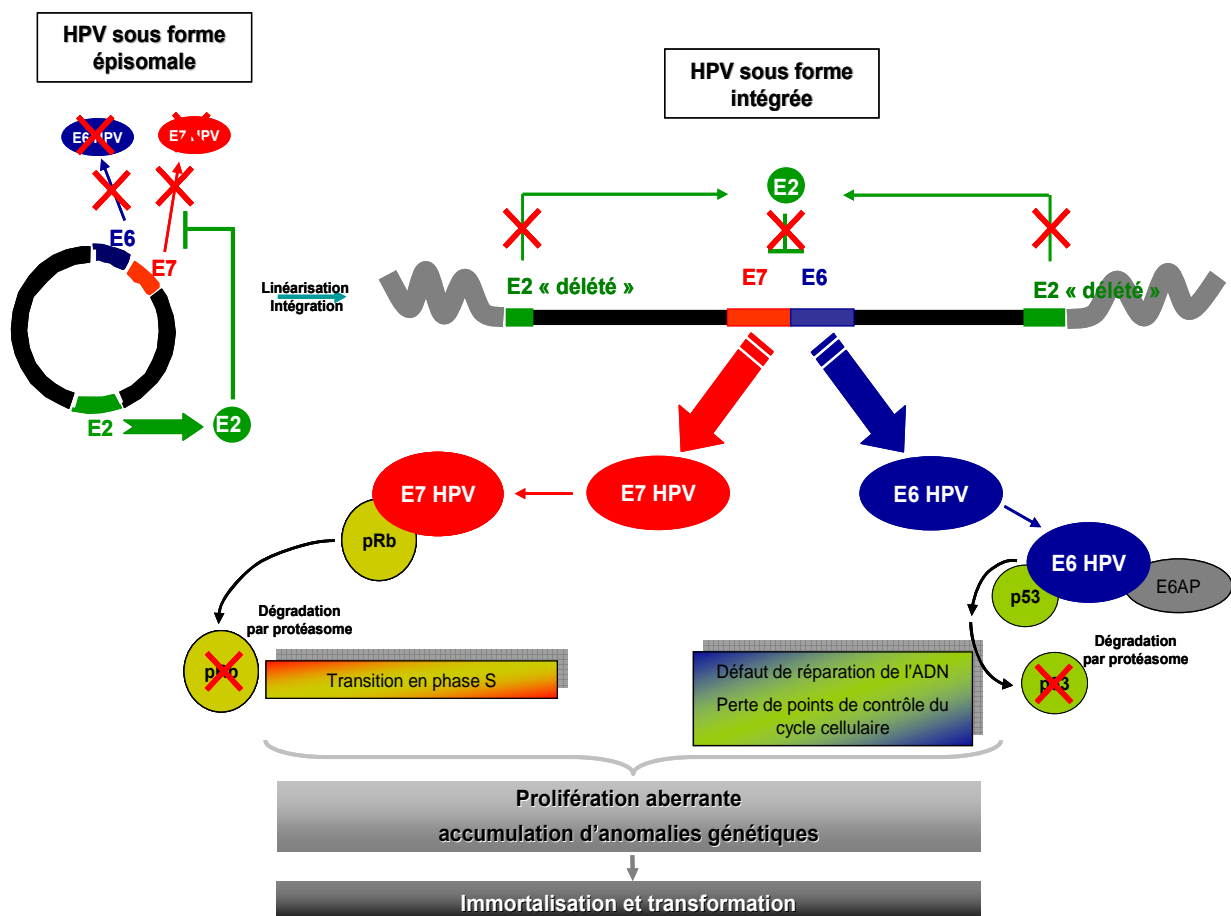
- **La troisième étape est la phase d'amplification qui est associée à une phase productive.** Cette étape est étroitement liée à la différenciation des cellules épithéliales. Les protéines tardives composant la capside (L1 et L2) ainsi que E4 sont exprimées. La protéine E4 va favoriser la libération des virus *via* la désorganisation de la lamina nucléaire. Les HPV ne sont pas des virus lytiques et ils profitent de la desquamation naturelle des cellules pour être libérés dans le milieu extérieur et potentiellement infecter un autre organisme (Flores & Lambert, 1997).

### 1.1.5. Intégration et carcinogenèse des HPV HR

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 à haut risque, les seules protéines à être constamment exprimées dans les tumeurs du col de l'utérus (Song *et al.*, 1999, Vousden *et al.*, 1988, Watanabe *et al.*, 1989).

#### 1.1.5.1. Intégration du génome viral

Le pouvoir immortalisant et transformant des HPV HR est étroitement lié à l'état physique du génome viral. L'intégration est un événement important du processus de carcinogenèse, mais constitue une impasse biologique pour le virus, car une fois son matériel génétique intégré, il ne peut plus avoir de cycle complet de multiplication (Popescu & DiPaolo, 1990). La linéarisation du génome intervient le plus souvent au niveau de la POL E1/E2 (Baker *et al.*, 1987, Choo *et al.*, 1987a, Choo *et al.*, 1987b, Schwarz *et al.*, 1985, Shirasawa *et al.*, 1989, Shirasawa *et al.*, 1986, Shirasawa *et al.*, 1987). Le plus souvent, la rupture du cadre de lecture de E2 entraîne une perte d'expression de la protéine E2 (**Figure 2**). Toutefois, il semblerait que toute ou une partie de la POL E1 puisse être éliminée lors de la linéarisation et de l'intégration du génome des HPV (Arias-Pulido *et al.*, 2006, Vinokurova *et al.*, 2005, von Knebel Doeberitz, 2002).



**Figure 2.** Intégration des hpv à haut risque et mécanismes d'immortalisation et de transformation

Alors, que la fixation de E2 sur le promoteur précoce active la réplication de l'ADN viral, cette protéine a la propriété de réprimer la transcription des gènes précoces.

L'intégration du génome des HPV qui semble s'effectuer la plupart du temps au hasard dans le génome de la cellule hôte, peut être une conséquence directe de l'instabilité chromosomique et un événement important dans la progression des lésions précancéreuses du col de l'utérus (mais aussi au niveau d'autres tissus pouvant être infectés par ces virus). La rupture du cadre de lecture de certains gènes cellulaires, faisant suite au phénomène de mutagenèse insertionnelle engendrée par l'intégration de l'ADN d'HPV pourrait constituer un facteur de progression vers un cancer. Plus de 190 sites d'intégration du génome viral ont été décrits à ce jour, et une revue de cette littérature permet de confirmer que l'intégration d'HPV se fait le plus souvent au hasard, mais avec une préférence pour les sites fragiles (Wentzensen *et al.*, 2004). Ainsi, une étude a 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. Il a été localisé également dans la même région chromosomique les génomes d'HPV16 intégrés dans les cellules SK-v, dérivant d'une lésion néoplasique intraépithéliale vulvaire (VIN, « Vulvar Intraepithelial Neoplasia »), ce qui fait penser que la région chromosomique 12q14-q15 peut correspondre également à un site préférentiel d'intégration de génomes d'HPV dans les tumeurs génitales (Sastre-Garau *et al.*, 1995). Plus récemment, des travaux ont proposé que l'intégration d'HPV18 se déroule de façon préférentielle près du locus de *c-myc* dans les carcinomes cervicaux (Couturier *et al.*, 1991, Durst *et al.*, 1987, Ferber *et al.*, 2003, Herrick *et al.*, 2005, Peter *et al.*, 2006, Sastre-Garau *et al.*, 2000). L'information apportée par ces études est très importante et très novatrice, puisque jusqu'alors, on pensait que l'intégration du génome d'HPV dans l'ADN de l'hôte se déroulait de manière totalement aléatoire. Or, si l'on sait que certaines régions sont plus favorables à la recombinaison, tels que les CFS (« common fragiles sites »), il n'avait jamais encore été montré que l'intégration d'HPV pouvait être quasi-spécifique d'une séquence de l'hôte, et surtout d'un gène comme *c-myc* correspondant à la région chromosomique 8q24 (Bernard *et al.*, 1994). Cela pourrait traduire que l'intégration en elle-même puisse jouer un rôle extrêmement important dans le développement d'un phénotype malin (en dehors des propriétés immortalisantes et transformantes de certains gènes de l'ADN viral) (Peitsaro *et al.*, 2002, Syrjanen & Syrjanen, 1999). Enfin, des études ont pu montrer une expression possible de E6 et E7 *via* des transcrits de fusion cellule-virus (Glahder *et al.*, 2003).

#### 1.1.5.2. Propriétés d'immortalisation et de transformation des protéines E6 et E7

Les propriétés de transformation des HPV à haut risque ont initialement été mises en évidence dans des cellules de rongeurs, et sont la conséquence de l'expression des oncoprotéines virales E7 et E6 (Phelps *et al.*, 1988, Tanaka *et al.*, 1989, Vousden *et al.*, 1989, Watanabe & Yoshiike, 1988a, Watanabe & Yoshiike, 1988b).

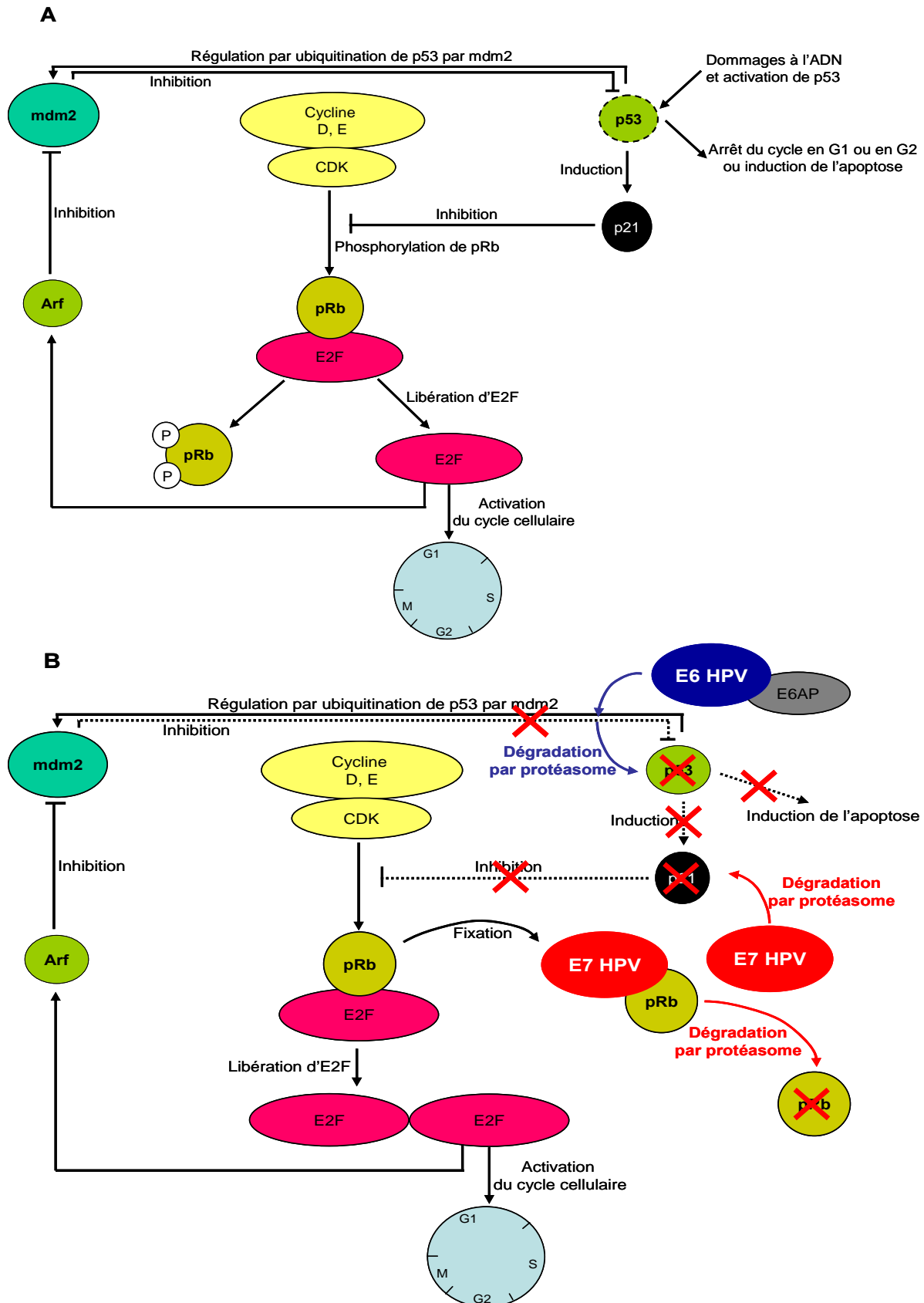


**La protéine E7** est composée de 98 acides aminés et divisée en 3 domaines, CR1, CR2 et CR3 (« Conserved Region ») basés d'après des homologies de séquences avec la protéine E1A de l'adénovirus. Au niveau du domaine CR3, E7 peut se dimériser *via* deux motifs en doigt de zinc (Cys-X-X-Cys) et se fixer à l'ADN. De nombreuses études ont montré que la protéine E7 pouvait se lier avec une forte affinité à pRb (RetinoBlastoma tumor suppressor Protein) (Dyson *et al.*, 1992, Munger *et al.*, 2001, Munger & Howley, 2002, Munger & Phelps, 1993, Munger *et al.*, 1989a, Munger *et al.*, 1989b, Munger *et al.*, 1991). Cette liaison favorise la dissociation des complexes pRb-E2F, conduisant ainsi à la libération des facteurs de transcription E2-F1, 2, 3/DP-1 induisant l'entrée de la cellule en phase S et la synthèse de l'ADN. La protéine pRb peut être inactivée du fait d'une dégradation induite par E7 et *via* le protéasome et cette dégradation est nécessaire à l'immortalisation des cellules et l'induction d'anomalies lors de la mitose (Duensing & Munger, 2003a, Duensing & Munger, 2003b, Duensing & Munger, 2004) (**Figures 3**). La protéine E7 lie aussi des protéines apparentées à la pRb et notamment p107 (active lors de la transition G1/S ainsi qu'en G2), et p130 (active lors de la transition G0/G1). Ces interactions permettent à E7 de déréguler le cycle cellulaire. De plus, E7 peut trans-activer directement les promoteurs des cyclines E et A (Caldeira *et al.*, 2000), et lier et ainsi neutraliser les inhibiteurs des CDK (Cyclin Dependent Kinase), p21 et p27 (Jones *et al.*, 1997, Jones & Munger, 1997, Zerfass-Thome *et al.*, 1996). Dans les conditions physiologiques, la transcription des gènes dépendante de E2F est aussi contrôlée par les hDACs (histone DéACétylaseS) (de Ruijter *et al.*, 2003), qui inhibent la transcription génique. Or il a été démontré que E7 d'HPV 31 peut se lier aux hDACs et ainsi activer la transcription du gène E2F-2 (de la famille E2F) (Longworth & Laimins, 2004). Il semble enfin que la liaison entre E7 et les hDACs est importante pour le maintien de la forme épisomale du génome viral durant la phase productive du cycle viral (Longworth *et al.*, 2005).

Les protéines E7 des HPV BR, quant à elles, se lient avec une faible affinité à pRb par rapport aux protéines E7 d'HPV à HR et n'ont pas d'activité immortalisante (McGlennen, 2000).

**La protéine E6** des HPV à haut risque joue aussi un rôle important car elle est nécessaire à l'immortalisation et la transformation des cellules. La protéine E6 est composée de 151 acides aminés et présente 2 domaines en doigts de zinc très conservés et indispensables à sa fonctionnalité (Rapp & Chen, 1998). Initialement, il a été montré que la protéine E6 des HPV haut risque avait une capacité à coopérer avec E7 dans le processus d'immortalisation et de transformation des cellules humaines (Hawley-Nelson *et al.*, 1988, Munger *et al.*, 2004, Munger & Howley, 2002, Munger *et al.*, 1989a). La première cible de E6 à avoir été identifiée est la protéine suppresseur de tumeur p53. Cette protéine est mutée dans plus de 50% des cancers humains alors que dans les cancers du col de l'utérus induits par HPV, elle est sauvage. E6 a la propriété d'induire la dégradation de p53 *via* la voie du protéasome. Ceci nécessite une complexation de la protéine virale avec une protéine associée, l'E6AP (« E6-Associated Protein ») (Ha & Califano, 2004, Huibregtse *et al.*, 1991, Huibregtse *et al.*, 1993a, Huibregtse *et al.*, 1993b, Scheffner *et al.*, 1990, Scheffner & Whitaker, 2003) (**Figure 3**). Cette E6AP, est une protéine cellulaire appartenant à la famille des ubiquitines ligases et qui permet l'ubiquitination de la protéine p53, constituant ainsi un signal de dégradation par le protéasome (Scheffner *et al.*, 1990, Scheffner & Whitaker, 2003). Cette dégradation du facteur de transcription p53

va conduire à une perte des mécanismes de régulation du cycle cellulaire en G1 et en G2. E6 peut aussi moduler l'activité de la télomérase, en régulant l'expression de la sous unité catalytique hTERT (« human TElomerase Reverse Transcriptase ») (Gewin & Galloway, 2001, Gewin *et al.*, 2004). E6 agit également avec de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle, dans l'adhérence et la polarité cellulaire ainsi que dans la formation des jonctions cellulaires (Mantovani & Banks, 2001).



**Figure 3.** Interactions des protéines E7 et E6 des HPV HR avec les protéines régulant le cycle cellulaire

A. Cas d'une cellule non infectée par HPV HR

B. Cas d'une cellule infectée par un HPV HR

## 1.2. CAUSALITE ENTRE INFECTION PAR UN HPV ET CANCER DU COL DE L'UTERUS

### 1.2.1. Causalité

C'est en 1995 que le lien de causalité entre l'infection par certains papillomavirus humains dit à haut risque oncogénique (HPV HR) et l'apparition des lésions cervicales a été confirmé par une étude épidémiologique de grande ampleur (Bosch *et al.*, 1995). Depuis, un grand nombre d'études sérieuses ont permis de confirmer ce lien de causalité : sans la présence du virus, le cancer du col utérin ne se développe pas. *In fine* 99,7% des cancers invasifs du col utérin abritent des HPV à haut risque (Bosch & de Sanjose, 2002, Herrington *et al.*, 1995b, Herrington *et al.*, 1995c, Munoz, 2000, Walboomers *et al.*, 1999). Ainsi, il est nécessaire d'intégrer dans l'histoire naturelle des lésions cervicales la présence de l'HPV.

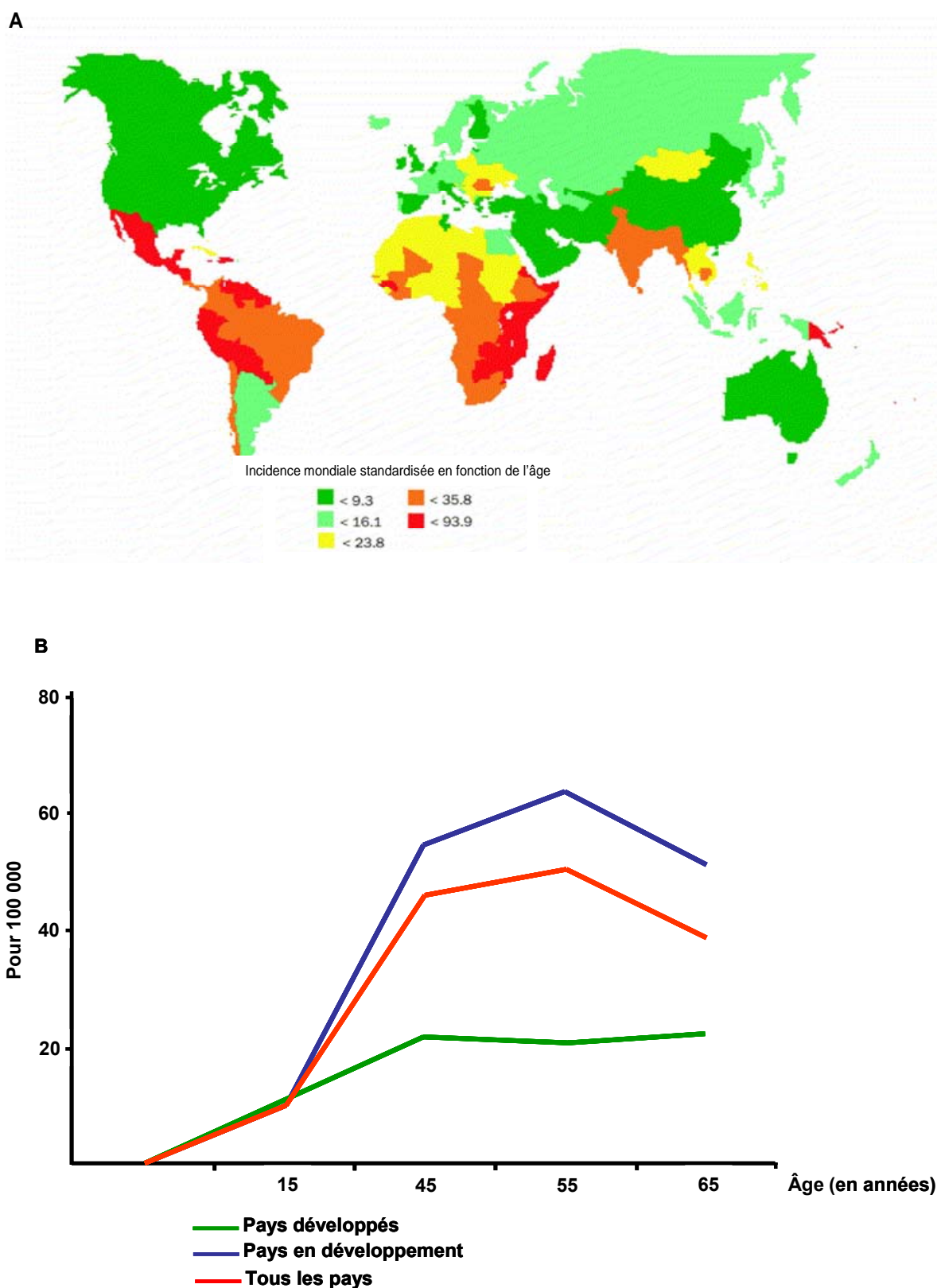
### 1.2.2. Epidémiologie

Un nombre très important d'études évaluant la prévalence de l'infection génitale à HPV dans différentes populations est disponible à ce jour. Ainsi, la proportion de femmes porteuses d'HPV est évaluée entre 15 et 40% dans les populations jeunes et sexuellement actives, avec un pic pour la classe d'âge 20-25 ans. Cette proportion chute à 2 à 8% après 35 ans. Dans un certain nombre de populations, un second pic de prévalence est décrit chez les femmes de plus de 50 ans (Bosch, 2003). L'infection à HPV est considérée comme étant la plus fréquente des infections sexuellement transmissibles. Le nombre de nouvelles infections génitales par un HPV dans le monde est estimé à 30 millions par an, et il a été rapporté que 50 à 75% des femmes de 15 à 44 ans sont ou ont été exposées aux HPV (Monsonogo *et al.*, 2006, Scheurer *et al.*, 2005). Selon les zones géographiques, le taux d'exposition des femmes aux HPV peut varier de façon importante. Ainsi aux Etats-Unis, on estime que 70% des femmes sexuellement actives auront rencontré un HPV au cours de leur vie sexuelle, et ce taux est de 95% sur le continent africain (Bosch *et al.*, 2002, Koutsky, 1997, Koutsky *et al.*, 1992).

A l'échelle mondiale, le cancer du col de l'utérus représente un problème important de santé publique puisque chaque année, 470 000 nouveaux cas sont diagnostiqués et 195 000 femmes en décèdent (Clifford *et al.*, 2005a, Franceschi & Mahe, 2005). Les taux d'incidence varient en fonction du développement industriel des pays concernés, et à titre d'exemple, ce taux va de 3,8/100 000 en Asie de l'Ouest jusqu'à 34,8/100 000 dans les Caraïbes (Bosch & de Sanjose, 2003, Franceschi, 2005, Parkin *et al.*, 2001) (**Figure 4A**). Effectivement, la prévalence du cancer du col de l'utérus à travers le monde est étroitement liée à l'existence d'une politique de dépistage des lésions précancéreuses. Ainsi, il représente le cancer féminin le plus fréquent dans les pays en voie de développement et il occupe la 7<sup>ème</sup> à la 9<sup>ème</sup> place dans les pays développés. Or, cette différence de prévalence entre pays développés et pays en voie de développement existe seulement pour le groupe des femmes de plus de 30 ans (Bosch, 2003). L'incidence du cancer du col de l'utérus augmente de façon importante entre 20 et 35 ans, et ceci de façon comparable en ce qui concerne les pays ayant un programme de

dépistage et ceux n'en n'ayant pas. Ceci suggère que l'exposition aux HPV est sensiblement la même dans ces deux groupes de pays. Cependant, dans les populations âgées de plus de 35 ans, l'incidence du cancer continue à augmenter dans les pays sans programme de dépistage, jusqu'à atteindre des taux 3 à 4 fois plus important que ceux observés dans les pays avec programme de dépistage, ce qui souligne l'importance de tels programmes (Bosch, 2003, Franceschi, 2005) (**Figure 4B**). Un second pic d'incidence peut apparaître ensuite dans les âges plus avancés (supérieur à 60 ans), possiblement en raison du second pic de prévalence de l'infection HPV et d'une certaine diminution du dépistage de la population à cet âge (Bosch, 2003) (**Figure 5B**). Enfin, une étude récente a montré que dans certains pays n'ayant aucun programme de prévention tels que l'Inde et le Nigéria, les prévalences de l'infection HPV sont les mêmes quel que soit le groupe d'âge considéré (Franceschi *et al.*, 2006).

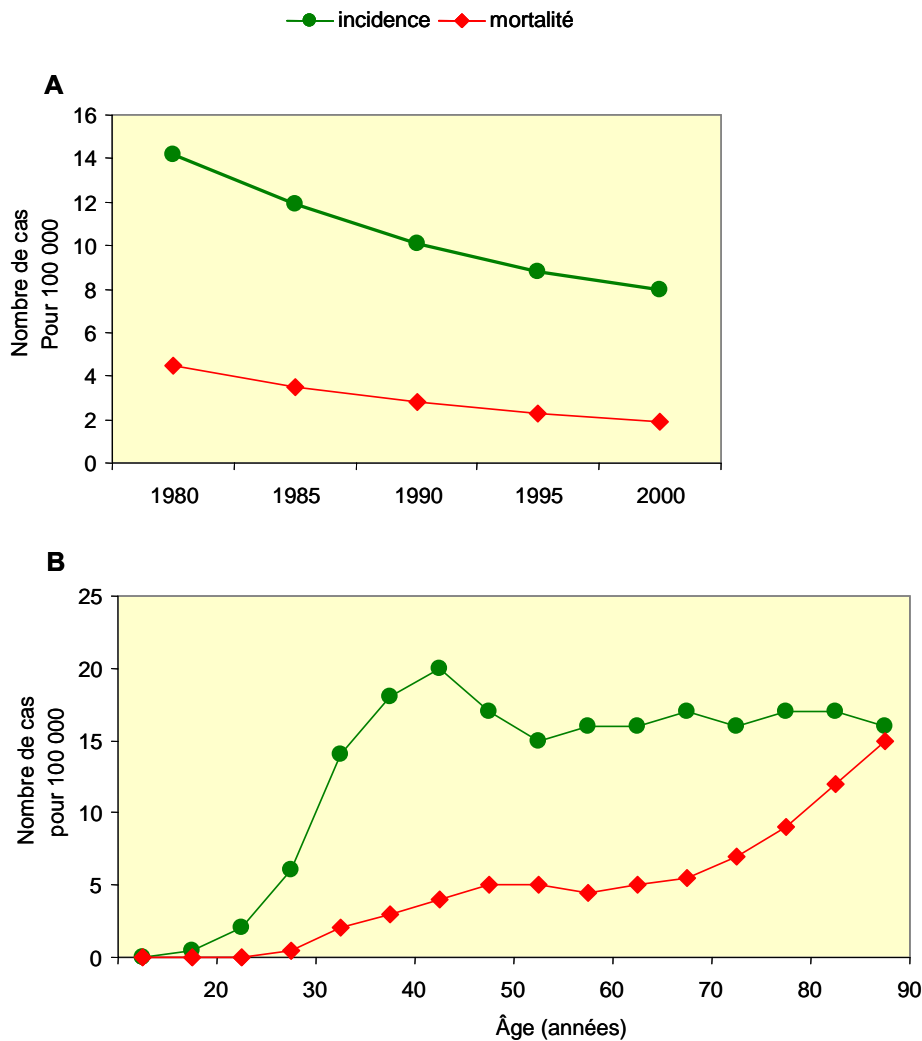
En France, les taux d'incidence sont passés de 15,6/100 000 à 8,6/100 000 de 1978 à 1992 et le nombre de nouveaux cas était de près de 6 000 en 1975, 4 200 en 1985 et 3 200 en 1995. Le nombre de décès est passé de 2 500 en 1975 à 1 600 en 1995, et à 1 000 en 2000 (Monsonogo, 2007) (**Figure 5A**). Ce cancer se situe au 8<sup>ème</sup> rang des cancers féminins en terme de fréquence, et au 5<sup>ème</sup> rang en terme de mortalité (Remontet *et al.*, 2003). Depuis 1995, l'incidence et la mortalité dues au cancer du col de l'utérus se sont stabilisées, la diminution du nombre de cas chez les femmes les plus âgées (de plus de 50 ans) étant compensée par une augmentation chez les femmes plus jeunes (de moins de 35 ans) (Monsonogo, 2007) (**Figure 5**).



**Figure 4.** Incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde

A. Incidence mondiale [d'après (Parkin *et al.*, 2001)]

B. Incidence mondiale en fonction de l'âge (Franceschi, 2005)



**Figure 5.** Incidence et mortalité du cancer du col de l'utérus en France

**A.** Evolution de l'incidence et de la mortalité depuis 1980 (Standardisation sur la population mondiale) [modifié d'après (Monsonogo, 2007)]

**B.** Incidence et mortalité en fonction de l'âge des femmes en 2000 [modifié d'après (Monsonogo, 2007)]

—●— incidence —◆— mortalité

### 1.2.3. Facteurs de risque

Ces virus étant transmis par voie sexuelle, des facteurs d'exposition aux HPV tels que le nombre de partenaires sexuels, l'âge lors des premiers rapports sexuels, les antécédents de maladies sexuellement transmissibles (MST), l'utilisation de contraceptifs oraux ont été définis comme des facteurs de risque de développer un cancer du col de l'utérus. De plus, il a été montré que les groupes de femmes à risque de développer un cancer du col de l'utérus se composent de patientes infectées de façon persistante par un HPV à haut risque (Bosch *et al.*, 2006). Ainsi, la détection des infections à HPV est à ce jour proposée dans les pratiques préventives spécifiques, et des outils performants sont à disposition pour diagnostiquer les femmes HPV positives.

### 1.3. PATHOLOGIES DU COL UTERIN ASSOCIEES AUX HPV

#### 1.3.1. Col de l'utérus, description anatomo-histologique

Le col utérin est la partie la plus inférieure de l'utérus, occupant le tiers supérieur du vagin. Il mesure 2,5 à 3 cm de long (chez la femme nullipare adulte) et regarde en bas et en avant. De forme conique, il présente un orifice à bord régulier. Le col de l'utérus est composé de tissus fibreux, musculaire et élastique. Le tissu conjonctif est prédominant et le tissu musculaire lisse occupant la portion interne du col est absent dans sa portion vaginale. Deux épithéliums d'origine embryonnaire différente recouvrent le col utérin:

##### - Un épithélium cylindrique, de l'endocol jusqu'à l'endomètre

Il est composé d'une seule couche de cellules et sa surface présente des surélévations (aspect papillaire) ou des invaginations dans le stroma (aspect glandulaire). Deux types cellulaires se côtoient dans cet épithélium : les cellules ciliées et les cellules muco-sécrétantes (sécrétant la glaire cervicale).

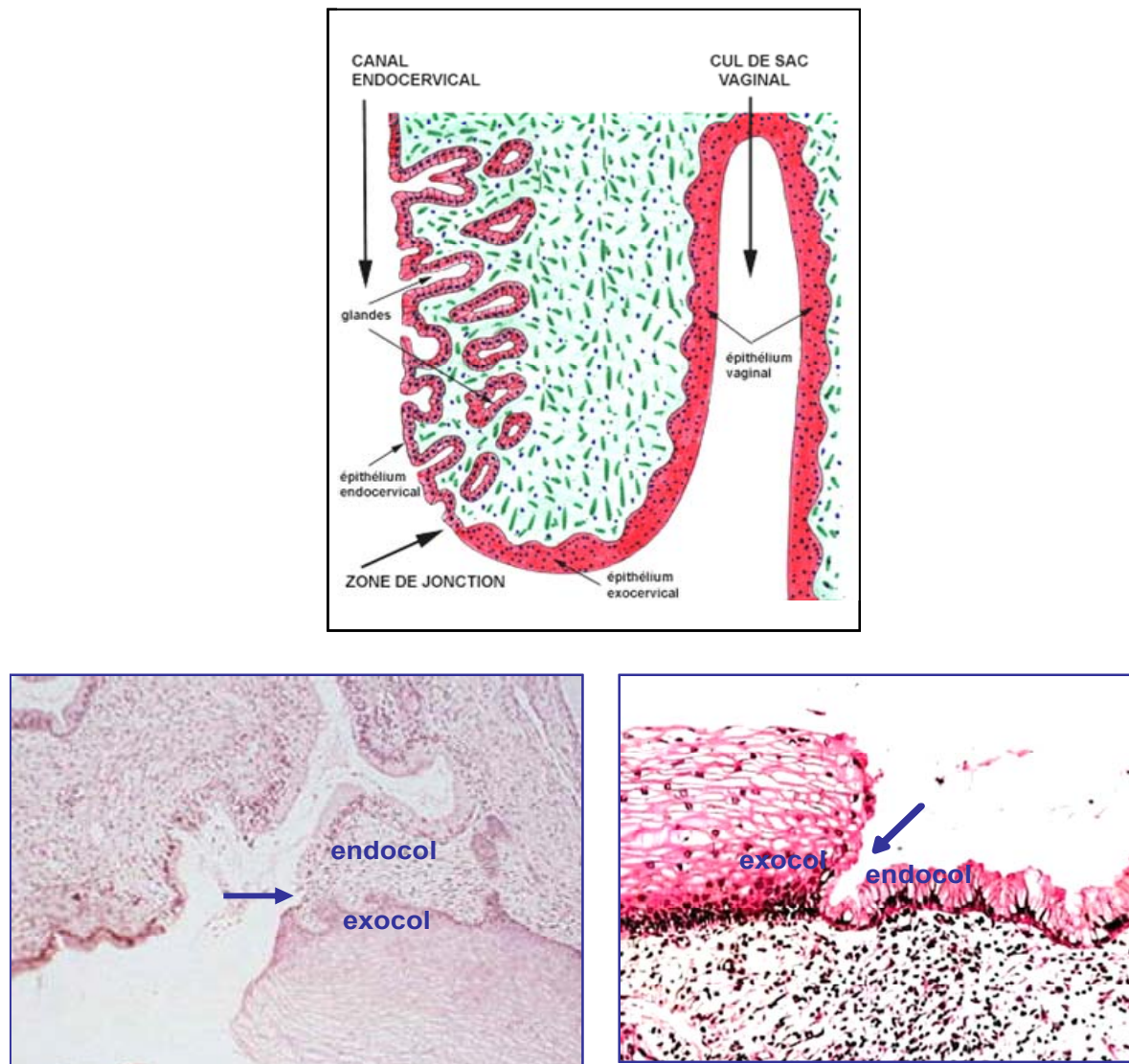
##### - Un épithélium malpighien, sur le versant exocervical et le vagin

Il est de type pavimenteux (pluristratifié) et non kératinisé. Cet épithélium est sous-tendu par du chorion, encore appelé stroma. Une lame basale séparant le stroma de l'épithélium est nécessaire à la conservation et au renouvellement de cet épithélium. Effectivement, un renouvellement permanent des cellules caractérise cet épithélium, de la partie basale vers la partie superficielle, et se traduit par une prolifération, une maturation et une desquamation des cellules. Ainsi, les cellules se répartissent sur 5 couches : basale, parabasale, intermédiaire, superficielle et desquamante. Le stroma est composé de fibroblastes et de cellules immunitaires.

##### - Zone de jonction ou rencontre entre deux épithéliums

La rencontre entre l'épithélium exocervical et endocervical est d'une importance capitale, car théoriquement, cette jonction se fait de façon brutale, avec passage instantané du revêtement malpighien au revêtement cylindrique (**Figure 6**). Cette région, que l'on appelle jonction pavimento-cylindrique, représente une zone de fragilité à la fois mécanique et immunitaire. En particulier au cours de la vie génitale de la femme, cette zone va être soumise à des modifications hormonales (cycles menstruels) et mécaniques (relations sexuelles, grossesses), ainsi qu'à des agressions aboutissant à la formation d'une région de transition ou zone de transformation. La transformation de l'épithélium cylindrique endocervical en un revêtement malpighien porte le nom de métaplasie malpighienne. Il n'est donc pas étonnant que cette zone de transformation puisse constituer une plaque tournante dans les pathologies infectieuses sexuellement transmissibles, et en particulier dans la pathologie précancéreuse cervicale. Effectivement, il a été montré que c'est au niveau de cette zone que va naître la majorité des lésions cervicales.





**Figure 6.** Représentation schématique et histologie de la zone de jonction pavimento-cylindrique  
Les flèches bleues représentent la jonction pavimento-cylindrique

### 1.3.2. Lésions HPV induites du col utérin

A la différence des lésions du col utérin non induites par les HPV et non précancéreuses (telles que les malformations, déformations, lésions inflammatoires ou dystrophies cervicales simples), que nous ne traiterons pas dans ce manuscrit, les lésions précancéreuses, induites par les HPV sont le plus souvent cliniquement muettes, ce qui ne facilite pas leur dépistage sans une technologie adaptée. Les lésions du col utérin peuvent être classées de la manière suivante :

#### - Condylomes cervicaux

Ils représentent très souvent une manifestation de l'infection à HPV, et ont l'apparence de verrues localisées sur le col. Différentes formes cliniques sont retrouvées. Certaines sont associées aux HPV BR, ce sont les formes acuminées. D'autres formes sont associées aux HPV HR, et ce sont les formes maculaires ou diffuses.

### - Dysplasies cervicales

Les dysplasies sont encore appelées néoplasies cervicales intraépithéliales ou CIN (« Cervical Intraepithelial Neoplasia »). Cette appellation fait référence à la classification histologique de Richart (Richart, 1975, Richart & Wright, 1992) à différents stades de gravité et correspondent à un bouleversement de la structure de l'épithélium du col utérin. Nous détaillerons ceci dans le chapitre suivant « 1.3.4. Histoire naturelle et détection des lésions associées à HPV ».

### - Cancer invasif du col utérin

En clinique, plusieurs formes de cancer du col de l'utérus sont décrites : forme infra-clinique avec frottis cervicaux positifs, formes bourgeonnantes et hémorragiques, formes infiltrantes ou encore formes ulcéraives. Deux formes histologiques sont décrites :

\* Le cancer épidermoïde ou SCC (« Squamous-cell Carcinoma »), développé à partir de l'épithélium pluristratifié de l'exocol, de loin la forme la plus fréquente (80 à 95%).

\* L'adénocarcinome ou ADC (« Adenocarcinoma »), développé à partir de la muqueuse de l'endocol, rare mais qui présente des aspects microscopiques particulièrement variés.

### 1.3.3. Contamination et transmission

#### 1.3.3.1. Comportements sexuels à risque

De nombreuses études épidémiologiques confirment que le comportement sexuel de l'individu et de son ou ses partenaires sont les plus importants facteurs de risque pour l'acquisition d'HPV génitaux et le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses au niveau du col de l'utérus (Franco, 1995, Schiffman *et al.*, 1993). Ainsi, l'âge au moment des premiers rapports sexuels, le nombre de partenaires sexuels au cours de la vie et le changement récent de partenaire vont constituer trois facteurs déterminants de l'infection génitale à HPV. Les comportements sexuels à risque comme facteurs de risque, ont été observés au travers d'études portant sur des cohortes de prostituées ou des femmes venant consulter pour des maladies sexuellement transmissibles, chez lesquelles la prévalence de l'infection par HPV est très importante (Kjaer *et al.*, 2001, Kjaer *et al.*, 2000). Il a pu être aussi montré que l'activité sexuelle des partenaires des femmes pour lesquelles des lésions du col utérin et/ou une infection par HPV ont été détectées, se présentait également comme un facteur de risque supplémentaire par rapport à des groupes de femmes qui n'ont pas ce type de pathologie génitale.

Enfin, la transmission des HPV par le sang n'est pas démontré aujourd'hui, car l'existence d'une virémie des HPV est peu probable (Howley, 1983, zur Hausen, 1996a, zur Hausen, 1996b), même si quelques études ont pu montrer la présence d'HPV dans le sang chez certaines patientes, présentant des lésions infiltrantes caractéristiques (Bodaghi *et al.*, 2005, Dong *et al.*, 2002).

Le virus peut se propager après desquamation des cellules infectées à un autre épithélium (muqueux, mais aussi cutané) du même organisme par un phénomène d'auto-inoculation, ce qui explique le caractère souvent multifocal des lésions à HPV, avec un passage vers le tractus génital féminin inférieur (vagin et vulve), voire vers l'anus. Dans la très grande majorité des cas, le passage à un autre hôte se fera à nouveau par voie sexuelle : une femme infectée par les HPV peut à son tour

transmettre l'infection à un partenaire, par contact direct entre les épithéliums génitaux lors d'une relation sexuelle.

### 1.3.3.2. Rôle du partenaire masculin

L'homme est certainement un élément important contribuant à la transmission de cette infection. Il a été montré que plus le nombre de partenaires sexuelles augmentait, plus la présence d'HPV au niveau pénien augmentait (Castellsague *et al.*, 2002, Castellsague *et al.*, 1997, Kjaer *et al.*, 2005).

Chez l'homme, l'infection génitale à HPV peut être latente, subclinique ou clinique. Il existe différents types de lésions cliniques, qui peuvent être des verrues génitales bénignes (souvent induites par des HPV BR), des néoplasies péniennes intraépithéliales de grade 1 à 3, et des lésions cancéreuses invasives.

Les lésions péniennes précancéreuses restent relativement exceptionnelles chez l'homme et touchent essentiellement les sujets immunodéficients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou transplantés d'organes (Gomousa-Michael *et al.*, 2000). C'est la persistance d'HPV à haut risque qui représente le facteur de risque principal de progression de telles lésions. Le cancer pénien est une maladie rare dans les pays développés (0,3 à 0,5% de tous les cancers masculins) (Aynaud *et al.*, 2003, Aynaud *et al.*, 1999, Malek *et al.*, 1993). En revanche dans les pays en voie de développement, il représente 10 à 22% de tous les cancers masculins, et peut atteindre une fréquence de 2% chez les hommes de plus de 75 ans dans certaines régions de l'Ouganda (Wabinga *et al.*, 2000). Enfin, il a été montré que la circoncision réalisée en période néonatale était associée à une diminution d'un facteur 3 du risque de développer un cancer pénien associé aux HPV (Maden *et al.*, 1993, Moses *et al.*, 1998). Par ailleurs, Castellsague a montré que la circoncision était associée à un risque réduit d'infection pénienne à HPV, et dans le cas d'antécédents de multiples partenaires sexuels, à un risque diminué de cancer cervical chez les partenaires féminins (Castellsague *et al.*, 2002).

### 1.3.3.3. Transmission verticale mère/fœtus

Des études ont permis d'établir l'existence d'une transmission verticale de la mère à l'enfant lors de l'accouchement par voie basse, par contact du nouveau-né avec les voies génitales maternelles (Cason *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 1998). Certains auteurs pensent que la prévalence de l'infection à HPV chez la femme enceinte serait plus élevée que chez celles qui ne le sont pas (Fife *et al.*, 1996b, Fife *et al.*, 1987), alors que pour d'autres, cette prévalence ne serait pas modifiée (Soares *et al.*, 1990, Tenti *et al.*, 1997). La transmission materno-fœtale des HPV est clairement reconnue par les obstétriciens. Elle peut être directe par contact entre les lésions maternelles et le fœtus (Puranen *et al.*, 1996, Puranen *et al.*, 1997), ou indirecte, par voie transplacentaire (Tseng *et al.*, 1998). Il a été rapporté, certes de façon anecdotique, la présence de condylomes buccaux ou génitaux chez des nouveau-nés de mères infectées par HPV. L'équipe de Tseng a également pu mettre en évidence la présence d'HPV dans le sang de cordon. Ceci permet de penser à une transmission autre que par voie génitale. La présence d'HPV a aussi été montrée au niveau de la caduque provenant d'avortements spontanés précoces et dans le syncytiotrophoblaste de produits de fausse-couche

(Hermonat *et al.*, 1997). Même si ce sont les HPV à bas risque tels que HPV6 et 11 qui sont le plus fréquemment retrouvés chez le nouveau-né, les HPV à haut risque peuvent être transmis avec une fréquence élevée lors de l'accouchement. Il semblerait que l'acquisition de ces HPV en période périnatale puisse conférer aux enfants de sexe féminin une augmentation du risque de CIN (Pakarian *et al.*, 1994). Il est estimé que 4 à 72% des nouveau-nés sont porteurs d'HPV si la mère est elle-même infectée. Mais de façon étonnante, 0,6 à 20% des nouveau-nés dont la mère n'est pas infectée au niveau génital peuvent abriter des HPV (Cason *et al.*, 1995, Sedlacek *et al.*, 1989). Ces données surprenantes confirment alors l'idée d'une contamination postnatale. Enfin, les facteurs qui semblent influencer la transmission materno-fœtale sont la charge virale HPV (Kaye *et al.*, 1994) et le grade élevé de la lésion présente chez la mère (Armbruster-Moraes *et al.*, 1993).

#### 1.3.4. Histoire naturelle et détection des lésions associées à HPV

La connaissance de l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus est très importante dans la compréhension de cette pathologie, et pour la mise en place des stratégies de dépistage, de la prise en charge thérapeutique et des stratégies vaccinales. Il est donc nécessaire d'inclure l'histoire naturelle de l'infection HPV dans celle des lésions précancéreuses et cancéreuses.

Nous avons vu préalablement qu'une infection par HPV était nécessaire au développement des lésions précurseurs et du cancer du col de l'utérus. Les différents stades de l'infection HPV et du processus de carcinogenèse, au cours de l'histoire naturelle des lésions du col de l'utérus se doivent d'être parfaitement identifiés et étudiés afin de permettre la définition d'un « point de départ » rationnel nécessaire à toute discussion visant à améliorer les efforts de prévention de cette pathologie. Une meilleure compréhension de cette l'histoire naturelle se traduit par l'établissement de modèles d'études de plus en plus précis, pour chaque étape de développement des lésions. Ces études restent malgré tout très dépendantes des limites techniques offertes par les méthodes de dépistage de l'HPV, la cytologie, la colposcopie et l'histopathologie. Pour des raisons encore inconnues mais fortement soupçonnables, les infections HPV tendant à causer des cancers sont majoritairement localisées dans la zone de transformation. Effectivement, les épithéliums de type utérin, anal ou bien encore au niveau des amygdales sont des exemples de tissus présentant des zones de transformation métaplasique propices aux infections HPV et au processus de carcinogenèse en découlant. Parmi le large spectre des anomalies épithéliales induites par une infection par un HPV, certaines ont été formellement identifiées comme étant des premières étapes permettant de suspecter le développement de néoplasies intraépithéliales plus sévères aboutissant au cancer invasif. Ces concepts histopathologiques sont très importants dans la prise en charge des lésions précancéreuses du col de l'utérus quand elles sont dépistées. Pour les études épidémiologiques, ceci renforce l'idée de considérer l'infection HPV comme un événement majeur nécessaire à la transition de l'état normal à l'état précancéreux ou cancéreux. Effectivement, les plus importantes caractéristiques virales intervenant dans cette histoire naturelle sont le génotype, la charge virale, intégration virale et la persistance virale. Ainsi, le type d'HPV (et notamment les types à haut risque) doit être considéré comme un facteur plus important que la présence ou l'absence d'anomalie microscopique liée à l'infection dans la prévention de ce cancer. D'autant plus que des types non carcinogènes (HPV à bas

risque) sont fréquemment associés à de telles anomalies cytologiques ou histologiques. Nous reviendrons sur ces notions dans le chapitre « 2. Facteurs viraux influençant l'évolution des lésions associées aux HPV ».

#### 1.3.4.1. Détection des lésions

Pour évaluer les lésions épithéliales du col utérin trois examens complémentaires existent : la cytologie, la colposcopie et l'histologie.

\* **La cytologie** est une méthode non invasive qui consiste à prélever à l'aide d'une cytobrosse par exfoliation, et à observer les cellules de l'épithélium muqueux (Schaffer *et al.*, 2000). L'utilisation de cette méthode de détection repose sur le fait que les cellules exfoliées que l'on observe sont représentatives de la lésion sous-jacente. Cette méthode est simple, peu onéreuse et possède une spécificité élevée (90%) (Clavel *et al.*, 2001, Schiffman *et al.*, 2000). Elle présente l'avantage d'avoir permis, par son utilisation dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus, une forte diminution de la prévalence du cancer du col de l'utérus depuis les années 1970 (Gustafsson *et al.*, 1997a, Gustafsson *et al.*, 1997b) : par exemple aux Etats-Unis, le taux de mortalité par cancer du col de l'utérus ainsi que son incidence ont baissé de plus de 40% entre 1973 et 1995 (Wingo *et al.*, 1998). Cette diminution de l'incidence de ce cancer durant cette période s'est accompagnée d'une augmentation de l'incidence des lésions précancéreuses. Cette évolution est en faveur du rôle bénéfique du dépistage de ces lésions et bien entendu de leur traitement. Aujourd'hui, c'est le système de Bethesda, dans sa version actualisée de 2001 (Solomon *et al.*, 2002), qui est utilisé pour formuler les résultats du frottis (Schaffer *et al.*, 2000) (**Figure 7**). Les anomalies des cellules malpighiennes constatées lors d'un frottis sont désignées en :

**Lésions intra-épithéliales de bas grade** ou **LGSIL** (« Low Grade Squamous Intreepithelial Lesions »), regroupant lésions condylomateuses et dysplasies légères (correspondant en histologie à des lésions de type CIN1 pour « Cervical Intra-epithelial Neoplasia » de grade 1).

**Lésions intra-épithéliales de haut grade** ou **HGSIL** (« High Grade Squamous Intreepithelial Lesions »), correspondent à des frottis évocateurs de dysplasie modérée ou sévère (correspondant en histologie à des lésions de types CIN2 et 3).

**Carcinome invasif** correspond à des frottis évocateurs de cellules malpighiennes cancéreuses.

**Les atypies des cellules malpighiennes** ou **ASC** (« Atypia of Squamous Cells ») sont caractérisées par des frottis appelés frottis équivoques ou atypiques. Ils représentent des altérations cellulaires peu marquées ou peu nombreuses pour être classées dans les lésions de bas grade. Cependant, ces altérations ne doivent pas être négligées : elles peuvent correspondre à une lésion de bas grade ou de haut grade (Sherman *et al.*, 1999). On retrouve par ailleurs une infection à HPV dans environ 50% de ces frottis. On estime qu'environ 60% de ces frottis correspondent à un col normal, 20 à 25% à des LGSIL, 10 à 15% à des HGSIL et 1%

à des cancers (Sherman *et al.*, 1999). L'actualisation du système de Bethesda en 2001 propose de distinguer 2 sortes d'atypies, appelées ASC-US (de signification indéterminée) et ASC-H (ne permettant pas d'exclure une lésion de haut grade) (Levine *et al.*, 2003, Solomon *et al.*, 2002).

La cytologie présente l'inconvénient d'une sensibilité médiocre (50% en moyenne) (Fahey *et al.*, 1995, Nanda *et al.*, 2000) et, malgré l'utilisation du système de Bethesda, d'une mauvaise reproductibilité inter-observateurs et inter-laboratoires (Stoler & Schiffman, 2001).

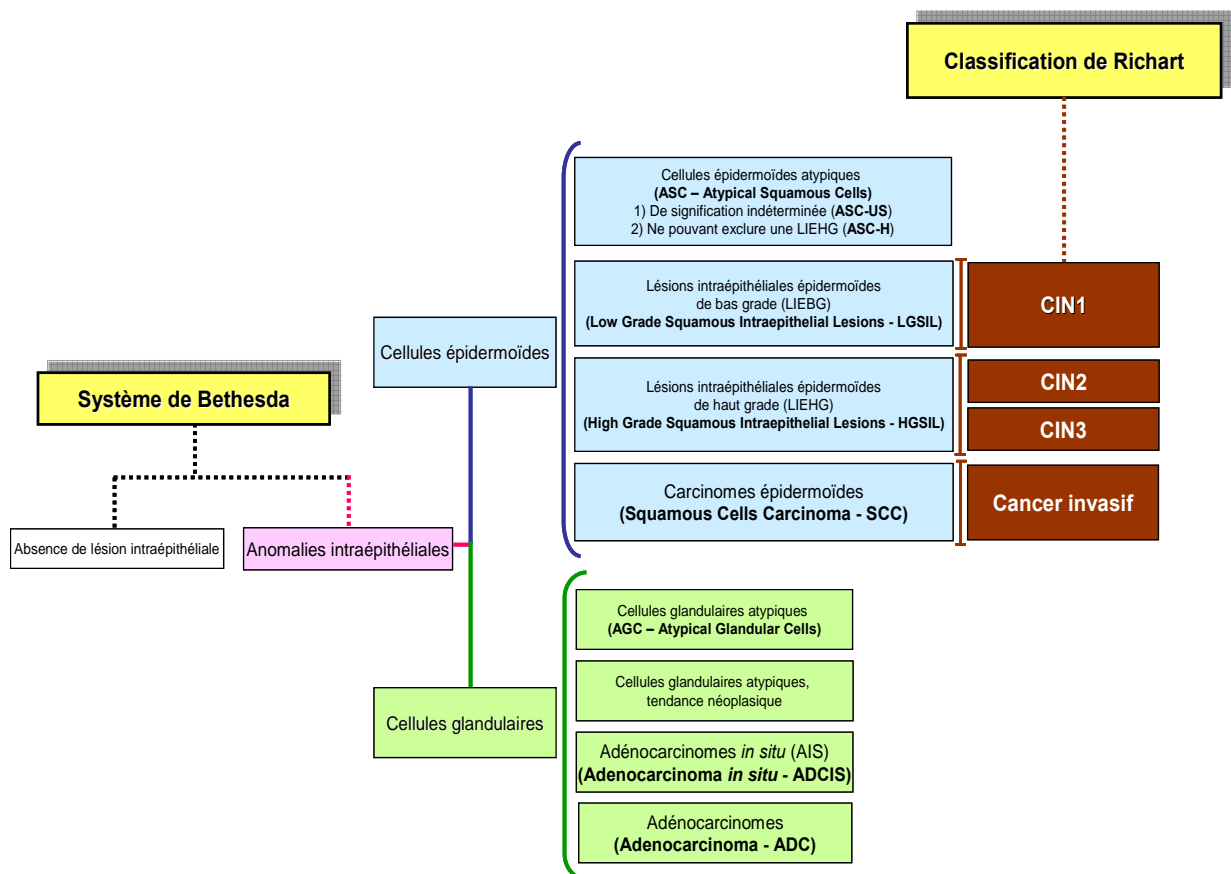
Cette méthode est utilisée depuis 1928, et est restée inchangée pendant plus d'un demi siècle. Cela fait une décennie seulement que de nouvelles avancées ont été réalisées, reposant sur le fait que le cancer du col de l'utérus est une maladie viro-induite. Ces avancées s'inscrivent dans le cadre de l'amélioration de la sensibilité et de la spécificité du test par l'introduction de technologies innovantes, allant de la cytologie en phase liquide en 1997 (Cartier, 2006, Monsonego *et al.*, 2001, Sherman *et al.*, 1997, Stoler, 2000), à la lecture automatisée des frottis (Howell *et al.*, 1998, Oringer *et al.*, 1997) et à l'ajout d'un test de détection des HPV (Clavel *et al.*, 1998b, Dalstein *et al.*, 2004, Ratnam *et al.*, 2000, Riethmuller *et al.*, 1999)

\* **La colposcopie** est une méthode qui consiste en l'examen macroscopique du col de l'utérus à l'aide d'une loupe. Elle permet d'évaluer l'aspect de l'épithélium du col de l'utérus. Trois types d'examen peuvent être pratiqués en colposcopie : l'examen sans préparation ; l'examen avec application d'acide acétique à 3% ; l'examen avec application de Lugol (solution iodo-iodurée) encore appelé test de Schiller (Holcomb & Runowicz, 2005, Lindeque, 2005). La colposcopie est considérée comme non satisfaisante lorsque la zone de jonction pavimento-cylindrique n'est pas visible, ou seulement partiellement visible (car s'enfonçant dans l'endocol), ou encore lorsqu'elle ne permet pas d'observer l'intégralité des lésions cervicales (qui s'enfoncent dans le canal endocervical). La Société Française de Colposcopie et de Pathologie Cervico-Vaginale (SFCPCV) reconnaît deux grades de transformations atypiques (TAG). Les TAG1 évoquent de simples dystrophies, des condylomes ou des dysplasies légères. Les TAG2 évoquent des dysplasies modérées ou sévères, ou encore un cancer invasif. Les TAG1 représenteraient 80% des transformations atypiques.

Les performances de cette technique sont fortement dépendantes de l'opérateur. La sensibilité est importante lorsque l'opérateur est aguerri, mais la spécificité reste inférieure à 50%, ce qui est à l'origine de traitements par excès. La variabilité intra et inter-observateurs est très élevée (Hopman *et al.*, 2000, Sellors *et al.*, 1990).

\* **L'histologie** est la méthode de référence, qui permet de proposer un diagnostic de certitude quant au type de lésion. Elle nécessite un prélèvement tissulaire (biopsie ou pièce opératoire) qui sera fixé et inclus en paraffine. Le bloc de tissu est coupé au microtome et les coupes obtenues montées sur une lame, colorées et enfin observées au microscope. Les systèmes de classification de Richart (Richart, 1975) et de l'OMS sont essentiellement destinées à l'histologie (**Figure 7**), mais on assiste aujourd'hui à la recherche d'une simplification de ces classifications, et certains pathologistes ont

adopté la classification de Bethesda, initialement destinée à la cytologie, au diagnostic histologique (McCluggage *et al.*, 1998). La sensibilité de cette technique est importante et sa spécificité est également élevée. Malgré l'évolution des systèmes de classification, la variabilité inter-opérateurs reste importante (Stoler & Schiffman, 2001). Le prélèvement tissulaire représente un geste invasif, qui est susceptible de modifier l'évolution naturelle de la lésion, avec excision partielle ou même parfois totale du tissu pathologique, ce qui peut aller jusqu'à la disparition de la lésion (on parle alors de biopsie curatrice), phénomène de cicatrisation avec inflammation et afflux de cellules immunitaires. Mais certains auteurs affirment que des biopsies répétées ne modifient pas significativement le cours de la maladie (Chenoy *et al.*, 1996).



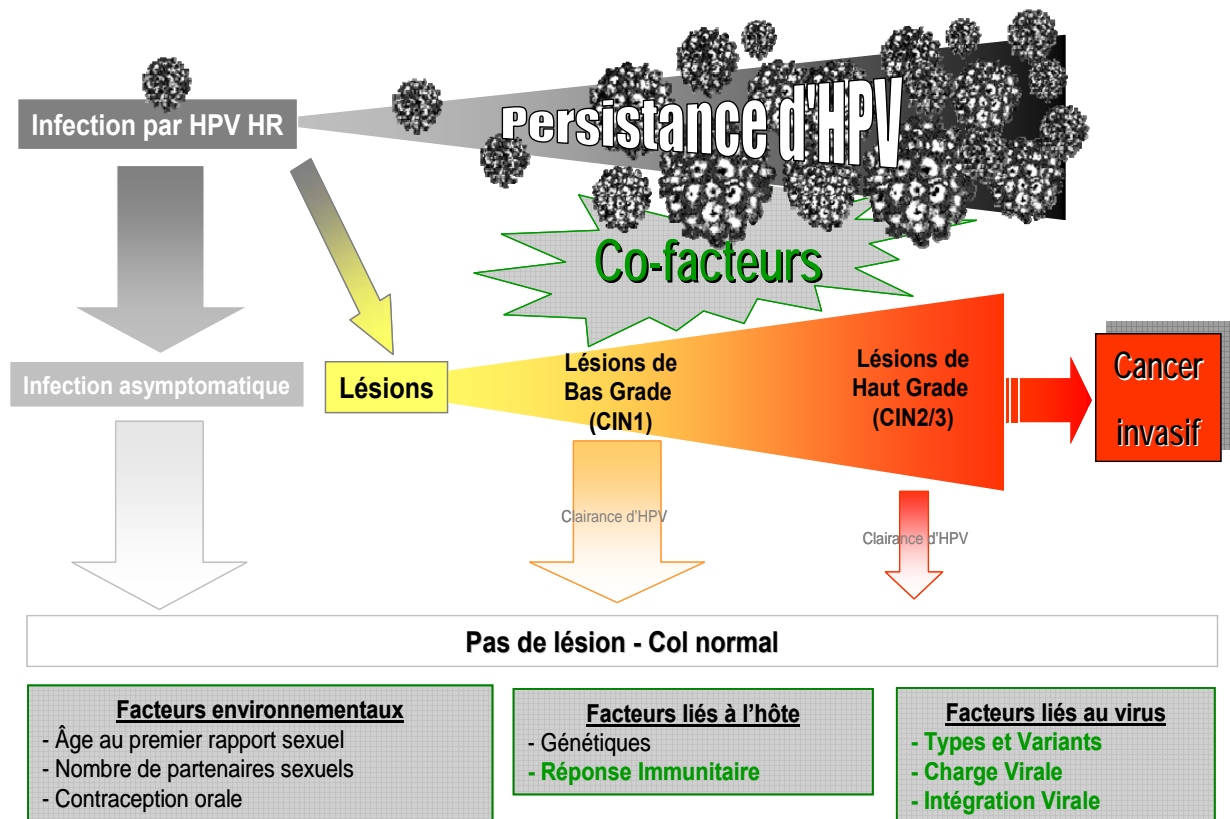
**Figure 7.** Classification cytologique de Bethesda (2001) et classification histologique de Richart (1973)

#### 1.3.4.2. Histoire naturelle des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin, induites par HPV

La plupart des infections par HPV sont contrôlées vraisemblablement par le système immunitaire et des mécanismes qui ne sont pas encore parfaitement élucidés. Ainsi on estime que la clairance virale est réalisée en 8 à 13 mois, et cette durée pourrait être différente en fonction des génotypes considérés. La clairance des HPV à bas risque est de l'ordre de 6 mois, alors que celle des HPV à haut risque est de 16 mois (Ho *et al.*, 2003, Moscicki *et al.*, 2006). La mise en place d'une réponse immunitaire efficace joue vraisemblablement un rôle important dans la clairance et limiterait par ailleurs les réinfections ultérieures par les mêmes génotypes.

Il a été longtemps supposé que le développement du cancer du col utérin résultait de la progression lente (10 à 20 ans) des lésions précurseurs : CIN1 -> CIN2 -> CIN3 -> Cancer (Richart, 1975). Cependant, des études longitudinales ont pu mettre en évidence notamment l'émergence de CIN3 qui ne sont pas précédées de dysplasies légères et modérées détectables au préalable (Koutsky *et al.*, 1992, Moscicki *et al.*, 2006, Woodman *et al.*, 2001). Ainsi on considère aujourd'hui que les lésions de bas grade (CIN1 et condylomes) seraient une manifestation distincte des CIN3, véritables lésions précancéreuses (Cox, 2003, Kiviat & Koutsky, 1993, Koutsky *et al.*, 1992, Moscicki, 1998, Moscicki *et al.*, 2006). La période nécessaire au développement d'une dysplasie sévère peut-être courte, un à deux ans (Koutsky *et al.*, 1992, Woodman *et al.*, 2001), ce qui signifierait que certaines CIN3 sont une manifestation plutôt courante et précoce des infections par HPV. Parmi les HPV détectés dans les CIN1, 80% sont à haut risque et 20% sont à bas risque (Richart *et al.*, 1998). On considère que les CIN1 ont des fort taux de régression, de 47 à 57% (Ostor, 1993a, Ostor, 1993b, Syrjanen, 1996). Le risque d'évolution d'une LGSIL est relativement faible : moins de 2 cas pour 1000 dans les 2 premières années qui suivent son apparition (Melnikow *et al.*, 1998, Soutter, 1988). Parallèlement, il a été montré que les lésions de bas grade ont un fort potentiel de régression suite à l'élimination de l'HPV par le système immunitaire (Moscicki *et al.*, 2004b). Si l'infection persiste, les lésions de bas grade peuvent progresser vers des lésions de haut grade. L'évolution des lésions de haut grade, et notamment des CIN3, est difficile à explorer pour des raisons éthiques. Ces lésions ont une probabilité plus forte de progresser vers un cancer invasif, or ceci n'est pas systématique, car elles sont susceptibles de régresser dans 32% à 35% des cas (Melnikow *et al.*, 1998, Moscicki *et al.*, 2004a, Ostor, 1993a, Ostor, 1993b) (**Figure 8**).





**Figure 8.** Histoire naturelle de l'infection HPV et des lésions cervicales précancéreuses et cancéreuses

## 1.4. DETECTION DES HPV

Les techniques classiques de la virologie ne peuvent pas être appliquées à la détection des HPV. En particulier par le fait que la culture de ces virus est très difficile dans des systèmes simples. Ainsi, les biologistes se sont tournés vers les méthodes de détection de l'ADN viral se basant sur l'utilisation d'outils de biologie moléculaire. Dans ce cas, ces outils doivent tenir compte de la multiplicité des génotypes d'HPV retrouvés au niveau du col de l'utérus. Toutes les techniques moléculaires de détection des HPV reposent sur l'hybridation d'une séquence nucléotidique connue par une sonde ARN ou ADN complémentaire, qu'il y ait amplification ou non.

### 1.4.1. Hybridation *in situ*

Les premières techniques de détection des HPV étaient basées sur l'hybridation *in situ* (HIS), et utilisaient des sondes d'acides nucléiques marquées par un élément radioactif ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ). L'utilisation de la radioactivité a ensuite été abandonnée au profit d'un marquage dit « froid », utilisant principalement la digoxigénine et la biotine, et également une technologie d'amplification de signal (Bettinger *et al.*, 1999). La technique d'HIS a été largement utilisée depuis la fin des années 80 dans

la recherche HPV en permettant de localiser au microscope une hybridation spécifique : sur des coupes histologiques, ou encore sur des étalements cellulaires de types frottis. Cette technique a permis les localisations précises de génomes viraux d'HPV dans les lésions au niveau du col utérin. L'utilisation de sondes spécifiques de types sur des coupes sériées d'une lésion a permis d'identifier différentes zones infectées par plusieurs types d'HPV. Par ailleurs, il a été proposé que l'aspect du marquage observé au microscope peut renseigner sur l'état physique du génome viral : un marquage homogène et diffus traduit plutôt une forme épisomale et non intégrée du génome d'HPV, alors qu'un marquage ponctué traduit plutôt une forme intégrée de l'ADN viral (Cooper *et al.*, 1991a, Cooper *et al.*, 1991b, Sano *et al.*, 1998). Cette technique présente certains inconvénients. Tout d'abord le seuil de détection de l'HIS est faible : 20 à 50 copies virales par cellule (Zehbe *et al.*, 1992), la technique est relativement longue et délicate. La sensibilité clinique pour les lésions de haut grade notamment, est de 60% environ. En revanche, la spécificité clinique pour ces mêmes lésions est bonne (Herrington *et al.*, 1995a, Unger *et al.*, 1998). Cette technique a donc été progressivement remplacée dans le courant des années 90 par les techniques plus sensibles, plus rapides, automatisable et plus faciles telles que la PCR et l'hybridation en phase liquide.

#### **1.4.2. Techniques de PCR conventionnelles**

La détection des HPV par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (« Polymerase Chain Reaction ») a la particularité de nécessiter une faible quantité d'ADN cible au départ. Elle a été utilisée avec succès sur des frottis ou lavages cervicaux, sur des biopsies congelées ou encore sur des tissus inclus en paraffine. Cette technique nécessite une extraction d'ADN qui peut être assez grossière et il n'y a pas besoin de recourir à des étapes d'extraction et de purification particulièrement poussées. Cette méthode est sensible (1 copie parmi  $10^5$  à  $10^6$  cellules). Elle est très spécifique, relativement rapide et présente l'avantage d'être en partie automatisable. Avec le développement important des techniques PCR dès la fin des années 80, les études épidémiologiques sur de grandes séries de patientes ont pu être réalisées au cours des années 90 (Bosch *et al.*, 1995, Walboomers *et al.*, 1999).

Devant la grande diversité des génotypes d'HPV, différents systèmes d'amplification reposant sur l'utilisation de couples d'amorces ont été développés :

##### **1.4.2.1. Couples d'amorces spécifiques**

Des techniques de PCR utilisant des amorces spécifiques ont été développées en premier (Shibata *et al.*, 1988). Ces PCR amplifient une séquence génomique d'un seul type d'HPV. Par la suite, des PCR utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques dans le même milieu réactionnel (PCR multiplexe) ont été développées, conduisant à des fragments amplifiés de tailles différentes selon le génotype (Soler *et al.*, 1991, Vandenvelde *et al.*, 1990).

Ces techniques présentaient cependant des limites car elles ne permettaient pas d'amplifier de nombreux types d'HPV de séquence proche mais non connue, ce qui pouvait poser problème lors de certaines études épidémiologiques. Ainsi, la prévalence des HPV dans les lésions précancéreuses et cancéreuses se trouvait sous-estimée.

#### 1.4.2.2. Couples d'amorces consensus

Le développement des PCR utilisant des amorces consensus a permis l'amplification d'un nombre important d'HPV différents, y compris des HPV qui n'avaient pas encore été identifiés. Le clonage des produits de PCR et leur séquençage ont permis d'identifier de nombreux types d'HPV et de compléter ainsi l'arbre phylogénique de cette famille de virus. Ces PCR ciblent des régions très conservées du génome des HPV et notamment la région L1. Trois couples d'amorces sont très utilisés actuellement et depuis plus d'une dizaine d'années : les amorces MY09/MY11 et les amorces GP5/GP6, et SPF qui permettent d'amplifier plus d'une vingtaine de génotypes différents.

\* **Les amorces MY09/MY11** sont des amorces dégénérées de 20 bases qui conduisent à un amplicon de 450 paires de bases (Resnick *et al.*, 1990). Le terme d'amorce dégénérée signifie qu'à certaines positions, le nucléotide incorporé de façon aléatoire lors de la synthèse. Ces amorces ont été améliorées, devenant PGMY09/11 (« PG » pour « Patti Gravitt ») : au lieu de dégénérer plusieurs positions des amorces, il s'agit maintenant d'un mélange défini d'amorces (Gravitt *et al.*, 2001), ce qui permet d'améliorer la reproductibilité et la sensibilité de ce système d'amplification.

\* **Les amorces consensus GP5/GP6** ne sont pas dégénérées et conduisent à un amplicon beaucoup plus court de 150 paires de bases (Snijders *et al.*, 1991, van den Brule *et al.*, 1990a, van den Brule *et al.*, 1990b). Ceci améliore nettement la sensibilité, en particulier pour l'amplification d'ADN qui a été endommagé après fixation ou congélations/décongélations successives. Ce couple d'amorces a été amélioré avec l'ajout de séquences très conservées en 3' des deux amorces, devenant GP5+/GP6+ et permettant d'augmenter la sensibilité analytique de 10 à 100 fois plus qu'avec le couple GP5/GP6 (de Roda Husman *et al.*, 1995).

\* **Les amorces SPF ou SPF10** (Kleter *et al.*, 1999) forment un amplicon de plus petite taille : 65 pb, permettant une détection très sensible d'un large spectre d'HPV.

La forte sensibilité analytique de la PCR engendre deux limitations qui incitent à prendre quelques précautions quant à l'utilisation de ces techniques.

- Tout d'abord la mise en place de ces techniques dans des laboratoires de biologie moléculaire spécialisés disposant de locaux adaptés et la formation des utilisateurs afin de réduire au maximum les risques de contamination inter-échantillons (au laboratoire et parfois même lors du prélèvement de l'échantillon biologique) et donc de résultats faussement positifs. Ces problèmes de contaminations peuvent être réduits par l'utilisation de désoxyUracile Tri Phosphate (dUTP) parmi les dNTP (désoxyNucléosides Tri Phosphate) et de l'enzyme Uracyl-N-Glycosylase (UNG) (telle que l'AMPerase®, Roche) (Bass *et al.*, 1993).

- Il est également difficile de connaître la signification clinique d'une simple détection d'HPV en ce qui concerne les infections dites « non à risque de CIN2+ », c'est-à-dire qui ne conduisent pas à l'apparition d'un cancer ou de lésions de haut grade (Snijders *et al.*, 2003).

### 1.4.3. Génométypage

Le génotypage consiste en l'identification des différents types d'HPV au sein d'un même échantillon. Généralement le génotypage consiste en une PCR consensus à laquelle s'ajoute une étape d'hybridation avec des sondes spécifiques marquées, soit sur membrane (blots, systèmes radioactifs ou froids) et plus couramment aujourd'hui en solution (ELISA, EIA). Plus récemment des techniques d'hybridations inverses sur bandelettes ou RLB (« Reverse Line Blotting ») ont été développées en se basant sur l'utilisation d'amorces marquées à la biotine lors de l'étape de PCR. Les amplicons sont ensuite mis en contact avec une bandelette sur laquelle sont fixées des sondes spécifiques de type. Les hybrides sont révélés par une réaction colorimétrique (Vernon *et al.*, 2000).

A titre d'exemple, le test INNO-LiPA® HPV genotyping test de la société Innogenetics (Gant, Belgique) permet de détecter 24 génotypes et l'étape d'amplification est réalisée à l'aide d'un couple d'amorces consensus SPF10 (Kleter *et al.*, 1999). Les sondes d'oligonucléotides spécifiques de chaque génotypes d'HPV sont fixées par leur extrémité poly(dT) sur une bandelette de nitrocellulose. Les amplicons, biotinylés lors de leur synthèse, s'hybrident spécifiquement au(x) sonde(s) correspondant aux génotype(s) amplifié(s). La streptavidine-PA (Phosphatase Alcaline) est ajoutée sur les bandelettes et va catalyser la réaction enzymatique avec le substrat NBT/BCIP (Bromo Chloro IndolylPhosphate et NitroBlue Tetrazolium) se traduisant par l'apparition d'un précipité violet sur la zone où l'hybridation se produit.

Le test Roche LINEAR ARRAY® HPV Genotyping (Roche Diagnostic, Meylan, France) permet de détecter 37 génotypes et nécessite une première étape d'amplification d'une séquence du gène L1, par PCR consensus MY11/MY09. Les produits amplifiés sont marqués par la biotine puis hybridés à l'aide de sondes nucléotidiques spécifiques et de façon discriminante pour 37 génotypes différents (13 HPV HR et 24 HPV BR), fixées sur une bandelette de nylon. La particularité de ce test, est qu'il permet de contrôler la qualité des extractions d'ADN en permettant la détection de la présence d'ADN cellulaire, *via* l'amplification et la détection du gène de la  $\beta$ -globine. Grâce au marquage à la biotine, on peut révéler en colorimétrie les produits hybridés par l'ajout d'un conjugué marqué à la Streptavidine-HRP (HorseRadish Peroxidase) et d'un substrat, et la formation d'un précipité sur la zone où l'hybridation se produit (Coutlee *et al.*, 2006, D'Souza *et al.*, 2005, Giuliani *et al.*, 2006, Stevens *et al.*, 2006a, Stevens *et al.*, 2006b, van Hamont *et al.*, 2006).

Récemment deux trousse commerciales permettant la détection des HPV par des puces à ADN ont été commercialisées. Ces technologies, reposent sur la détection de séquences spécifiques d'ADN d'HPV, qui sont préalablement amplifiées par PCR. La détection des produits amplifiés est réalisée à l'aide de biopuces à ADN.

Ainsi, le PapilloCheck® HPV-Screening (Greiner Bio-One, Monroe, Etat-Unis) permet la détection qualitative de 24 types d'HPV (15 HPV-HR, 3 HPV à « risque intermédiaire » et 6 HPV-BR). Ce test est basé sur la détection d'un fragment du gène E1 de 350 pb, amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour chacun des 24 types d'HPV. Les produits amplifiés s'hybrident sur une biopuce contenant les 24 sondes ADN spécifiques de chaque type d'HPV. L'ADN fixé est marqué par une molécule fluorescente et détecté par un système spécifique.

Le second test, le Clinical Arrays® HPV Genotyping (Genomica, Madrid, Espagne) permet de détecter 35 types d'HPV (dont 15 HPV-HR, 9 HPV à « risque intermédiaire » et 11 HPV-BR) à partir de différents types de prélèvements (écouvillons, suspensions cellulaires, tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine). Un fragment de 450 paires de bases dans la séquence de L1 est amplifié. Les produits amplifiés sont marqués par la biotine, et s'hybrident aux sondes ADN fixées sur la biopuce. Un conjugué Streptavidine-HRP est ajouté et se fixe à la biotine. Après l'ajout du substrat TMB (TetraMethylBenzidine) et par action de la peroxydase, un précipité se forme sur la zone où l'hybridation se produit.

Il existe encore d'autres systèmes de génotypage, moins utilisés aujourd'hui : la détection par séquençage, par RFLP (« Restriction Fragment Length Polymorphism »), ou encore par PCR-SSCP (« Single-Stranded Conformation Polymorphism »).

#### **1.4.4. PCR quantitative en temps réel : détermination d'une charge virale HPV**

La PCR conventionnelle est une technique non quantitative, puisque l'analyse des produits amplifiés s'effectue en point final. Ceci pose un problème si l'on souhaite obtenir une charge virale dans l'établissement d'un résultat quantitatif. C'est avec l'émergence des techniques de PCR en temps réel à la fin des années 90, que la détermination d'une charge virale de manière parfaitement quantitative est devenue possible (Clementi *et al.*, 1995).

##### **1.4.4.1. Principes de la PCR en temps réel**

Le principe de la PCR quantitative en temps réel repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule reporter fluorescente. L'intensité de fluorescence ou RFU (« Relative Fluorescence Unit »), mesurée à chaque cycle PCR, augmente au fur et à mesure de la synthèse des brins d'ADN complémentaires. Un logiciel d'analyse de la fluorescence permet d'obtenir une courbe (le nombre de cycles en fonction de la fluorescence mesurée) représentant la réaction d'amplification. Les différentes phases de la réaction de PCR (phase d'initiation, phase exponentielle et phase de plateau) peuvent être observées (**Figure 9A**). Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est faible, et permet de définir une ligne de base. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR néo-synthétisés va entraîner une augmentation rapide de l'intensité de fluorescence. Quelle que soit la stratégie de quantification utilisée, les courbes des cinétiques enzymatiques doivent avoir la même allure : 1) après normalisation des fluctuations auxquelles sont soumises les mesures de fluorescence ; 2) après définition d'un seuil de fluorescence commun à toutes les courbes cinétiques. Une fois ceci réalisé, il est nécessaire de déterminer le seuil de détection optique pour chaque cinétique d'amplification, permettant au logiciel l'extrapolation des standards pour déterminer la quantité initiale d'acide nucléique d'intérêt. Le fait de normaliser les mesures et de les exprimer en valeur relative plutôt qu'absolue permet de définir une ligne de base (ou bruit de fond) commune à toutes les cinétiques générées. Cette ligne de base permet alors de caractériser et de corriger toute dérive de fluorescence au cours de la réaction d'amplification.

Selon le logiciel équipant l'appareil de PCR quantitative en temps réel, plusieurs méthodologies ont été développées pour déterminer le point de départ de la phase exponentielle de la courbe cinétique  $RFU = f(n)$  ( $n$  étant le nombre de cycles) (Rasmussen *et al.*, 2000). Ce point correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence émise ait dépassée une valeur significativement différente du bruit de fond. Ce point est appelé seuil de détection optique, symbolisé par les lettres Ct (« threshold Cycle ») dans la méthode dite « du seuil » (lorsque l'utilisateur place lui-même le point seuil), ou Cp (« Crossing Point »), lorsque le logiciel calcule ce seuil comme correspondant au premier maximum (en valeur absolue) de la dérivée seconde de la fonction sigmoïde représentant la réaction d'amplification  $RFU = f(n)$ . Ce Cp correspond physiquement à l'accélération maximale de la réaction. C'est un point remarquable de la cinétique d'amplification puisqu'il est inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes avant amplification par PCR (Heid *et al.*, 1996). Enfin, dans la méthode dite « des points ajustés » (fit point method) la courbe cinétique est convertie en fonction semi-logarithmique, et une droite de régression est établie à partir des points de la phase exponentielle linéarisée (**Figure 9B**).

La PCR en temps réel possède d'autres avantages par rapport à la PCR conventionnelle : rapidité (45 minutes *versus* environ 4 heures) ; disparition de l'étape post-PCR ; très faibles probabilités de contamination car les amplifiats n'ont plus à être manipulés ; volumes réactionnels très faibles (5µL).

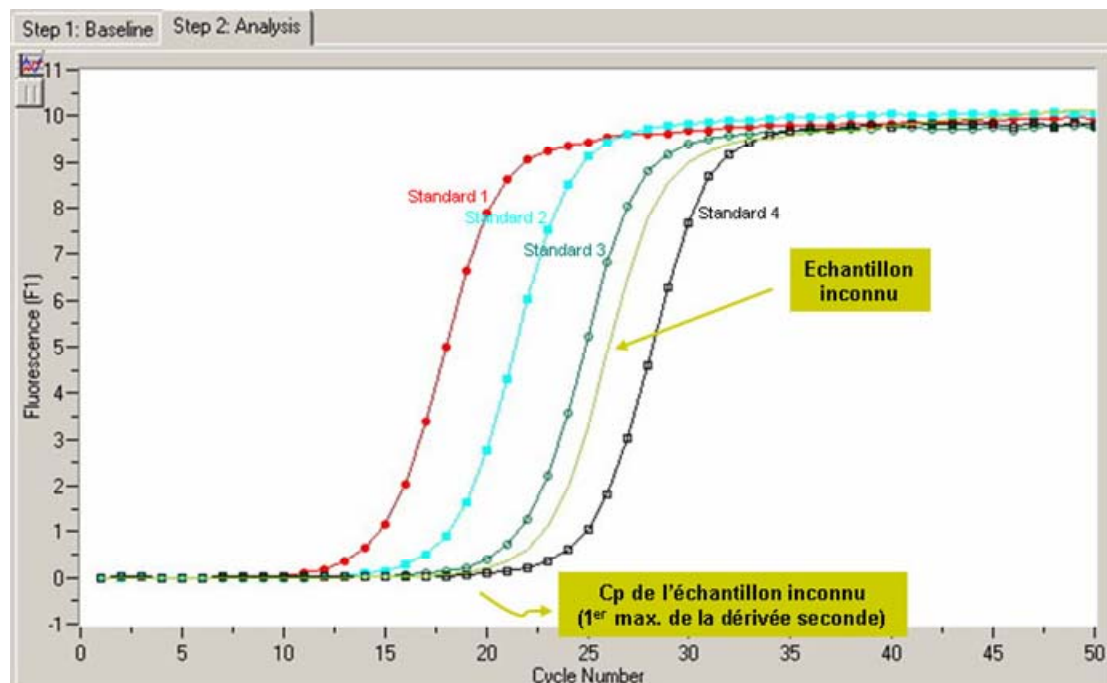
#### 1.4.4.2. Stratégies de quantification

La concentration en acide nucléique peut être mesurée de deux façons : soit de façon absolue après établissement d'une courbe d'étalonnage à partir d'un standard externe, soit de façon relative après normalisation par rapport à un gène de référence (gène endogène validé) ou un calibrant (échantillon servant de référence).

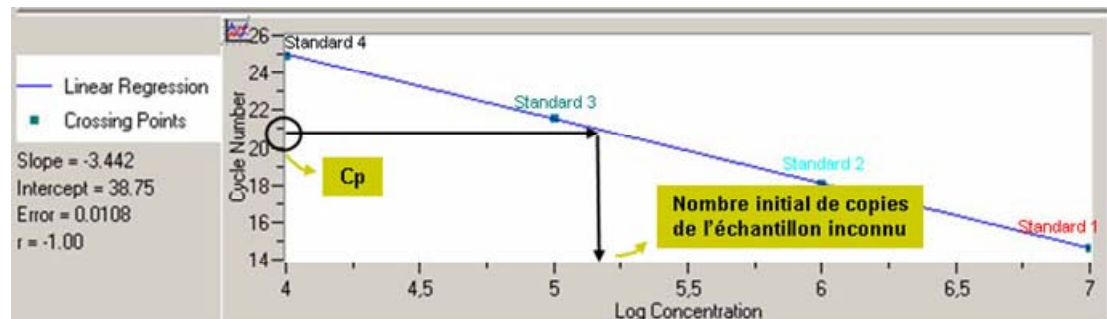
**\* La quantification absolue par étalonnage avec un standard :** La détermination d'une quantité absolue d'acides nucléiques repose sur l'établissement d'une gamme d'étalonnage à partir de plusieurs dilutions sériées d'un standard externe titré en nombre de copies. Pour chacune de ces dilutions, la cinétique de réaction PCR est suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil correspondant : Ct ou Cp (nous parlerons à présent et relativement à notre travail de Cp). Une droite d'étalonnage, exprimant la valeur des Cp en fonction de la concentration de la cible pour chaque point de gamme est ensuite tracée. La droite obtenue est validée par le calcul de l'efficacité d'amplification ( $E = 10^{-1/\text{pente}}$  ; cette efficacité doit être voisine de 2) et du coefficient de régression linéaire  $r$  qui permet de vérifier la bonne qualité des dilutions ( $r^2 \geq 0,99$ ). Il est alors possible connaissant le Cp d'un échantillon, d'en extrapoler la quantité d'acide nucléique initialement présente dans l'échantillon (**Figure 9A et 9B**). Il est impératif que l'efficacité d'amplification des échantillons soit similaire à celle de la courbe d'étalonnage (la différence d'efficacité maximale tolérée étant de 5%). Habituellement, les standards externes employés sont constitués d'une solution titrée de plasmide contenant la séquence d'intérêt, ou bien de produits de PCR contenant la séquence d'intérêt. Dans le cas de la quantification des ARNm et afin de contrôler l'efficacité de l'étape de transcription inverse, le standard

préconisé est une solution titrée, soit d'ARN recombinant, soit d'ARNc synthétique, identique à l'ARN cible natif et généré par transcription *in vitro*. La difficulté majeure d'une quantification absolue est la préparation d'un standard dont le nombre absolu de copies ou la concentration en cible d'intérêt est exactement connue, reproductible et stable durant un temps bien défini. Les stratégies de quantification absolue sont le plus souvent réservées à des applications bien particulières telles que la quantification de virus dans les liquides biologiques. Dans le cas d'échantillons cellulaires et de la détection des HPV, un gène de référence tel que le gène de albumine (Laurendeau *et al.*, 1999) est détecté parallèlement à la quantification d'un gène viral afin de mesurer la cellularité de l'échantillon. Cette stratégie répond idéalement à l'attente des cliniciens en ce qui concerne la détermination d'une charge virale absolue, la concentration en cible étant exprimée en nombre de copies de virus par cellule.

**A**



**B**



**Figure 9.** Représentation graphique de la PCR en temps réel

**A.** Exemple de cinétiques de réaction de PCR en temps réel à l'aide du logiciel LightCycler®3 (Roche). Détermination du seuil optique ou Cp (« Crossing Point ») d'un échantillon de concentration inconnue

**B.** Exemple de détermination de la concentration initiale d'un échantillon à l'aide d'une gamme et de la droite d'étalonnage

\* **La quantification relative** : Les méthodes de quantification relative permettent d'analyser la quantité de cible relativement à un gène de référence. La mesure de ce dernier a pour but de normaliser les différences liées à la quantité et la qualité des acides nucléiques extraits et de détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR. Le gène de référence doit satisfaire aux critères suivants : 1) être un gène endogène existant à l'état d'une seule copie (dans le cas d'un travail sur l'ADN) et d'expression constante (dans le cas d'un travail sur l'ARN) ; 2) être amplifié par PCR avec une efficacité similaire à celle du gène cible, quelle que soit la nature de l'échantillon étudié. Les gènes de référence les plus utilisés sont 1) pour les ADN : les gènes de structure tels que ceux de la  $\beta$ -actine, de l'albumine et de la cyclophiline. 2) pour les ARN : les gènes des sous-unités 18S et 28S des ARN ribosomiaux, la GlycérAldéhyde-3-Phosphate DesHydrogénase (GAPDH), de l'Hypoxanthine PhosphoRibosylTransférase (HPT) et de la  $\beta$ 2-microglobuline ; Le rapport cible/référence est calculé pour chaque échantillon et dans un second temps rapporté à celui d'un calibrant. Le calibrant est une solution d'acide nucléique servant de référence et contenant les gènes cibles et référence appropriés.

Deux méthodes de calcul sont proposées pour cette stratégie de quantification relative. La première est une variante de la méthode par étalonnage. Deux courbes d'étalonnage sont construites parallèlement, l'une pour le gène cible et l'autre pour le gène de référence endogène. Les quantités de gènes cibles et de gènes de référence sont déterminées puis divisées entre elles pour obtenir une valeur normalisée de la quantité de gènes cibles. Cette méthode ne nécessite donc pas l'utilisation d'un standard externe titré de façon absolue. La seconde méthode est celle que l'on appelle communément la méthode comparative des  $C_p$ . Elle permet de calculer à partir d'une formule mathématique le nombre de molécules de gènes ou de messagers contenu dans un échantillon donné. Elle consiste après co-amplification du gène cible et du gène de référence à comparer les  $C_p$  calculés à partir de l'échantillon analysé et du calibrant. Le nombre de molécules de gène (ou de transcrit) initial, normalisé par le gène de référence et relatif au calibrant est donné par la formule suivante :  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ , dans laquelle  $\Delta\Delta C_p = \Delta C_p$  (tissus analysé) –  $\Delta C_p$  (calibrant) avec  $\Delta C_p = C_p$  (gène cible) –  $C_p$  (gène de référence endogène). Comme pour toutes les méthodes de quantification, la méthode du calcul du  $\Delta\Delta C_p$  repose sur l'hypothèse que les échantillons et le calibrant ont des efficacités d'amplification égales (Meijerink *et al.*, 2001, Pfaffl, 2001).

#### 1.4.4.3. Sondes fluorescentes utilisées en PCR temps réel

\* **Les sondes non spécifiques – Les agents intercalants** : L'utilisation des agents intercalants constitue le système de détection le plus simple en PCR temps réel. L'agent intercalant le plus souvent utilisé est le SYBR<sup>TM</sup> Green I (Kubista *et al.*, 2006) qui, à chaque étape d'hybridation, s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Lorsqu'il est excité par des ultraviolets, il émet une fluorescence qui est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation. Le système est simple, sensible mais de spécificité conditionnée par le choix des amorces. Le SYBR<sup>TM</sup> Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin. Ainsi, tous les produits de PCR non spécifiques de même que les dimères d'amorces éventuellement formés vont engendrer un signal de fluorescence. Ce défaut de spécificité constitue la limite majeure des agents intercalants. La spécificité peut être contrôlée en établissant une courbe de fusion post-PCR et en déterminant la



température de fusion ou Tm (« melting Temperature ») des produits amplifiés (Ririe *et al.*, 1997, Wittwer *et al.*, 1997).

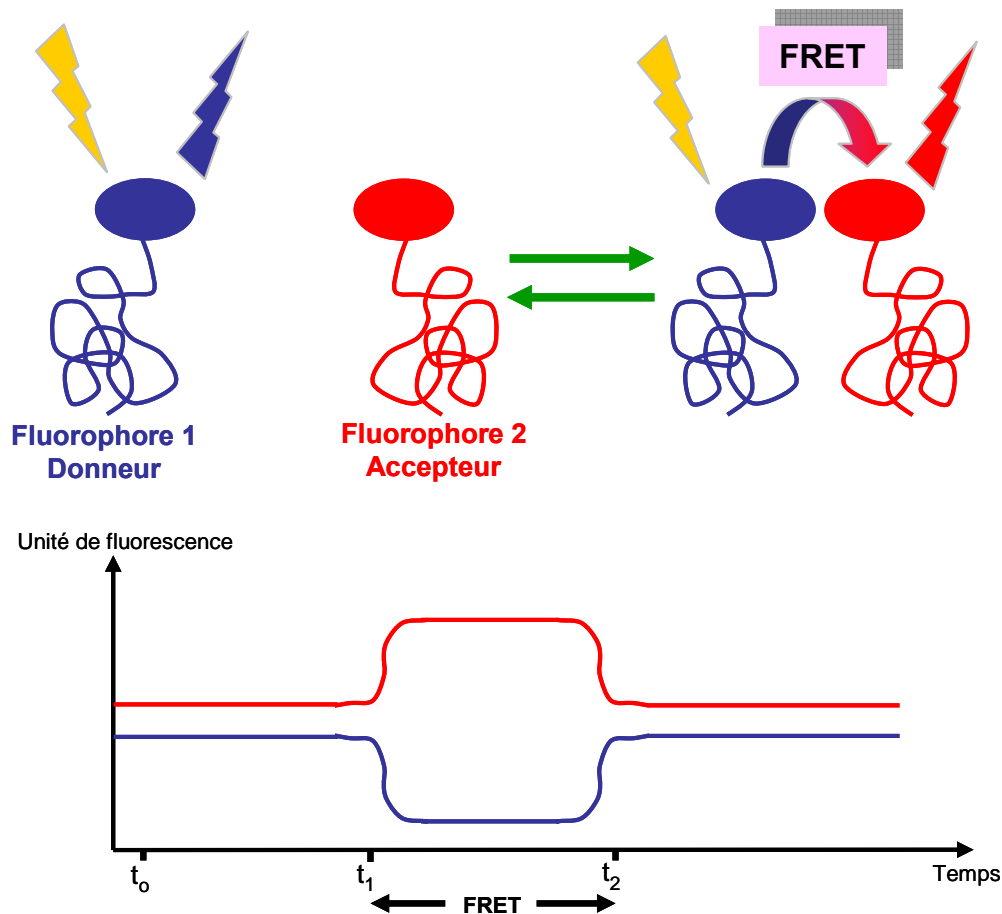
**\* Les sondes spécifiques :**

***Le principe de base : quenching par FRET :***

Les sondes fluorogéniques spécifiques sont des fragments d'ADN monobrin, non extensibles par l'ADN polymérase, spécifiques du fragment amplifié et portant un à deux groupements fluorophores. Un groupement fluorophore est une molécule capable d'absorber l'énergie lumineuse, de passer à un état excité, puis de restituer cette énergie sous forme d'une émission fluorescente en retournant à son état initial. A chaque cycle d'amplification il y a hybridation spécifique de la sonde fluorogénique sur chaque molécule d'amplicon synthétisée. La mesure de l'intensité de fluorescence émise par le groupement fluorophore excité permet de suivre en direct la réaction d'amplification d'ADN. Cependant, l'émission de fluorescence ne doit se produire que lorsque la sonde est hybridée de façon spécifique sur sa cible. Ainsi, on introduit un second fluorophore qui va absorber l'énergie émise par le fluorophore excité et empêcher l'émission de fluorescence lorsque la sonde est libre dans le milieu réactionnel. Ce processus de transfert d'énergie se fait par résonance de fluorescence ou FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfert ») entre une molécule excitée (le fluorophore donneur ou reporter) et une molécule voisine (le fluorophore accepteur ou quencher) (Chen & Kwok, 1999). L'énergie du reporter est transférée au quencher, et cette énergie peut être soit absorbée par le quencher, soit dissipée dans l'environnement, soit restituée sous forme de fluorescence ou sous forme de chaleur. Ce processus porte le nom de quenching de fluorescence. Le spectre d'émission du donneur se chevauche avec le spectre d'excitation du fluorophore accepteur, le transfert d'énergie conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence du donneur parallèlement à l'augmentation de l'intensité de fluorescence de l'accepteur (**Figure 10**).

Selon la nature du quencher participant au FRET, plusieurs systèmes de détection ont été élaborés. Les stratégies de détection les plus employées sont celles utilisant comme sondes fluorogéniques les sondes TaqMan™ ou sondes d'hydrolyse (Livak *et al.*, 1995), les sondes FRET en tandem ou sondes LightCycler™ (Zhang, 2004) et les sondes Beacon™ (Martinez-Lopez *et al.*, 2004, Tyagi, 1996). D'autres systèmes ont été développés et sont pour l'instant moins utilisés, tels que le système Scorpion™ (Whitcombe *et al.*, 1999), le système Amplifluor™ (Nazarenko *et al.*, 1997) et le système des sondes peptidiques Light-up ou sondes Peptide Nucleic Acids (PNA) (Svanvik *et al.*, 2000).

Pratiquement, un appareillage spécifique, couplant un thermocycleur à un fluorimètre, permet de mesurer la fluorescence émise à chaque cycle d'amplification.



**Figure 10.** Principe du quenching par FRET

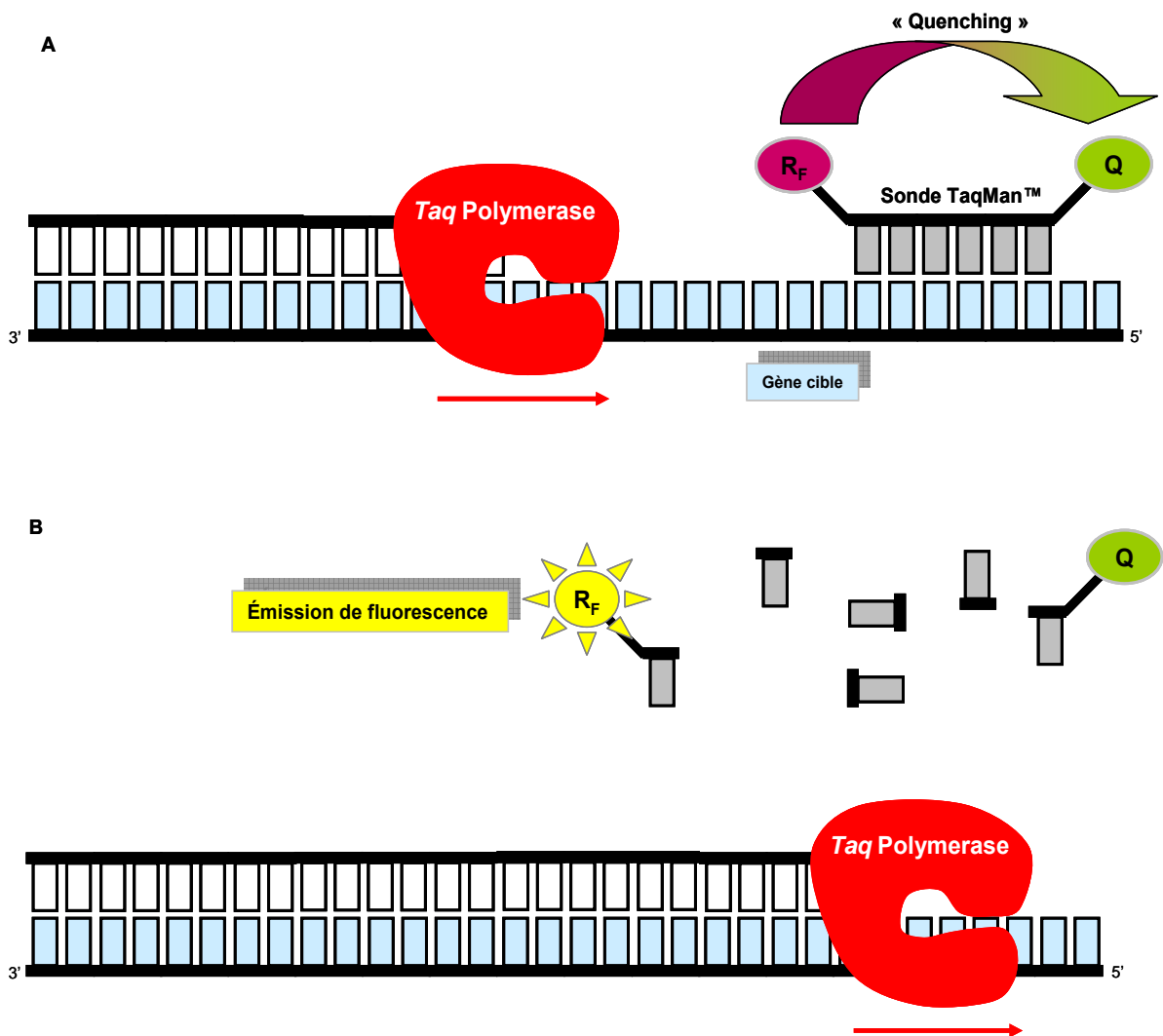
Les courbes représentent le profil caractéristique d'une expérience de FRET. Entre  $t_1$  et  $t_2$ , les deux molécules fluorescentes n'interagissent pas et émettent chacune leur fluorescence propre. Au temps  $t_1$ , sous l'effet d'un rapprochement des deux molécules, le phénomène de FRET se produit. Au temps  $t_2$ , l'interaction entre les deux molécules est interrompue, le FRET disparaît.

#### **Les sondes fluorogéniques d'hydrolyse ou sondes TaqMan™ :**

La sonde TaqMan™ est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores en 5' et 3' (Livak *et al.*, 1995). L'extrémité 5' porte le reporter qui est un dérivé de la fluorescéine (FAM, TET, JOE, HEX ou VICTM) et l'extrémité 3' porte le quencher qui est habituellement un dérivé de la rhodamine (TAMRA). La faible taille de la sonde (20 à 25 nucléotides) permet la proximité des deux groupements fluorophores, et l'énergie émise par le reporter est transférée par FRET au quencher, qui l'absorbe complètement. La particularité du système TaqMan™ est d'utiliser l'activité exonucléase 5'-3' de l'ADN polymérase qui hydrolyse la sonde hybridée à la séquence cible lors de l'étape d'élongation des amorces. Le clivage de la sonde entraîne l'éloignement des deux groupements fluorophores et libère l'effet quenching exercé par le TAMRA, ce qui a pour conséquence l'émission de fluorescence. L'intensité de la fluorescence émise est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification (**Figure 11**) (Heid *et al.*, 1996).

Ce type de sonde nécessite l'utilisation des conditions d'amplification en deux étapes : une étape de dénaturation à 94°C et une étape combinant l'hybridation des amorces et de la sonde TaqMan™, et l'élongation à une température identique aux environs de 60°C. Effectivement, la sonde ne pouvant

être hydrolysée que lorsqu'elle est hybridée à son brin complémentaire, la température d'extension des amorces doit être compatible avec la température d'hybridation de la sonde. La  $T_m$  d'une sonde TaqMan™ doit donc être élevée et voisine de 70°C, ce qui impose une conception rigoureuse des amorces. Par ailleurs, ces sondes nécessitent une ADN polymérase dotée d'une activité exonucléase 5'-3' dont l'efficacité conditionnera la qualité et l'intensité du signal émis. Le clivage de la sonde étant irréversible, l'utilisation de ce type de sonde ne permet pas l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR. L'introduction à l'extrémité 3' d'une molécule ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN ou noyau MGB (Minor Groove Binder) augmente la  $T_m$  de la sonde et stabilise son interaction avec la matrice d'ADN (Kutyavin *et al.*, 2000). Ce système appelé TaqMan™ – MGB permet de dessiner des sondes plus petites (13 à 20 nucléotides) et d'associer le groupement reporter à un quencher non fluorescent. Ceci rend alors possible la détection de deux cibles différentes (ou biplexing) au cours de la même réaction PCR. Ces modifications ont aussi permis d'étendre les applications de cette chimie au génotypage par discrimination allélique.



**Figure 11.** Le principe des sondes d'hydrolyse TaqMan™.

***Les sondes fluorogéniques FRET en tandem (sondes LightCycler™) :***

Il s'agit de deux sondes très courtes (Zhang, 2004) portant chacune un fluorophore et qui s'hybrident à proximité l'une de l'autre. La particularité de ces sondes réside dans le fait que le FRET s'effectue entre deux fluorophores séparés par moins de 5 nucléotides. La proximité des deux groupements permet un transfert d'énergie direct et très efficace : les deux sondes appariées sur leurs séquences cibles restent proches et l'énergie libérée par le donneur de haute énergie est directement captée par le fluorophore accepteur de moindre énergie qui, une fois excité émet à son tour un signal fluorescent mesurable. Le signal émis est directement lié à l'hybridation des sondes sur une cible spécifique. Cela confère une certaine flexibilité dans le choix des sondes, pouvant alors avoir des T<sub>m</sub> identiques à 2°C près et supérieurs au T<sub>m</sub> des amorces de 5 à 10°C. De plus, les sondes ne sont pas hydrolysées ce qui rend l'émission de fluorescence réversible et la production d'une courbe de fusion réalisable après PCR. Par ailleurs, avec ce type de sonde, le transfert d'énergie par FRET n'est efficace que lorsque la fluorescéine est associée à l'un des fluorophores très particuliers que sont les rouges LightCycler™, LC Red 640 et LC Red 705, ce qui limite à deux le nombre de cibles à quantifier simultanément.

***Les sondes fluorogéniques Beacon™ (sondes d'hybridation phare) :***

Une sonde Beacon™ (Tyagi, 1996) a une structure dite « en épingle à cheveux » qui porte en 5' un groupement fluorophore reporter et en 3' un groupement non fluorescent quencher appartenant à la famille des dark quencher, qui sont le Dabcyl™ (ou rouge de méthyle) et les fluorophores BHQ™ (« Black Hole Quencher™ »). Ce type de quencher, qui restitue l'énergie transmise par le donneur sous forme de chaleur, a aussi une très grande efficacité d'absorption. Les bras de la tige de cette structure en boucle résultent de l'appariement de ses extrémités complémentaires. La boucle est complémentaire de la séquence à détecter. Dans ce système la proximité des deux groupements est imposée par la structure « en épingle à cheveux » de la sonde. Lorsque la sonde s'apparie de façon spontanée à la séquence complémentaire de l'ADN elle subit un changement de conformation au cours duquel le quencher s'éloigne du reporter qui émet alors une fluorescence mesurable. Du fait des propriétés des quenchers utilisés, le bruit de fond est considérablement réduit, et la sensibilité de détection est largement supérieure à celle des systèmes avec quenchers fluorescents. Les quenchers des sondes Beacon™ constituent un groupement universel auquel peut être couplée la quasi-totalité des fluorophores employés (FAM, TET, HEX, JOE/VICTM, TAMRA, CY5, CY3, Rouge Texas...). Cette propriété fait du système Beacon™ l'outil de choix pour la détection simultanée de plusieurs cibles (multiplexage) au cours d'une même réaction PCR. L'inconvénient majeur est la difficulté de conception des sondes, dont la structure en boucle est cruciale pour garantir un fonctionnement optimum et un bruit de fond minimum.

**1.4.5. Technique d'hybridation en phase liquide : le test Hybrid Capture® II (Digene)**

La technologie Hybrid Capture® II (HCII®) (Digène, Gaithersburg, Etats-Unis) repose sur une hybridation en phase liquide avec une amplification de signal par chimiluminescence pour la détection qualitative de l'ADN cible recherché (Brown *et al.*, 1994, Schiffman *et al.*, 1995). Cette trousse se

décline sous deux versions : l'une détecte simultanément 13 types d'HPV HR : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. L'autre version est un coffret permettant de détecter 5 types d'HPV BR : 6, 11, 42, 43, 44. Le test HCII® labellisé CE, a obtenu l'agrément de la FDA (« Food and Drug Administration ») en 1997 (Villa & Denny, 2006) et l'agrément de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé (AFSSAPS) en 1998 (Monsonogo, 2007).

Après dénaturation de l'échantillon cellulaire (il n'y a pas d'étape d'extraction d'ADN), l'ADN est hybridé avec l'un ou l'autre des cocktails de sondes ARN. Les hybrides ADN/ARN sont ensuite capturés par des anticorps anti-hybrides adsorbés sur le fond des puits d'une microplaque. Des anticorps anti-hybrides couplés à une enzyme sont ensuite ajoutés et la détection finale des hybrides est réalisée grâce à l'addition d'un substrat chimioluminescent. L'intensité du signal émis est mesurée par un luminomètre.

Les prélèvements cervico-utérins validés pour le test HCII® sont les suivants :

- Le Digene Cervical Sampler™ ou cytobrosse (Pap smear®) dans milieu de transport STM® (« Specific Transport medium »).
- Les milieux de cytologie liquides : PreservCyt® (Cytoc®), Surepath® (Tripath®).

Un contrôle négatif et un calibre positif titré, ainsi que deux contrôles de qualité titrés en HPV (HPV type 6 et type 16) permettent de valider chaque série d'analyses. Les résultats sont interprétés par le logiciel qui compare la valeur de lumière relative mesurée ou RLU (« Relative Light Unit ») pour un échantillon testé par rapport au seuil de positivité clinique donné par le calibre positif. Ainsi les résultats obtenus sont positifs ou négatifs, signant la présence ou l'absence d'HPV au-delà du seuil clinique dans l'échantillon testé. Le seuil est fixé à 1 pg/mL, ce qui correspond à environ 100 000 copies de génome viral par mL de prélèvement. Cette méthode est très utilisée aujourd'hui, mais ne permet pas de connaître le ou les types d'HPV présents. Différents consensus internationaux sur l'utilisation du test HPV en pratique clinique dans le dépistage précoce des cancers du col de l'utérus ont été établis suite aux publications faites avec le test HCII® (Lazcano-Ponce *et al.*, 2003, Monsonogo *et al.*, 2006, Saslow *et al.*, 2002, Saslow *et al.*, 2003). Enfin, depuis le 1<sup>er</sup> avril 2003, le test HCII® a obtenu l'agrément de la FDA pour son utilisation en dépistage primaire en association avec l'examen cytologique chez les femmes de plus de 30 ans (Saslow *et al.*, 2003).

#### 1.4.6. Apport de la détection des HPV dans le dépistage

Malgré le succès certain de la cytologie de Papanicolaou (Pap) comme outil de dépistage du cancer du col utérin, cette technique possède des limitations importantes pour un test de laboratoire. En dépit d'une spécificité clinique adéquate, la sensibilité clinique moyenne pour la détection des CIN ou du cancer du col de l'utérus invasif est limitée (50%) (Brink *et al.*, 2006, Brink *et al.*, 2005). Ainsi, depuis les années 90, la détection de l'ADN des HPV comme outil de dépistage génère un fort intérêt. Ceci provient du fait que la détection de l'agent causal de ce cancer dans les cellules cervico-utérines selon une technique standardisée présente des performances diagnostiques acceptables, tout en étant plus reproductible et mieux adaptée à la pratique clinique que la cytologie conventionnelle. Dans le contexte de la recherche sur le dépistage du cancer du col de l'utérus, la détection des infections à HPV est utilisée pour au moins trois applications spécifiques.

#### 1.4.6.1. Dépistage primaire

A l'époque où le gouvernement américain demandait une réévaluation des programmes de dépistage du cancer du col de l'utérus, Reid et Lorincz ont été les premiers à proposer l'utilisation d'un test HPV comme complément au frottis cervico-utérin (Cullen *et al.*, 1991, Lorincz *et al.*, 1992, Reid, 1987, Reid *et al.*, 1991). Depuis, plusieurs études ont porté sur l'intérêt de la détection des HPV comparativement au frottis cervico-utérin. Dans la plupart de ces études, c'est le test Hybrid Capture® de première ou seconde génération qui a été utilisé. Ces études ont ciblé les populations européennes (Clavel *et al.*, 1999, Clavel *et al.*, 2001, Cuzick *et al.*, 1995, Dalstein *et al.*, 2004, Petry *et al.*, 2003, Schneider *et al.*, 2000), mais également africaines, asiatiques, latino-américaines, et nord américaines (Bradley *et al.*, 2006, Cox, 2006, Koliopoulos *et al.*, 2007). La plupart de ces travaux sont basés sur des études transversales où la performance du test de dépistage est évaluée par comparaison à des lésions prévalentes. A certaines études était ajouté un suivi, de façon à identifier les lésions cervicales prévalentes ainsi que les lésions incidentes à court terme. Les sensibilités et spécificités cliniques de la cytologie et de la détection d'HPV dans le cadre du dépistage primaire du cancer et des HGSIL, obtenues lors des principales études européennes, sont représentées sur la **Table 1** (Clavel *et al.*, 1999, Clavel *et al.*, 2001, Cuzick *et al.*, 1995, Dalstein *et al.*, 2004, Petry *et al.*, 2003, Schneider *et al.*, 2000).

Etude	Pays	Taille de la cohorte	Âge (années)	Test HPV	Caractéristiques de l'étude	SENSIBILITE		SPECIFICITE		Notes
						HPV	Cytologie	HPV	Cytologie	
Cuzick, 1995	Grande Bretagne	2 009	20-45	PCR HPV16, 18, 31, 33	Femmes sans anomalies cytologiques	75	46	96	96	
Clavel, 1999	France	1 518	15-72	HCII®	Femmes sans anomalies cytologiques	100	79	86	96	Recalculée pour résultats de dépistage à l'entrée dans l'étude
Cuzick, 1999	Grande Bretagne	2 981	plus de 35	HC®, HCII®, PCR MY09/11	Femmes sans anomalies cytologiques	95	79	94	94	
Schneider, 2000	Allemagne	4 761	18-70	PCR GP5+/6+		89	20	94	99	Contrôle du biais
Clavel, 2001	France	7 932	15-76	HCII®	Femmes sans anomalies cytologiques.	100	68	87	95	Tous âges. Cytologie conventionnelle
						100	88	86	93	Tous âges. Cytologie ThinPrep
						100	58	90	96	>30 ans. Cytologie conventionnelle
						100	84	88	95	>30 ans. Cytologie ThinPrep
Petry, 2003	Allemagne	7 908	plus de 30	HCII®		98	44	95	98	histo > CIN2+
Dalstein, 2004	France	3 574	15-87	HCII®		95	87	83	92	Tous âges. Pap > ASCUS
						95	65	83	99	Tous âges. Pap > HGSIL
						93	88	85	94	>30 ans. Pap > ASCUS
						93	61	85	99	>30 ans. Pap > HGSIL

**Table 1. Comparaisons des performances cliniques de la cytologie et de la détection d'HPV**

Récapitulatif des principales études européennes, dans le cadre du dépistage primaire des HGSIL et des cancers (modifié d'après Rousseau et Franco, 2003)

Considérant toutes les comparaisons entre le frottis cervical et la détection d'HPV (par PCR ou HCII®), cette dernière présente en moyenne une sensibilité plus élevée que la cytologie, mais une spécificité plus basse pour la détection des lésions de haut grade. La sensibilité moyenne du frottis cervical est de 62% et la spécificité moyenne est de 96%. En ce qui concerne le test HPV la sensibilité moyenne est de 86% et la spécificité moyenne est de 85%. En revanche, les performances du test HPV chez les femmes de 30 à 35 ans est améliorée : sensibilité de 89% et spécificité de 90% ; les infections étant plus « à risque de lésions CIN2/3+ » (c'est-à-dire, plus à risque de conduire à des lésions de haut grade) chez les femmes âgées que chez les femmes jeunes. Cependant, une telle augmentation est aussi observée avec la cytologie. Une observation importante est que la sensibilité et la valeur prédictive négative obtenues en combinant test HPV et cytologie, approche 100% (Ratnam *et al.*, 2000, Schiffman *et al.*, 2000). Ceci permet d'augmenter sans risque l'intervalle de dépistage de 1-3 ans à 3-5 ans selon la population et le profil de risque (Dalstein *et al.*, 2004).

Une récente revue d'études comparant les sensibilité et spécificité du test HPV et de la cytologie conventionnelle et regroupant plus de 60 000 femmes, a permis de montrer que la sensibilité de la cytologie était plus faible que celle du test HPV et variait considérablement entre les études (Cuzick *et al.*, 2006). La sensibilité moyenne de la cytologie pour la détection des lésions supérieures à CIN2 (CIN2+) est de 53%, mais varie de 18,6% à 76,7% selon les études. Là encore, la sensibilité est meilleure pour le groupe de femmes de plus de 35 ans que pour les femmes plus jeunes. La spécificité moyenne de la cytologie est élevée : 96,3%. Toutes les études regroupées dans cette revue montre que le test HPV est très sensible, notamment pour la détection des CIN2+ et CIN3+ de 96,1% en moyenne, et une variation de 76,5% dans les groupes de jeunes femmes et de 95,5% dans les groupes de femmes plus âgées. Un travail publié par notre équipe en 2004 a permis de montrer que le test HPV est plus sensible (94,3%) que la cytologie (65,1 à 86,8% selon le seuil défini) pour la détection des lésions supérieures ou égales à CIN2. Il est en revanche moins spécifique (83,4%) que la cytologie conventionnelle (99,3 à 91,8% selon le seuil défini) (Dalstein *et al.*, 2004). Cette différence est substantielle pour le groupe des femmes ayant moins de 35 ans, mais pour le groupe des femmes plus âgées, la différence de spécificité entre le test HPV et la cytologie conventionnelle est relativement faible. Enfin, ce travail montre également que la combinaison de la cytologie et du test HPV permet d'obtenir 100% de sensibilité et de valeur prédictive négative (Dalstein *et al.*, 2004).

Plusieurs organisations gouvernementales et non gouvernementales, associations médicales professionnelles et organismes de soins de santé ont établi des recommandations pratiques concernant le dépistage et les stratégies de prévention. Alors que certains groupes adoptent des stratégies basées essentiellement sur une analyse des résultats scientifiques provenant des études cliniques et des études épidémiologiques, d'autres interprètent ces résultats de façon plus libérale en prenant en compte des facteurs additionnels tels que les coûts d'implantation, les pratiques courantes et l'opinion de groupes professionnels. Ainsi les principales recommandations que l'on peut retenir de la conférence consensus EUROGIN 2006 sont les suivantes :

- L'utilisation du test HPV seul pour un dépistage primaire représente une méthode plus sensible que la cytologie conventionnelle dans de très nombreuses études. Des études à venir doivent permettre de définir la meilleure utilisation de ce test pour le dépistage primaire

- L'IARC a établi qu'il y avait suffisamment de preuves scientifiques pour affirmer que la détection d'HPV en utilisant un système validé, dans le cadre du dépistage primaire permettait d'obtenir des performances au moins aussi bonnes que celles obtenues par l'utilisation de la cytologie conventionnelle.

- Parce que le test HPV est plus sensible que la cytologie dans la détection des lésions de type CIN2 et CIN3, les femmes qui présentent des résultats négatifs (cytologie et test HPV) peuvent être rassurées quant au risque très faible – environ 1/1000 – de développer une CIN2, CIN3 ou un cancer du col utérin non diagnostiqué.

- L'indice de coût/efficacité du test HPV utilisé seul présente une approche très attractive (Goldie *et al.*, 2001, Goldie *et al.*, 2004).

- Il est important que le développement d'un test HPV puisse être conduit avec une validation clinique afin de s'assurer que les résultats obtenus soit objectifs et hautement reproductibles.

- Les tests HPV permettent de s'affranchir de la variabilité inter-laboratoire et inter-observateur que peut apporter la cytologie conventionnelle.

- Une détection des seuls types d'HPV 16, 18 et éventuellement 45 pourrait être utilisée dans la surveillance des femmes présentant des résultats de tests HPV positifs associées à une cytologie négative. L'importance du typage des autres types d'HPV est encore insuffisamment connue à ce jour.

- Enfin, les femmes et les cliniciens doivent être mieux informés sur la nature très fréquente et bénigne de la majorité des infections par HPV.

#### 1.4.6.2. Triage secondaire

Le triage secondaire consiste en un dépistage d'infections à HPV pour la détection de cancer du col utérin ou de lésions précancéreuses chez les femmes pour qui une cytologie anormale requiert une évaluation plus poussée. La détection des HPV sert alors à compléter l'information de la cytologie de contrôle normalement effectuée, ou bien peut se substituer à cette cytologie. Peu après l'adoption du système de classification de Bethesda, à la fin des années 80, il a été estimé que les diagnostics d'ASCUS (ASC-US et ASC-H) et de LGSIL représentaient 9,4% des frottis et jusqu'à 12,5% dans certains groupes ethniques (CDC, 1993). Cette proportion aurait eu tendance à diminuer avec les années, puisqu'il atteignait 5% en 1992 et 1993 selon une enquête du Collège des pathologistes américains (Davey *et al.*, 2000). En revanche une enquête datant de 2000 suggère une augmentation du taux médian d'ASCUS de 2,8% en 1993 à 4,5% en 1997, alors que la proportion des LGSIL serait demeurée relativement stable (Davey *et al.*, 2000). Enfin, sachant que 50% des ASCUS sont négatifs en HPV à haut risque, l'utilisation du test HPV permettrait d'éviter 50% des colposcopies (Riethmuller *et al.*, 1999, Schiffman & Solomon, 2003, Stoler, 2000, Stoler, 2003).

Lors de la conférence de consensus EUROGIN 2006, plusieurs points généraux et des recommandations ont été retenus :

- La majorité des interprétations cytologiques indéterminées sous-entend en fait un col de l'utérus normal, 6 à 11% sous-entend des CIN2 ou CIN3 et environ 1/1000 sous-entend un cancer du col de l'utérus.



- Le test HPV peut être l'outil préférentiel pour les femmes ayant un frottis diagnostiqué équivoque à partir d'un échantillon de cytologie en phase liquide.
- La forte sensibilité et la forte valeur prédictive négative du test HPV rapporté en dépistage primaire justifie l'utilisation de cet outil dans la prise en charge des femmes présentant des frottis équivoques.
- Le test HPV est efficace et plus sensible qu'une cytologie répétée dans la prise en charge des frottis équivoques.
- L'apport du test HPV est évident dans le triage des cytologies de type ASCUS ou limites, et l'European guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening, recommande son utilisation.
- Un triage par colposcopie ou par cytologie ou encore par test HPV des cytologies ASCUS ou limites, pour lesquelles un test HPV positif a été relevé, devra être choisi en fonction d'une stratification par classe d'âge spécifique.
- Les femmes pour lesquelles un diagnostic de cytologie équivoque a été réalisé et pour lesquelles le test HPV s'est révélé négatif doivent être rassurées et peuvent être recommandées pour une cytologie répétée à 12 mois.
- La première utilisation du typage des HPV pourrait être incluse dans le triage des frottis équivoques dès que les recommandations cliniques sur la prise en charge des femmes présentant des infections par les HPV 16, 18 et éventuellement 45 auront été développées.

#### 1.4.6.3. Suivi post-traitement

La détection des HPV peut aussi aider au suivi des femmes traitées et ainsi permettre une prise en charge adéquate, dans le cas où la persistance du virus augmente la probabilité de récurrence de la lésion. Le test HPV comme un « test de guérison » à 6 mois après un traitement (par conisation par exemple) est l'outil le plus sensible pour mesurer la persistance ou la récurrence d'une CIN (Alonso *et al.*, 2006, Carter *et al.*, 2006, Lu *et al.*, 2006).

Pour conclure, les différentes directions pour les investigations futures sont :

- Compléter les études s'intéressant à l'évaluation de la fréquence des lésions de haut grade en incluant le dépistage classique chez les femmes non infectées par HPV *versus* les femmes ayant une cytologie normale. Le triage-reflexe des femmes ayant des LGSIL doit aussi être évalué.
- L'évaluation de l'indice de coût/efficacité et de l'utilité clinique du test HPV pour les besoins de dépistage doit être complétée en considérant tous les facteurs économiques internationaux.
- La nécessité d'évaluer d'autres marqueurs qui permettraient d'identifier parmi les femmes infectées par HPV celles qui sont le plus à risque de développer des lésions de types CIN3+. Ceci inclu le génotypage des HPV (notamment HPV16, 18 et 45), la charge virale spécifique d'un type d'HPV, les tests de détection des ARNm E6/E7 HPV et la détection de p16.



## 2. FACTEURS VIRAUX INFLUENÇANT L'ÉVOLUTION DES LÉSIONS ASSOCIÉES AUX HPV

### 2.1. PERSISTANCE ET CLAIRANCE DE L'INFECTION HPV

Les infections par HPV sont fréquentes mais la plupart vont être éliminées spontanément (Castle *et al.*, 2005a, Castle *et al.*, 2002, Castle *et al.*, 2005b, Moscicki *et al.*, 2006). Ainsi, lors du suivi de femmes infectées par un type d'HPV donné, seule une petite proportion de cette population conservera le même type viral au cours du temps (Hildesheim *et al.*, 1994, Ho *et al.*, 1998a, Ho *et al.*, 1995, Molano *et al.*, 2003, Moscicki, 1998, Richardson *et al.*, 2003). Pour la majorité des infections, soit le virus est éliminé complètement, soit il est présent de façon latente et à un niveau indétectable dans les cellules épithéliales.

Il est néanmoins clairement établi que le risque de développer une lésion précancéreuse est proportionnel au nombre d'échantillons infectés par HPV à haut risque, pour une même patiente (Ho *et al.*, 1995, Koutsky *et al.*, 1992). Ceci suggère que la carcinogenèse résultante d'une infection par HPV HR est étroitement associée à la persistance du virus (Schiffman & Castle, 2003a, Schiffman & Castle, 2003b, Wallin *et al.*, 1999). Or, la définition de cette persistance n'est pas clairement établie, et il n'existe pas à ce jour de réel consensus permettant de statuer sur ce qui constitue un état de persistance et un état d'infection transitoire. Seules certaines études se basant sur la détection des HPV tous les 6 à 12 mois et sur l'apparition de lésions précancéreuses, peuvent prétendre à une bonne discrimination des infections persistantes de celles qui ne le sont pas. Quoiqu'il en soit une meilleure connaissance de l'histoire naturelle des épisodes infectieux propre à chaque individu, peut être obtenue par l'étude de cohortes importantes, dont les patientes bénéficient de mesures de détection multiples et répétées de la présence d'un HPV.

Il existe une véritable hétérogénéité dans les études et des méthodes d'investigations parmi les nombreuses publications à ce sujet. Celles-ci ont donné une certaine idée de l'histoire naturelle de l'infection par HPV, mais un seuil séparant les infections persistantes des infections transitoires, ne peut être clairement établi. De plus, pour les types d'HPV détectés le plus couramment (tel que l'HPV16 par exemple) il est impossible de distinguer clairement une infection persistante, d'une perte et ré-acquisition du même type viral, provenant du même partenaire sexuel ou non. Pour répondre à cette question certains experts avaient proposé la détection des variants moléculaires, ce qui aurait permis une meilleure discrimination des infections et réinfections (Franco *et al.*, 1994). Or, de nombreuses études ont montré par la suite, que la majorité des infections persistantes (et notamment celles qui concernent les types 16 et 18) mettent en jeu quasiment toujours les mêmes variants (Trottier & Franco, 2006, Trottier *et al.*, 2006, Villa *et al.*, 2000).

D'une façon générale, il a été montré que la persistance doit être spécifique d'un type précis d'HPV pour permettre l'évolution lésionnelle (Sigstad *et al.*, 2002). Bien que certains auteurs considèrent la définition de la persistance comme la présence d'un même type d'HPV sur deux

prélèvements cervico-utérins à au moins un an d'intervalle (Einstein & Goldberg, 2002), ils estiment que cette persistance concerne seulement 10 à 20% des infections (Dalstein *et al.*, 2003, Franco *et al.*, 1999, Ho *et al.*, 1998a, Richardson *et al.*, 2003).

Les facteurs influençant la durée de l'infection à HPV sont encore mal connus, mais on peut en discriminer certains parmi les facteurs liés à au virus, tels que le ou les type (s) de virus infectant (s) (*voir le chapitre « 2.2. Génotypes d'HPV et variants »*), la charge virale (*voir le chapitre « 2.3. Charge virale »*) et l'intégration virale (*voir le chapitre « 2.4. Intégration virale »*). Des facteurs environnementaux (le nombre de partenaires sexuels, la contraception orale, la parité, le tabagisme, certains facteurs nutritionnels) (que nous ne traiterons pas dans ce travail), et des facteurs liés à l'hôte qui sont notamment la mise en place et l'efficacité des réponses immunitaires (*voir le chapitre : « 3. Immunité muqueuse dans les infections et lésions associées aux HPV »*) sont susceptibles d'influencer la persistance de l'infection virale.

## 2.2. GENOTYPES D'HPV ET VARIANTS

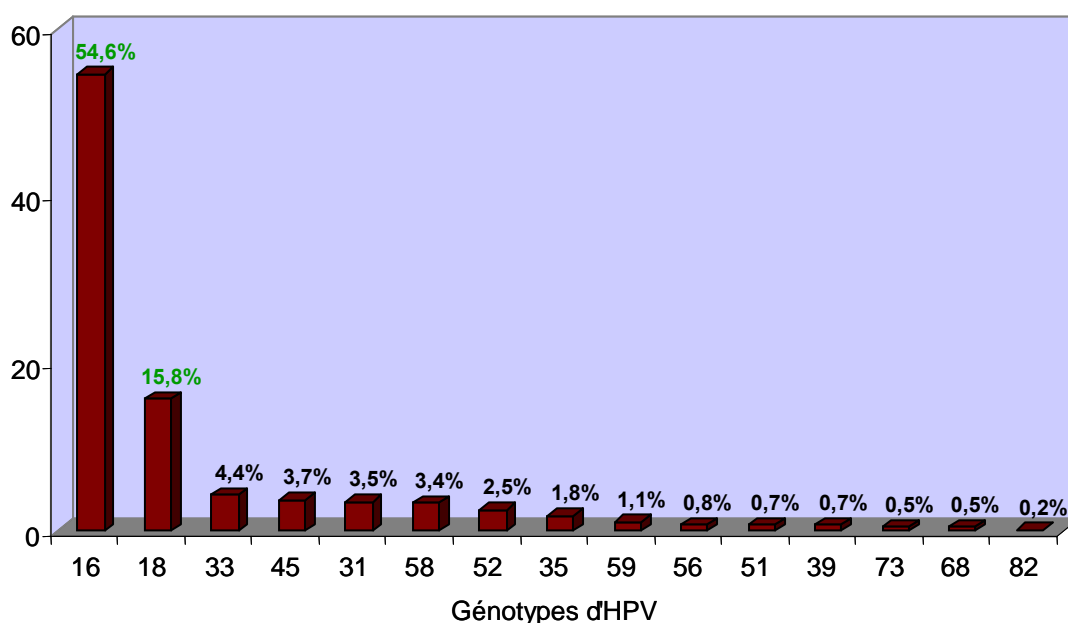
Des études ont montré que le pouvoir pathogène des HPV est en partie dépendant du type de virus infectant. Il est maintenant établi que les infections par les HPV-BR tendent à persister moins longtemps que les infections par HPV-HR. Parmi les HPV à haut risque, la durée moyenne de l'infection est plus importante pour les HPV de types 16, 18, 31, 33, 35 que pour les autres génotypes (Brisson *et al.*, 1996, Elfgrén *et al.*, 2000). De nombreuses études ont montré que l'HPV de type 16 était retrouvé dans plus de 50% des tissus tumoraux (Bosch *et al.*, 1995) et qu'il persistait plus longtemps que les autres types (Kulasingam *et al.*, 2002, Londesborough *et al.*, 1996, Molano *et al.*, 2003, Richardson *et al.*, 2003, Woodman *et al.*, 2001).

### 2.2.1. Distribution des génotypes d'HPV dans les cancers invasifs

L'IARC a publié en 2004 une analyse de 12 études effectuées dans 25 pays qui a permis d'estimer la distribution des génotypes d'HPV dans 3085 cas de cancer du col de l'utérus (Munoz *et al.*, 2004). La prévalence globale d'HPV a été estimée à 96%, et les 15 types prédominants étaient les suivants dans l'ordre d'importance décroissant : HPV16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 39, 51, 73, 68 et 66. Les types 16 et 18 sont retrouvés dans 70% des cas et les 8 types les plus fréquents 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 et 35 permettent d'expliquer 89% des cas de cancers du col de l'utérus dans le monde. Une prédominance plus forte d'HPV16 a été observée en Afrique, en Europe et en Amérique du Nord. En Afrique sub-saharienne, c'est l'HPV45 qui est trouvé le plus fréquemment dans les cancers, alors que c'est l'HPV31 en Amérique latine (Munoz *et al.*, 2004). Dans un peu plus de 4% des cancers, un ou plusieurs HPV de type indéterminé ont été détectés. Or, ces cas représentent très probablement plus un échec de détection des types connus, que des infections par des types inconnus (Clifford *et al.*, 2006a).

Une méta-analyse très complète de 85 études (dont les séries de l'étude de l'IARC) a permis de regrouper 10 058 cas de cancer du col de l'utérus dans un premier temps (Clifford *et al.*, 2003), et mis à jour récemment pour atteindre 14 500 cas en janvier 2006 (Clifford *et al.*, 2006a). Les génotypes d'HPV prédominants dans les cancers du col utérin sont apparus être les suivants (dans l'ordre d'importance décroissant) : 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 56, 51, 39, 6, 68, 73, 66 et 70 (**Figure 12**). Une fois encore, les types 16 et 18 expliquent près de 80% des cancers dans le monde entier, et les 8 types les plus fréquents (HPV16, 18, 33, 45, 31, 58, 52 et 35) sont trouvés dans 90% des cas. Par rapport à la distribution géographique des génotypes, les 8 mêmes HPV sont retrouvés de façon prédominante dans les 5 régions du monde : Afrique, Asie, Amérique du Nord, Amérique centrale/du Sud et Europe. La prévalence d'HPV16 varie de 52% en Asie à 58% en Europe, et la prévalence de l'HPV18 varie de 13% en Amérique centrale/du Sud à 22% en Amérique du Nord. De même, l'importance relative des types 31, 33, 35, 45, 52 et 58 apparaît varier en fonction de la zone géographique, notamment en ce qui concerne la prévalence de l'HPV58 qui est particulièrement importante en Asie.

Enfin, il est très intéressant de souligner que la distribution des génotypes d'HPV varie significativement entre les deux grandes formes histologiques de cancer du col de l'utérus. Ainsi, l'HPV16 est trouvé plus fréquemment (près de 60% des cas) dans les SSC que dans les ADC, et l'HPV18 est détecté plus souvent (près de 80% des cas) dans les ADC que dans les SCC (Clifford *et al.*, 2003).



**Figure 12.** Fréquence des génotypes d'HPV retrouvés dans les cancers du col de l'utérus au niveau mondial  
Données estimées sur 14 500 cas (modifié d'après Clifford, 2006)

### 2.2.2. Distribution des génotypes d'HPV dans les HGSIL

Une méta-analyse a estimé la distribution des génotypes d'HPV dans 4 338 lésions de type HGSIL (Clifford *et al.*, 2003). Une mise à jour de cette étude a été publiée récemment, représentant 7000 cas à travers le monde. Les génotypes détectés les plus fréquemment dans ces lésions sont les

suivants (en ordre d'importance décroissant) : 16, 31, 58, 18, 33, 52, 35, 51, 56, 45, 39, 66 et 6. Les 8 principaux types sont les mêmes que ceux détectés dans les cancers du col de l'utérus, avec une sous-représentation de l'HPV18 et une très faible représentativité de l'HPV45. En fonction des zones géographiques, la prévalence d'HPV16 dans les HGSIL varie de 34% en Asie, à 52% en Europe. L'HPV18 est trouvé au 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> rang des types les plus fréquents dans les HGSIL en fonction des régions, et sa prévalence varie de 6% en Europe à 10% en Amérique du Nord. L'importance des autres types (31, 33, 35, 45 et 58) varie en fonction des régions, et il est très intéressant de noter que l'HPV45 est seulement présent en Amérique Central/du Sud, dans la liste des 8 génotypes les plus fréquents dans les HGSIL.

### 2.2.3. Distribution des génotypes d'HPV dans les LGSIL

Une méta-analyse de 53 études et portant sur 8303 cas de lésions de type LGSIL a été réalisée (Clifford *et al.*, 2005b). Quarante neuf pourcent des cas provenaient d'Europe, 29% d'Amérique du Nord, et seulement 3% provenaient d'Afrique ou d'Asie. Une variation très importante de la détection d'HPV dans ces lésions a été observée en fonction des études (de 29 à 100%). Ainsi, pour les 3 plus importantes cohortes (plus de 1000 LGSIL) de cette méta-analyse, l'HPV est détecté dans 55% des cas pour l'étude croate (Grce *et al.*, 2001), 73% des cas pour l'étude Italienne (Vogolino *et al.*, 2000) et 95% des cas pour l'étude de l'ALTS Group. Ceci peut être expliqué par différents facteurs : la mauvaise reproductibilité des lectures cytologiques/histologiques, les différences de sensibilités des systèmes d'amorces de PCR utilisés, la définition histo-pathologique de la LGSIL en fonction des régions. Afin de réduire les erreurs d'interprétation, cette étude s'est basée seulement sur les LGSIL dans lesquelles une détection d'HPV a pu être effectuée, c'est-à-dire 5 910 cas. Il en résulte que l'HPV16 est le type le plus fréquemment trouvé dans ces lésions (26%), suivi ensuite par l'HPV31 (12%), l'HPV51 (11%), l'HPV53 (10%), l'HPV56 (10%), l'HPV52 (9%), l'HPV18 (9%), l'HPV66 (9%) et l'HPV58 (8%). Dans 5% des LGSIL, d'autres types d'HPV ont été détectés. Ces résultats soulignent la grande hétérogénéité de la distribution des génotypes d'HPV dans ce type de lésions (Clifford *et al.*, 2005b). Le type 16 est le plus fréquemment trouvé dans toutes les zones géographiques, mais la proportion de LGSIL attribuées à ce type varie d'une région à l'autre. Ainsi en Afrique elle est de 16%, contre 29% en Europe. De la même façon, la proportion de LGSIL attribués à HPV18 varie de 5% en Amérique Central/du Sud à 12% en Amérique du Nord.

### 2.2.4. Distribution des génotypes d'HPV dans les ASCUS

Aucune méta-analyse décrivant la distribution des types d'HPV dans les cytologies ASCUS (ASC-US et ASC-H) n'existe. Ceci est dû en partie au fait que le diagnostic ASCUS n'est pas standardisé, et que les variations inter- et intra-observateurs sont très importantes. Quoi qu'il en soit, il semble que la positivité en HPV des échantillons provenant de cytologie ASCUS varie en fonction de l'âge. Dans une étude de l'ALTS Group se basant sur 3 363 ASCUS aux Etats-Unis, 61% de ces échantillons ont été testés positifs pour HPV, en utilisant le couple d'amorces PGMY09/11 (Castle, 2005). Mais, il s'avère que cette positivité en HPV varie de 78% en ce qui concerne le groupe des femmes de 18 à 24 ans, à 32% pour le groupe des femmes de plus de 35 ans (Rodriguez *et al.*, 2007). La prévalence

des géotypes 16 et 18, dans les échantillons ASCUS positifs pour HPV, est respectivement de 24% et de 8% (Castle *et al.*, 2005b). De la même manière cette prévalence diminue avec l'âge, de 35% chez les femmes de 18 à 24 ans à 19% chez les femmes de plus de 35 ans (Rodriguez *et al.*, 2007).

#### 2.2.5. Distribution des géotypes d'HPV dans les cytologies normales

Une étude de l'IARC, regroupant des échantillons de 11 pays, a permis d'estimer la distribution des géotypes d'HPV dans les cytologies sans anomalie. Un protocole standardisé utilisant le couple d'amorces GP5+/6+ a été choisi et un total de 15 613 échantillons provenant de femmes de 15 à 74 ans ont été testés pour différents types d'HPV (Clifford *et al.*, 2005a). Les types les plus fréquemment détectés sont l'HPV16, 42, 58, 31, 18, 56, 81, 35, 33, 45 et 52. Les femmes d'Afrique Sub-Saharienne infectées par HPV sont significativement moins sujettes à une infection par HPV16 que les femmes européennes. De façon très intéressante, chez les femmes d'Amérique du Sud une distribution des géotypes intermédiaires entre les femmes d'Afrique Sub-Saharienne et les femmes européennes est retrouvée. Enfin, l'HPV35 est trouvé de façon plus fréquente en Afrique Sub-Saharienne qu'en Europe, alors que la proportion de femmes sans anomalie cytologique est la même quelle que soit la région (Clifford *et al.*, 2006a).

#### 2.2.6. Géotypes d'HPV et risque de développer des lésions

A partir de la méta-analyse de l'IARC, il a été montré que les HPV de types 16, 18 et 45 étaient significativement plus souvent détectés dans les cancers épidermoïdes (SCC) que dans les lésions de type HGSIL et LGSIL, et inversement pour les autres types (Clifford *et al.*, 2003). Ainsi, les types HPV39, 51 et 56, ainsi que les types HPV53 et 66 sont détectés respectivement 10 fois plus souvent et 30 fois plus souvent dans les LGSIL que dans les cancers du col de l'utérus (Franceschi, 2005). Ces différences soulignent l'importance des géotypes d'HPV dans le développement d'un cancer du col de l'utérus.

Or ces observations doivent être interprétées avec beaucoup de précautions et le géotypage ne doit pas être considéré comme le seul facteur prédictif du devenir d'une lésion. Effectivement, ces études permettent seulement une approche comparative de la distribution des types viraux dans les différentes lésions cervicales, mais il serait intéressant de mesurer de façon plus précise le risque de progression vers un cancer des lésions pour chaque type d'HPV détecté. Les risques de progression vers des lésions supérieures ou égales à CIN3, spécifiquement pour chaque type doivent être évaluées à partir d'études prospectives (Kahn, 2005).

Une étude a permis de montrer que les femmes infectées par HPV16 présentant des cytologies ASCUS ou des LGSIL avaient un risque absolu sur deux ans de développer des lésions supérieures ou égales à CIN3 de 14,9% pour les ASCUS, et 21,1% pour les LGSIL. En comparaison, les femmes infectées par d'autres types d'HPV à haut risque et ayant des lésions ASCUS ou LGSIL présentent un risque absolu de développer une lésion de type CIN3 ou plus de 8,1% pour les ASCUS et 9,9% pour les LGSIL. Il est intéressant de noter que pour ce groupe de femmes non infectées par HPV16, mais par un (ou des) autre (s) type (s), le risque absolu de développer une lésion de type CIN3 ou plus est

le même que le risque absolu général pour les ASCUS (8,8%) et légèrement inférieure pour les LGSIL (15,5%) (Castle *et al.*, 2005b).

Enfin, il est intéressant d'observer que les HPV53 et 66 sont considérés comme des génotypes à « haut risque probable », et sont trouvés relativement souvent dans les LGSIL et rarement dans les cancers du col utérin. Ces deux génotypes sont associés à des cancers avec des prévalences très faibles, inférieures à la prévalence de l'HPV6 (HPV BR) pour le cancer du col de l'utérus (Clifford *et al.*, 2005a).

### 2.2.7. Cas des infections multiples

Les co-infections avec 2 ou plusieurs types d'HPV différents sont fréquemment trouvées dans les études épidémiologiques. Plus de 50% des LGSIL présentent plusieurs types d'HPV (ALTS Group, 2003). Dans une étude brésilienne, plusieurs types ont été détectés lors de la même visite chez 20% des patientes (Rousseau *et al.*, 2001). Il semble que l'infection avec un type d'HPV donné ne diminue pas la probabilité d'infection par un type phylogéniquement proche. Ainsi, une étude a montré que les infections multiples sont plus fréquentes que les mono-infections et que le risque de nouvelle infection n'est pas plus faible lorsque une première infection a déjà eu lieu, et ce même avec des types phylogéniquement proches (par exemple, HPV16 et 31 ; HPV18 et 45 ; HPV6 et 11) (Thomas *et al.*, 2000). Or, il semble que les co-infections 16-18 se produisent moins fréquemment que les co-infections 16-52, 16-68 et 18-6 et 18-11 (Rousseau *et al.*, 2003a, Rousseau *et al.*, 2003b). L'importance des co-infections HPV sur la durée d'un épisode d'infection par un type d'HPV donné n'est pas clairement établie. En général, la persistance des multi-infections est comparable à celle des mono-infections, et il est difficile de comparer les études en raison de la diversité des définitions de la clairance. Ainsi, certains auteurs ont montré que les multi-infections étaient plus souvent associées à une persistance importante (Hoffmann *et al.*, 1998, Perrons *et al.*, 2005), et qu'une co-infection HPV16 avec un autre type entraînait une persistance d'HPV16 plus longue comparée à une simple infection par HPV16 (Woodman *et al.*, 2001). En revanche, il existe des études contradictoires à ce sujet et il a été montré que la persistance de l'infection HPV était indépendante des co-infections avec d'autres types (Rousseau *et al.*, 2001). Enfin en 2001, un travail de Liaw a montré que la présence d'HPV16 était associée à un risque accru de co-infection avec d'autres types sans affecter pour autant la persistance de l'infection (Liaw *et al.*, 2001).

### 2.2.8. Variants HPV

Certains auteurs se sont intéressés à l'étude de la clairance de l'infection virale, en fonction des variants d'HPV détectés, et notamment les variants d'HPV16 et d'HPV18 (Burk & DeSalle, 2006). Ainsi, Xi *et al.* ont montré que le risque de développer une lésion de type CIN3 ou un cancer du col de l'utérus est plus important pour les variants HPV16 Non Européen (NE), par rapport aux variants Européen (E) (Xi *et al.*, 2002). Ceci pourrait être dû à des différences de régulation transcriptionnelle entre les variants, ainsi qu'à des différences d'activités biologiques des protéines codées par les variants, ou à la capacité de l'hôte à monter une réponse immunitaire spécifique. Dans une étude récente, les clairances de différents variants HPV16 et HPV18 ont été observées sur une période de 2



ans pour des patientes américaines d'origine africaine et d'origine caucasienne (Xi *et al.*, 2006). Cette étude a permis de discriminer 624 cas infectés par HPV16 (560 avec un variant européen et 64 avec un variant africain) et 182 cas infectés par HPV18 (108 avec un variant européen et 74 avec un variant africain). Les variants africains (HPV16 et HPV18) sont plus souvent trouvés chez les patientes d'origine africaine et les variants européens sont plus souvent détectés chez les patientes d'origine européenne. Aucune différence n'a pu être montrée en ce qui concerne la clairance des variants africains HPV16 comparée à la clairance des variants européens HPV16, et aucune différence n'a pu être montrée en ce qui concerne la clairance des variants africains HPV18 comparée à la clairance des variants européens HPV18. En revanche, les variants européens HPV16 et 18 comparés aux variants africains présentent des temps de clairance plus long chez les femmes d'origine européenne, et les variants africains comparés aux variants européens présentent des temps de clairance plus long chez les femmes d'origine africaine (Xi *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que ces variants de types hautement oncogènes ont co-évolué avec leur hôte, et dans un second temps, que cette évolution a permis la sélection des variants qui persistaient le plus longtemps lors d'une infection. Ces observations ont permis d'établir l'existence d'un risque augmenté de développement d'un cancer du col de l'utérus qui est alors associé à un variant spécifique d'un génotype individuel particulier (Bamshad *et al.*, 2004). De façon intéressante, et à l'opposé, certaines études ont montré une augmentation du risque de développer un cancer associé aux variants non européens chez les femmes d'origines européenne, nord-américaine (Burk *et al.*, 2003) et sud-américaine (Berumen *et al.*, 2001, Grodzki *et al.*, 2006, Hildesheim *et al.*, 2001) ; et une augmentation du risque de cancer associé aux variants européens chez les femmes d'origine africaine (Tu *et al.*, 2006). Au vu de ces études, il apparaît que les variants n'ayant pas co-évolué avec une population seraient plus pathogènes (Chen *et al.*, 2005).

Ainsi, il existe donc différents génotypes d'HPV et différentes répartitions géographiques, et cette donnée doit être considérée avec intérêt dans le cadre du dépistage des lésions ainsi que dans le cadre du développement et de la distribution des vaccins anti-HPV. Une vaccination efficace en une zone géographique donnée passe nécessairement par la connaissance et la description des génotypes d'HPV présents.

## 2.3. CHARGE VIRALE

### 2.3.1 Aspects semi quantitatif et quantitatif de la charge virale (CV)

La première approche de détermination d'une charge virale HPV (CV HPV) a été réalisée en 1994 par Kaye *et al.*, dans une étude sur la transmission verticale (mère à enfant) d'une infection HPV16 (Kaye *et al.*, 1994). La technique de mesure de la CV utilisée était basée sur une mesure densitométrique par LASER des produits de PCR. Les résultats de ce travail ont montré qu'une CV HPV16 élevée était un facteur important, mais pas le seul déterminant pour une transmission de la

mère à l'enfant (Kaye *et al.*, 1994). L'association de fortes CV HPV avec l'apparition de lésions de grade élevé a été décrite rapidement par la suite (Ho *et al.*, 1995). Mais les mesures de CV HPV ont été réalisées par des outils à priori semi-quantitatifs, tels que la PCR couplée à la quantification des produits amplifiés (Ho *et al.*, 1995) et le test de détection des HPV Hybrid Capture® (Melbye *et al.*, 1996). Il faut attendre l'année 1997 pour que la notion de détermination semi quantitative d'une CV HPV apparaisse. Ainsi par la technique des PCR différentielles, utilisant des amorces consensus et des amorces spécifiques en parallèle, une mesure de CV HPV a été réalisée sur des échantillons de cytologie. Les résultats ont permis de montrer que les CV HPV élevées pouvaient être un facteur important dans la progression des CIN, et que dans le cadre d'une pratique clinique, l'utilisation de la technique des PCR HPV différentielles pour déterminer une CV pouvait améliorer la prise en charge des lésions du col utérin (Ikenberg *et al.*, 1997). Les auteurs prennent ainsi conscience que l'amélioration de la détection des lésions cervicales se fera par une amélioration des outils de détection de l'ADN d'HPV et pourquoi pas par la mise au point d'outils de mesure de la CV HPV (Coutlee *et al.*, 1997). Par la suite, plusieurs études se sont intéressées aux valeurs données par le test Hybrid Capture® (HC®) dans le cadre d'une détermination de la CV. Certains auteurs ont ainsi considéré les résultats du test HC® comme étant quantitatifs, d'autres comme des données semi-quantitatives, au même titre que des techniques de PCR conventionnelles qui seraient suivies par une mesure densitométrique des produits de PCR. Les premiers résultats ont été relativement controversés ; certains, ne montrant pas d'association entre la valeur de CV HPV et le grade des lésions (Clavel *et al.*, 1998a, Clavel *et al.*, 1998b, Forslund *et al.*, 1997), d'autres montrant en revanche une association (Almog *et al.*, 2003, Coutlee *et al.*, 1997, Ho *et al.*, 1998b).

Avec l'arrivée du test Hybrid Capture® de seconde génération (HCII®), les travaux étudiant l'association entre CV HPV et grade et/ou progression des lésions se sont multipliés. Il est rapidement apparu que les hautes valeurs de RLU du test HCII® étaient corrélées à des grades élevés de lésions et/ou à un risque accru de progression des lésions (Dalstein *et al.*, 2003, Hernandez-Hernandez *et al.*, 2003, Nindl *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 2002, Woodman *et al.*, 2001). Mais, même si de faibles CV restent associées généralement à un état de normalité microscopique ou éventuellement à des lésions de type LGSIL, l'importance d'un éventuel pronostic clinique associé à des lésions de grade plus sévère dans le cas de CV élevées n'est pas complètement établi, et ne peut reposer sur cette seule observation. Effectivement, des CV élevées peuvent être associées avec des lésions de type LGSIL qui régressent, d'autant plus que ces lésions sont vraisemblablement productives au même titre que des lésions condylomateuses associées aux HPV à bas risque.

Au sein de notre équipe, nous avons pu montrer que dans le cas d'une infection HPV persistante chez 127 patientes, le risque relatif de développer une HGSIL est le même pour les femmes de plus de 30 ans que pour les femmes plus jeunes. Ce risque est également le même pour les femmes ayant un frottis anormal par rapport à celles ayant un frottis normal. Mais la charge virale donnée par le test HCII® influence le risque relatif de développer une HGSIL : avec une valeur de 1 pour les valeurs de charge virale inférieures à 10 pg/mL, ce risque passe à 2,7 pour les valeurs de charges virales supérieures à 100 pg/mL (Dalstein *et al.*, 2003). Les résultats des travaux se basant sur l'utilisation des valeurs HCII® pour la détermination d'une CV ont été longtemps controversés, puisque

aucune normalisation de la valeur de charge virale par le nombre de cellules présentes dans l'échantillon n'était apportée, et qu'il est impossible, par cette technique, de différencier les multi-infections des mono-infections (Moberg *et al.*, 2004). Une équipe a d'ailleurs montré par plusieurs études que malgré les excellentes performances analytiques et cliniques du test HCII®, les valeurs données, à l'instar de celles du test de première génération, ne permettaient pas d'associer CV et grade et/ou progression des lésions (Bory *et al.*, 2002, Clavel *et al.*, 1998a, Clavel *et al.*, 1999, Clavel *et al.*, 2000, Clavel *et al.*, 1998b).

### 2.3.2. Apport de la PCR en temps réel dans la mesure de la charge virale

La mise au point des techniques visant à évaluer la charge virale de manière quantitative est récente, et date du début des années 2000 avec l'avènement de la PCR en temps réel. Effectivement, un premier travail utilisant une technique de PCR en temps réel avec des sondes TaqMan® spécifiques des HPV16, 18, 31 et 45 a montré une association entre les valeurs élevées de CV et le grade élevé des lésions (Swan *et al.*, 1999). Aujourd'hui, les techniques basées sur la PCR en temps réel représentent la meilleure approche de quantification de l'ADN des HPV. Elles possèdent aussi une rapidité et une reproductibilité qui sont supérieures à ce que l'on peut obtenir avec les techniques semi-quantitatives de PCR classique et les tests de détection d'HPV. La PCR en temps réel permet une véritable quantification de l'ADN viral grâce à l'utilisation d'une gamme d'étalonnage obtenue à partir de standards (Gibson *et al.*, 1996, Heid *et al.*, 1996).

La quantification d'un gène de référence cellulaire en parallèle de la quantification d'un nombre de copies virales permet de normaliser la CV en fonction d'un nombre de cellules (Moberg *et al.*, 2003). Pour cela, il s'avère nécessaire de quantifier un gène cellulaire tel que la  $\beta$ -globine (Hart *et al.*, 2001, Lefevre *et al.*, 2004, Swan *et al.*, 1999), la GAPDH (Gravitt *et al.*, 2003b) ou encore l'albumine (Laurendeau *et al.*, 1999).

La nature des échantillons à partir desquels ces techniques de PCR en temps réel peuvent être appliquée est très diverse. Ainsi, il est possible d'utiliser des lignées cellulaires, des biopsies, des lavages cervico-utérins, des résidus liquides provenant de prélèvements par cytobrosse (cytologie conventionnelle ou en phase liquide), des résidus liquides provenant du milieu de transport Digene (Hart *et al.*, 2001, Lefevre *et al.*, 2004, Lefevre *et al.*, 2003).

La PCR en temps réel permet de déterminer une CV spécifique d'un type donné de virus, contrairement aux valeurs données par le test HCII® qui correspondent à la détection semi-quantitative de 13 types d'HPV à haut risque. Les amorces ciblent le plus souvent les séquences des gènes E6 et E7, mais quelques études ont apporté l'utilisation de séquences du gène L1 (Depuydt *et al.*, 2006, Fontaine *et al.*, 2005, Hart *et al.*, 2001). De part sa prévalence dans les lésions cervicales de grades sévères (supérieures ou égales à CIN2), l'HPV16 est le génotype le plus quantifié dans les différentes études (Gravitt *et al.*, 2003b, Peitsaro *et al.*, 2002, van Duin *et al.*, 2002). La quantification de la CV HPV16 s'est rapidement présentée comme un outil intéressant dans les travaux sur d'autres pathologies associées à HPV, et notamment au niveau d'autres types de muqueuses (Klussmann *et al.*, 2001a, Klussmann *et al.*, 2003, Klussmann *et al.*, 2001b, Mellin *et al.*, 2002, Weinberger *et al.*, 2006). Les CV des autres génotypes viraux ont aussi pu être déterminées par l'utilisation de la PCR

en temps réel : 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66 et 68 (Depuydt *et al.*, 2006, Flores-Munguia *et al.*, 2004, Flores *et al.*, 2006, Gravitt *et al.*, 2003a, Moberg *et al.*, 2004, Swan *et al.*, 1999). Hart *et al.*, ont publié un travail se basant sur l'utilisation du couple d'amorces GP5+/6+ (Jacobs *et al.*, 1997), et d'un système de sonde Scorpion™, ciblant la POL L1 d'HPV. Grâce à ce système consensus on peut ainsi détecter 20 types d'HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 et 68) (Hart *et al.*, 2001). Or, au vu de la prévalence des multi-infections HPV au niveau de l'épithélium cervico-utérin, ce système ne permet pas de déterminer une CV véritable, puisque par définition, elle doit être spécifique d'un type donné. Le risque de réactions croisées entre les différents génotypes est important, car techniquement il est nécessaire que les amorces soient sélectionnées afin d'amplifier des séquences très courtes (de 40 à 150 paires de bases), ce qui augmente le risque d'amplifications aspécifiques. Or, la mise au point d'une technique de PCR en temps réel est très longue et doit absolument être accompagnée d'études de reproductibilité, spécificité et sensibilité avant d'être validée. Et les auteurs ont compris que cette validation était une étape obligatoire avant l'utilisation de ces technologies pour des études à plus ou moins grande échelle, et ainsi quelques études ont été réalisées dans ce but. C'est le cas notamment en ce qui concerne les PCR en temps réel ciblant l'HPV16 et l'HPV18 (Gravitt *et al.*, 2003b) et 8 PCR en temps réel ciblant les HPV16, 18, 31, 39, 45, 51, 52 et 58 (Flores-Munguia *et al.*, 2004).

Enfin, la détermination d'un seuil de détection (analytique et clinique) représente une notion indispensable à intégrer dans les travaux se basant sur la quantification de l'ADN d'HPV. Ce seuil de détection est nécessaire (mais pas suffisant) pour permettre de discriminer en fonction de la CV HPV les infections « non à risque de CIN2+ » des infections « à risque de CIN2+ », qui sous-entendent une progression des lésions vers un grade plus sévère (Snijders *et al.*, 2006, Snijders *et al.*, 2003, van Duin *et al.*, 2002).

### 2.3.3. Applications de la mesure de la charge virale

En 2000 deux études importantes ont été publiées par une équipe suédoise. Une première étude regroupant plus de 400 cas de carcinomes *in situ* du col utérin et plus de 600 femmes sans lésion a permis de déterminer que la CV HPV16 mesurée par PCR en temps réel, est un facteur déterminant dans le développement du cancer du col de l'utérus (Josefsson *et al.*, 2000). Un second travail a permis d'observer l'évolution de la charge virale HPV16, mesurée par PCR en temps réel à partir d'échantillons de cytologie, durant une période allant jusqu'à 26 ans chez des femmes qui ont développé un cancer *in situ* et chez les femmes qui n'ont pas développé de lésion. Le résultat de cette étude montre que les femmes ayant de très fortes charges virales ont 30 fois plus de risque de développer un cancer que les autres sur une période de 10 ans (Ylitalo *et al.*, 2000).

La CV HPV et notamment la CV HPV16, serait corrélée à la sévérité du diagnostic histologique. Ainsi, les charges virales généralement inférieures à 100 copies par cellule, sont trouvées fréquemment pour les épithéliums normaux ou avec une dysplasie légère, et les charges virales supérieures à 1 000 copies par cellule sont mesurées dans les cas de dysplasie modérée ou sévère. (Gravitt *et al.*, 2003a, Sun *et al.*, 2001, van Duin *et al.*, 2002). Mais, ce phénomène n'est pas retrouvé pour l'HPV18, 31, 33, 45 et 56 (Gravitt *et al.*, 2003a, Weissenborn *et al.*, 2003). Il semblerait que la

charge virale soit spécifique des génotypes au même titre que la persistance et que la clairance virale, puisque certaines études montrent que seule la charge virale de l'HPV16, et pas celle des autres types, est corrélée au grade élevé des lésions (Lorincz *et al.*, 2002, Ylitalo *et al.*, 2000, Zerbini *et al.*, 2001). Une étude rétrospective de l'évolution de la CV HPV16 chez des patientes ayant des cytologies normales et anormales a permis de définir la charge virale comme un indicateur du potentiel d'évolution d'une infection et donc d'une lésion (van Duin *et al.*, 2002). Les patientes présentant des CV élevées ont un risque accru de développer des lésions de haut grade (supérieure ou égale à CIN2) (Abba *et al.*, 2003, Schlecht *et al.*, 2003a, Schlecht *et al.*, 2003b, van Duin *et al.*, 2002). De la même manière, une CV élevée en HPV16, 18 et 45 est corrélée avec un risque élevé de développer un cancer invasif du col de l'utérus (Moberg *et al.*, 2005). Par ailleurs, il paraîtrait logique de trouver des charges virales faibles dans les lésions cancéreuses, en raison de l'intégration virale. Effectivement, il a été observé que très peu de virus sont produits dans les cancers du col de l'utérus, phénomène qui est lié probablement à l'intégration du génome HPV dans le génome de la cellule hôte. Cependant, les choses sont loin d'être simples, puisqu'il a été montré que la cohabitation au sein d'une même lésion de formes intégrées et épisomales est possible (Kalantari *et al.*, 2001, Peitsaro *et al.*, 2002). Ainsi, bien que la charge virale HPV et notamment la CV HPV16 soit corrélée à l'apparition d'un cancer du col utérin, son utilité ainsi qu'une valeur seuil prédictive restent encore à déterminer. Beaucoup d'incertitudes sont dues aux variations d'échantillonnage et aux différentes méthodes de mesures utilisées dans les différentes études. Il faut rajouter à cela les différences que l'on peut trouver dans les classifications histologiques des lésions, et l'interprétation des résultats de ces études apparaît très difficile.

Enfin, la mesure de la CV HPV après traitement chirurgical de la lésion du col de l'utérus pourrait constituer un marqueur pronostique important du geste thérapeutique. Effectivement, il a été montré que les CV HPV élevées mesurées avant résection chirurgicale diminuaient de façon très rapide après le traitement (Lillo *et al.*, 2005, Song *et al.*, 2006)

## 2.4. INTEGRATION VIRALE

### 2.4.1. Premières approches de l'étude de l'intégration virale

C'est au début des années 80 que les études sur l'intégration des HPV dans le génome de la cellule hôte ont commencé à être publiées. Notamment, grâce aux travaux de Gissmann *et al.* qui soupçonnaient l'intégration d'HPV6 dans certains types de pathologies génitales telles que les verrues génitales (condylomes acuminés) et les tumeurs de Buschke-Lowenstein sans pouvoir le prouver et ce qui n'est pas le cas (Gissmann *et al.*, 1982). Et c'est en 1986 que K. Syrjanen publie une revue dans laquelle il propose l'hypothèse que les transformations malignes de l'épithélium utérin sont conditionnées essentiellement par le type d'HPV et la propriété d'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Selon lui, les HPV16 et 18 sont les seuls génotypes capables d'exister sous forme intégrée dans les cellules infectées (Syrjanen, 1986).

Les premières techniques utilisées pour déterminer le statut physique des HPV étaient basées sur une digestion enzymatique de l'ADN par *Bam*H 1 suivie d'un Southern blot. Le génome d'HPV ne présentant qu'un seul site *Bam*H 1, les formes épisomales migrent à 8000 pb environ, alors que les formes intégrées migrent sous forme de bandes de tailles variables en fonction du site d'intégration (Cullen *et al.*, 1991).

Il a été montré par hybridation *in situ* (HIS), que l'intégration des HPV (notamment des types 16 et 18) était retrouvée régulièrement dans les lignées de cellules cancéreuses (HeLa, CaSki, SiHa) mais aussi dans les cancers *in situ* et invasifs du col utérin (Shirasawa *et al.*, 1986, Shirasawa *et al.*, 1987). De plus, les formes intégrées co-existeraient avec les formes épisomales (Choo *et al.*, 1987b). L'intégration comme un facteur pronostique de progression des lésions est même proposé par Schneider-Maunoury *et al.*, qui ont détecté par HIS des phénomènes d'intégration dans les lésions précancéreuses du col de l'utérus (Schneider-Maunoury *et al.*, 1987). Parallèlement à cela, les sites d'intégration des HPV dans le génome cellulaire sont étudiés, notamment par HIS. Et il apparaît rapidement pour certains auteurs que l'intégration d'HPV se fait au hasard (Mincheva *et al.*, 1987). En revanche, une étude de Popescu *et al.* sur les cellules HeLa a permis de définir 4 sites d'intégration de l'HPV18, dont 3 sont à proximité d'oncogènes cellulaires, dont *c-myc*, et tous étant à proximité de « zones fragiles » (Popescu *et al.*, 1987). D'autres études, incluant plusieurs autres lignées cellulaires infectées par différents types d'HPV, ont confirmé ceci par la suite : les HPV sont le plus souvent intégrés à proximité d'oncogènes cellulaires (*c-myc*, *c-raf-1*, *c-src-1*) (Ambros & Karlic, 1987, Cannizzaro *et al.*, 1988, Couturier *et al.*, 1991, Durst *et al.*, 1987, Popescu & DiPaolo, 1990). Il s'est également avéré que la linéarisation du génome viral entraînait une délétion invariable de la POL E2 d'HPV16 (Choo *et al.*, 1987a, el Awady *et al.*, 1987, Schneider-Maunoury *et al.*, 1987), et que les POL E6 et E7 étaient quant à elles systématiquement conservées (Choo *et al.*, 1987a).

L'apparition de systèmes d'amplification couplés aux techniques d'hybridation *in situ*, a permis d'affiner les résultats obtenus jusque là. Ainsi en 1991, Cullen *et al.* se sont intéressés à déterminer le statut physique des HPV dans 181 lésions intra épithéliales et cancers invasifs. Quatre vingt un pourcent des lésions présentaient des formes intégrées d'HPV, et parmi les lésions induites par HPV16, 72% présentaient des formes intégrées et 11% seulement des formes épisomales. Il s'avère de façon assez contradictoire avec les résultats publiés jusqu'à ce jour, que l'intégration d'HPV16 dans les carcinomes n'est pas une constante, et que ce phénomène n'est pas toujours requis pour induire la progression maligne des lésions (Cullen *et al.*, 1991). En revanche, en ce qui concerne les lésions induites par HPV18, la forme intégrée de ce génotype est observée dans 100% des cas, seulement une lésion sur les 23 étudiées présente les deux formes du virus, intégrée et épisomale. Ce qui sous-entend que l'efficacité de transformation de ce génotype est supérieure à celle de l'HPV16, indiquant par la même que l'HPV18 serait associé à des cancers plus agressifs (Cullen *et al.*, 1991).

Avec le développement des techniques de PCR au début des années 1990, de nouvelles données sont venues compléter ces premières approches. Très vite, des techniques de PCR ciblant le gène E2 et E1 ont été développées afin de discriminer les formes épisomales des formes intégrées du virus. C'est Das *et al.* qui pour la première fois ont mis au point une technique de PCR permettant de

distinguer les formes épisomales des formes intégrées de l'ADN d'HPV16 (Das *et al.*, 1992a, Das *et al.*, 1992b). Pour cela, des amorces spécifiques de la POL E2 ont été utilisées, permettant la détection d'un fragment de 1 139 paires de bases. En appliquant cette technique à 122 échantillons provenant de lésions dysplasiques de tout grade et de cancers invasifs, et en comparant les résultats à ceux donnés par les techniques de Southern blotting, il ont montré que 70% des cancers invasifs présentaient des formes intégrées d'HPV16 contre 23% pour les dysplasies et les cancers *in situ* (Cullen *et al.*, 1991, Das *et al.*, 1992a). Ces observations rejoignent celles de Cullen *et al.* dans la mesure où pour 30% des cancers il ne peut pas détecter d'intégration d'HPV par sa technique de PCR ciblant E2. Les auteurs suggèrent que ce phénomène n'est pas nécessaire à la progression maligne des lésions et que d'autres mécanismes interviennent (Das *et al.*, 1992b). Ces résultats permettent de proposer que l'intégration du génome d'HPV à celui de la cellule hôte puisse passer par une linéarisation de l'ADN suite à une coupure au niveau d'une région différente à la POL E2. Ainsi, une étude a pu montrer qu'une séquence de 1 465 paires de bases allant des POL E1 à E2 était généralement délétée lors de l'intégration de l'ADN viral, et que la perte de cette séquence peut s'avérer un marqueur intéressant de l'intégration (Chen *et al.*, 1994).

Des formes mixtes (intégrées et épisomales) peuvent aussi co-exister dans les lésions, et il s'avère que la fréquence des lésions avec des formes intégrées du génome d'HPV augmente avec la gravité des lésions du col de l'utérus (Berumen *et al.*, 1995, Daniel *et al.*, 1995, Das *et al.*, 1992a, Das *et al.*, 1992b, Grayson *et al.*, 1996, Kalantari *et al.*, 2001, Tonon *et al.*, 2001), mais aussi des lésions d'autres muqueuses (Fife *et al.*, 1996a, Gillison *et al.*, 1999, Holm *et al.*, 1994, Rodrigo *et al.*, 2001, Sanchez-Lanier *et al.*, 1994, Suzuk *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 1994a, Suzuki *et al.*, 1994b).

Enfin, les techniques de PCR et de Reverse Transcriptase (RT-) PCR ont permis de confirmer les résultats de Cullen *et al.*, publiés en 1991 (Cullen *et al.*, 1991) et montrent que le phénomène d'intégration est dépendant du type d'HPV. Effectivement, une étude a montré que différents profils d'intégration sont retrouvés pour HPV16 et HPV18. Soixante dix pourcent des cancers induits par HPV16 abritent uniquement des formes intégrées d'HPV, 20% abritent des formes mixtes et 10% abritent uniquement des formes épisomales ; alors que 100% des cancers induits par HPV18 abritent uniquement des formes intégrées (Park *et al.*, 1997). Cette étude a permis de montrer par RT-PCR que l'expression des transcrits E6 et E7 est corrélée au statut physique de l'ADN d'HPV. La détection de l'ARNm de E2 par RT-PCR est possible uniquement dans les cas où des formes épisomales ou mixtes sont détectées, et de manière plus sensible que la détection de la perte de la POL E2 par PCR, de part le nombre de copies disponibles. Ceci suggère que la RT-PCR puisse constituer une technique plus adaptée à la détection des formes du génome d'HPV (Park *et al.*, 1997). D'ailleurs plusieurs études conduites sur des prélèvements provenant du col de l'utérus, mais aussi d'autres tissus, ont confirmé cette hypothèse (Al-Bakkal *et al.*, 1999, Hudelist *et al.*, 2004, Kim & Taylor, 2003).

Des techniques de PCR multiplexes permettant de détecter à la fois l'ADN viral total (en ciblant E6) et l'ADN épisomal (en ciblant E2) ont été mises au point, afin d'étudier l'intégration d'HPV (Brestovac *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 1994, Lukaszuk *et al.*, 2003, Yoshinouchi *et al.*, 1999). Des techniques de PCR particulières (Ligation-mediated PCR) ont aussi été développées afin de détecter

les séquences du génome d'HPV intégrées (DIPS-PCR) dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus, permettant ainsi de définir précisément les sites d'intégration et les séquences délétées au cours de l'intégration virale (De Marco *et al.*, 2007, Luft *et al.*, 2001). Enfin, des techniques couplant la PCR à l'hybridation *in situ* utilisant des système d'amplification fluorescent (FISH) sont toujours utilisées afin de localiser l'ADN d'HPV dans les cellules infectées à partir d'échantillons fixés sur lame (Bryan *et al.*, 2006, Hopman *et al.*, 2005, Ragin *et al.*, 2004).

#### 2.4.2. Apport de la PCR en temps réel dans la mesure de l'intégration virale

Il s'est avéré avec le développement des techniques de PCR en temps réel, qu'il était envisageable de pouvoir quantifier l'intégration virale en terme de pourcentage de formes intégrées, mixtes et épisomales. De nombreuses études se sont donc appuyées sur ces nouvelles technologies pour proposer des techniques de quantification de l'intégration. Les techniques de PCR en temps réel dans la détection du statut physique d'HPV se sont révélées novatrices dans l'apport d'une notion quantitative de ce phénomène d'intégration virale.

Une équipe finnoise a donc mis au point une technique de PCR en temps réel permettant de détecter et de quantifier l'intégration d'HPV16 (en choisissant de cibler le gène E2 et le gène E6) dans 31 échantillons d'ADN provenant de cellules cervico-utérines : certaines provenant de lésions CIN1, CIN2 et CIN3, d'autres non. Les auteurs ont observé que seulement 4 échantillons sur 31 présentaient uniquement des formes intégrées d'HPV, et que seul 1 échantillon présentait uniquement des formes épisomales. Disposant des données d'évolution des lésions, cette étude rétrospective a permis d'observer que l'intégration du génome d'HPV est une étape qui peut apparaître précocement dans des lésions CIN1, voire même lorsque l'infection par HPV ne conduit pas à l'apparition de lésions. La particularité de ce travail est qu'il a permis d'associer la charge virale (CV) HPV16 avec des taux d'intégration et de définir que les fortes CV HPV16 et des formes mixtes du génome d'HPV étaient liées à une progression rapide (en moins de deux ans) des lésions vers des grades plus sévères (Peitsaro *et al.*, 2002). Cette première étude n'a pas permis de définir de façon claire des seuils de taux d'intégration comme marqueurs prédictifs d'évolution des lésions.

D'une façon générale, il semble que l'augmentation de la proportion de lésions abritant des formes intégrées d'HPV est corrélée avec la sévérité de la lésion (Andersson *et al.*, 2005, Cheung *et al.*, 2006, Ueda *et al.*, 2003), mais des formes intégrées peuvent être détectées dans les lésions de bas grade (De Marco *et al.*, 2007, Kulmala *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que pour des CV qui ne diffèrent pas significativement, les formes intégrées d'ADN d'HPV16 sont observées plus fréquemment dans les cancers que dans les lésions CIN2/3 (Guo *et al.*, 2006). Ces résultats permettent de renforcer l'hypothèse que la mesure du taux d'intégration puisse constituer un facteur prédictif de l'évolution des lésions CIN. Kulmala *et al.* ont observé que dans les lésions de bas grade (LGSIL) et dans les frottis avec des atypies cellulaires (ASC-US), le taux d'intégration d'HPV16 est d'autant plus élevé que l'âge des patientes est élevé (Kulmala *et al.*, 2006). D'autres auteurs se sont intéressés à la quantification de l'intégration, dans d'autres tissus que la muqueuse du col utérin. De façon assez surprenante, il apparaît que l'intégration du génome d'HPV joue un rôle important dans la développement des cancer de l'œsophage (Si *et al.*, 2005), alors que cette relation semble plus



controversée en ce qui concerne le développement de cancers de la cavité oro-pharyngée (Ha *et al.*, 2002, McKay *et al.*, 2005).

La majorité des études s'est focalisée jusqu'alors à l'intégration des génomes de l'HPV16 et dans une moindre mesure de l'HPV18 dans les lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin. Néanmoins, il est intéressant de noter, que d'autres génotypes d'HPV peuvent être observés sous forme intégrée dans le génome de la cellule hôte. Ainsi, une étude s'est intéressée aux génotypes 52 et 58, qui sont trouvés plutôt rarement dans les cancers du col de l'utérus. Il s'est avéré que les HPV52 et 58 étaient trouvés sous forme intégrée dans respectivement 25 et 12,5% des cancers (alors que l'ADN des HPV16 et 18 est trouvé intégré dans 82 et 100% des cancers). Ce qui souligne que l'intégration de ces génotypes n'est pas un pré-requis au développement d'un cancer (Ho *et al.*, 2006).

Même si la signification des taux d'intégration en fonction du grade des lésions n'est pas claire actuellement, il a été montré dans une étude comparant les cancers invasifs et des cancers *in situ*, induit par HPV16, que des différences significatives pouvaient être trouvées. Ainsi, dans les cancers invasifs, l'ADN de l'HPV16 est dans 40% des cas sous forme épisomale, dans 46% des cas sous forme mixte et dans 15% des cas sous forme intégrée, alors que dans les cancers *in situ*, le génome viral est à 70% sous forme épisomale, à 29% sous forme mixte et à 9% sous forme intégrée (Arias-Pulido *et al.*, 2006). Cette étude indique que des délétions sont observées dans les gènes E1 et E2, et que ces délétions touchent le plus fréquemment la POL E2 d'HPV16 située entre les nucléotides 3243 et 3539. Mais il est proposé aussi que dans les lésions abritant des formes mixtes de génome d'HPV, la protéine E2 exprimée à partir des formes épisomales pourrait réguler l'expression des gènes E6 et E7 des génomes viraux intégrés à l'ADN de la cellule hôte (Arias-Pulido *et al.*, 2006). Ainsi, la mesure de l'expression des transcrits d'HPV, tels que E6, E7 mais aussi E1 et/ou E2 pourrait constituer un outil intéressant dans la détermination de marqueurs prédictifs de l'évolution des lésions.

#### 2.4.3. Intégration virale et quantification des ARNm

La détection de transcrits d'HPV dans des échantillons cervico-utérins a été en premier lieu réalisée par des techniques de RT-PCR classiques. Aujourd'hui un test de détection est commercialisé (PreTect HPV-proofer®, Norchip) pour les 5 principaux HPV à haut risque (16, 18, 31, 33 et 45) (Molden *et al.*, 2005a, Molden *et al.*, 2005b). Des études utilisant ce test ont montré que la détection des transcrits E6 et E7 est possible dans les lésions précancéreuses de tout grade (Molden *et al.*, 2005b). Une étude norvégienne a montré que les ARNm E6 et E7 sont détectables à l'aide de cette technologie dans plus de 90% des biopsies de cancers du col de l'utérus (Kraus *et al.*, 2006). L'utilisation de la détection des ARNm E6 et E7 pourrait s'avérer être un marqueur pertinent de la persistance de l'infection et du risque de développer des lésions précancéreuses chez les jeunes femmes (inférieur à 30 ans) (Molden *et al.*, 2006, Molden *et al.*, 2005a). Enfin, l'expression des ARNm E6 et E7 semble être indépendante de la CV HPV et l'intégration du génome d'HPV génère une expression importante et stable des protéines E6 et E7. De plus les résultats positifs du PreTect® HPV-Proofer® semblent être corrélés à la perte de la réplication des HPV (Andersson *et al.*, 2006). Les techniques de PCR quantitatives en temps réel, couplées à une étape de transcription inverse ont

été développées et appliquées à la quantification des transcrits viraux dans quelques études seulement à ce jour.

La quantification des transcrits E6 et E7 par PCR en temps réel a été réalisée sur des résidus de cytologie provenant de 348 échantillons, dont des échantillons sans lésion, des ASCUS, des LGSIL et des HGSIL. Il s'est avéré que la CV HPV16, ainsi que le nombre de copies de transcrits augmentait significativement avec le grade de la lésion. Il semblerait que la RT-PCR en temps réel (permettant la quantification des transcrits) soit plus sensible que la PCR en temps réel (permettant la quantification de la CV) pour décrire l'évolution des ASCUS, LGSIL et HGSIL (Wang-Johanning *et al.*, 2002).

De façon étonnante une étude chez des patients immunodéprimés transplantés d'organes et présentant des lésions de grade variable au niveau génital et cutané, a montré que chez les patients présentant des taux d'expression d'ARNm E6 et E7 mesurables, une réponse anticorps dirigés contre des antigènes d'HPV a pu être détectée (Dang *et al.*, 2006).

Ces données permettent de suggérer que la détermination des taux d'expression des transcrits d'HPV puisse constituer un marqueur potentiellement prédictif de l'évolution des lésions cervicales (Wang-Johanning *et al.*, 2002), mais aussi des lésions cancéreuses au niveau d'autres muqueuses (Arora *et al.*, 2005, Rodrigo *et al.*, 2001, Slebos *et al.*, 2006).

Enfin, les travaux sur l'expression des gènes d'HPV par RT-PCR en temps réel ont permis d'affiner les connaissances sur la régulation de la réplication et de la transcription virale. Une étude récente a permis de montrer que la CV et la polyploïdie dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus, n'étaient pas directement corrélées avec les taux d'ARNm mesurés. Il est suggéré que le niveau d'expression des ARNm et la CV pourraient constituer des marqueurs prédictifs de l'évolution des lésions précancéreuses, alors que la polyploïdie pourrait être liée au processus d'intégration virale dans les cellules infectées par HPV18 ou co-infectées avec un autre type (Scheurer *et al.*, 2007).

### 3. IMMUNITE MUQUEUSE DANS LES INFECTIONS ET LESIONS ASSOCIEES AUX HPV

#### 3.1. ETAT IMMUNITAIRE ET INFECTION HPV

Il est assez remarquable de constater que l'infection par les HPV s'accompagne d'une faible, voire inexistante réaction inflammatoire. En l'absence de cette réaction inflammatoire, la présentation des protéines virales par les cellules dendritiques aux lymphocytes doit être limitée. Néanmoins, en réponse à l'infection du tractus génital par les HPV, l'organisme va développer une réponse immunitaire spécifique mesurable au niveau périphérique et locale (Stanley, 2006, Stanley, 2001). Schématiquement, la réponse humorale serait responsable de l'inactivation des particules virales ainsi que de la prévention des ré-infections des sites muqueux, alors que la réponse cellulaire éliminerait les cellules infectées, et permettrait la régression des lésions associées. Il a été montré que parmi les co-facteurs qui modulent la persistance et la clairance des infections par HPV, la réponse immunitaire semble jouer un rôle déterminant (Moscicki *et al.*, 2006).

La fréquence accrue des néoplasies cutanéomuqueuses associés à l'HPV chez les individus immunodéprimés démontre bien l'importance du système immunitaire dans le contrôle des lésions induites par HPV (Ferenczy *et al.*, 2003, Sillman *et al.*, 1997). Parallèlement à cela la prévalence des infections par HPV est accrue dans les populations de patients greffés d'organes (Alotaibi *et al.*, 2006, Dunne & Markowitz, 2006, Luron *et al.*, 2006, Tan & Goh, 2006) ou infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Palefsky *et al.*, 1999, Sun *et al.*, 1997). Le déficit immunitaire, et notamment le déficit en lymphocytes CD4 permettrait la réplication des HPV qui seraient restés sous forme latente et la progression tumorale. Ainsi, chez les individus greffés, les carcinomes cutanés associés aux HPV sont fréquemment associés à une profonde immunosuppression, puisque le nombre de lymphocytes CD4 est diminué de façon significative comparée aux patients sans carcinome (Ducloux *et al.*, 1998, Dunne & Markowitz, 2006). Chez ces patients, des études ont aussi montré la plus forte fréquence de détection des infections HPV dans d'autres organes, tels que la cavité buccale par rapport aux sujets immunocompétents (Rose *et al.*, 2006). De la même façon, le risque de développer un cancer de l'anus serait 10 fois supérieur chez les transplantés par rapport à la population générale, et la prévalence de l'infection anale par HPV est de 47% chez les transplantés (Patel *et al.*, 2007). Dans cette dernière étude se basant sur une population de transplantés rénaux, les auteurs proposent même un programme de dépistage des lésions anales chez ces patients qui reposerait sur la détection d'HPV (Patel *et al.*, 2007).

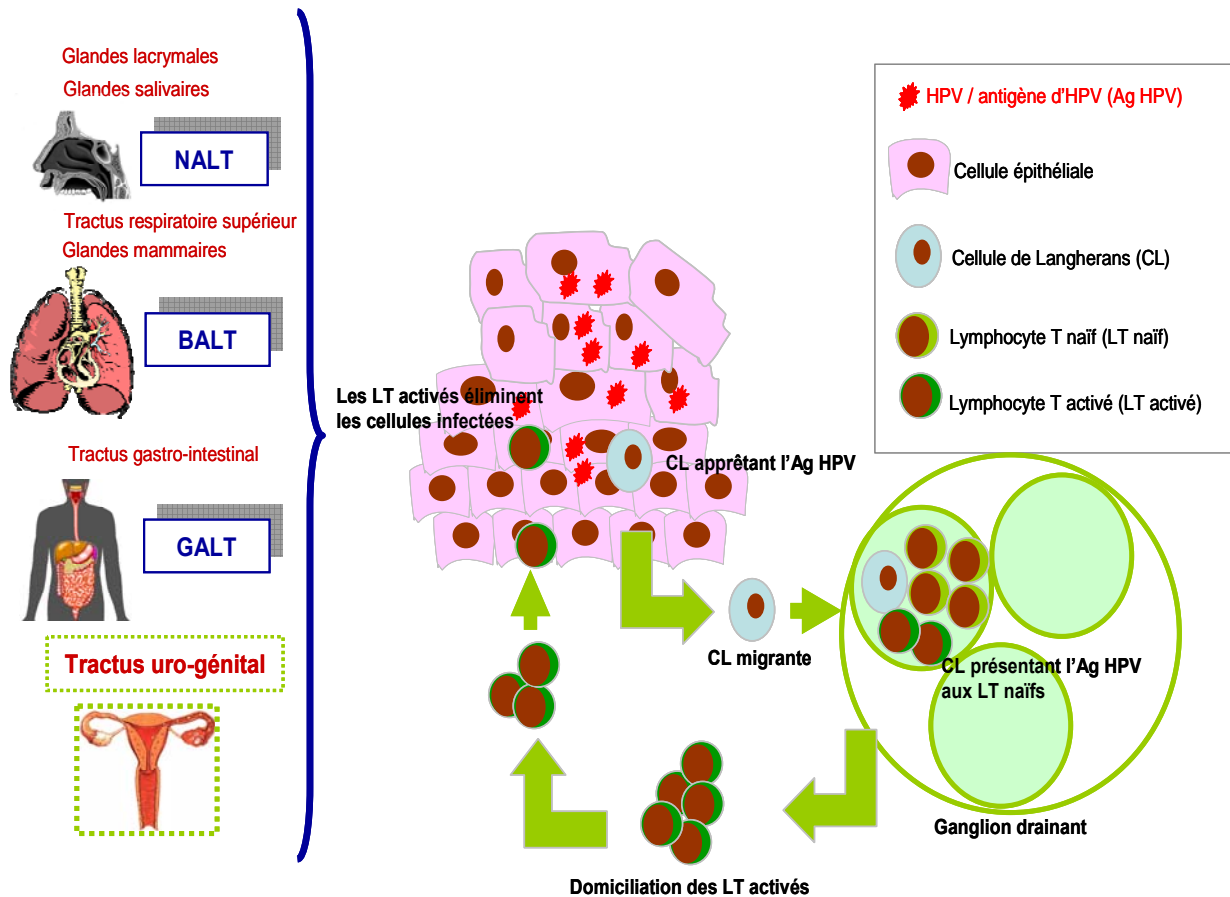
Des études effectuées parmi les populations de femmes infectées par le VIH semblent indiquer que les lésions dysplasiques progressent et évoluent plus rapidement chez les femmes VIH positives que chez les femmes immunocompétentes. Ces lésions récidiveraient également plus souvent après

traitement (Clifford *et al.*, 2006b, Eckert *et al.*, 1999, Frisch *et al.*, 2000). Cette relation est fortement dépendante du type viral infectant. Les femmes infectées par le VIH ne sont pas plus fréquemment infectées par l'HPV16 que les femmes immunocompétentes mais le sont par les autres génotypes. Ceci suggère que l'HPV16 a une capacité plus importante à échapper à la surveillance immunitaire, contribuant ainsi à la forte prévalence de l'HPV16 dans les lésions cancéreuses du col utérin (Clifford *et al.*, 2006b, Strickler *et al.*, 2003).

## 3.2. INITIATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE

### 3.2.1. Système Immunitaire Commun des Muqueuses (SICM)

Le SICM encore nommé MALT (« Mucosal-Associated Lymphoid Tissue ») est un ensemble de tissus lymphoïdes regroupant les territoires immuns muqueux de l'organisme (**Figure 13**). Ce système assure la protection de plus de 400 m<sup>2</sup> de muqueuses exposées aux risques de l'environnement : muqueuse oculaire, respiratoire, digestive, cutanée, urogénitale... La régulation des réponses immunes muqueuses (locales) est relativement indépendante de celle de l'immunité systémique (générale) et sa principale particularité réside dans cette dichotomie et dans sa capacité à faire circuler des effecteurs immunitaires entre les différents sites muqueux tout en répondant à certaines règles de compartimentation des réponses (Riethmuller & Seilles, 2000). Au contact de l'antigène, ces cellules initient leur différenciation et migrent vers la circulation générale pour coloniser différents sites effecteurs. Or, le tractus de la femme n'est pas clairement rattaché au SICM et il serait physiologiquement un mauvais site inducteur et effecteur des réponses immunes (Mestecky & Fultz, 1999, Riethmuller & Seilles, 2000, Seillès *et al.*, 1999). Cette particularité est illustrée par la grossesse qui est un bel exemple de greffe semi-allogénique tolérée. Chez l'homme, il semblerait cependant que le système urogénital soit mieux intégré dans le SICM.



**Figure 13.** Le Système Immunitaire Commun des Muqueuses (SICM)

(NALT = Nasal Associated Lymphoid Tissue ; BALT = Bronchus Associated Lymphoid Tissue ; GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue)

### 3.2.2. Système inducteur de la réponse immunitaire

L'aptitude de la barrière épithéliale à lutter contre les infections dépend de sa constitution et de l'organisation du tissu lymphoïde sous-jacent. Au niveau de l'épithélium du col de l'utérus, cette barrière ne joue pas toujours son rôle.

- Au niveau du vagin et de l'exocol, cette muqueuse ne comporte ni nodules, ni follicules lymphoïdes. Il n'existe pas de cellules M qui sont spécialisées dans la capture des antigènes et en particulier viraux. Les cellules épithéliales infectées ne sont pas des cellules présentatrices d'antigène (CPA) au sens strict du terme, mais elles sont capables de les capturer. Il existe dans cette région une certaine sensibilité liée à un déficit physiologique du système immunitaire sécrétoire. En effet, il existe très peu de plasmocytes et aucune sécrétion active d'Immunoglobulines A sécrétoires (IgA-S).

- Au niveau de l'endocol, la situation est différente. Des nodules lymphoïdes, quelques follicules lymphoïdes au niveau de l'endomètre et quelques cellules M ont été décrits. Au niveau de la muqueuse, de type glandulaire, un grand nombre de plasmocytes sont présents, sécrétant des IgA-S.

- La zone de jonction pavimento-cylindrique est une zone de fragilité immunitaire. Elle est le siège d'une production particulièrement marquée en cytokines immunosuppressives des fonctions

cellulaires : interleukine 10 (IL-10) et facteur de croissance des tumeurs ou TGF $\beta$  (« Tumor Growth Factor ») (Giannini *et al.*, 2002).

### 3.2.3. Sécrétions des muqueuses du tractus génital

Les IgA-S sont les immunoglobulines majoritaires des sécrétions muqueuses. Au niveau du tractus génital féminin, il est intéressant de noter que la glaire cervicale en est pratiquement dépourvue. Les IgA-S constituées de deux monomères, exercent leurs fonctions par le biais de mécanismes différents de ceux utilisés par les IgG (Russell *et al.*, 1999) : par exemple, le mécanisme d'exclusion immune est la possibilité qu'ont les IgA-S de se combiner aux sites antigéniques de la particule infectieuse et de favoriser son élimination. Or, dans les sécrétions vaginales, ce sont les IgG qui prédominent (75%). Seulement 22% d'IgA sont retrouvés avec la moitié de monomères, limitant ainsi leur efficacité. Il n'existerait donc pas à ce niveau l'habituelle dichotomie entre système immunitaire systémique et système immunitaire muqueux (Bard *et al.*, 2004). Au niveau du mucus cervical, une prédominance des IgG est trouvée là encore, avec toutefois au niveau des IgA totaux, une quantité plus importante d'IgA-S polymères (80%) qui proviendraient de l'utérus (Bard *et al.*, 2002, Bard *et al.*, 2004, Bierl *et al.*, 2005, Kutteh *et al.*, 1998, Marais *et al.*, 2006).

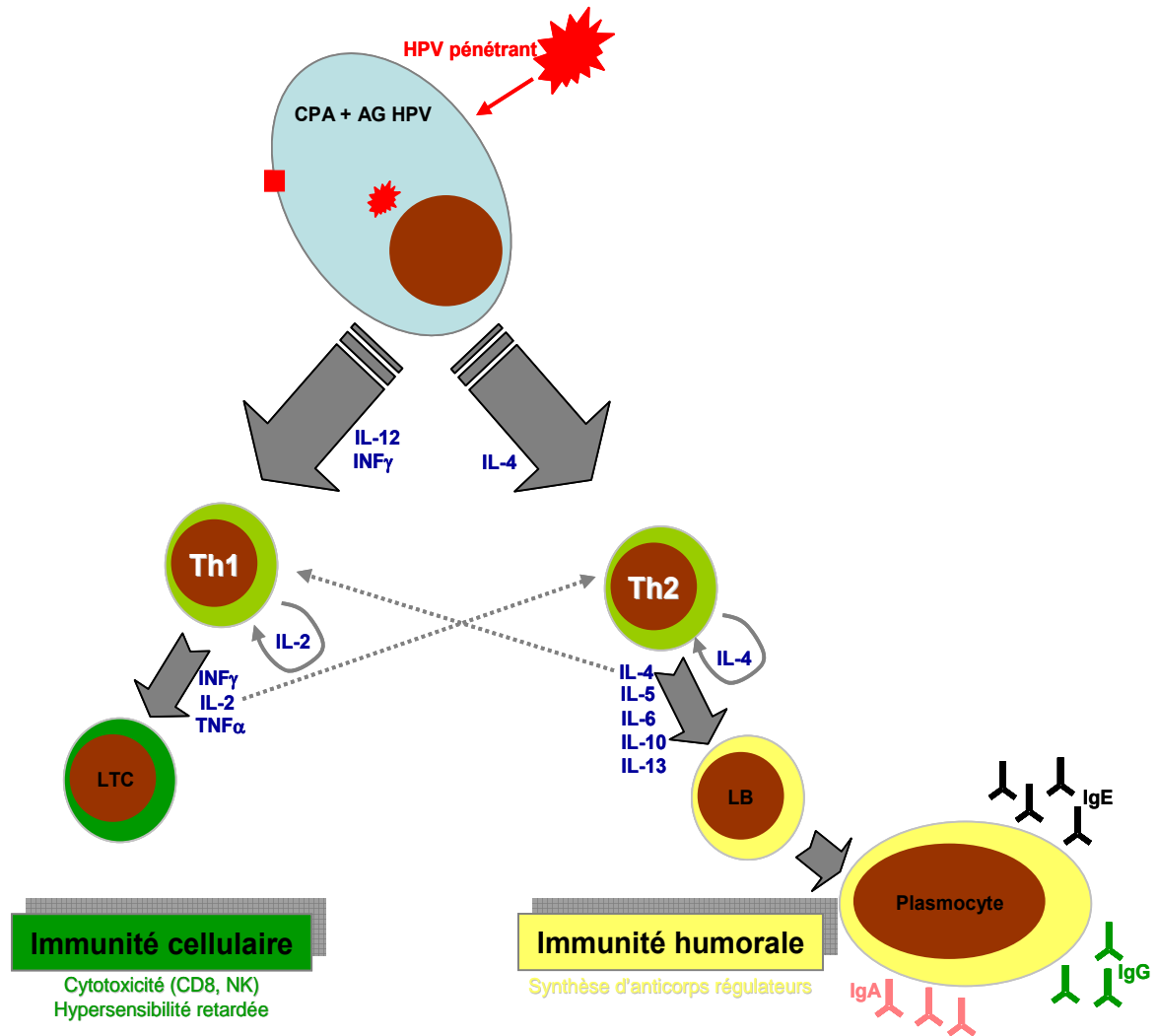
### 3.2.4. Coopération cellulaire et initiation de la réponse immunitaire muqueuse

Suite à une infection HPV, la réponse immunitaire résulte de la mise en place de façon synergique d'une réponse immunitaire innée et d'une réponse immunitaire adaptative spécifique d'antigène. La réponse immunitaire innée est activée grâce à certains signaux moléculaires tels que les protéines de choc thermique, des molécules de structure riches en mannose. Des cellules sentinelles incluant les cellules épithéliales et les cellules de Langerhans vont interagir avec les effecteurs de la réponse immune innée que sont les macrophages, les monocytes, les leucocytes polymorphes et les cellules natural killer (cellules NK) afin d'assurer l'élimination de l'agent pathogène.

L'accès et la présentation des antigènes sont compromis par l'absence de formations lymphoïdes et de cellules M spécialisées dans ces fonctions. Or, la stimulation du système immunitaire lymphocytaire initialement naïf vis-à-vis des HPV passe obligatoirement par une présentation de l'antigène aux lymphocytes, par des CPA comme les cellules de Langerhans, les macrophages ou encore les kératinocytes. Les CPA apprêtent les antigènes viraux en courts peptides, qui sont exportés par des molécules de transport TAP1 et TAP2 (Transporter Associated Protein) vers le réticulum endoplasmique où ils sont associés aux molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Les cellules de Langerhans subissent des transformations après avoir capté l'antigène, et l'expression du récepteur CCR7 à leur surface leur permet de migrer sous l'attraction de la chimiokine MIP-3 $\beta$  (« Macrophage Inflammatory Protein ») (Chardonnet *et al.*, 1992, Chardonnet *et al.*, 1985). Ces cellules, initialement présentes au niveau du site de l'infection, ont la propriété de migrer vers les organes lymphoïdes drainant les sites concernés et de transporter soit des particules virales entières, soit des corps apoptotiques de cellules infectées. Dans les organes lymphoïdes, les CPA activent les cellules T naïves et induisent leur différenciation en cellules effectrices, grâce aux actions combinées de la présentation peptidique par le CMH, des molécules de co-stimulation telles

que CD80, CD86 et CD40 et la production de cytokines (IL-2 ou IL-10) (Niedergang *et al.*, 2004). La réponse immune à une infection HPV médiée par les cellules T sera orientée vers une réponse T helper de type 1 (Th 1) ou type 2 (Th 2), ou encore une réponse T régulateur (Wang & Hildesheim, 2003). Une réponse Th1 sera en faveur d'une production de cellules T cytotoxiques effectrices qui pourraient jouer un rôle important dans l'élimination des cellules infectées par le virus, alors qu'une réponse Th2 induirait la stimulation et la différenciation des cellules B en plasmocytes qui synthétisent les anticorps neutralisants (**Figure 14**). Les cellules T primaires activées contre les antigènes d'HPV peuvent contrôler une première infection et définir un sous-type constituant des cellules mémoires (Kaech *et al.*, 2002). La reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T activés est favorisée par la synthèse d'INF $\gamma$  (Interféron $\gamma$ ) qui permet d'augmenter l'expression des molécules CMH de classe I et II à la surface des cellules épithéliales. Enfin, la reconnaissance par les cellules T des antigènes d'HPV est la base de l'élimination complète des cellules infectées. Les lymphocytes ainsi stimulés acquièrent à leur tour la propriété d'être domiciliés *via* la circulation sanguine vers les épithéliums infectés, par expression de récepteurs aux chimiokines et expression de molécules de surface. Leur rôle est de détruire les cellules infectées, soit par cytotoxicité directe, soit par interaction avec la molécule Fas-Ligand présente sur les lymphocytes et la molécule Fas présente sur les cellules infectées ou tumorales, soit encore par la synthèse de cytokines comme le TNF $\alpha$  (« Tumor Necrosis Factor ») (Hildesheim & Wang, 2002, Moscicki *et al.*, 2006).

Ces étapes sont susceptibles d'échappement. Les cellules de Langerhans sont nombreuses au niveau de l'épithélium du col de l'utérus, exprimant à leur surface des molécules de classe I et II du CMH. Leur croissance est sous la dépendance du TNF produit par les kératinocytes (Malejczyk *et al.*, 1996). Or il a été montré que cette synthèse est diminuée dans le cas d'une infection par HPV, et il a été montré que la densité des cellules de Langerhans diminuait avec le grade de la lésion (Uchimura *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré que l'expression des gènes du CMH I, des protéasomes et des TAP peut être modifiée par l'intégration du génome d'HPV, induisant un défaut de présentation antigénique (Banks *et al.*, 1991, Bartholomew *et al.*, 1997, Sheu *et al.*, 2005). Enfin, les cellules de Langerhans n'expriment pas les molécules de co-stimulation appartenant à la famille des B7 (CD80). Ainsi, en leur absence, le lymphocyte T CD8 naïf reçoit un signal d'anergie (ou de tolérance) vis-à-vis de cet antigène, au lieu d'obtenir un signal d'activation complet (Niedergang *et al.*, 2004). Un autre système d'échappement des HPV à la réponse immunitaire serait lié au polymorphisme du système CMH qui permet seulement à certaines combinaisons peptides viraux/molécules du CMH d'être immunogènes et pas à d'autres (Maciag *et al.*, 2000, Maciag *et al.*, 2002, Zoodsma *et al.*, 2005a, Zoodsma *et al.*, 2005b, Zoodsma *et al.*, 2005c)



**Figure 14.** Réponse immunitaire Th1 / Th2

LB = Lymphocyte B ; LTC = Lymphocyte T Cytotoxique ; IL- = Interleukine ; INF $\gamma$  = Interféron  $\gamma$  ; TNF $\alpha$  = Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ; Ig = Immunoglobuline ; NK = Natural Killer

### 3.3. REPONSE IMMUNITAIRE COMME MARQUEUR D'ÉVOLUTION DES LÉSIONS

S'il est logique que la réponse immunitaire locale soit fondamentale dans le contrôle de l'infection par HPV, et compte tenu de la domiciliation des cellules effectrices depuis les organes lymphoïdes secondaires vers les muqueuses *via* le système sanguin, il est légitime de supposer que les réponses immunitaires systémiques puissent constituer le reflet des réponses locales.

#### 3.3.1. Immunité périphérique humorale

Il a été clairement établi que l'immunité humorale empêchait les infections par papillomavirus. Tout d'abord, dans les modèles animaux, tel que le lapin et les bovins, il a été montré, suite à une immunisation par des VLP L1, que les anticorps anti-L1 protégeaient de l'infection CRPV (« Cottontail Rabbit PapillomaVirus ») et BPV (Breitburd & Coursaget, 1999, Stanley, 1998). L'étude de l'immunité



humorale et la mise en place de tests sérologiques, ont été particulièrement difficiles à développer dans le cadre des infections à HPV. Ces virus n'étant pas cultivables dans des conditions classiques, l'obstacle majeur a été de disposer de quantités suffisantes d'antigènes viraux. La découverte de l'auto-assemblage des protéines de capsides L1 et L2 en VLP lorsqu'elles sont produites en quantité suffisante (Hagensee *et al.*, 1993, Kirnbauer *et al.*, 1992, Lowy & Schiller, 1999, Rose *et al.*, 1994a, Rose *et al.*, 1994b)} a permis le développement de tests pour mesurer la réponse sérologique lors d'une infection à HPV. Ces VLP sont constituées soit uniquement de protéine L1, soit d'une association des protéines L1 et L2 dans un rapport 30/1 (Kirnbauer *et al.*, 1993). Ces deux types de VLP possèdent une taille, une morphologie et des épitopes conformationnels semblables aux virions natifs (Hagensee *et al.*, 1993, Kirnbauer *et al.*, 1993). A partir de ce moment, plusieurs études séro-épidémiologiques ont pu être réalisées avec des VLP HPV comme antigènes pour la réalisation de tests ELISA. Mais à l'évidence, l'utilisation de ces tests de détection des réponses anticorps pour la protéine L1 pendant et après une infection HPV a montré ses limites en diagnostic, du fait de la faible sensibilité clinique de la technique et de l'importante variabilité de l'intervalle entre l'infection et la séro-conversion. En revanche, il s'est avéré que ce marqueur pouvait permettre d'apprécier une infection courante ou passée dans les populations étudiées. La survenue des anticorps dirigés contre les protéines L1 ou L2 d'HPV n'est pas simplement associée à l'infection (Studentsov *et al.*, 2002). Dans une étude prospective portant sur des femmes infectées par HPV, les femmes ayant une infection cervico-vaginale à HPV haut risque étaient 8 à 10 fois plus susceptibles de faire une séroconversion que celles infectées par les génotypes à bas risque. Quant aux taux d'anticorps, ils pouvaient rester élevés durant une longue période, et ce d'autant plus que les taux initiaux étaient élevés ou qu'une exposition antigénique s'était avérée répétée (Ho *et al.*, 2004). Le maintien d'un taux élevé d'anticorps de type IgG dirigés contre HPV16 pourrait être associé à une diminution du risque d'infection par un type d'HPV proche phylogéniquement du type 16 (Ho *et al.*, 2002). La séropositivité chez les femmes atteintes d'un cancer du col de l'utérus a été montrée comme un facteur de bon pronostic pour la survie, les taux de mortalité étant augmentés chez les patientes séronégatives pour HPV16. Il a été suggéré qu'une séropositivité associée à la survie des patientes, pouvait être liée à une persistance de l'ADN viral sous forme épisomale de l'HPV. En revanche, les femmes pour lesquelles le génome d'HPV serait sous forme intégrée dans le génome de leurs cellules cervico-utérines, présenteraient un risque plus important de faire une lésion de haut grade ou un cancer (Gissmann, 1996).

L'immunité humorale dirigée contre HPV a aussi été étudiée. La détection des anticorps dirigés contre les protéines non structurales a aussi été réalisée avec des protéines de fusion et des peptides de synthèse (Banks *et al.*, 1987, Cason *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1987). En raison de la forte production de la protéine E4 au cours du cycle viral, il a été proposé d'utiliser les anticorps anti-E4 comme marqueur de la réplication virale (Dillner *et al.*, 1997, Kanda *et al.*, 1992, Muller *et al.*, 1990, Muller *et al.*, 1995b). Enfin, les études se basant sur l'utilisation des protéines E6 et E7, produites en fortes quantités dans les cellules cancéreuses, ont permis de mettre en évidence des réponses contre E6 et E7 chez les patientes ayant un cancer du col de l'utérus (Dillner, 1990, Dillner *et al.*, 1990a, Dillner *et al.*, 1991, Dillner *et al.*, 1990b, Mann *et al.*, 1990, Stacey *et al.*, 1992, Stacey *et al.*, 1993), mais

aucune signification pronostique n'a pu être clairement établie (Stacey *et al.*, 1992, Stacey *et al.*, 1993).

### 3.3.2. Immunité périphérique cellulaire

En ce qui concerne les épitopes immunogènes et reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC), de nombreuses expériences menées chez des individus sains et à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP) ont permis de définir un peptide de E6 (E6 29-38) (Evans *et al.*, 2001), 3 peptides de E7 (E7 11-20, E7 82-90, E7 86-93) (Ressing *et al.*, 1996a, Ressing *et al.*, 1996b) et un peptide de E2 (E2 69-77) (Konya *et al.*, 1997) reconnus par les CTL en association avec la molécule HLA-A2, ainsi qu'un peptide de E6 (E6 80-88) et de E7 (E7 44-52), reconnus par les LTC en association avec la molécule HLA-B18 (Bourgault Villada *et al.*, 2004). Les études des réponses immunitaires cellulaires cytotoxiques ont été réalisées en majorité à partir de CMSP de femmes ayant des lésions cervicales précancéreuses ou des cancers invasifs du col de l'utérus. Les antigènes les plus étudiés sont les protéines E6 et E7 d'HPV16, exprimées précocement dans les lésions, et de façon permanente dans les cellules tumorales. Les études ont montré qu'un faible pourcentage de patientes ayant des CIN et infectées par HPV16 présentent des LTC CD8+, de 10 à 30% seulement (Evans *et al.*, 1997, Evans *et al.*, 2006, Nakagawa *et al.*, 1996, Nakagawa *et al.*, 1997, Nakagawa *et al.*, 1999, Nakagawa *et al.*, 2002, Ressing *et al.*, 1996b). Des études utilisant le marquage par des tétramères HLA-A2/E7 11-20 (« Human Leucocyte Antigen ») (Youde *et al.*, 2000) ont montré que le pourcentage de lymphocytes T circulants spécifiques d'HPV16 chez les femmes infectées est très faible (de 1 pour 1 250 à 1 pour 200 000). Ces lymphocytes jouent malgré tout probablement un rôle déterminant dans l'élimination des cellules infectées après leur domiciliation vers les sites infectés.

Les réponses immunitaires T CD4+ au cours de l'infection naturelle par HPV restent encore aujourd'hui mal définies et assez contradictoires selon les études. Elles sont le plus souvent mesurées après stimulation des CMSP par de la protéine de capsid L1 ou des protéines de synthèse issues de L1, ou encore de E6 et E7. Au cours d'une étude longitudinale, des proliférations de lymphocytes T CD4+ spécifiques vis-à-vis de peptides E6 et E7 d'HPV16 ont été mises en évidence lors de régressions de CIN avec clairance d'HPV16 (Kadish *et al.*, 2002). La production d'IL-2 a été mesurée chez des malades ayant une infection à HPV16 avec ou sans CIN : elle était corrélée soit à une élimination d'HPV16, soit à une persistance virale et une évolution vers une CIN de plus haut grade (de Gruijl *et al.*, 1999b). Plusieurs équipes ont aussi montré une diminution du pourcentage de patientes ayant des CMSP synthétisant de l'IL-2 après stimulation par des peptides E6 et E7 en fonction du grade de la lésion (de Gruijl *et al.*, 1999b, Luxton *et al.*, 1997, Luxton *et al.*, 1996, Tsukui *et al.*, 1996). Des intradermoréactions, reflet d'une réaction d'hypersensibilité retardée (réponse CD4), ont été observées chez une majorité de patientes avec une CIN régressive et chez aucune patiente ayant un cancer invasif (Hopfl *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que l'activité des cellules CD4+ est fondamentale pour la régression des lésions. La réponse lymphocytaire T CD4+ semble être davantage détectée au cours des infections asymptomatiques (Tsukui *et al.*, 1996), chez les femmes présentant des lésions de bas grade ou des CIN3, et disparaît lors de l'évolution vers le cancer invasif.

Des proliférations lymphocytaires spécifiques de peptides de E2 d'HPV16 ont été mises en évidence chez des individus non porteurs d'HPV16 au moment de l'étude, qui auraient éliminé spontanément le virus et dont la spécificité croiserait avec d'autres HPV tels que les types 26 et 45 (de Jong *et al.*, 2002a, de Jong *et al.*, 2002b). Cette faible activité des lymphocytes périphériques pourrait être due à une diminution de l'expression de la chaîne  $\zeta$  de la molécule CD3 des lymphocytes T spécifiques d'HPV (de Gruijl *et al.*, 1999a) ainsi qu'à une diminution de synthèse de  $\text{TNF}\alpha$  comme cela a été montré chez des patientes avec un cancer du col utérin (Kono *et al.*, 1996). Cette faible activité pourrait aussi être due à une anergie des lymphocytes T effecteurs en rapport avec une synthèse et une sécrétion par la tumeur de cytokines suppressives comme le  $\text{TGF}\beta$  (Hazelbag *et al.*, 2001, Hazelbag *et al.*, 2002) ou l'IL-10 (Clerici *et al.*, 1997, Jacobs *et al.*, 1998).

Il est donc difficile de savoir si après l'infection virale, l'absence d'élimination du virus est liée à une anomalie primitive des réponses immunes cellulaires ou bien si ce déficit est secondaire, généré par la présence même du virus.

Compte tenu des divergences observées dans les études des réponses immunitaires périphériques qui ne sont qu'un reflet de ce qui se passe localement, il était important de se pencher sur l'étude des réponses immunitaires locales. Au cours de l'histoire naturelle de l'infection à HPV, les cellules épithéliales infectées restent localisées au niveau du col de l'utérus. L'immunité locale doit jouer un rôle crucial dans le contrôle des lésions intraépithéliales induites par les HPV.

### 3.3.3. Immunité locale humorale

La réponse immune humorale serait responsable localement de l'inactivation des particules virales ainsi que de la prévention des ré-infections des sites muqueux.

Sur le plan physiologique, des études soulignent le caractère particulier des muqueuses génitales féminines, suggérant que la réponse immunitaire humorale du tractus génital féminin associe une synthèse locale à une transsudation d'immunoglobulines depuis le plasma (Bard *et al.*, 2002, Hocini *et al.*, 1995). Ce type d'exploration requiert des techniques de prélèvement non invasives et pas toujours faciles à mettre en œuvre et posant des problèmes de reproductibilité quant aux quantifications d'immunoglobulines. Un travail au sein de notre équipe a permis de mettre au point et de valider une technique ELISA permettant de quantifier différents isotypes d'immunoglobulines à partir de différents compartiments biologiques (salive, sérum, région cervico-vaginale et région endo-cervicale, au niveau de la zone de jonction) (Bard *et al.*, 2002). Chez 18 femmes de 20 à 45 ans, les IgA totales, les IgA-S, les IgM et les IgG ont été dosées, et il a été constaté de fortes variations des différents isotypes d'immunoglobulines entre les femmes. Le taux moyen d'immunoglobulines est plus élevé dans les sécrétions endo-cervicales que dans les sécrétions cervico-vaginales. Il a été observé une prédominance des IgG (80%) dans les sécrétions génitales (exo-cervicales et cervico-vaginales) par rapport aux IgA totales (12%). Ces données sont contradictoires avec ce que l'on trouve dans les autres types de sécrétions muqueuses, telles que la salive, où l'on note une prédominance d'IgA (80%). Les IgG et IgM des fluides génitaux semblent provenir principalement du compartiment plasmatique, alors que les IgA et IgA-S résultent d'une synthèse locale (Bard *et al.*, 2002). Un second

travail a permis de quantifier les différentes immunoglobulines dans les compartiments biologiques décrits ci-dessus, chez des patientes infectées par des HPV à haut risque. Il s'avère que la distribution des immunoglobulines dans les sécrétions génitales des femmes infectées par HPV est la même que pour les femmes sans infections HPV, mis à part une augmentation significative du taux d'IgA-S dans le compartiment cervico-vaginal. Par ailleurs, il a été observé une diminution significative du taux d'IgA-S dans la salive. Ces résultats montrent que lors d'une infection HPV les réponses immunitaires humorales au niveau du tractus génital féminin sont modifiées (Bard *et al.*, 2004). Il semblerait aussi que selon le type viral, les profils d'immunoglobulines puissent être différents. Effectivement, les patientes infectées par HPV16 présentent une proportion d'IgA-S par rapport aux IgA totales plus faible dans les deux compartiments génitaux, que chez les patientes infectées par un autre type d'HPV (Bard *et al.*, 2004).

Enfin, il a été montré que des anticorps anti-E6 et anti-E7 sont détectables dans les lavages cervico-vaginaux, et avec un titre beaucoup plus important que dans le sérum (Silins *et al.*, 2002, Silins *et al.*, 1999).

### 3.3.4. Immunité locale cellulaire

Dans les modèles animaux, les études sur l'immunité cellulaire locale ont été réalisées dans des modèles de lésions à fort potentiel de régression. Ainsi, il a été montré que dans les infections buccales des bovins par BPV (conduisant à l'apparition de papillomes bénins), la régression des lésions s'accompagne d'une forte infiltration de lymphocytes T CD4+ dans le derme, alors qu'au niveau des couches basales de l'épithélium, c'est un infiltrat de lymphocytes T CD8+ qui est observé (Knowles *et al.*, 1996). Dans le modèle canin (papillomatose orale canine), une infiltration massive de lymphocytes T CD4+ est observée au cours de la régression des lésions (Nicholls *et al.*, 2001a, Nicholls *et al.*, 2001b, Nicholls & Stanley, 2000, Soutter & Kesic, 1994). L'analyse temporelle et séquentielle de biopsies a permis d'établir que cet infiltrat apparaissait juste avant le phénomène de régression et qu'il atteignait une taille maximale lors de la disparition de la lésion (Nicholls *et al.*, 2001a, Nicholls *et al.*, 2001b, Nicholls & Stanley, 2000). Dans le modèle du lapin, Okabayashi a montré en 1991 un infiltrat de lymphocytes T plus important dans les lésions qui régressent que dans celles qui progressent (Okabayashi *et al.*, 1991), alors que Selvakumar en 1997 a montré un infiltrat de lymphocytes T CD8+ au cours de la régression des lésions associées au CRPV (Selvakumar *et al.*, 1997).

Chez la femme, la présence de cellules immunitaires a été largement décrite au niveau du col utérin aussi bien dans l'épithélium que dans le stroma sous-jacent. Les auteurs s'accordent sur la nature des modifications des populations immunitaires observées au cours de l'histoire naturelle des infections par HPV, modifications différentes en fonction de la nature des lésions (Stern, 2005, Wang & Hildesheim, 2003). Chez les femmes sans lésion il a été montré que la densité des cellules CD4+ était supérieure à celle des cellules CD8+, avec un ratio de cellules CD4+/CD8+ de l'ordre de 1,75 (Edwards *et al.*, 1995). Une autre étude a montré que le ratio de cellules CD4+/CD8+ était équivalent à celui trouvé dans le sang, en utilisant des suspensions de cellules mononuclées, obtenues par

dilacération de biopsies de col utérin (Crowley-Nowick *et al.*, 1995). Dans les lésions condylomateuses infectées par HPV à bas risque, plusieurs travaux ont montré, et notamment par immunohistochimie, la présence d'un infiltrat lymphocytaire qui résultait d'une augmentation du nombre de cellules CD4+ et CD8+ dans le stroma et dans l'épithélium (Coleman *et al.*, 1994, Hong *et al.*, 1997). Dans les lésions qui régressent, les auteurs ont observé une augmentation du ratio CD4+/CD8+ dans l'épithélium, mais pas dans le stroma. Par ailleurs, la majorité des cellules présentent le marqueur mémoire CD45RO et des marqueurs d'activation (Coleman *et al.*, 1994). Dans les cancers invasifs, de nombreuses études ont mis en évidence une importante infiltration lymphocytaire que l'on ne retrouve pas dans les lésions précancéreuses (CIN2 et CIN3) (Bell *et al.*, 1995, Edwards *et al.*, 1995, Ghosh & Moore, 1992, Hilders *et al.*, 1994, Sheu *et al.*, 1997). Par ailleurs, ces études ont montré une inversion du ratio CD4+/CD8+ de 0,94 à 0,7 selon les études. L'équipe de Tay a montré que cette inversion était due à une chute de nombre de cellules CD4+ (Tay *et al.*, 1987). Edwards *et al.* ont identifié cette diminution du ratio CD4+/CD8+ uniquement dans le stroma sous-jacent de l'épithélium dysplasique - pas dans le stroma de l'épithélium normal -, et ont noté que les cellules CD8+ avaient tendance à s'organiser en agrégats dans le stroma (Edwards *et al.*, 1995). Cette observation a été reprise en 2002 par l'équipe de Kobayashi *et al.* qui ont mis en évidence d'authentiques follicules lymphoïdes dans les lésions de haut grade (Sashiyama *et al.*, 2002). Dans ce travail, la présence de protéines E6 et E7 dans les espaces intercellulaires des centres germinatifs a été observée, co-localisant avec un marquage CD35 suggérant que ces antigènes étaient associés à des cellules dendritiques folliculaires. Ces dernières pourraient être susceptibles de délivrer des signaux de prolifération, car un fort marquage Ki67 a été observé au niveau des follicules lymphoïdes (Sashiyama *et al.*, 2002).

Concernant l'état d'activation des cellules infiltrantes, il semble que dans les cancers, peu de cellules immunitaires expriment le récepteur à l'IL-2 (Ghosh & Moore, 1992, Sheu *et al.*, 1997). Cette absence pourrait être liée à la production d'une molécule immunosuppressive par les cellules tumorales elles-mêmes : le TGFβ (Sheu *et al.*, 1997). Dans les lésions précancéreuses, une minorité de cellules immunitaires exprimerait le granzyme B, marqueur de cellules cytotoxiques activées, alors que dans les cancers, d'importants infiltrats de cellules exprimant le granzyme B sont détectés (Bontkes *et al.*, 1997). Au vu des études, il semble qu'un infiltrat de cellules immunitaires effectrices susceptibles d'éliminer les cellules tumorales soit présent dans les cancers. La fonctionnalité de ces lymphocytes infiltrant les tumeurs ou TIL (« Tumor Infiltrating Lymphocyte ») a été étudiée, et les résultats ont montré que ces cellules présentaient une activité cytotoxique non spécifique de type NK envers les lignées cellulaires infectées par le même type d'HPV (Ghosh & Moore, 1992, Hilders *et al.*, 1994).

## 4. OBJECTIFS

Le cancer du col de l'utérus est la conséquence complexe d'interactions entre un HPV HR et l'hôte. Les connaissances sur l'histoire naturelle des infections à HPV dans le tractus génital évoluent rapidement. Aujourd'hui, il est admis d'une part, que la majorité des infections par HPV régressent spontanément sur une courte période (en 12 mois environ) en ne donnant lieu à aucun symptôme ou seulement à des lésions bénignes, et d'autre part, que dans un petit nombre de cas, les infections persistent et confèrent à l'hôte un risque élevé de développement d'une lésion de haut grade, qui en l'absence de diagnostic et de traitement, peut conduire à un cancer invasif. De ce fait, un élément primordial, et actuellement mal compris de cette pathologie est de disposer d'outils pertinents, permettant de distinguer les infections « à risque de CIN2+ » (celles qui conduisent à l'apparition de lésions précancéreuses et de cancers) des infections « non à risque de CIN2+ » (celles qui ne vont pas conduire à l'apparition de lésions précancéreuses et de cancers). S'il ne fait plus aucun doute que l'acquisition d'une infection par HPV est liée à l'activité et aux comportements sexuels, les facteurs contrôlant l'évolution de la maladie commencent seulement à être décrits. Il est important de déterminer clairement les facteurs responsables de la clairance ou de la persistance de ces infections.

Le phénomène de persistance virale est toujours mal compris, mais les facteurs qui en sont responsables sont liés probablement autant aux spécificités du virus (charge virale, intégration, génotypes) qu'à l'hôte (système immunitaire), et c'est dans ce contexte que mon travail de thèse se situe.

## 1. PERFORMANCES D'UN TEST DE DETECTION DES HPV : LE TEST ROCHE AMPLICOR® HPV MWP

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

[Manuscrit en préparation]

Ces travaux ont été présentés sous forme orale :

❖ Au 6<sup>th</sup> International Multidisciplinary Congress of European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia (EUROGIN), à Paris (France), en avril 2006

*Comparison of AMPLICOR® and HCI® tests for detection in ASCUS, LGSIL and HGSIL specimens: use of INNO-LiPA Genotyping assay to screen the discordant results*

Monnier-Benoit S., Mo L.Z., Mougin C.

Ces travaux ont été présentés sous forme affichée :

❖ Au 22<sup>th</sup> International Conference and Clinical Workshop Papillomavirus 2005, à Vancouver (Canada), du 30 avril au 6 mai 2005

*Performances of the Roche Amplicor HPV Test for High-Risk HPV detection in cervical samples collected in the Digene Specimen Transport Medium and PreservCyt™*

Mo L.Z., Monnier-Benoit S., Riethmuller D., Madoz L., Coumes-Marquet S., Chézy E., Mougin C., Prétet J-L.

### *Introduction*

Une approche supplémentaire dans le dépistage des lésions précurseurs du cancer du col de l'utérus est apportée par le développement de méthodes de biologie moléculaire permettant de détecter les HPV dans les cellules cervicales. Les grandes études cliniques sont menées en majorité à l'aide du test de détection des HPV Hybrid Capture® II (HCII®). Récemment une nouvelle trousse commerciale permettant la détection des HPV est apparue sur le marché européen, le test AMPLICOR® HPV MWP (Roche Diagnostic, Meylan, France) (test AMPLICOR®). Ce test est basé sur une amplification par PCR à l'aide des amorces MY09/MY11, d'une hybridation sur microplaque et d'une révélation des 13 mêmes types d'HPV détectés par HCII®. Il donne également un contrôle de l'extraction de l'ADN, grâce à l'amplification en parallèle du gène de la  $\beta$ -globine. Les performances diagnostiques de nouvelles méthodes de détection des HPV se doivent d'être étudiées afin de valider les nouveaux outils de détection des HPV.

### *Objectifs et Méthodes*

Dans ce contexte, nous avons comparé les performances du test AMPLICOR® avec celles du test HCII® dans la détection des HPV.

Pour cela, nous avons testé à l'aide de ces deux trousse 470 échantillons cervico-utérins (55 normaux, 208 ASCUS, 193 LGSIL et 14 HGSIL) provenant de résidus de cytologie liquide, collectés dans le milieu PreservCyt® (ThinPrep Pap Test, Cytyc Corporation). Les échantillons présentant des résultats discordants ont été génotypés avec la trousse INNO-LiPA Genotyping HPV test v2 (Innogenetics) (test INNO-LiPA). Ce test est basé sur une amplification par PCR d'un fragment de L1, à l'aide des amorces SPF10 et d'une hybridation inverse sur bandelettes.

### *Résultats*

Parmi les 470 échantillons, 250 étaient positifs (53,2%) pour un HPV HR avec l'un ou l'autre test. Nous avons obtenu 232 résultats positifs concordants et 220 résultats négatifs concordants, donnant un taux de concordance de 96,2%. Dans les échantillons normaux, nous avons une concordance de 96,4% ; dans les ASCUS, le taux de concordance était de 97,1% ; dans les LGSIL une concordance entre les deux tests de 95,3% a été calculée ; et enfin, dans les HGSIL, la concordance entre les deux tests était de 92,9% (**Table 2**).



Echantillons Cervico-utérins Résultats AMPLICOR®	Résultats HCII®		Concordance	κ
<b>Tous les échantillons (n=470)</b>	HCII® +	HCII® -		
AMPLICOR® +	232	9	96,17%	0,92
AMPLICOR® -	9	220		
<b>Cytologie normale (n=55)</b>	HCII® +	HCII® -		
AMPLICOR® +	11	1	96,36%	0,89
AMPLICOR® -	1	42		
<b>ASCUS (n=208)</b>	HCII® +	HCII® -		
AMPLICOR® +	85	3	97,12%	0,94
AMPLICOR® -	3	117		
<b>LGSIL (n=193)</b>	HCII® +	HCII® -		
AMPLICOR® +	124	4	95,34%	0,90
AMPLICOR® -	5	60		
<b>HGSIL (n=14)</b>	HCII® +	HCII® -		
AMPLICOR® +	12	1	92,86%	0,63
AMPLICOR® -	0	1		

**Table 2.** Comparaison des résultats obtenus avec le test AMPLICOR® et le test HCII® pour la détection d'HPV HR dans 470 échantillons de cytologie liquide

Au total, seulement 18 résultats discordants ont été obtenus : 9 étant HCII® positifs et AMPLICOR® négatifs et 9 étant HCII® négatifs et AMPLICOR® positifs. Ces 18 échantillons ont été génotypés à l'aide du test INNO-LiPA, afin d'obtenir un « résultat HPV consensus » (c'est-à-dire 2 tests HPV concordant – positifs ou négatifs – sur 3). Nous avons montré à l'aide du génotypage, que les 18 échantillons abritaient un HPV. Les 9 échantillons présentant des résultats HCII® positif et AMPLICOR® négatif abritaient l'HPV53. Parmi les 9 échantillons présentant des résultats HCII® négatif et AMPLICOR® positif, 8 abritaient des infections multiples. De façon surprenante, 4 échantillons (dont 1 HGSIL) abritaient un HPV16. Nous avons déterminé la charge virale HPV16 pour ces 4 échantillons, et il s'est avéré que les valeurs mesurées pour ces échantillons étaient inférieures à 5 copies par cellule (**Table 3**).

Echantillon	Âge (années)	Cytologie	Résultats AMPLICOR®	Résultats HCII®	Génotypage	PCR en temps réel E6 HPV16 (copies/cellule)
1	28	N	-	3	53	
2	33	ASCUS	-	3	53	
3	39	ASCUS	-	4	53	
4	36	ASCUS	-	18	53,66	
5	42	LGSIL	-	5	53	
6	18	LGSIL	-	12	53	
7	32	LGSIL	-	12	53	
8	38	LGSIL	-	20	53	
9	34	LGSIL	-	141	53	
1	50	N	+	-	16,53,70,56	< 5
2	37	ASCUS	+	-	6,16,18,51,53,54,66,70	< 5
3	46	ASCUS	+	-	68,39	
4	55	ASCUS	+	-	18,52,53,70	
5	19	LGSIL	+	-	31,33,52,53	
6	23	LGSIL	+	-	51,53,66	
7	46	LGSIL	+	-	51,53,54,66	
8	53	LGSIL	+	-	16	< 5
9	46	HGSIL	+	-	6,16,31,51,52,53,56	< 5

**Table 3.** Echantillons présentant des résultats discordants entre le test AMPLICOR® et le test HCII®

Résultat du génotypage par le test INNO-LiPA.

Afin de mesurer les sensibilités et spécificités analytiques des tests AMPLICOR® et HCII® au cours de cette étude, nous avons comparé les résultats obtenus à l'aide de chacune des deux trousse, à un « résultat HPV-HR consensus », défini par 2 résultats HPV concordants sur 3. Dans notre étude, la sensibilité (96,4%) et la spécificité analytique (100%) du test AMPLICOR® sont les mêmes que celles du test HCII® (Table 4).

	Résultats HPV HR consensus		Sensibilité	Spécificité	κ
	+	-			
<b>AMPLICOR® +</b>	241	0	96,4%	100%	0,96
<b>AMPLICOR® -</b>	9	220			
<b>HCII® +</b>	241	0	96,4%	100%	0,96
<b>HCII® -</b>	9	220			

**Table 4.** Comparaison des performances (sensibilité et spécificité analytiques) des tests AMPLICOR® et HCII®

### *Conclusion*

Cette étude a permis de comparer directement les performances des tests HCII® et AMPLICOR®, et les concordances entre les résultats des deux tests se sont avérées excellentes : 96,1% pour tous les échantillons, avec des variations de 92,9% à 97,1% en fonction de la cytologie des échantillons (normaux, ASCUS, LGSIL, HGSIL).

En ce qui concerne les échantillons discordants HCII® positifs et AMPLICOR® négatifs, nous pouvons supposer l'existence d'une réaction croisée entre l'HPV53 et la sonde spécifique du type 56, présente dans la trousse commerciale HCII®. Effectivement, ces deux génotypes sont très proches phylogéniquement. En ce qui concerne les échantillons présentant des résultats discordants HCII® négatifs et AMPLICOR® positifs, il semble vraisemblable que le test AMPLICOR® bénéficie d'une meilleure sensibilité analytique, du fait qu'il est basé sur l'utilisation d'une amplification par PCR. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les CV HPV16 des échantillons abritant ce type ont été mesurées comme étant très faibles en PCR en temps réel E6 HPV16.

En conclusion, le test AMPLICOR® a montré d'excellentes performances analytiques et cliniques, et peut-être recommandé au même titre que le test HCII® dans la détection des HPV.



## 2. COMPARAISON DES VALEURS DE CHARGE VIRALE HPV MESUREES PAR HCII® ET PCR EN TEMPS REEL

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

Jean-Luc Prétet, Véronique Dalstein, Sylvain Monnier-Benoit, Sébastien Delpéut, Christiane Mougin

[J Clin Virol. 2004 Oct;31(2):140-7]

Une partie de ce travail a été présenté sous forme orale :

❖ Au 21<sup>th</sup> International Conference and Clinical Workshop Papillomavirus 2004, à Mexico City (Mexique), du 16 au 20 février 2004

*Baseline HPV16 load is predictive for high grade lesion development*

Mougin C., Dalstein V., Monnier-Benoit S., Prétet JL.

❖ Aux 3<sup>èmes</sup> Rencontres LightCycler® (Roche), à Paris (France), le 27 novembre 2003.

*Quantification du génome du virus HPV16 par PCR en Temps Reel : profil d'évolution de la charge virale au cours d'une infection transitoire bénigne, et au cours d'une infection chronique avec apparition de lésions précancéreuses du col utérin*

Dalstein V., Monnier-Benoit S., Prétet JL., Mougin C.

## Introduction à la publication n°1

### *Introduction*

La détection des HPV HR par le test Hybrid Capture® II (HCII®) est très utilisée en clinique, de part ses performances en terme de sensibilité clinique, de reproductibilité et d'accessibilité. Or ce test donne un résultat qualitatif (positivité pour au moins un type d'HPV HR détecté par la trousse), et n'est pas validé en tant que test quantitatif. Néanmoins, des études – dont une menée par notre équipe – ont montré que la charge virale (CV) des HPV HR, mesurée par HCII®, pouvait être présentée comme étant un facteur prédictif de l'apparition des lésions cervicales (Dalstein *et al.*, 2003, Woodman *et al.*, 2001).

### *Objectifs et Méthodes*

L'objectif de notre travail était d'établir si les valeurs données par le test HCII® pouvaient être considérées comme quantitatives, en dépit du fait que la cellularité dans les échantillons cervico-utérins peut être variable. Pour cela nous avons comparé les valeurs obtenues par le test HCII® (en RLU) avec des valeurs de CV HPV16 obtenues par PCR en temps réel. La CV HPV16 a été normalisée en fonction du nombre de cellules et peut être ainsi exprimée en nombre de copies de virus par cellule.

Nous avons utilisé 100 échantillons cervico-utérins HPV HR positifs, obtenus à l'aide d'une brosse (PAP® smear, Digene) et conservé dans le milieu spécifique du test HCII®, Specimen Transport Medium (STM®, Digene). Une fois l'ADN extrait, deux PCR en temps réel ont été effectuées : l'une permet de déterminer un nombre de copies d'HPV16 (en ciblant E6 d'HPV16, développée en collaboration avec l'Action Concertée N°11 de l'Agence Nationale de Recherche Contre le SIDA) ; l'autre permet de déterminer un nombre de cellules (en ciblant le gène de l'albumine, présent en 2 copies dans chaque cellule diploïde eucaryote) (Laurendeau *et al.*, 1999). Les valeurs de CV peuvent être normalisées en fonction du nombre de cellules.

### *Résultats*

Une excellente corrélation entre le nombre de cellules présentes dans les échantillons cervico-utérins déterminé par PCR en temps réel ciblant l'albumine et déterminé par dosage spectrophotométrique, a été montrée. Nous avons validé la reproductibilité de la technique de PCR en temps réel ciblant le gène E6 d'HPV16. Nous avons pu montrer que la PCR en temps réel E6 HPV16 était très reproductible, avec une variabilité inter-expérience de moins de 5%. La CV HPV16 a été mesurée dans 40 échantillons cervico-utérins abritant ce génotype et nous avons montré une bonne corrélation entre les valeurs données par le test HCII® et les valeurs de CV HPV16 que l'on tienne compte ou non de la cellularité du prélèvement.

### *Conclusion*

Ces résultats montrent que les valeurs de RLU données par le test HCII® peuvent constituer une bonne estimation de la charge virale HPV HR. Ces observations sont contradictoires à ce que Bory *et*

*al.* ont pu montré en utilisant des échantillons provenant de résidus de cytologie liquide (Bory *et al.*, 2002). Il est important d'insister sur le fait que notre étude a été réalisée à partir de prélèvements cervico-utérins dédiés à la détection des HPV. Des précautions particulières doivent donc être prises avec les échantillons cervico-utérins provenant de résidus de cytologie liquide, dans lesquels la CV HPV HR est susceptible de varier en fonction du volume résiduel du prélèvement.







# High risk HPV load estimated by Hybrid Capture II<sup>®</sup> correlates with HPV16 load measured by real-time PCR in cervical smears of HPV16-infected women

Jean-Luc Prétet\*, Véronique Dalstein, Sylvain Monnier-Benoit, Sébastien Delpet, Christiane Mougin

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA3181 et IFR 133, Centre Hospitalier Universitaire J. Minjoz, Boulevard A. Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

Received in revised form 5 February 2004; accepted 7 February 2004

## Abstract

**Background:** High risk human papillomavirus (HR-HPV) load determined by quantitative methods has already been considered as highly predictive of future development of high grade cervical lesions. Some studies also demonstrated that Hybrid Capture II<sup>®</sup> (HCII<sup>®</sup>) results can be considered as a reflection of HPV DNA load, while others did not. HCII<sup>®</sup> assay, well suited for routine HR-HPV screening, is not especially dedicated for quantitative use. However, we have recently shown that women with high viral loads assessed by HCII<sup>®</sup> were at increased risk of cervical precancer. **Objectives:** The aim of the study was to determine if the values given by the HCII<sup>®</sup> assay can be considered as quantitative. **Study design:** We used a real-time PCR allowing precise quantification of both HPV16 genome and albumin gene to normalize the measuring HPV16 load in cervical cells and to compare the data with those obtained by HCII<sup>®</sup> in a series of 40 HR-HPV positive samples. **Results:** Reproducibility of the HPV16 real-time PCR, assessed from nine independent experiments of serial dilutions of SiHa cell DNA, was reflected in coefficients of variation for standard curves of crossing point (Cp) values below 5%. The HPV16 loads with a broad individual variability were significantly related to the cumulative load estimated by HCII<sup>®</sup> and did not depend on the cellularity of samples. **Conclusions:** We assume that the HCII<sup>®</sup> values can be used as a quantitative measure of HR-HPV DNA, so long as cervical specimens are collected using standardized protocols.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Human papillomavirus; Cervical cancer; Viral load; HCII<sup>®</sup>; Real-time PCR

## 1. Introduction

Human papillomaviruses (HPV) are epitheliotropic viruses that infect the squamous epithelia of the skin or mucosal cells. One of the most common sites for HPV infections is the genital tract and certain types of HPV have unequivocal oncogenic potential. For instance, HPV16, HPV18 and other high risk HPV (HR-HPV) are associated with precancerous and cancerous lesions of the cervix.

HR-HPV have been found in 99.7% of cervical malignancies, (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999) and HPV16 was the most frequently detected (up to 65% in Europe) (Bosch et al., 1995). Because of the strong association between HPV infection and cervical cancer, detection of HPV DNA in cervical samples may be an available option to identify women at risk of developing cancer (Bory et al., 2002; Ho et al., 1995; Wallin et al., 1999).

Numerous molecular techniques have been used to detect HPV in cervical samples, such as Southern blot, dot blot, in situ hybridization, filter in situ hybridization, PCR, and most recently solution hybridization with the Hybrid Capture II<sup>®</sup> (HCII<sup>®</sup>) assay (for review, see Trofatter, 1997). This latter technique is widely used because of its high sensitivity, reproducibility, objectivity, easiness and accessibility for routine clinical practice (Clavel et al., 2001; Cuzick et al., 1999; Petry et al., 2003; Riethmuller et al., 1999). This

**Abbreviations:** CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HCII, Hybrid Capture II; HGSIL, high grade squamous intraepithelial lesion; HPV, human papillomavirus; HR, high risk; PC, positive control; RLU, relative light unit

\* Corresponding author. Tel.: +33-3-81-669112; fax: +33-3-81-668342.

E-mail address: jean-luc.pretet@ufc-chu.univ-fcomte.fr (J.-L. Prétet).

assay is based on the hybridization of single-stranded viral DNA with two cocktails of RNA probes that recognize 13 HR-HPV types and five low risk HPV types. RNA/DNA hybrids are then reacted with labelled anti-hybrid antibodies and a chemiluminescent substrate, which emits light measured by a luminometer. Presence or absence of HPV DNA in the specimen is defined according to the strength in relative light units (RLU) compared with 1 pg/ml HPV DNA positive control (PC). The sample is considered positive when the ratio RLU/PC is equal or greater than 1.

Several studies have shown the potential relevance of HCII<sup> </sup> test in the triage and management of patients with atypical squamous cells of undetermined significance (The ALTS Group, 2000) or as a test of cure for patients treated for cervical intraepithelial neoplasia (Elfgren et al., 2002; Jain et al., 2001; Nobbenhuis et al., 2001). Furthermore, HR-HPV testing has been proposed as an adjunct to cervical cytology in primary cervical cancer screening of women over the age of 30 (Bory et al., 2002; Cuzick et al., 2003; Petry et al., 2003). In these women, the HPV test permits to identify those with a persistent infection and who are at risk for developing high grade squamous intraepithelial lesions (HGSIL) or worse (Dalstein et al., 2003; Kjaer et al., 2002; Nobbenhuis et al., 1999). In another way, a negative HPV test permits to reassure women that no significant lesion will develop in the next future (Monsonogo et al., 2004).

Although the HCII<sup> </sup> assay allows an estimation of the amount of HPV DNA present in the sample, it has not been validated as a quantitative test. Interestingly, it was shown that HPV RLU ratios positively correlated with both severity and size of the lesions (Sun et al., 2001). We recently observed that the risk to develop high grade squamous intraepithelial lesions increased significantly with the HR-HPV viral load determined by the HCII<sup> </sup> test (Dalstein et al., 2003). However, despite a specific cervical sampling dedicated only to HPV detection and collected by the same trained gynaecologists, the number of cells harvested may vary from sample to sample. Thus, the HR-HPV load determined by the HCII<sup> </sup> test may be biased according to the cellularity of the specimen.

Very recently, the availability of the real-time PCR has provided an attractive alternative to measure a precise HPV DNA load. With this technology, a cellular gene (e.g. albumin gene) can also be quantified, that reflects the number of cells present in the sample. The determination of HPV copies per cell permits to appreciate the true viral load. It has recently been shown that the highest HPV16 load were highly predictive of appearance of carcinoma in situ (CIS) (Josefsson et al., 2000). Ylitalo et al. also demonstrated that HPV16 load consistently increased already within 13 years or more before diagnosis of CIS; in the year before the lesion was diagnosed, the risk of developing CIS was increased 43-fold in women with high viral load and only three-fold in women with low viral load (Ylitalo et al., 2000). In an

elegant study, van Duin et al. observed that women with HGSIL harboured HPV16 at high levels, whatever the cytology was; the viral load was also greater at entry in the study in women who developed cytological abnormalities; a decrease in HPV16 load preceded viral clearance and regression of the lesions (van Duin et al., 2002).

HCII<sup> </sup> test has provided an accurate and attractive method for routine HPV detection. The aim of the study here was to establish if the values given by this test may be considered as quantitative. For this purpose, we compared the results with those obtained using a real-time PCR quantification. We therefore, validated this latter technique for the detection of HPV16. Thus, we found a good overall correlation between the HCII<sup> </sup> results and those obtained by real-time PCR.

## 2. Material and methods

### 2.1. Samples

One hundred HR-HPV positive cervical samples were randomly selected from our library of archival specimens, whatever the cytology and/or histology was. These specimens were collected using the Digene Cervical Sampler<sup> </sup> and transferred in a vial containing 1 ml Digene Specimen Transport Medium<sup> </sup> (STM). After a step of denaturation with sodium hydroxide, the samples were tested for HPV in a routine way with the Hybrid Capture II<sup> </sup> system (Digene, Gaithersburg, Maryland, USA) according to the manufacturer's instructions. They were then stored at –20 C until further experiments. In an arbitrary way and as described in a former study (Dalstein et al., 2003), the samples were classified in three groups according to the HCII<sup> </sup> results: group 1: <10 pg/ml; group 2: 10–99 pg/ml and group 3:  100 pg/ml.

### 2.2. DNA extraction

After thawing, 350  l denatured samples were neutralized with 50  l of 5 M acetic acid and 3 M potassium acetate. DNA was then purified using the QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after enzymatic digestion by a protease (56 C, 15 min), the lysate was loaded onto the Qiaamp column. After two washes, DNA was eluted twice with 40  l of elution buffer. DNA was quantified by spectrophotometry and concentration adjusted to 50 ng/ l when possible.

### 2.3. Real-time PCR

Amplification techniques using hydrolysis probes, performed on LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France), were used for the quantitative estimation of HPV16 DNA copies and albumin genes.

Table 1  
Sequences of primers and probe used to amplify the E6 HPV16 gene

	Sequence
Sens primer	5'-TTTTATGCACCAAAAGAGAACTGC-3'
Antisens primer	5'-AGCTCTGTGCATAACTGTGGTAACTT-3'
Probe	5'-FAM-ATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACC-TAMRA-3'

FAM: 6-carboxyfluorescein; TAMRA: 6-carboxy-*N,N,N',N'*-tetramethyl-rhodamine.

The real-time PCR for quantification of HPV16 DNA copies has been developed by the HPV subgroup: "opportunistic infections" from Agence Nationale de Recherche contre le SIDA (action concert  e number 11). Primers and probe targeting the E6 gene of HPV16 and designed using the LightCycler Probe Design Software<sup> </sup> (Roche Diagnostics) are presented in Table 1. To prepare standards, DNA was extracted from a batch of HPV16 positive SiHa cells known to harbour one to two copies of HPV16 per cell. For the following calculations we considered that each SiHa cell contained two copies of HPV16. An aliquot of DNA was submitted to an albumin real-time PCR in triplicate, as described below, in order to accurately determine the number of SiHa cells and by deduction the exact number of HPV16 genome copies. Then, four 10-fold serial dilutions of DNA were prepared in order to get 165,000; 16,500; 1650 and 165 copies of HPV16 genomes. Those samples, run in parallel with cervical DNA samples, were used to plot the standard curves. The PCR reaction was carried out in a final volume of 20 µl containing 1X Fast Start DNA Master Hybridization Probe (Roche Diagnostics), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 nM each primer, 50 nM probe and 2 µl of DNA solutions corresponding to 5–100 ng of DNA. Thermal cycling consisted in a step of 10 min at 95  C, followed by 50 cycles of 10 s at 95  C and 30 s at 60  C. Only 40 samples, which revealed to contain amplifiable HPV16 DNA, were considered for the present study.

Quantification of human albumin genes was performed as previously described (Laurendeau et al., 1999). The reference human genomic DNA provided by Roche Diagnostics (Meylan, France) was serially diluted and run in parallel with the DNA from cervical samples. Dilutions corresponding to 165,000; 33,000; 6600 and 1320 genomic DNA copies were used to plot the standard curve and to determine the number of cells present in the sample. Primers and probe were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). The albumin reaction was carried out in a final volume of 20 µl containing 1X Fast Start DNA Master Hybridization probe (Roche Diagnostics), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 nM each primer, 100 nM Taqman probe and 2 µl of DNA corresponding to 5–100 ng of DNA. Thermal cycling consisted in a step of 10 min at 95  C in order to activate the DNA polymerase, followed by 45 cycles of 15 s at 95  C and 60 s at 65  C.

All data collected by the LightCycler were analyzed with the Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software<sup> </sup>, Version 3.5 (Roche Diagnostics).

#### 2.4. Conventional PCR and HPV genotyping of PCR products

Material from 33 out of the 40 samples positive for HPV16 was available for qualitative PCR assay. HPV DNA was tested by L1 HPV consensus PCR with the MY09/MY11 primers as previously described (Manos et al., 1989). The denatured amplimers were then genotyped using the Hybridowell<sup>TM</sup> Universal Kit (Argene Biosoft, Varilhes, France) as we described (Riethmuller et al., 1999). The kit allows the detection of 96 amplified products per microtiter plate. Briefly, each well was coated with 5 µl of denatured amplified products overnight at room temperature. After washing, biotin labelled oligonucleotide probes specific for HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV45, HPV51, HPV52, HPV58 and HPV68 were added to wells and incubated for 30 min at 37  C. After several washes, the detection was performed with streptavidin peroxidase for 15 min at room temperature. Finally, colored products were revealed with tetramethylbenzidine substrate and optical density was read at 450 nm.

#### 2.5. Statistical analysis

Relative correlation between cell number in each sample determined by DNA dosage at 260 nm and by albumin real-time PCR, as well as, correlations between HPV16 load determined by real-time PCR and HR-HPV load given by HCII<sup> </sup> were assessed by the Spearman's rank correlation test. Distribution of HPV16 loads according to the different categories of HCII<sup> </sup> values was analyzed by the Mann–Whitney *U*-test. All analyses were performed using the STATA<sup>TM</sup> 5.0 statistical software (College station, TX).

### 3. Results

#### 3.1. HR-HPV DNA estimated by HCII<sup> </sup>

Among the 40 HPV16 positive samples, 15 harboured <10 pg/ml of HR-HPV DNA (range 2–9.6 pg/ml corresponding to  $2 \times 10^5$ – $9.6 \times 10^5$  copies of HPV genome per ml). Ten samples harboured 10–99 pg/ml of HR-HPV DNA (range 12.4–96 pg/ml corresponding to  $1.24 \times 10^6$ – $9.6 \times 10^6$  copies of HPV genome per ml) and 15 samples harboured  $\geq 100$  pg/ml of HR-HPV DNA (range 132–2393 pg/ml corresponding to  $1.32 \times 10^7$ – $2.39 \times 10^8$  copies of HPV genome per ml).

#### 3.2. Correlation between number of cells determined by DNA dosage and albumin real-time PCR

The HCII<sup> </sup> assay needs a denaturation step of cervical samples with sodium hydroxide. In order to neutralize the pH before DNA extraction, specimens were treated with acetic acid and potassium acetate. DNA yield varied from

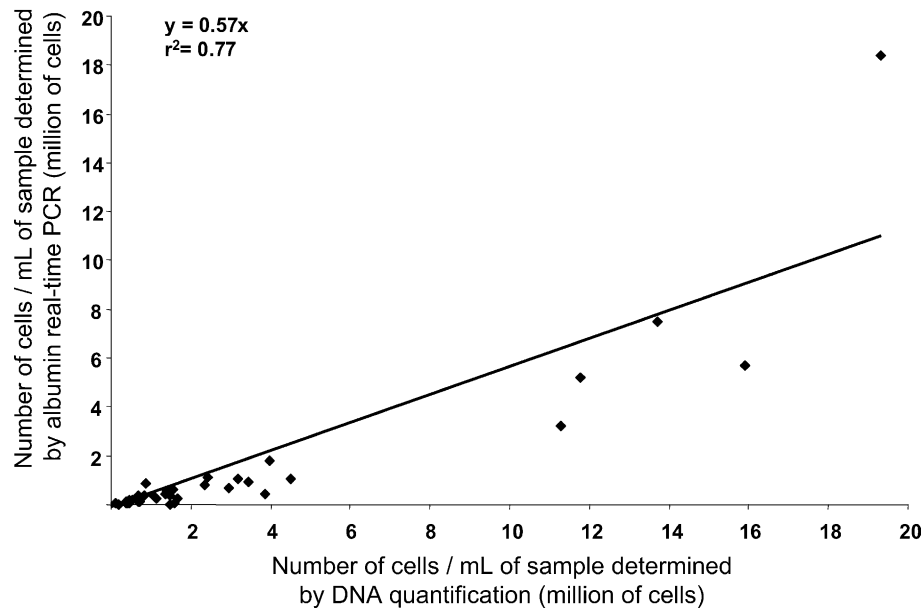


Fig. 1. Correlation between the number of cells present in cervical samples as determined by albumin real-time PCR and DNA dosage. Both techniques were performed on the same DNA extract from 40 cervical samples.

sample to sample and concentration of DNA measured by spectrophotometry ranged from 2.5 to 507 ng/ $\mu$ l. Variations in DNA concentration might represent differences in cellularity. While enumeration of cells with a microscope is not easy because of cell alteration, the number of cells can be deduced (i) from DNA concentration—considering that one cell contains approximately 6 pg of DNA and (ii) by determining the number of albumin genes—considering that each diploid cell contains two copies of this gene.

Then, the cell number per ml of cervical samples calculated by albumin real-time PCR was plotted as a function of the cell number calculated by DNA dosage. We observed a relatively similar range of values between the two assays (Fig. 1). The Spearman's rank correlation was 0.83 ( $P < 10^{-4}$ ), which also indicates good agreement between the two measures.

### 3.3. Validation of E6 HPV16 real-time PCR

In order to validate the HPV16 quantitation method, dilutions of DNA from SiHa cells corresponding to 165,000; 16,500; 1650 and 165 copies of HPV16 genomes were run in nine independent experiments. Data were used to plot the standard curves of crossing point (Cp) versus the logarithm of HPV16 genomes that were generated by the LightCycler Software<sup>®</sup> (Version 3.5), using the second derivative maximum method (Fig. 2). The highly significant linear regression between Cp and the logarithm of HPV16 copies was assessed by excellent coefficients of correlation ( $r^2 > 0.95$ ) for each standard curve. The nine replicate amplifications for every dilution of SiHa cell DNA gave very similar Cp values. Indeed, the standard deviation did not exceed 1.04 and coefficient of variation was less than

4.93%. This was consistent with low values for standard deviation and coefficient of variation for slope and Y intercept (Fig. 2, inset). These data as a whole demonstrate the high reproducibility of the E6 HPV16 DNA quantification assay.

### 3.4. Correlation between HR-HPV load measured by HCII<sup>®</sup> and HPV16 real-time PCR

The crude HPV16 load varied from  $5.6 \times 10^3$ – $8.4 \times 10^7$  copies per mL of original STM sample. The logarithm of HPV16 load was then plotted as a function of the logarithm of HR-HPV load estimated by HCII<sup>®</sup>. As shown in Fig. 3A, a correlation was found between the two viral load measures. The Spearman's rank correlation reached 0.87 ( $P < 10^{-4}$ ), which confirms a good agreement between both HPV quantification methods.

Then, the HPV16 load was studied with normalization for cell number by albumin real-time quantitation and for convenience expressed in copies/ $10^3$  cells. Results varied from 10–280000 copies/ $10^3$  cells. In order to appreciate the correlation between the normalized HPV16 load and the HR-HPV load, the logarithm of values were plotted. Again there was an excellent rank correlation with a Spearman rho value of 0.74 ( $P < 10^{-4}$ ) (Fig. 3B).

Finally, values of normalized HPV16 load were reported according to the HCII<sup>®</sup> values in the three defined groups (Fig. 4). While the median normalized HPV16 load was lower in the first group when compared to the second group (170 copies/ $10^3$  cells versus 810 copies/ $10^3$  cells, respectively), this difference was not statistically significant ( $P = 0.06$ ). It was however interesting to note that in the second group, the cervical sample with the lowest normalized



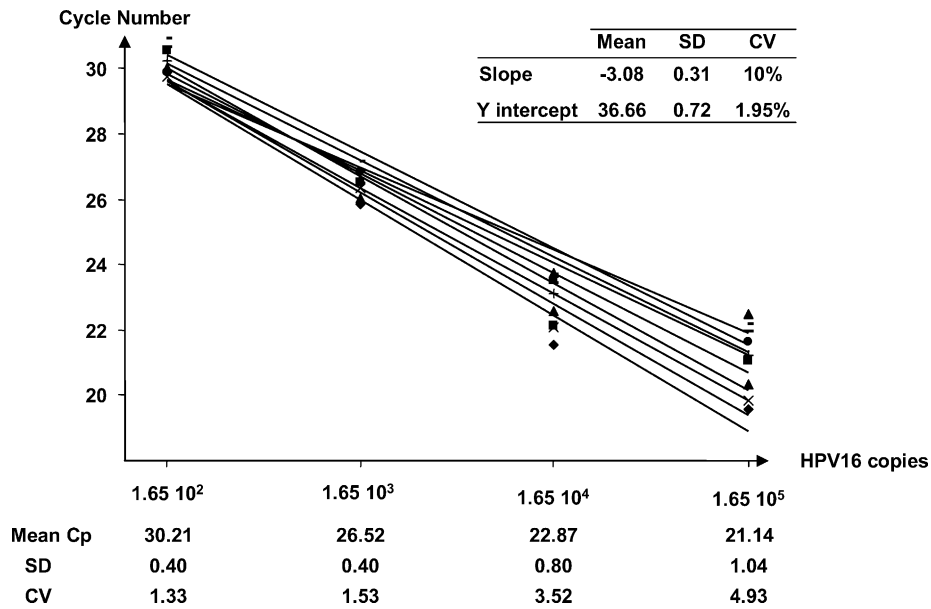


Fig. 2. Reproducibility of HPV16 quantification standard curves for E6 HPV16 DNA quantification were drawn for nine independent experiments. Mean of Cp, slope and Y intercept, standard deviation (S.D.) and coefficient of variation (CV) were calculated.

HPV16 load (69 copies/10<sup>3</sup> cells) also presented the lowest HCII<sup>®</sup> value (12 pg/mL). If this sample had not been taken into account, the difference would have become significant ( $P = 0.03$ ). In contrast, the median normalized HPV16 viral load in the third group ( $2.27 \times 10^4$  copies/10<sup>3</sup> cells) was significantly higher when compared to the first and the second groups.

### 3.5. Low frequency of multiple HPV genotypes

Crude viral loads measured by HCII<sup>®</sup> test were most of the time higher than that measured by HPV16 real-time PCR. Since multiple infections are quite common, we were interested to appreciate their frequency. Material was available for 33 samples that were genotyped for nine additional HR-HPV. Only four samples (12%) were found to harbor at least another HR-HPV type: 1 HPV18, 1 HPV31, 1 HPV35 and 1 HPV65.

## 4. Discussion

We recently published that HR-HPV values given by the HCII<sup>®</sup> test were predictive of the risk to develop a high grade lesion (Dalstein et al., 2003). While the HCII<sup>®</sup> test is well suited for routine HPV screening, it was not designed, a priori, to be a quantitative test and validity of HCII<sup>®</sup> values, as a viral load, is still debated (Clavel et al., 2001; Dalstein et al., 2003; Lorincz et al., 2002; Sun et al., 2001, 2002). Here, we used a real-time PCR method for E6 HPV16 quantification in order to appreciate whether the HCII<sup>®</sup> assay could be suitable as a quantitative approach for clinical practice. Indeed, recent data have suggested that the HR-HPV load would help to identify women at high risk for progres-

sion to HGSIL (Josefsson et al., 2000; van Duin et al., 2002; Ylitalo et al., 2000).

Real-time PCR is a recent technology that allows accurate and rapid quantification of nucleic acids of interest. Quantification of albumin genes permits to appreciate the number of cells present in the sample. Indeed, we found a good correlation between the number of cells estimated after DNA quantification and albumin real-time PCR. The slope for the regression line was less than one, suggesting that quantification of cells might be overestimated by DNA dosage as previously described (Rasmussen, 2001) or underestimated by albumin real-time PCR. The tested samples, primarily dedicated for HCII<sup>®</sup> test, have been denatured with the Di-gene buffer that contains sodium hydroxide and then stored at  $-20^\circ\text{C}$  before DNA extraction. These pretreatments are likely to compromise the DNA integrity. Thus, the albumin real-time PCR may be not as efficient as with fresh material. In the same way, quantification of HPV16 genomes by real-time PCR is likely dependent on the DNA quality. Thus, we definitely chose to normalize HPV copy numbers according to sample cellularity itself evaluated by albumin PCR.

Few validated protocols for HPV16 quantification are available. The real-time PCR test yield highly precise and reproducible results. Indeed, the different HPV16 standard runs in nine independent assays presented very similar Cp, slopes and Y intercepts as confirmed by low coefficients of variation. The real-time PCR allowed the quantification of HPV DNA over a large dynamic range (from 10<sup>3</sup> up to 10<sup>8</sup> copies per ml STM). These large inter-individual variations have to be precisely investigated in relation to virological, immunological and clinical parameters.

The present study was limited to samples harbouring HPV16, which represents more than 50% of HR-HPV

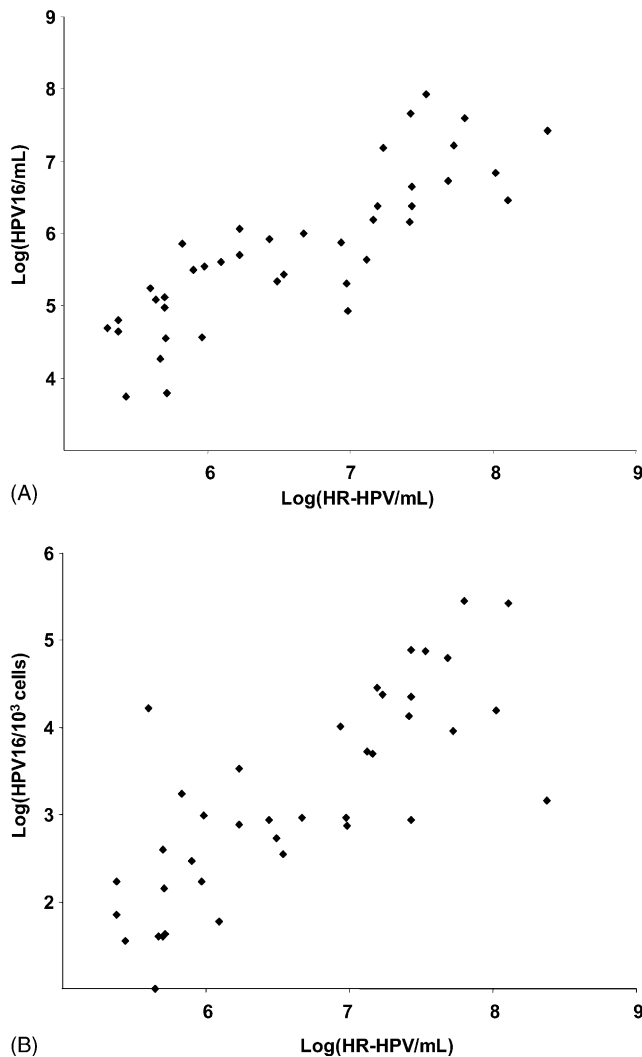


Fig. 3. Correlations between HPV16 crude load (HPV16 per mL, A panel) or HPV16 normalized load (HPV16 per 10<sup>3</sup> cells, B panel) and HR-HPV load determined by HCII<sup>®</sup> (HR-HPV per mL).

types detected in our cohort of infected women (unpublished data). Although we studied a relatively low number of specimens (40), we did find a correlation between the HR-HPV load determined by HCII<sup>®</sup> and the crude HPV16 load assessed by real-time PCR, as recently observed by Gravitt et al. in a larger series of 111 specimens (Gravitt et al., 2003). Because some authors reported that the cellularity of the cervical samples might bias the HCII<sup>®</sup> values, we normalized HPV16 load according to the cell number which was calculated from albumin real-time PCR. The correlation between the crude HR-HPV load given by the HCII<sup>®</sup> test and the normalized HPV16 titer estimates was still excellent. The adjustment for cellularity appeared not to be necessary to obtain more accurate results as already published (Gravitt et al., 2003).

Additionally, normalized HPV16 results were related to the HCII<sup>®</sup> values. Indeed, we confirmed that the HPV16 copy numbers were higher among women with HCII<sup>®</sup>

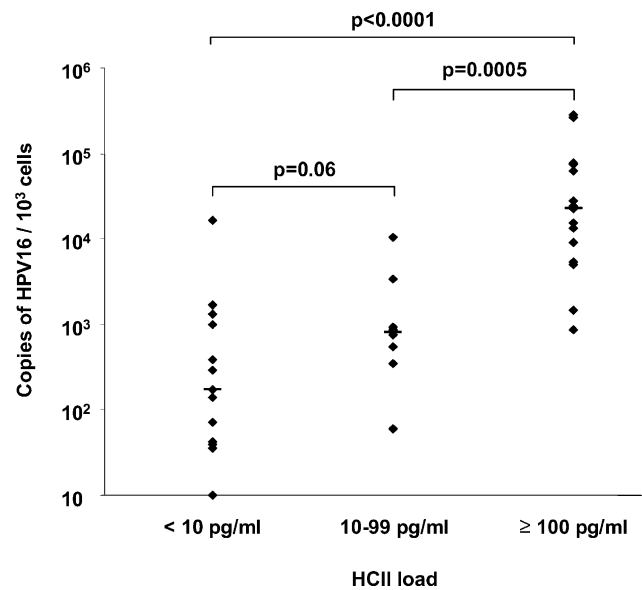


Fig. 4. Distribution of normalized HPV16 load measured by real-time PCR according to the HR-HPV load determined by HCII<sup>®</sup> assay. Cervical samples were classified in three groups according to the HCII<sup>®</sup> values: <10 pg/ml (*n* = 15); 10–99 pg/ml (*n* = 10); ≥ 100 pg/ml (*n* = 15). Each E6 HPV16 is represented by a black diamond. Bars show the median viral load.

results ≥ 99 pg/ml or comprised between 10 and 99 pg/ml, than in women with HCII<sup>®</sup> results <10 pg/ml.

These findings might extend the usefulness of the HCII<sup>®</sup> test in screening programs since the RLU values may represent quantitative data. Our previous study provides evidence that women with low levels of HR-HPV (e.g. <10 pg/ml) are more likely to clear their infection, while women with high HR-HPV loads (e.g. ≥100 pg/ml) are at high risk of CIN2/3+ development (Dalstein et al., 2003). Ho et al. have also noted that CINs with a high viral load are more likely to persist than those with a low level of HR-HPV (Ho et al., 1995). Furthermore, Peitsaro et al. emphasized that an initial high viral load will increase the probability of integration into the host cellular DNA (Peitsaro et al., 2002), an important step in tumour progression. Whether HCII<sup>®</sup> values, as well as true HPV loads measured by real-time PCR, may be of clinical relevance to identify women with increased risk to develop high grade lesions or worse, further intensive laboratory and clinical investigations are needed before an HPV load assay can be applied in routine cervical cancer screening.

Moreover, with the HCII<sup>®</sup> test, it is not possible to discriminate between an increased risk linked to a viral load per se or to a multiple HPV infection. More accurate results could have been achieved if additional HR-HPV types, such as HPV18, HPV45, HPV31, HPV33 (Moberg et al., 2003) would have been taken into account for real-time quantification. However, we have to point out that the proportion of multiple infections is low (12%) in our series when compared with recent data (Rousseau et al., 2001).

Our results support the idea that the values given by HCII® can be considered as a good estimation of the HR-HPV load as reported previously (Dalstein et al., 2003; Farthing et al., 1994; Sun et al., 1995, 2001, 2002). This is in contrast with two studies that do not achieve such a conclusion (Bory et al., 2002; Lorincz et al., 2002). In particular, Bory et al., who performed the HCII® test from liquid based cytology, suggest that variations in the cell number preclude any semi-quantitative use of the HCII® values (Bory et al., 2002). We have to emphasize that in our study a special device dedicated only to HPV testing was used by the same trained gynaecologists to collect cervical cells. Moreover, the cervical samples analyzed to estimate the HR-HPV load were always collected after a Pap smear, that likely minimized differences in cell collection, as already described (Gravitt et al., 2003). Particular cautions have to be taken with residual specimens from liquid-based cytology. Indeed, the size of residues available for HPV testing is dependent on the volume used for liquid-based cytology. Moreover, part of the viral genomes that would not be anymore associated with cells because of their disruption might be eliminated from the supernatant during the cell filtration step. As a consequence, the presence of HR-HPV DNA might be largely underestimated in these residues.

In conclusion, the real-time quantitative PCR method, that can be used to detect and quantify viruses with a known sequence, was applied for the detection of HPV16 in cervical swabs and would greatly facilitate investigations on HPV pathogenesis. The application of this method to samples tested by HCII® permitted to validate the latter for viral load estimation, so long as samples are collected using standardized protocols. The use of both techniques to evaluate viral persistence or clearance in cervical disease outcome is currently in progress in our laboratory.

## Acknowledgements

We would like to thank S. Coumes Marquet for excellent technical assistance with Hybrid Capture II®, the HPV group of ANRS AC11 for providing hybridization probes and reference human genomic DNA and Dr. L. Bermont for critical review of the manuscript. We are indebted to gynaecologists who participated to the HPV screening program. Dr. V. Dalstein and S. Monnier-Benoit were supported by fellowships from Fondation de France and Région de Franche-Comté, respectively. Part of the study was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer, Département du Jura.

## References

Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, et al. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* 2002;102:519–25.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer IBSCC Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796–802.

Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, et al. Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* 2001;84:1616–23.

Cuzick J, Beverley E, Ho L, Terry G, Sapper H, Mielzynska I, et al. HPV testing in primary screening of older women. *Br J Cancer* 1999;81:554–8.

Cuzick J, Szarewski A, Cubie H, Hulman G, Kitchener H, Luesley D, et al. Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 2003;362:1871–6.

Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003;106:396–403.

Elfgrén K, Jacobs M, Walboomers JM, Meijer CJ, Dillner J, Kjaer SK, et al. Rate of human papillomavirus clearance after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *Obstet Gynecol* 2002;100:965–71.

Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol* 1994;47:649–52.

Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, et al. Comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:477–84.

Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1365–71.

Jain S, Tseng CJ, Horng SG, Soong YK, Pao CC. Negative predictive value of human papillomavirus test following conization of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 2001;82:177–80.

Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2189–93.

Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002;325:572.

Laurendeau I, Bahuau M, Vodovar N, Larramendy C, Olivi M, Bieche I, et al. TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin Chem* 1999;45:982–6.

Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002;360:228–9.

Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, Wolinsky S. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209–14.

Moberg M, Gustavsson I, Gyllenstein U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2003;41:3221–8.

Monsonogo J, Bosch FX, Coursaget P, Cox JT, Franco E, Frazer I, et al. Cervical cancer control, priorities and new directions. *Int J Cancer* 2004;108:329–33.

Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK, et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001;84:796–801.

- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354:20–5.
- Peitsaro P, Johansson B, 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* 2002;40:886–91.
- Petry KU, Menton S, Menton M, van Loenen-Frosch F, de Carvalho Gomes H, Holz B, et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer* 2003;88:1570–7.
- Rasmussen R, 2001. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid cycle real-time PCR. Methods and applications*, Springer. p. 21–34.
- Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, Bettinger D, Schaal JP, Carbillet JP, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:157–64.
- Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis* 2001;184:1508–17.
- Sun CA, Lai HC, Chang CC, Nieh S, Yu CP, Chu TY. The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001;83:95–9.
- Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:41–7.
- Sun XW, Ferenczy A, Johnson D, Koulos JP, Lungu O, Richart RM, et al. Evaluation of the Hybrid Capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1432–7.
- The ALTS Group, 2000. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study (ALTS) Group. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:397–402.
- Trof  tter Jr KF. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* 1997;102:21–7.
- van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002;98:590–5.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12–9.
- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;341:1633–8.
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355:2194–8.



### 3. EVOLUTION DE LA CHARGE VIRALE HPV16 AU COURS DE L'HISTOIRE NATURELLE DES LÉSIONS DU COL UTERIN

#### Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions

Sylvain Monnier-Benoit, Véronique Dalstein, Didier Riethmuller, Najoua Lalaoui, Christiane. Mougin, Jean-Luc Prétet

[J Clin Virol. 2006 Mar;35(3):270-7. Erratum in: J Clin Virol. 2006 Oct;37(2):137]

Ce travail a été présenté sous forme orale :

❖ Au VI<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie, à Bordeaux (France), du 10 au 12 mai 2004

*La charge virale du papillomavirus humain de type 16 : un profil d'évolution prédictif du développement d'une lésion pré-invasive du col utérin*

Monnier-Benoit S., Dalstein V., Prétet JL., Mougin C.

❖ Au 21<sup>th</sup> International Conference and Clinical Workshop Papillomavirus 2004, à Mexico City (Mexique), du 16 au 20 février 2004

*Baseline HPV16 load is predictive for high grade lesion development*

Mougin C., Dalstein V., Monnier-Benoit S., Prétet JL.

❖ Aux 3<sup>èmes</sup> Rencontres LightCycler® (Roche), à Paris (France), le 27 novembre 2003.

*Quantification du génome du virus HPV16 par PCR en Temps Reel : profil d'évolution de la charge virale au cours d'une infection transitoire bénigne, et au cours d'une infection chronique avec apparition de lésions précancéreuses du col utérin*

Dalstein V., Monnier-Benoit S., Prétet JL., Mougin C.

❖ Au International Multidisciplinary Congress of EUROpean Research Organization on Genital Infection and Neoplasia (EUROGIN), à Paris (France), en avril 2003

*Real time PCR quantification of HPV16 DNA load*

Dalstein V., Prétet JL., Monnier-Benoit S., Madoz L., Mougin C.

## Introduction à la publication n°2

### *Introduction*

La CV des HPV HR semble être prédictive de l'apparition des lésions précancéreuses et du cancer du col de l'utérus. Ainsi, la quantification de l'ADN d'HPV comme élément prédictif de la sévérité d'une lésion, pourrait constituer un meilleur marqueur qu'un simple test HPV (Moberg *et al.*, 2004, Moberg *et al.*, 2005). L'avènement de la quantification absolue de la CV grâce aux techniques de PCR en temps réel a permis de montrer que même si les fortes CV sont associées à un risque important de développer des lésions de grades élevés, les faibles CV n'excluent pas systématiquement une progression des lésions du col de l'utérus vers un grade plus sévère.

### *Objectifs et Méthodes*

Il s'est avéré très intéressant de pouvoir mesurer les variations de la CV HPV16 au cours de l'histoire naturelle de l'infection chez des femmes présentant des anomalies cytologiques mineures.

Pour cela, nous avons réalisé une étude rétrospective sur 38 patientes pour lesquelles la CV HPV16 a été mesurée. Parmi ces patientes, 13 ont développé des lésions de type CIN2/3 (le « groupe cas ») et 25 n'ont pas développé de lésion (résultats HCII® négatif et cytologie normale) (le « groupe témoins »). L'ADN a été extrait de 132 échantillons cervico-utérins, et la CV HPV16 a été déterminée à l'aide des techniques de PCR temps réel décrites précédemment (Laurendeau *et al.*, 1999, Prétet *et al.*, 2004). Les résultats obtenus ont été exprimés en nombre de copies d'HPV16 pour 1 000 cellules.

### *Résultats*

Nous avons montré que l'incidence cumulative d'apparition des lésions CIN2/3 sur une période de 18 mois augmente de 14%, chez les femmes ayant des CV initiales inférieures à 200 copies pour 1 000 cellules, à 48%, chez les femmes ayant des CV initiales supérieures à 200 copies pour 1 000 cellules. Nous avons observé que les profils d'évolution de la CV HPV16 étaient différents en fonction de l'évolution des lésions. Ainsi, pour le « groupe témoins », la médiane de CV HPV16 a diminué au cours du suivi, alors qu'elle a augmenté (et reste toujours supérieure à 200 copies pour 1 000 cellules) pour les femmes ayant développé des CIN2/3. Les CV HPV16 à la fin du suivi et pour la période de temps de 1 à 12 mois avant la fin de l'étude, étaient significativement différentes entre les deux groupes de patientes. Enfin, nous avons montré qu'il existait différents profils d'évolution de CV en fonction des patientes. D'une façon générale, la clairance de l'infection (et donc l'élimination des lésions) semble être toujours précédée d'une diminution significative de plus d'un logarithme de la CV HPV16. Lorsque l'on considère l'évolution de la CV HPV16 entre les deux premiers points de suivi, l'incidence cumulative d'apparition d'une lésion CIN2/3 augmente de 15%, chez les femmes qui présente une CV stable ou qui diminue, à 50%, chez les femmes qui présentent une augmentation de la CV.

### *Conclusion*

Ces données obtenues sur une petite cohorte, montrent que l'évolution de la CV HPV16 est prédictive de l'évolution des lésions du col de l'utérus. Nous avons pu déterminer un seuil clinique de CV HPV16 au dessus duquel une patiente a un risque élevé de développer une lésion CIN2/3. Cette étude nous a permis aussi d'observer que des profils de CV HPV16 différents étaient trouvés en fonction de l'histoire naturelle des lésions, et il semble que la chute de la CV (de 1 à 2 logarithmes) puisse constituer un facteur de bon pronostic (régression des lésions). Enfin, alors qu'il a été montré que la persistance virale pouvait être définie comme 2 tests HPV positifs à 12 mois d'intervalle, nous avons observé dans le « groupe témoins » des patientes présentant des CV HPV16 élevées pendant de longues périodes de temps (25 et 44 mois). Cette observation pose la question de la durée de la persistance d'infection, qui définit les infections dites « à risque de CIN2+ » – associées à un risque élevé de développer une lésion de haut grade – et les infections « non à risque de CIN2+ » qui ne sont pas associées à un risque de HGSIL. Ceci suggère également qu'outre la persistance et la CV, d'autres facteurs déterminants sont impliqués dans l'évolution des lésions.





# Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions

S. Monnier-Benoit<sup>a</sup>, V. Dalstein<sup>a</sup>, D. Riethmuller<sup>b</sup>, N. Lalaoui<sup>a</sup>, C. Mougin<sup>a</sup>, J.L. Prétet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3181, IFR 133, Université de Franche-Comté, Centre Hospitalier Universitaire Jean Minjoz, Boulevard A Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

<sup>b</sup> Service de Gynécologie-Obstétrique, EA 3181, IFR 133, Université de Franche-Comté, Centre Hospitalier Universitaire, Boulevard A Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

Received 7 April 2005; received in revised form 1 August 2005; accepted 5 September 2005

## Abstract

**Background:** High burden of high risk human papillomavirus (HR HPV) has been shown to be predictive for the development of high grade cervical lesions and invasive cancers. However, low viral load cannot inevitably exclude progression towards cervical diseases. Moreover, few studies addressed whether viral load could predict infection clearance.

**Objectives:** We carried out a retrospective study to analyze the variations of HPV16 load over time as a predictive marker of clinical outcome.

**Study design:** The population consisted of 38 women who were found HR HPV positive by HCII<sup>®</sup> test at study entry. Among them, 13 had developed a CIN2/3 (cases) and 25 had a negative HCII<sup>®</sup> test and a normal cytology (controls) at study exit. The HPV16 DNA loads were quantified in 132 longitudinal cervical samples using quantitative real-time PCR.

**Results:** At study entry, the median of HPV16 load was not statistically different between controls and cases. However, when using a cut-off value of 200 copies/10<sup>3</sup> cells, the rate of cumulative incidence of CIN2/3 at 18 months increased from 14% in women with a load ≤ 200 copies/10<sup>3</sup> cells to 48% in women with a load > 200 copies/10<sup>3</sup> cells. The longitudinal analysis performed on follow-up samples showed that in cases the progression to CIN2/3 was linked to HPV16 burden increasing over time, whereas in controls a decrease of at least 1 log HPV16 DNA load was observed over ≥ 2 time points.

**Conclusions:** These results show that kinetics of HPV load, rather than a single HPV detection, might be more reliable to estimate whether a HPV infection will progress or be cleared.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Human papillomavirus (HPV); Cervical intraepithelial neoplasia (CIN); HPV16 DNA load; Quantitative real-time PCR

## 1. Introduction

Since the discovery of high risk human papillomaviruses (HR HPV) as a major cause of carcinoma of the uterine cervix (Bosch et al., 1995; Walboomers et al., 1999; zur Hausen,

2002), considerable efforts have been made in the last decade to introduce HPV testing in screening and management of women at risk for cancer precursors [for review, see (Lorincz and Richart, 2003; Solomon et al., 2001)]. However in France, in 2000, an estimated 3387 women were diagnosed with invasive cancer leading to 1000 deaths (Exbrayat, 2003).

HR HPV infection is the most common sexually transmitted infection throughout the world. However, this infection is mostly transient as the virus is generally cleared within a mean period of 8–10 months (Ho et al., 1998; Dalstein et al., 2003). On the other hand, several authors have pointed out that persistent infections are of predictive value for present as well as future cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (Bory

**Abbreviations:** ASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; FU, follow-up; HCII, hybrid capture II; HGSIL, high grade squamous intraepithelial lesion; HPV, human papillomavirus; HR HPV, high risk HPV; LGSIL, low grade squamous intraepithelial lesion; LR HPV, low risk HPV; PCR, polymerase chain reaction; STM, specimen transport medium

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 81 66 91 12; fax: +33 3 81 66 83 42.

E-mail address: jean-luc.pretet@ufc-chu.univ-fcomte.fr (J.L. Prétet).

et al., 2002; Dalstein et al., 2003; Ho et al., 1998, 1995; Koutsky et al., 1992; Nobbenhuis et al., 1999; Petry et al., 2002; Remmink et al., 1995; Schlecht et al., 2001). In addition, women found to be HR HPV negative are unlikely to develop cervical lesion, at least during a 2 year follow-up (FU) (Clavel et al., 2004; Dalstein et al., 2003).

Numerous qualitative techniques based on molecular hybridization or PCR have been used to detect HPV at the cervical level [for review, see (Hubbard, 2003)]. Nevertheless, analytical sensitivity of techniques varies widely from low (e.g. 0.1 copy/cell for Southern blot) to high sensitivity (e.g.  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  copy/cell for PCR). As for PCR, its sensitivity depends on primers (e.g. MY11/09 versus GP5/6), DNA polymerase or size of the amplified target DNA (Snijders et al., 2003). The Digene Company (Gaithersburg, MD, USA) has developed the Hybrid Capture II<sup>®</sup> assay (HCII<sup>®</sup>), based on HR HPV DNA hybridization with a cocktail of riboprobes specific for 13 viral genotypes. The specimen is scored as positive if the value is greater than or equal to the 1.0 relative light unit. Although this assay has not been validated as a quantitative test, we have shown in a previous study that HR HPV load estimated by HCII<sup>®</sup> was predictive of any CIN outcome (Dalstein et al., 2003). Furthermore, we reported that HCII<sup>®</sup> load was correlated with HPV16 load measured by real-time PCR (Prétet et al., 2004).

Several authors have also noted that quantitative measurement of HPV DNA, as an evolutive predictor or determinant of disease severity, was of better value than a single HPV positive result (Moberg et al., 2004; Schlecht et al., 2003; van Duin et al., 2002; Ylitalo et al., 2000). For instance, the amount of HR HPV DNA increases with the grade of the lesion (Lo et al., 2005; Swan et al., 1999; van Duin et al., 2002; Weissenborn et al., 2003). This increase was noted for HPV16, but not for HPV18, 31, 33, 45, 56 (Gravitt et al., 2003; Swan et al., 1999; Weissenborn et al., 2003). Moreover, the highest HPV16 loads are predictive of the appearance of carcinoma before any intraepithelial lesions are detectable (Josefsson et al., 2000; Ylitalo et al., 2000). Moberg et al. (2004) recently pointed out that the risk of developing cervical carcinoma increased whatever the HR HPV genotype was. However, the odds ratio for carcinoma *in situ* was higher for HPV16 than for other HR HPV (e.g. HPV31 or HPV18/45). In a model of temporal relationship in HPV-induced carcinoma, Peitsaro et al. (2002) have proposed that the probability of integration increases with high HPV16 DNA loads.

Because of fluctuations in viral status, ranges of viral load can be however very large, even when stratified according to the lesion grade (Swan et al., 1999; Ylitalo et al., 2000). Thus, the dynamics of HPV infection over time would be more informative to predict histological outcome. Up to now, the kinetics of HPV load during the natural history of cervical disease have been little investigated (van Duin et al., 2002). We thus studied whether changes in HPV16 load monitored at 12-month interval were associated with a histological outcome of CIN2/3 or normal outcome at study exit.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Population

Our retrospective study was performed on samples from women who attended the Gynaecology Department of the University Hospital of Besançon (France). Cohort characteristics and FU design have been reported in detail elsewhere (Dalstein et al., 2003, 2004). Briefly, women were followed-up every 6 months by cytology and HPV testing. When high grade squamous intra-epithelial lesions were suspected, women were referred for colposcopy and biopsy for histological evaluation.

Inclusion criteria for the present study were a positive HCII<sup>®</sup> test and a cytology within normal limits or with minor abnormalities. Among the eligible women, we included 38 patients who were tested HPV16 positive as we previously described (Prétet et al., 2004). There were 13 patients referred to as “cases” who had developed a histological proven CIN2/3 during the surveillance protocol. They were compared with 25 women referred to as “controls” who had a negative HCII<sup>®</sup> test and a normal cytology at the end of FU.

Cases and controls were matched for age, initial cytology, HR HPV load by HCII<sup>®</sup>, mixed infection with low risk (LR) HPV (Table 1). According to the clinical outcome, the median of FU durations between study entry and study exit was 11 months in cases and 23 months in controls. The median of sample numbers during the observation period was three for cases as well for controls. The main characteristics of the two groups of women are given in Table 1.

### 2.2. DNA extraction from cervical exfoliated cells

One hundred and thirty-two cervical samples had been obtained both at entry in the study and during the FU period.

Table 1  
Characteristics of the enrolled women

	Controls (n = 25)	Cases (n = 13)	p
Median age—years (range)	28 (17–49)	32 (21–41)	NS
Initial cytology <sup>a</sup>			
Normal	16	7	NS
ASCUS	2	2	
LGSIL	7	4	
Mixed infection with LR HPV Nb (%)	3 (12%)	1 (7.7%)	NS
Median of HR HPV loads by HCII <sup>®</sup> pg/mL (range)	69 (1.4–3442)	132 (1.8–2393)	NS
Median of FU—months (range)	23 (10–45)	11 (3–29)	<0.05
Median of sample numbers dur- ing FU Nb (range)	3 (3–6)	3 (2–5)	NS

ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; LGSIL: low grade squamous intraepithelial lesions; HR HPV: high-risk HPV; LR HPV: low risk HPV; NS: not significant.

<sup>a</sup> The cytology system used was that of Bethesda (2002).

They were collected every 6–12 months until suspicion of CIN2/3 or a negative HCII® test and a normal cytology. Ninety-seven samples were provided from controls and 35 from cases.

Cervical cells had been collected using the Cervical Sampler® (Digene) and transferred in a vial containing 1 mL Specimen Transport Medium® (STM) (Digene). The samples had been denatured with a solution of sodium hydroxide for routine HR HPV testing with the HCII® assay (Digene). They were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further processing.

Before DNA extraction, the samples were thawed. Three hundred and fifty microliters of each sample were neutralized with 50  $\mu\text{L}$  of 5M acetic acid and 3 M potassium acetate and used for DNA extraction using the QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

### 2.3. Real-time quantitative PCR

Quantification of HPV16 DNA and human albumin gene was performed with a LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France) using hydrolysis probes on all samples at all time points.

For HPV16, the PCR reaction targeted the E6 gene. The sequences of the forward and reverse primers were respectively: 5'-TTTTATGCACCAAAGAGAACTGC-3' and 5'-AGCTCTGTGCATAACTGTGGTAACTT-3' (Eurogentec, Seraing, Belgium). A fluorescent oligomer 5'-FAM-ATG-TTTCAGGACCCACAGGAGCGACC-TAMRA-3' (Eurogentec) served as a probe. The reaction procedures have been described in detail previously (Prétet et al., 2004).

Five 10-fold serial dilutions of DNA from SiHa cells (considered to harbour two copies of HPV16 per cell) were prepared in order to get 82,500, 8250, 825, 82 and 8 copies of HPV16 per microliter. These samples, run in parallel with DNA from cervical samples, were used to plot the standard curves.

Each cervical sample was also subjected to real-time PCR for the quantification of human albumin gene as previously described (Laurendeau et al., 1999). Serial dilutions of the reference human genomic DNA provided by Roche Diagnostics (Meylan, France) were prepared in order to get 82,500, 16,500, 3300, 660 and 132 genomic DNA copies. These dilutions were used to plot the standard curves and to determine the number of cells present in the cervical samples. Water blanks were included in each assay as negative controls.

All data collected by the LightCycler were analyzed with the Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software®, Version 3.5 (Roche Diagnostics). For convenience, the concentrations of HPV16 DNA were expressed as a number of HPV16 copies per  $10^3$  cells. Medians of viral loads and cell numbers were studied over three time periods: [25–48]-month, [13–24]-month and [1–12]-month before end-point study.

### 2.4. Statistical analysis

Age, initial cytology, initial HR HPV load and HPV16 load, mixed infection with LR HPV, duration of FU, number of samples collected during the FU and number of cells in samples were compared using the Mann–Whitney *U*-test, the Chi-square test and the Fisher's exact test whichever appropriate in case of discrete variables.

CIN2/3 cumulative incidence was calculated from the day of study entry until the last FU visit. Estimation was performed according to the method of Kaplan and Meier.

In controls the outcome was HPV clearance associated with normal cytology. Viral loads at entry and study end point were compared using the Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test.

All statistical tests were two-sided and a *p* value less than 0.05 was considered to be significant. Analyses were performed using the STATA™ 5.0 statistical software (College station, TX).

## 3. Results

### 3.1. Quantification of albumin gene

This quantification permitted to estimate the number of cells present in each cervical sample. After testing the 97 control samples, the median of cell numbers present in 1 mL of STM was  $5.2 \times 10^5$  (range  $6.5 \times 10^3$ – $3.3 \times 10^6$ ). Similarly, after testing the 35 samples from cases, the median of cell numbers present in 1 mL STM was  $7.1 \times 10^5$  (range  $3.4 \times 10^4$ – $2.8 \times 10^6$ ). The median of cell numbers from smears collected in controls and cases was not statistically different in the different periods and at study exit (data not shown).

### 3.2. HPV16 load at study entry

At the time of initial presentation, the median of HPV16 DNA copy numbers was higher (299 copies/ $10^3$  cells; range:  $1.7$ – $2.2 \times 10^4$  copies/ $10^3$  cells) in women who developed a CIN2/3 than the median of HPV16 load (63 copies/ $10^3$  cells; range  $0.3$ – $6.38 \times 10^5$  copies/ $10^3$  cells) in controls, though not reaching statistical significance.

Despite this lack of significance, the Kaplan–Meier estimate showed that HPV16 DNA load at entry in the study and cumulative incidence of CIN2/3 were significantly correlated ( $p=0.05$ ). Using a cut-off level of 200 HPV16 copies/ $10^3$  cells for qPCR, that corresponds to the 1 pg/mL HCII® cut-off, the percentage of 18-month cumulative incidence of high grade lesions increased from 14% (CI 95% 5.4–36.6) among women with load  $\leq 200$  copies to 48% (CI 95% 25.8–74.8) among women with load  $> 200$  copies (Fig. 1).



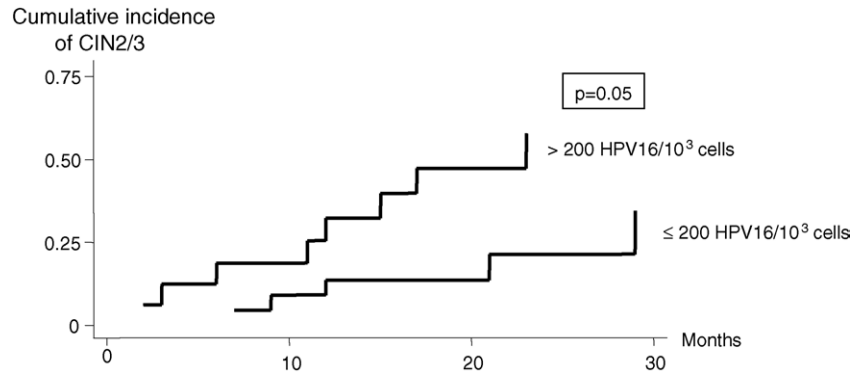


Fig. 1. Kaplan–Meier estimates of cumulative incidence of CIN2/3 among the 38 women, according to the initial HPV16 load (cut-off: 200 copies/ $10^3$  cells).

### 3.3. Kinetics of HPV16 load during FU

We next monitored the relation between HPV16 loads and time to the end of FU in controls and cases by stratifying into three time periods before study exit (Fig. 2).

In controls, the median of HPV16 DNA loads constantly decreased from 83 copies/ $10^3$  cells at 25–48 months before end of FU to 0.47 copie/ $10^3$  cells at the end of FU. The HPV16 DNA was even undetectable in smears of 7 out of 25 women. For cases, at the exception of one sample, harvested during the first time period (25–48 months), the median of HPV16 loads remained high ( $>200$  copies/ $10^3$  cells) throughout FU and even increased up to  $1.3 \times 10^4$  copies/ $10^3$  cells at time of cervical disease. The difference in HPV16 DNA loads between controls and cases was highly significant at study exit ( $p < 0.001$ ) and 1–12 months earlier ( $p = 0.01$ ). The 13 cases have been treated by loop electro-excision procedure.

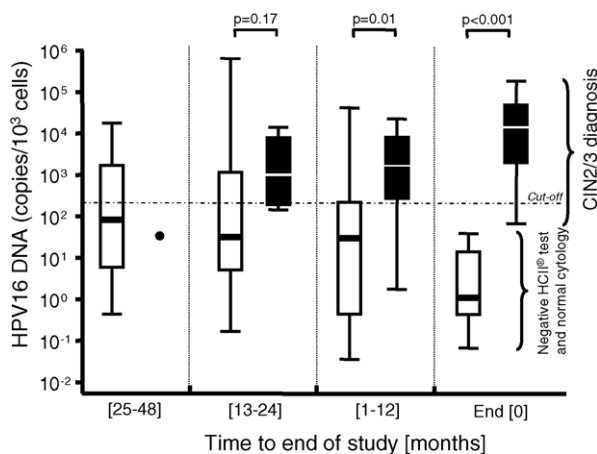


Fig. 2. HPV16 DNA loads in different time periods before study end-point. Empty boxes represent values in controls and filled boxes represent values in cases. Horizontal bars in boxes represent medians and the whiskers represent the extreme values. Statistical analysis was performed with the Mann–Whitney *U*-test.

### 3.4. Individual dynamics of HPV16 load

Dynamics of HPV16 DNA load during FU were variable among controls and cases.

Among controls, two types of viral load profiles were observed (Fig. 3A). In 15 subjects, HPV16 load decreased

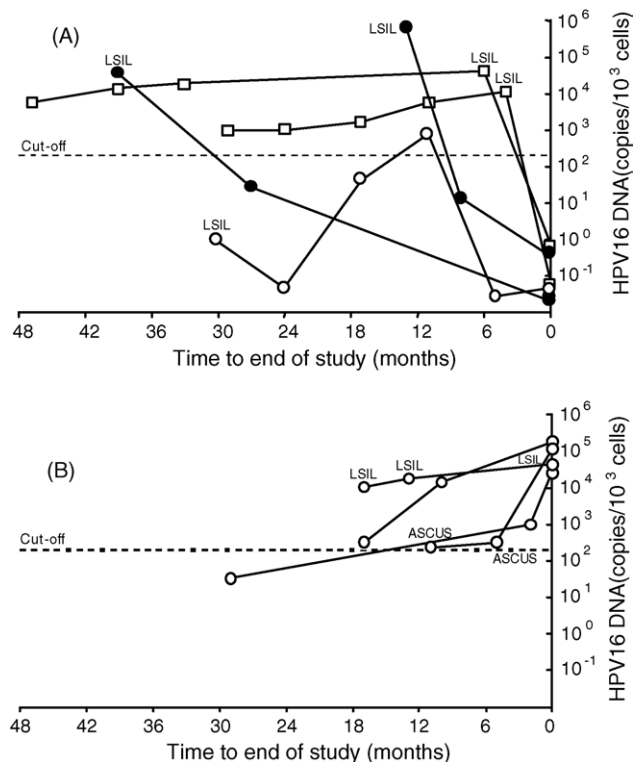


Fig. 3. Longitudinal monitoring of HPV16 DNA loads in some representative women. (A) Representative patterns of HPV16 load profiles in 5 controls. Two of them presented a steadily decrease of HPV16 load (black circles). Three of them presented a transient viral peak (white circles) or a phase of plateau (white squares) before HPV16 load dropped dramatically. (B) Representative patterns of HPV16 load profiles in four cases. Points without cytology information correspond to smears within normal limits. Points with abnormal smears are reported on the graphs. ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance; LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion.



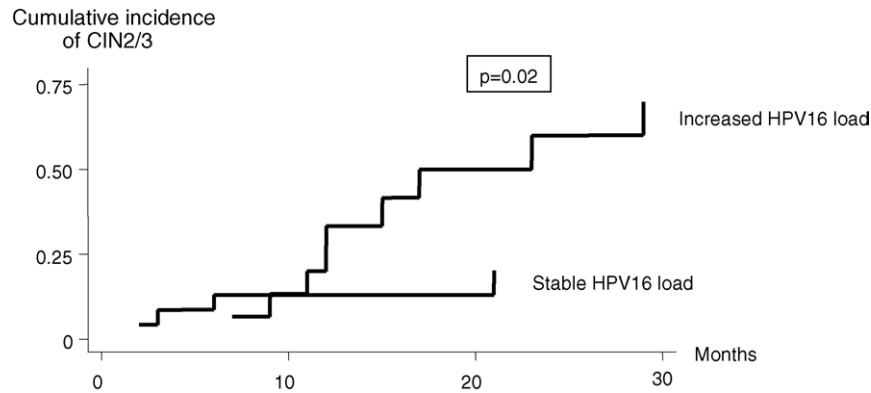


Fig. 4. Kaplan–Meier estimates of cumulative incidence of CIN2/3 among the 38 women, according to the evolution of HPV16 load between the 2 first smears.

steadily during FU (Fig. 3A, black circles). Patients presenting such a viral load profile are likely to control their HPV infection. In the remaining 10 subjects, the decline in HPV16 load was preceded by a transient peak of viral load (eight patients, Fig. 3A, white circles) or by a phase of plateau (two patients, Fig. 3A, white squares). The duration of these plateaus was 25 and 44 months. Nevertheless, we would like to point out that a reduction of HPV16 load of at least 1 log was observed between study entry and study exit in each control ( $p < 0.0001$ ).

Among cases, HPV16 load increased until CIN2/3 diagnosis in 8 out of 13 women. Moreover, HPV16 loads were consistently above 200 copies/ $10^3$  cells at the second visit (Fig. 3B). Four cases showed stable values of HPV16 load that remained high (above 200 copies/ $10^3$  cells) during FU period. Only one patient presented at the first visit with a low HPV16 load – 1.7 copy/ $10^3$  cells – that increased to 66 copies/ $10^3$  cells during the monitoring period.

In addition, the Kaplan–Meier estimate confirmed that kinetics of HPV16 loads over the 2 first time points did significantly correlate with abnormal outcome (Fig. 4). Indeed, cumulative incidence of CIN2/3 rose from 15% (CI 5.4–36.6) among patients with a stable HPV16 load to 50% (CI 27.4–77.8) among patients with an increased HPV16 load.

### 3.5. Cytology evolution during FU

Among controls, nine women had a smear evocative of minor abnormalities at study entry. They normalized their cytology and cleared their HPV infection during FU, as confirmed by a negative HCII® test and a negative real-time HPV16 PCR at study exit. Sixteen women had a smear within normal limits at entrance and at study exit. However, four of them transiently presented a cytology in favour of LGSIL. Interestingly, two out of four women showed a quite long duration of infection with a phase of plateau (Fig. 3A, white squares).

Whatever the initial cytology was, all cases were diagnosed with histological proven CIN2/3 while Pap smears

were evocative of HGSIL in seven cases, LGSIL in one case, ASCUS in two cases and normal in three cases.

## 4. Discussion

We recently demonstrated that persistence, as well as baseline high risk HPV load were predictive of CIN2/3+ (Dalstein et al., 2003). We also reported that viral loads estimated by HCII® were highly correlated with HPV16 loads measured by a real-time quantitative PCR (Prétet et al., 2004). Here, we analyzed the dynamics of HPV16 burden over time. We observed that HPV16 DNA profiles were concordant with the clinical outcomes in most patients. Indeed, patients who developed a CIN2/3 showed an increase in HPV16 load over time, while women who became HR HPV negative (by HCII®) without any CIN outcome presented with a decrease of at least 1 log.

Authors already reported that quantification of HPV DNA permits to distinguish more accurately women at high risk of cervical lesions than qualitative detection of the virus (Dalstein et al., 2003; van Duin et al., 2002; Ylitalo et al., 2000). Real-time PCR allows such a quantitative approach of HPV infection (Nagao et al., 2002; Prétet et al., 2004). However, a HPV test with a high analytical sensitivity—our system was sensitive enough to detect one copy per  $5 \times 10^4$  cells (data not shown) – would present a very low clinical specificity (Snijders et al., 2003). Therefore, a relevant cut-off (e.g. an HPV16 load above which the patient is considered at risk to develop a cancer) should be defined before the test could be suitable for clinical practice. For convenience we have chosen a cut-off for viral load of 200 HPV16 genomes/ $10^3$  cells because it represented approximately the HCII assay threshold. Indeed, the 1 pg HPV genome/mL corresponds to  $10^5$  HPV genomes/mL. Since the cervical samples harbor a mean of  $5 \times 10^5$  cells/mL, the HCII® cut-off represents  $10^5$  HPV/ $5 \times 10^5$  cells equivalent to 200 HPV16/ $10^3$  cells. Interestingly this cut-off was in the range of the two thresholds proposed by van Duin et al. according to initial cytology:  $2.4 \times 10^4$  HPV16/scrapes (a scrape contains approximately

$0.6 \times 10^5$ – $2.2 \times 10^5$  cells) for women with normal cytology and  $4.3 \times 10^6$  HPV16/scrapes for women with abnormal smears (van Duin et al., 2002; Snijders et al., 2003).

At first visit, HPV16 loads as well as HR HPV loads were more elevated in cases than in controls, although not significant. This result was expected as we previously demonstrated that HPV16 loads determined by real-time PCR were highly correlated to HR HPV loads determined by HCII® test (Prétet et al., 2004). In contrast, when stratified according to the designed periods, the median of HPV16 loads was readily higher in cases than in controls 12 months before study end-point. This difference was not due to sampling bias as smear cellularity was very close between controls and cases. These findings are in keeping with those of van Duin et al. (2002). A similar trend in HPV16 load was observed in samples taken 13–24 months before the end of FU but the difference was not significant. This can be related to the small cervical sample size available from cases at this time period.

Although some baseline samples were positive by HCII® test (a liquid hybridization using HPV RNA probes for HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), they apparently harboured a low HPV16 load (e.g.  $<10$  copies/ $10^3$  cells, a viral load under the HCII® threshold). This discrepancy might be partly explained by the processing of samples required for HCII® analysis as we previously discussed (Prétet et al., 2004). Also, the presence of multiple HR HPV contributing to a positive HCII® test must not be excluded. Thus, CIN2/3 development may be due to other genotypes that could have been detected and quantified using the technology developed by Moberg et al. (2003). Confounding effects due to multiple infections would have been prevented if we had recruited women infected only by HPV16. However, the sample size would have been too low to draw conclusions.

Using a threshold value of 200 copies/ $10^3$  cells, as discussed above, we were able to observe a high incidence of CIN2/3 in women with a baseline load  $>200$  copies/ $10^3$  cells confirming that high viral loads are predictive of CIN2/3 development [for review, see (Snijders et al., 2003)]. In addition, the frequent monitoring of these women had allowed an early diagnosis and thereby an early therapeutic intervention. Indeed HR HPV and especially HPV16 infection persisted throughout the FU with increasing levels. van Duin et al. (2002) reported similar results and led the hypothesis that increasing viral loads over time would favour viral persistence and by consequence the development of cervical CIN2/3 or worse.

On the other hand, normal outcome in controls was strongly associated to sustained reductions of HPV16 DNA levels over  $\geq 2$  time points. This likely reflects an efficient immune response against HPV and/or HPV infected cells leading to an extensive reduction of viral burden that reaches levels without any clinical significance. There were, however, eight patients who showed a peak of viral load followed by viral clearance. This high viral burden observed months

before study exit might be necessary to stimulate the immune system and to favour efficient virus elimination.

Unexpectedly, a viral persistence, which had been defined by at least two smears positive for the same HPV genotype at 12-month interval (Einstein and Burk, 2001), was observed in several controls. Thus, two women with a normal cytology at study entry and a high viral load ( $>10^3$  copies/ $10^3$  cells) during 25 and 44 months (Fig. 3A, white squares), presented a transient LGSIL that spontaneously disappeared after viral clearance. The latter results raise the question of the duration and load of HPV infection to define a deleterious persistence with an increased risk of high grade lesion. We have also to keep in mind that fluctuations in viral status due to the presence of additional HPV types might explain the inconsistency between natural history of cervical lesions and HPV load (Crum et al., 2004). Other studies have already clearly demonstrated that loss of detectable HPV precedes cytologic improvements by several months (Dalstein et al., 2003; Nobbenhuis et al., 2001). As previously reported, infections with high levels of oncogenic HPV DNA, and especially HPV16, were more likely to persist than infections with low levels of HPV DNA (van Duin et al., 2002).

Other criteria should be taken into account to improve the clinical relevance of HPV16 load. Interestingly, in every control, HPV DNA levels decreased by at least 1 log over  $\geq 2$  time points. These observations might be very useful for clinical practice. Indeed, women with such a HPV16 load decrease have a great probability not to develop a CIN2/3 as shown here. An elegant report recently confirmed that patients with CIN2/3 lesions, whose quantitative HPV16 load have dropped below 1000 copies per  $10^3$  cell equivalents by their week 15 visit resolved their lesions, while patients whose HPV16 load increased over the follow-up period, particularly to high levels, did not clear their lesions (Trimble et al., 2005). Prospective studies in HPV-infected women, including determination of viral load profile, are needed to confirm our hypothesis. However, such an approach for cervical cancer screening suffers from the necessity of high patient compliance with at least two repeated control visits (Schlecht et al., 2003).

Now, the challenge remains to propose biological test(s), that could distinguish relevant from non relevant high risk HPV infection from a single sample (Snijders et al., 2003). Few investigators have already developed technologies to study integration (Klaes et al., 1999; Peitsaro et al., 2002; Swan et al., 1999) and mRNA expression (Lamarcq et al., 2002; Molden et al., 2005) in HR HPV associated cervical diseases. More studies are needed to evaluate these potential markers as prognosis factors for the development of high grade lesions or worse.

## Acknowledgements

We are grateful to Sylviane Coumes-Marquet for excellent technical assistance with HPV testing. We are indebted to

Dr. Peter J.F. Snijders for critical reading of the manuscript. Part of this work was granted by “La Ligue Contre le Cancer (comité du Jura, France)”. Sylvain Monnier-Benoit is the recipient of a pre-doctoral scholarship from the Conseil Régional de Franche-Comté (France).

## References

- Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quéreux C, Birembaut P, et al. Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* 2002;102(5):519–25.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(11):796–802.
- Clavel C, Cucherousset J, Lorenzato M, Caudroy S, Nou JM, Nazeyrollas P, et al. Negative human papillomavirus testing in normal smears selects a population at low risk for developing high-grade cervical lesions. *Br J Cancer* 2004;90(9):1803–8.
- Crum CP, Beach KJ, Hedley ML, Yuan L, Lee KR, Wright TC, et al. Dynamics of human papillomavirus infection between biopsy and excision of cervical intraepithelial neoplasia: results from the ZYC101a protocol. *J Infect Dis* 2004;189(8):1348–54.
- Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003;106(3):396–403.
- Dalstein V, Riethmuller D, Sautière JL, Prétet JL, Kantelip B, Schaal JP, et al. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population; benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* 2004;40(8):1225–32.
- Einstein MH, Burk RD. Persistent human papillomavirus infection: definitions and clinical implications. *Papillomavirus Rep* 2001;12:119–23.
- Exbrayat C. Col de l'utérus. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. In: Remontet L, Buemi A, Velten M, Jouglu E, Estève J, editors. Paris: Actis; 2003. p. 107–12.
- Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* 2003;112(1–2):23–33.
- Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338(7):423–8.
- Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(18):1365–71.
- Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(8):940–5.
- Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qvarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355(9222):2189–93.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 1999;59(24):6132–6.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327(18):1272–8.
- Lamarq L, Deeds J, Ginzinger D, Perry J, Padmanabha S, Smith-McCune K. Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn* 2002;4(2):97–102.
- Laurendeau I, Bahuau M, Vodovar N, Larramendy C, Olivi M, Bieche I, et al. TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin Chem* 1999;45(7):982–6.
- Lo KW, Yeung SW, Cheung TH, Siu NS, Kahn T, Wong YF. Quantitative analysis of human papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: A study in Chinese population. *J Clin Virol* 2005.
- Lorincz AT, Richart RM. Human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cytology in cervical screening programs. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(8):959–68.
- Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3221–8.
- Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* 2004;112(5):854–9.
- Molden T, Kraus I, Karlsen F, Skomedal H, Nygard JF, Hagmar B. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):367–72.
- Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, et al. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):863–7.
- Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Risse EK, et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001;84(6):796–801.
- Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354(9172):20–5.
- Peitsaro P, Johansson B, 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* 2002;40(3):886–91.
- Petry KU, Bohmer G, Iftner T, Davies P, Brummer O, Kuhnle H. Factors associated with an increased risk of prevalent and incident grade III cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer among women with Papanicolaou tests classified as grades I or II cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(1):28–34.
- Prétet J-L, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delpeut S, 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* 2004;31(2):140–7.
- Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61(3):306–11.
- Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001;286(24):3106–14.
- Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2003;103(4):519–24.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* 2003;201(1):1–6.
- Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(4):293–9.
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is depen-

- dent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 1999;37(4):1030–4.
- Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, Ronnett B, Pizer E, Elko A, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11(13):4717–23.
- van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* 2002;98(4):590–5.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12–9.
- Weissenborn SJ, Funke AM, Hellmich M, Mallmann P, Fuchs PG, Pfister HJ, et al. Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high-grade cervical lesions are strongly elevated. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2763–7.
- Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355(9222):2194–8.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50.

#### 4. INTEGRATION D'HPV16 DANS LES LESIONS DU COL UTERIN

Comparison of percentage of integration and viral load patterns determined by quantitative real time PCR E2 and E6 HPV16 in different cervical lesions

[Manuscrit en préparation]

Ces travaux ont été présentés sous forme orale :

❖ Au 6<sup>th</sup> International Multidisciplinary Congress of European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia (EUROGIN), à Paris (France), en avril 2006

*Reliability and pitfalls of real-time PCR to estimate the percentage of HPV16 integration*

Saunier M., Monnier-Benoit S., Prétet J-L.

Ces travaux ont été présentés sous forme affichée :

❖ Au 22<sup>th</sup> International Conference and Clinical Workshop Papillomavirus 2005, à Vancouver (Canada), du 30 avril au 6 mai 2005

*Real-time quantitative PCRs (RTqPCR) targeting E2 and E6 are reliable methods to determine the physical status of HPV16 DNA*

Monnier-Benoit S., Saunier M., Căpîlna M., Mo LZ., Mougin C., Prétet JL.

## Introduction

Le développement d'un cancer du col de l'utérus se fait généralement en plusieurs étapes qui peuvent être décrites par des profils histopathologiques bien définis : LGSIL, HGSIL et cancer invasif. Beaucoup d'études se sont intéressées aux facteurs influençant la progression des atypies mineures vers des HGSIL ou un cancer, et ont montré que la persistance virale (notamment des types 16 et 18) est nécessaire au développement d'un cancer, et que cette persistance est modulée par différents facteurs liés à l'hôte et au virus. Parmi les facteurs liés aux virus, nous avons vu que la CV jouait un rôle important. En revanche, nous venons de voir que dans certains cas, de fortes CV, persistantes pendant plus de 3 ans, étaient considérées comme des infections « non à risque de CIN2+ ». Nous avons donc voulu en savoir davantage en nous intéressant à un phénomène lié au processus de carcinogenèse, qui est l'intégration virale.

## Objectifs et Méthodes

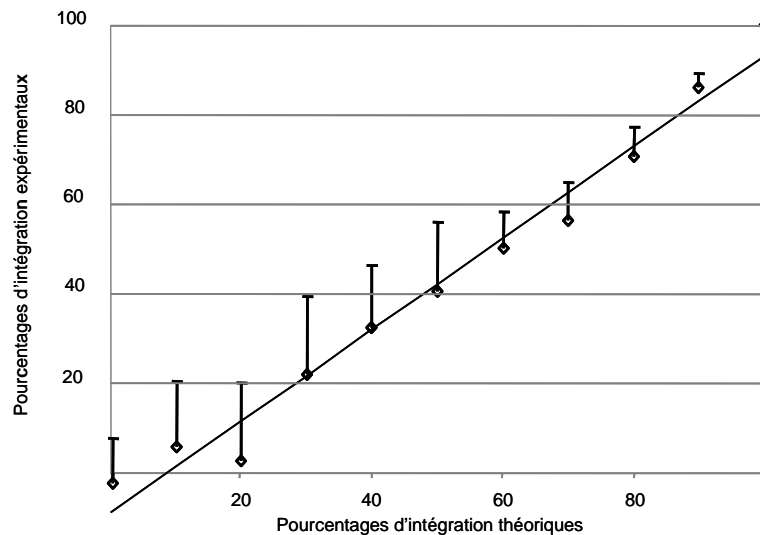
Aujourd'hui les données résultantes des études sur l'intégration des HPV sont très hétérogènes, probablement du fait des technologies utilisées pour mesurer ce processus. L'objectif de notre travail a donc été dans un premier temps de valider une technique de PCR en temps réel permettant de mesurer des taux d'intégration du génome d'HPV16, puis dans un second temps, d'utiliser cette technique afin de déterminer les relations entre grade des lésions, taux d'intégration et charge virale.

Pour cela, 318 échantillons d'ADN de cellules cervico-utérines ont été utilisés, provenant de prélèvements de cytologies différentes (PAP smear® et STM® du test HCII® ; résidus de cytologie liquide ; biopsies fixées au formaldéhyde et incluses en paraffine). Une PCR ciblant le gène de l'albumine et une PCR ciblant le gène E6 d'HPV16 – décrites précédemment (Laurendeau *et al.*, 1999, Monnier-Benoit *et al.*, 2006, Prétet *et al.*, 2004) – ont permis de quantifier respectivement le nombre de cellules et le nombre de copies totales (épisomales et intégrées) d'HPV16, définissant la charge virale. Une PCR ciblant le gène E2 d'HPV16 – décrite et utilisée précédemment (Peitsaro *et al.*, 2002) – a permis de quantifier le nombre de copies d'HPV16 sous forme épisomale. Le pourcentage d'intégration est déterminé en utilisant la relation :  $[1 - (\text{nb copies épisomales} / \text{nb copies totales})] \times 100$ . Des gammes d'étalonnage ont été réalisées en utilisant des dilutions d'ADN humain calibré (PCR albumine) et des dilutions de plasmides pBR322-HPV16 dans de l'ADN de sperme de saumon (PCR E6 HPV16 et PCR E2 HPV16).

## Résultats

La sensibilité analytique de la PCR E2 a été déterminée à 100 copies de E2 d'HPV16 pour 100 000 cellules en réalisant des dilutions de plasmides pBR322-HPV16 dans de l'ADN de cellules HaCat. La spécificité de la technique a aussi été évaluée et aucune réaction croisée n'a été observée en utilisant des échantillons contenant d'autres types d'HPV (18, 31, 33, 39, 52 et 56). Enfin la reproductibilité de la technique est excellente, puisque que pour 17 expérimentations différentes et indépendantes, les coefficients de variation des valeurs de Cp obtenus pour les points de gamme de calibration sont inférieurs à 4%. L'efficacité de la technique a été aussi mesurée à une valeur constante de 1,9. Enfin, nous avons validé notre méthode de mesure des taux d'intégration, en

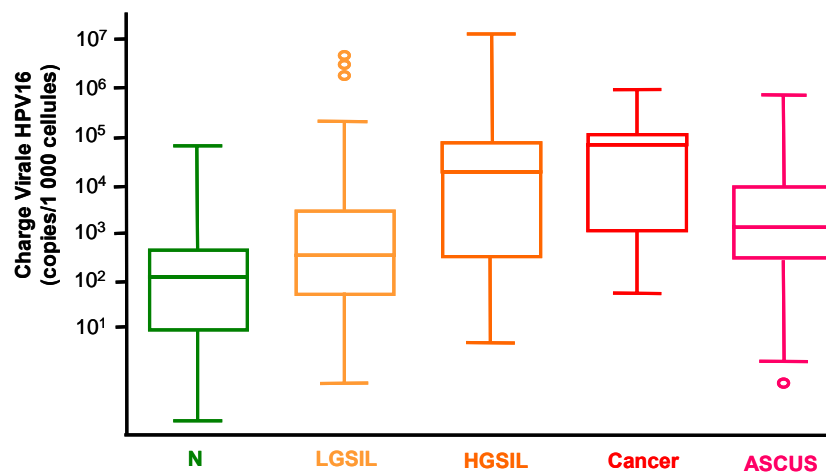
mélangeant de l'ADN de cellules SiHa (cellules infectées par 2 copies d'HPV16 intégrées et représentant 100% d'intégration) et du plasmide pBR322-HPV16 (représentant les formes épisomales). Ainsi nous avons pu développer des modèles théoriques d'intégration de l'HPV16 allant de 0 à 100% d'intégration, par incrémentation de 10%. Une excellente corrélation entre les résultats expérimentaux et les résultats théoriques a été observée ( $r^2=0,98$ ) (**Figure 15**).



**Figure 15.** Taux d'intégrations expérimentaux en fonction des taux d'intégrations théoriques

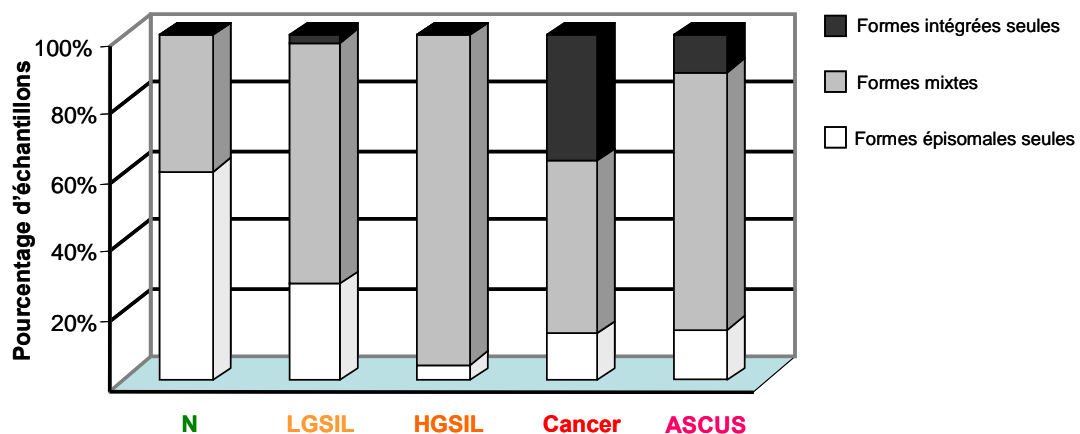
Les barres verticales représentent l'écart à la moyenne

Nous avons mesuré la CV HPV16 des 190 échantillons, et nous avons montré une augmentation de cette CV qui est liée à la sévérité de la lésion. Ainsi, la CV médiane mesurée dans les échantillons provenant de cytologie normale est égale à 100 copies pour 1 000 cellules, 276 copies pour 1 000 cellules en ce qui concerne les LGSIL, 15 415 copies pour 1 000 cellules en ce qui concerne les HGSIL, et pour les cancers une CV médiane de près de 55 000 copies pour 1 000 cellules a été mesurée. Les ASCUS présentent une valeur médiane de CV qui est intermédiaire entre les LGSIL et les HGSIL (**Figure 16**).



**Figure 16.** Charge virale en fonction du diagnostic cytologique

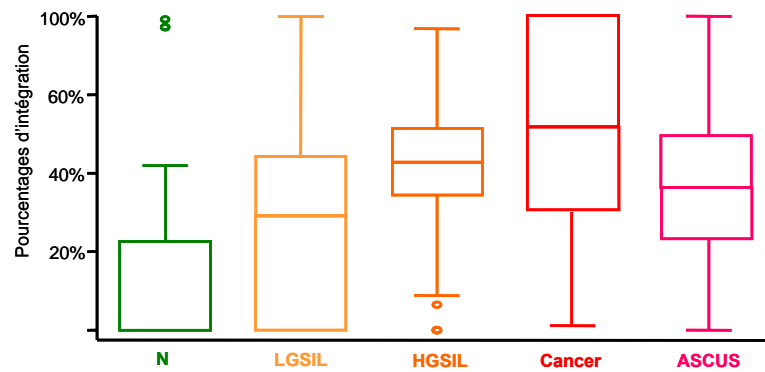
Nous avons ensuite souhaité décrire la proportion relative d'échantillons présentant uniquement des formes épisodales, des formes mixtes (épisodales et intégrées) et uniquement des formes intégrées, en fonction des anomalies cytologiques (**Figure 17**). Ainsi, nous avons observé que tous les types d'échantillons abritaient des formes intégrées (mixtes ou uniquement intégrées). Dans les échantillons normaux, nous observons une majorité de formes épisodales seules par rapport aux formes mixtes. La proportion des échantillons avec des formes épisodales seules diminue à 20% dans les LGSIL au profit des formes mixtes, et diminue encore plus dans les HGSIL, pour avoir une quasi-totalité de formes mixtes (99%). Enfin dans les cancers, le pourcentage de cas présentant des formes intégrées seules augmente au détriment des cas présentant des formes mixtes pour atteindre 40%.



**Figure 17.** Distribution des formes du génome d'HPV16 (formes intégrées seules, épisodales seules ou mixtes) en fonction des anomalies cytologiques

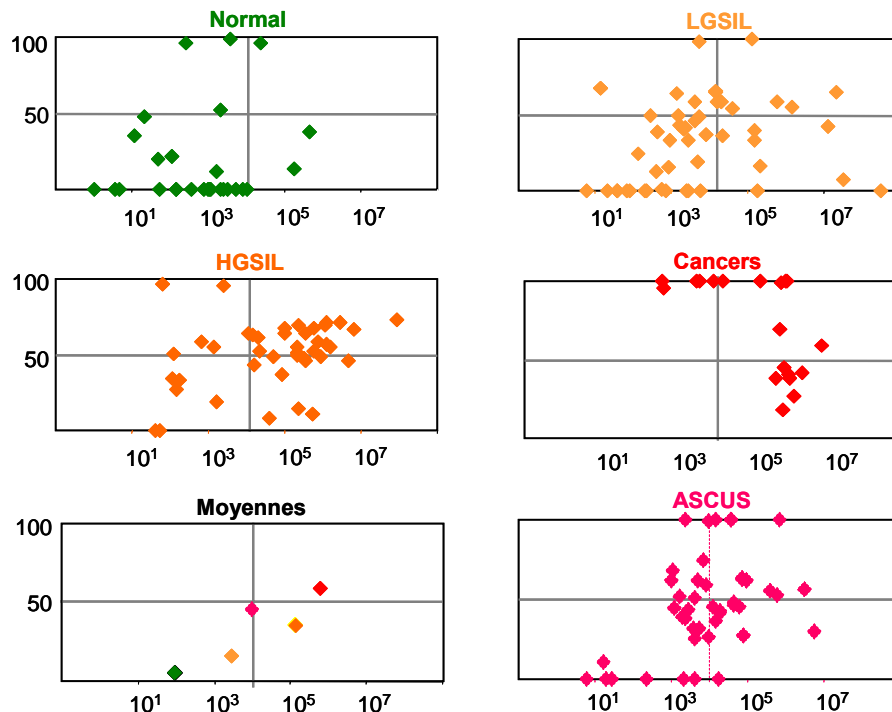
Nous avons donc déterminé le taux d'intégration pour chaque échantillon, et représenté la distribution de ce taux en fonction des anomalies cytologiques (**Figure 18**). Nous avons constaté de fortes différences de taux d'intégration en fonction de l'anomalie. Il est intéressant de noter que la médiane des taux d'intégration augmente avec la sévérité des anomalies.





**Figure 18.** Taux d'intégration en fonction du grade des lésions

Enfin, nous avons tenté d'établir s'il existait un lien entre le taux d'intégration et la CV HPV16. De façon intéressante, nous avons noté que des profils différents se dessinaient en fonction des grades de lésions. Dans les échantillons normaux, une faible CV et un faible taux d'intégration sont mesurés ; dans les échantillons de LGSIL, des valeurs moyennes de CV et de taux d'intégrations sont observées ; dans les échantillons de HGSIL les CV et les taux d'intégrations se situent dans les valeurs élevées. En ce qui concerne les cancers, nous avons noté 2 populations d'échantillons : l'une avec de fortes CV et des taux d'intégrations modérés (inférieur à 70%), et l'autre avec de faibles CV et des taux d'intégrations de 100% (seulement des formes intégrées). Pour les ASCUS, des sous-groupes d'échantillons peuvent être décrits, avec des profils correspondant à chaque catégorie de lésions (**Figure 19**).



**Figure 19.** Distribution de la charge virale en fonction du taux d'intégration, pour chaque prélèvement provenant d'échantillons normaux ou avec des anomalies cytologiques

### Conclusion

Cette étude nous a permis de valider une méthode de quantification des taux d'intégration de l'HPV16 dans des prélèvements cervico-utérins de différentes natures (biopsie, résidus de cytologie liquide et prélèvement dédiés au test HCII®). Nous avons validé la technique de PCR E2 HPV16, décrite par Peitsaro *et al.* (Peitsaro *et al.*, 2002), en montrant qu'elle présente une bonne sensibilité analytique, une bonne spécificité, une excellente efficacité et une excellente reproductibilité.

Nos premières observations sur le statut physique d'HPV16 dans les différentes lésions montrent des formes intégrées dans les échantillons normaux ou provenant d'anomalies cytologiques. Nous avons montré que les formes mixtes étaient majoritaires dans toutes les catégories étudiées, et que la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées (mixtes et intégrées seules) augmente avec la sévérité de l'anomalie. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature. Le fait de détecter des formes intégrées dans les échantillons provenant de col normaux, suggère que l'intégration est un événement relativement précoce et qui peut avoir lieu sans manifestation cytologique.

Aucune étude sur l'intégration d'HPV n'a été présentée en décrivant des taux d'intégration, comme nous le faisons aujourd'hui. Nous avons observé que les médianes de taux d'intégration augmentent avec le grade de la lésion, de 17% dans les échantillons normaux à 65% dans les cancers. Enfin, nous avons montré en exprimant la CV en fonction du taux d'intégration que ces deux facteurs semblaient liés. Ainsi nous pouvons proposer l'hypothèse que de fortes CV sont associées à une forte probabilité d'intégration.

## 5. PROFILS IMMUNITAIRES EN FONCTION DU POTENTIEL EVOLUTIF DES LESIONS

### Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix

Sylvain Monnier-Benoit, Frédéric Mauny, Didier Riethmuller, Jean-Sébastien Guerrini, Mihai Căpîlna, Sophie Félix, Estelle Seillès, Christiane Mougin, Jean-Luc Prétet  
[Gynecol Oncol. 2006 Jul;102(1):22-31]

Ce travail a été présenté sous forme affichée :

❖ Au 20<sup>th</sup> International Papillomavirus Conference, à Paris (France), du 4 au 9 octobre 2002

*Plasticity of T cell population in high risk HPV-induced cervical lesions with different malignancy potential*

Monnier-Benoit S., Mougin C., Căpîlna M., Riethmuller D., Schaal JP., Seillès E., Prétet JL.

## Introduction à la publication n°3

### *Introduction*

Si les facteurs viraux (CV, intégration) peuvent moduler la persistance d'un HPV HR, il a été montré que le système immunitaire, et notamment sa composante cellulaire, jouait un rôle prépondérant dans l'élimination des lésions associées aux HPV (Stanley, 2006). Parce que l'infection reste localisée au niveau du col utérin, l'étude des réponses immunitaires muqueuses locales semble tout à fait pertinente pour mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'évolution des pathologies génitales associées aux HPV. Or, très peu d'études décrivent les cellules immunitaires au cours de l'histoire naturelle des lésions associées à HPV à partir d'échantillons parfaitement caractérisés sur le plan virologique et cytologique ou histologique.

### *Objectifs et Méthodes*

L'objectif de ce travail a été de caractériser les populations de cellules immunitaires infiltrant les lésions cervicales de différents grades, induites par HPV HR.

Pour cela nous avons analysé une série de biopsies provenant de lésions parfaitement décrites histologiquement et virologiquement, et représentant l'histoire naturelle des lésions associées aux HPV HR : des CIN1 qui régressent, des CIN1 qui progressent, des CIN3 et des cancers invasifs. Nous avons utilisé des techniques d'immunohistochimie couplées à des systèmes d'amplification de signal, afin de détecter les cellules CD4+, CD8+ et CD45RO+. Les densités cellulaires ont été estimées dans l'épithélium et dans le stroma, et les rapports cellules CD4+/cellules CD8+ ont été déterminés.

### *Résultats*

Nous avons montré que des cellules CD4+ prédominaient dans les CIN1 qui ont régressé par rapport aux CIN1 qui ont progressé, aux CIN3 et aux cancers invasifs. De plus, une augmentation de la densité des cellules CD8+ et CD45RO+ a été observée dans les cancers. Enfin, des infiltrats de cellules CD8+ parfois organisées en agrégats rappelant la structure de follicules lymphoïdes, ont été observés dans les CIN3 et les cancers invasifs.

### *Conclusion*

Ce travail a permis de montrer qu'il y a un recrutement différentiel des cellules lymphocytaires T en fonction du grade de la lésion et de leur potentiel d'évolution. Notamment, la réponse immunitaire cellulaire locale observée dans les CIN1 infectées par HPV HR et qui ont régressé semble être sensiblement du même type que dans les lésions génitales induites par les HPV à bas risque. L'accumulation de cellules immunitaires de types CD4+ pourrait donc constituer un marqueur de régression des lésions. Les cellules CD45RO+ qui sont des cellules immunitaires mémoires, sont trouvées de façon plus abondante dans les lésions au fort potentiel de progression, laissant également supposer que des cellules mémoires lymphocytaires sont présentes dès les stades précoces (CIN1). Il est intéressant de noter que dans 70% des CIN3, les cellules immunitaires s'organisent en agrégats rappelant les formations lymphoïdes. Ainsi, il semblerait que l'initiation de la

réponse immunitaire puisse s'effectuer dans les CIN3, mais que l'activation des signaux nécessaires à l'amplification de cette réponse soit absente. Enfin un infiltrat massif de cellules CD8+ et CD45RO+ a été observé dans les cancers, suggérant que les HPV HR possèdent des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire, car ces cellules à potentiel cytotoxique semblent ne pas être inefficaces pour induire une régression tumorale.





# Immunohistochemical analysis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix<sup>☆</sup>

Sylvain Monnier-Benoit<sup>a</sup>, Frédéric Mauny<sup>b</sup>, Didier Riethmuller<sup>a</sup>, Jean-Sébastien Guerrini<sup>a</sup>, Mihai Căpîlna<sup>c</sup>, Sophie Félix<sup>d</sup>, Estelle Seillès<sup>e</sup>, Christiane Mougín<sup>a</sup>, Jean-Luc Prétet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> EA 3181, IFR 133, Université de Franche-Comté, Rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France

<sup>b</sup> Département d'Informations Médicales (DIM), Hôpital St. Jacques, 25000 Besançon, France

<sup>c</sup> Clinica de Obstetrică-Ginecologie, Târgu Mureș Hospital, Târgu Mureș, Romania

<sup>d</sup> Service d'Anatomopathologie, Hôpital Jean Minjoz, 25000 Besançon, France

<sup>e</sup> INSERM U 645, IFR 133, EFS, Boulevard Fleming, 25020 Besançon cedex, France

Received 3 August 2005

Available online 20 January 2006

## Abstract

**Objectives.** Humoral and cellular immune responses are likely to play a key role for the clearance or persistence and progression of high risk (HR) HPV-associated cervical lesions. Although there are many studies describing the systemic T-cell responses to HPV16 and 18 proteins, few data are available regarding the cellular mucosal immune responses. We used immunohistochemistry to characterize populations of T-immune cells (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>) in HR-HPV-infected precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix.

**Methods.** Four biopsies from normal cervix, 9 CIN1 which have regressed (rCIN), 5 CIN1 which have progressed (pCIN) to high grade lesions, 13 CIN3 and 11 invasive carcinomas were included. All dysplasias and carcinomas were HR-HPV-positive and low-risk-HPV-negative. They were stained with monoclonal antibodies specific for CD4, CD8 and CD45RO and examined by microscopy.

**Statistical analysis.** The Kruskal–Wallis test and the Siegel's and Castelan's method were used.

**Results.** CD4<sup>+</sup> cells predominated in regressing CIN1 both within the stroma and the epithelium with the highest CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio compared with pCIN1, CIN3 and invasive carcinoma. At the exception of CD45RO<sup>+</sup> cells, T cells were detected with similar frequencies in both pCIN1 and CIN3. However, in 7 out of 10 CIN3, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells were visible as organized lymphoid follicle structure. The CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells far exceeded the CD4<sup>+</sup> cells in invasive cancers.

**Conclusions.** Density and distribution of immune T cells depend on the malignant potential of HR-HPV lesions. These results suggest that the studied lymphocyte subsets have an important role to fulfil during the natural history of HR-HPV-associated lesions.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Uterine cervix; CIN; Cancer; HPV; CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>; CD45RO<sup>+</sup>

## Introduction

High Risk-Human Papillomavirus (HR-HPV) infection has been recognized as the major risk factor for the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and invasive cancers

<sup>☆</sup> Funding for this study was obtained from the Ligue Contre le Cancer, Comité du Jura and Comité du Doubs (France).

\* Corresponding author. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Boulevard A Fleming, 25030 Besançon cedex, France. Fax: +33 3 81 66 83 42.

E-mail address: [jean-luc.pretet@ufc-chu.univ-fcomte.fr](mailto:jean-luc.pretet@ufc-chu.univ-fcomte.fr) (J.-L. Prétet).

[1–3]. These viral infections are highly prevalent in sexually active young women [4–6], but a majority of them are transient, mostly asymptomatic and usually cleared within a period of 8 to 13 months [4,7].

Only few infections persist and may progress to cervical dysplasia and cancer. Several longitudinal studies have indeed consistently reported that persistence of HR-HPV is necessary for development and progression of CIN to invasive carcinoma [2,5,8–10]. If majority of CIN1 are at higher rate of regression than CIN3 (57% vs. 32% respectively) and at lower rate of progression to invasive cancer (1% vs. >12% respectively), a

small percentage of CIN1 (11%) will progress to CIN3 (for review, see [11]). The mechanisms underlying viral and CIN clearance/persistence are not well understood. Some studies have shown that the viral genotypes, as well as the viral load, may determine the duration of infection [12–14]. Moreover, host factors, such as polymorphism of p53 at codon 72, have been shown to be associated with an increased risk to develop cervical neoplasia [15]. But, this association is still debated [16,17]. On the other hand, it became obvious that polymorphism of HLA molecules might determine the capacity of the host to eliminate HPV-associated lesions, like HLA DRB1\*130 which confers a protective role [18]. Furthermore, HIV-seropositive women are more at risk for developing CIN and cervical carcinoma than HIV-seronegative women [19,20]. Thus, cell-mediated surveillance of HPV-infected cells is likely to be important in infection and disease resolution. However, most studies have focused on the systemic T-cell responses to the E6 and E7 proteins of HPV16 and 18 [21–26].

Changes in the mucosal immune responses in the cervix may have implications for the development of different grades of CIN and cervical cancer. As with all MALT (Mucosa-associated Lymphoid Tissue), the genital mucosa has both inductor and effector sites involved in the immune responses [27], and HPV infection can interfere with local immune vigilance mechanisms in the induction phase (antigen presentation) and in the effector phase (generation of antibody-producing B cells and cytotoxic T cells) (for review, see [28]). However, the mechanism of this interference is not well known. Our group already explored cervico-vaginal and endocervical secretions for the measurement of total IgA, S-IgA, IgM and IgG in 28 women harboring HR-HPV and in 40 controls and demonstrated changes in humoral immunity in the female genital tract in response to HPV [29]. Several other studies have characterized the T lymphocyte subsets that infiltrate cervical squamous intraepithelial lesions (SIL). A CD4<sup>+</sup> infiltrate has been shown to be associated with the regression of Low Risk-HPV (LR-HPV)-induced genital warts [30,31]. By contrast, lymphocytes infiltrating invasive carcinoma of the cervix were of CD8 phenotype [32–36]. Little is known about the phenotype of immune cells present in CIN of different grades. Moreover, data are somehow discordant. Tay et al. have observed an equal repartition of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the stroma of CIN and a low density of CD4<sup>+</sup> cells in the epithelium when compared to normal tissues [36]. More recently, Edwards et al. did not find any difference in the density of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in low grade and high grade SIL when compared to metaplasia [33]. Finally, Kobayashi et al. have described in CIN3 the presence of lymphoid follicles as well as CD8<sup>+</sup> cell-dominant aggregates. The latter were especially seen in HIV-seropositive women and were associated with the worst clinical outcome [37]. Cell-mediated responses to HPV may thus be associated with local factors, as well as with the stage of the disease and virological factors.

The objective of our study was to compare T-cell phenotype infiltrates in either regressing or progressing CIN1, in CIN3 and invasive carcinomas from women whose HPV status was determined. Especially, we sought to evaluate whether density and/or distribution of T lymphocytes might be of predictive

value for persistence and progression of HPV-associated cervical lesions.

## Materials and methods

### Samples and patients

Forty two histological specimens were selected for this retrospective study. They were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. All samples were provided from immunocompetent patients.

Thirty one samples were provided from patients who have participated in an observational study protocol as we previously described [13] and who were

Table 1  
Characteristics of the studied cases

Histological status	Age (years)	HPV type
<i>Normal cervix; n = 4; median age 44 years</i>		
1	39	neg
2	48	neg
3	36	neg
4	49	neg
<i>CIN; n = 27; median age 35 years</i>		
<i>Regressing CIN1; n = 9</i>		
5	47	31
6	35	16
7	30	16
8	49	16
9	45	33
10	34	16
11	26	18 and 58
12	22	16
13	18	18
<i>Progressing CIN1; n = 5</i>		
14	40	16
15	39	18
16	37	16 and 33
17	24	16
18	35	31
<i>CIN3; n = 13</i>		
19	46	16
20	39	16
21	40	16
22	50	52
23	35	16 and 31
24	36	16 and 33
25	26	33
26	26	16
27	42	52
28	33	16
29	33	16 and 31
30	23	16
31	34	16
<i>Invasive carcinoma; n = 11; median age 44 years</i>		
32	44	16
33	39	16
34	46	16
35	65	16
36	42	16
37	58	16
38	44	16
39	41	16
40	72	16
41	65	16
42	33	16



tested for LR and HR-HPV by Hybrid Capture II® assay (HCII) (Digene, Gaithersburg, MD, US). Specific HPV genotypes were further identified as we described [38,39]. Colposcopy was done before tissue resection. Four specimens with no CIN or HPV changes were used as normal tissues. Fourteen patients had CIN1. Among these lesions, 9 have regressed (named rCIN1), and 5 have progressed (named pCIN1) during follow-up. Criteria for regression were a normal smear and an HPV-negative test at the end of follow-up. Criteria for progression were an abnormal smear, a positive HPV test and a histologically proven CIN3 [13].

Thirteen other patients had CIN3, which have been treated.

Eleven cases of invasive carcinoma were provided from the Gynecologic Clinic of the Târgu Mureș hospital (Romania). Because women from this hospital had not been tested for HPV status, a standard in situ hybridization (ISH) was applied on carcinoma biopsies as we described previously [40]. Furthermore, these biopsies were tested for HPV16 by a quantitative real-time PCR as we recently published [39].

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 5 µm tissue sections with the following monoclonal antibodies anti-CD4 (NovoCastr, Newcastle, UK), anti-CD8 (Dako, Carpinteria, USA) and anti-CD45RO (Dako).

Tissue sections were dewaxed in xylene and rehydrated through graded ethanol. Antigen retrieval was performed by heating sections at 100°C in 50 mM Tris–HCl at pH 9.9 for 45 min for CD4 detection, or in 10 mM citrate buffer at pH 6 for 45 min and 15 min for CD8 and CD45RO detection respectively.

The Catalyzed Signal Amplification system (CSA, Dako) was used in order to improve the sensitivity of immunohistochemical staining. Briefly, non-specific binding was eliminated by using the quencher solution provided in the kit. Each primary antibody was diluted in PBS–BSA 0.1% as follows: 1/20 (anti-CD4), 1/2000 (anti-CD8) and 1/2500 (anti-CD45RO). After 1 h of incubation at room temperature, sections were washed 3 times with a mixture of 50 mM Tris–HCl at pH 7.5/0.1% Tween20. Revelation was performed with the CSA system according to the manufacturer's instructions. Diaminobenzidine was used as a final chromogen. Sections were then counterstained with hemalum, mounted in Eukitt® (O Kindler GmbH and Co, Freiburg, Germany) and visualized under microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). Controls consisted in the omission of the primary antibodies, and they were invariably negative. Positive controls were done on appendix and lymph node sections (not shown).

### Quantification of labeled cells

Representative fields of CD4, CD8 and CD45RO staining were photographed with a numerical camera. Pictures were transferred onto a computer and analyzed by 3 independent authors (SMB, JSG and JLP). Positive cells were counted, and surface areas of both stroma and epithelium were determined with the Scion Image for Windows program (Scion Corporation for NIH, USA). Results were expressed as the median of positive cells per mm<sup>2</sup>.

CD4+/CD8+ ratios were determined by counting CD4+ and CD8+ cells on the same field in the stroma and epithelium.

### Statistical analysis

Data are expressed as median, range and first and third quartiles. According to data set characteristic (small sized samples, non-Gaussian), differences between groups were assessed using the Kruskal–Wallis test. When significant, post-hoc pairwise comparisons between groups were performed using the method described by Siegel and Castelan, which includes corrections for significance values to take account for multiple comparisons [41]. Normal subjects presented in the text and figures were only included in the descriptive phase of the statistical analysis. Differences on immune T cells between lesions were tested on the following 4 groups: rCIN, pCIN, CIN3 and invasive carcinoma. The level of significance was set to 0.05. Analyses were performed with the SYSTAT package (v 10.0).

## Results

### Characteristics of the studied cases

At recruitment, the median age of women with normal cervix (44 years) was similar to that of women with invasive carcinoma (44 years) but older than that of women with dysplasia (rCIN1, pCIN1 and CIN3) (35 years). The difference in age is likely attributable to the fact that the 4 women with normal cervix were undergoing surgery and were more likely to be peri-menopausal. Moreover, cancer precursors traditionally occur at least a decade earlier than does the invasive cancer, which explains the difference in age between women with dysplastic lesion and those with invasive cancer (Table 1).

The 4 women without any cervical lesion were HPV-negative, while all other selected women with an initial CIN diagnosis were HR-HPV-positive and LR-HPV-negative. Eighteen out of 27 (67%) women with CIN harbored HPV16. Five out of 27 (19%) women were infected with 2 different HPV types (cases no. 11, no. 16, no. 23, no. 24 and no. 29). As for biopsies from invasive carcinoma, they all demonstrated a positive signal of hybridization with the HPV16/18 probe (data not shown). When tested by real-time PCR, these samples proved to be HPV16-positive.

### Immunohistochemistry

All numerical densities (expressed as median [25–75%] number of cells per mm<sup>2</sup> area) of CD4+, CD8+ and CD45RO+ cells and CD4/CD8 ratios (median [25–75%]) are given in Table 2.

Table 2  
Values (median [25–75%]) of the CD4+, CD8+ and CD45RO+ cell densities and CD4/CD8 ratio in stroma and epithelium of normal, rCIN1, pCIN1, CIN3 and invasive carcinoma specimens

Specimens		Cell densities (cells/mm <sup>2</sup> )			CD4/CD8 ratio
		CD4+	CD8+	CD45RO+	
Normal (n = 4)	Stroma	296 [284–387]	297 [252–321]	379 [356–419]	0.71 [0.71–0.84]
	Epithelium	48 [29–57]	44 [35–71]	135 [107–152]	0.36 [0.34–0.52]
rCIN1 (n = 9)	Stroma	362 [263–450]	172 [130–205]	291 [223–398]	1.33 [1.12–1.40]
	Epithelium	41 [23–49]	26 [16–31]	36 [20–62]	0.54 [0.48–0.83]
pCIN1 (n = 5)	Stroma	389 [297–396]	378 [252–410]	447 [300–512]	0.93 [0.92–1.06]
	Epithelium	24 [19–32]	68 [55–71]	139 [95–153]	0.78 [0.69–0.84]
CIN3 (n = 13)	Stroma	308 [155–490]	402 [216–470]	505 [415–570]	0.93 [0.83–0.97]
	Epithelium	14 [11–23]	46 [41–55]	56 [31–83]	0.80 [0.56–0.93]
Invasive carcinoma (n = 11)	Stroma	258 [225–436]	517 [325–817]	782 [573–967]	0.39 [0.20–0.53]
	Epithelium	13 [10–21]	127 [76–236]	121 [76–181]	0.17 [0–0.65]

### *T lymphocytes were observed in normal cervix*

In normal cervix, CD4, CD8 and memory CD45RO reactive cells were present. As shown in Figs. 1A and B, the populations of CD4+, CD8+ and CD45RO+ cells were mostly distributed throughout the stroma. The median density of CD4+ cells was 296 [284–387]/mm<sup>2</sup>, and that of CD8+ cells was 297 [252–321]/mm<sup>2</sup> (Figs. 2A, B) with a median CD4/CD8 ratio of 0.71 [0.71–0.83] (Fig. 4A). The density of CD45RO+ cells was 379 [356–419]/mm<sup>2</sup> (Fig. 2C).

In the epithelium, the median density of lymphocytes was less compared to the stroma. Fewer CD8+ cells (44 [35–71]/mm<sup>2</sup>) and CD4+ cells (48 [29–57]/mm<sup>2</sup>) (Figs. 3A, B) were observed with a median CD4/CD8 ratio of 0.36 [0.34–0.52]

(Fig. 4B). The CD45RO+ cells appeared also to be less abundant (135 [107–152]/mm<sup>2</sup>) than in the stroma (Fig. 3C).

### *The CD4/CD8 ratio was higher in regressing CIN1 than in progressing CIN1*

A comparison of the median density of lymphocytes between regressing CIN1 (rCIN1) and progressing CIN1 (pCIN1) is shown in Figs. 2 and 3. The densities of CD4+, CD8+ and CD45RO+ cells were not statistically different in rCIN1 and pCIN1 either in the stroma or in the epithelium. The CD4/CD8 ratio in the stroma however declined in pCIN1 (0.93 [0.92–1.06]) compared to rCIN1 (1.33 [1.12–1.40]), but the difference was at the limit of significance (Fig. 4A).

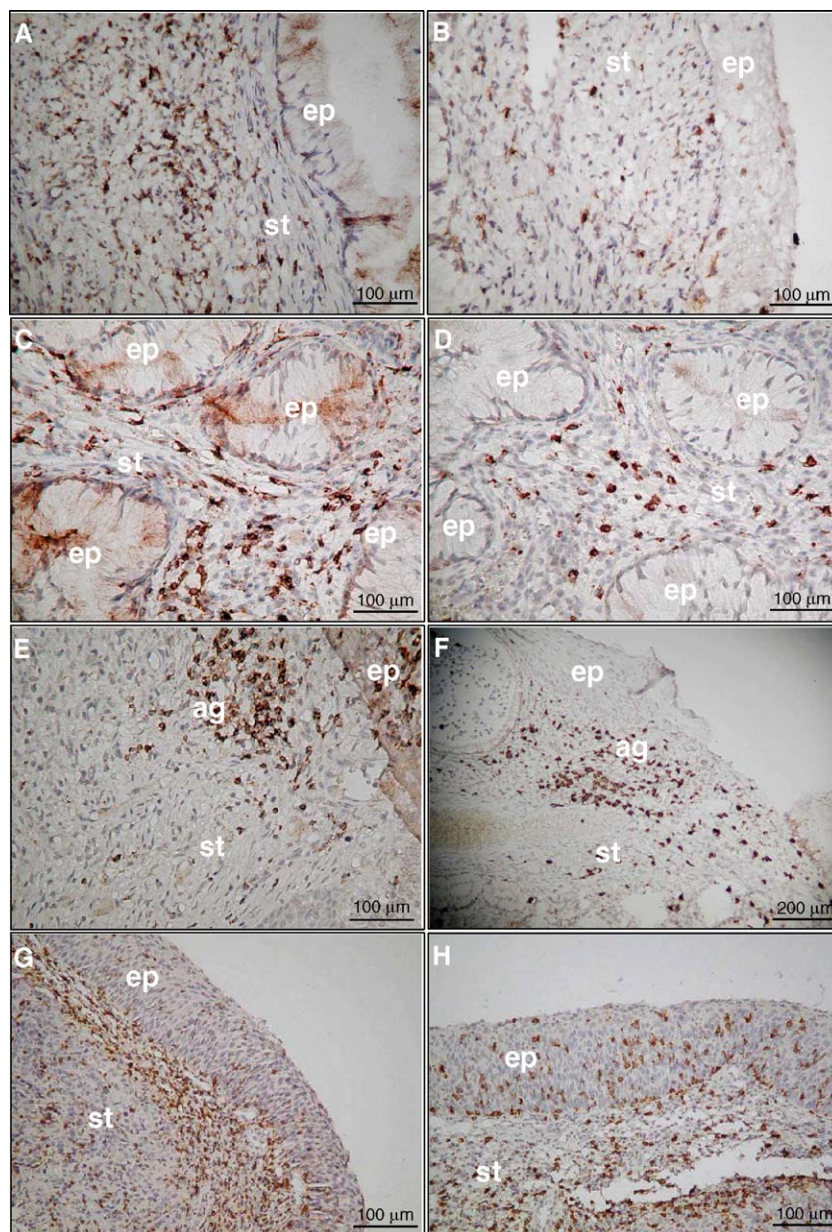


Fig. 1. Immunohistochemistry staining of lymphocyte subsets in cervical tissues. CD4 (A) and CD8 (B) staining performed on normal cervix. CD4 (C) and CD8 (D) staining performed on regressing CIN1. CD4 (E) and CD8 (F) staining performed on CIN3. CD45RO (G) and CD8 (H) staining performed on invasive cancer. st: stroma, ep: epithelium, ag: T-cell aggregate. The catalyzed system amplification was used to allow staining to be adequately visualized.

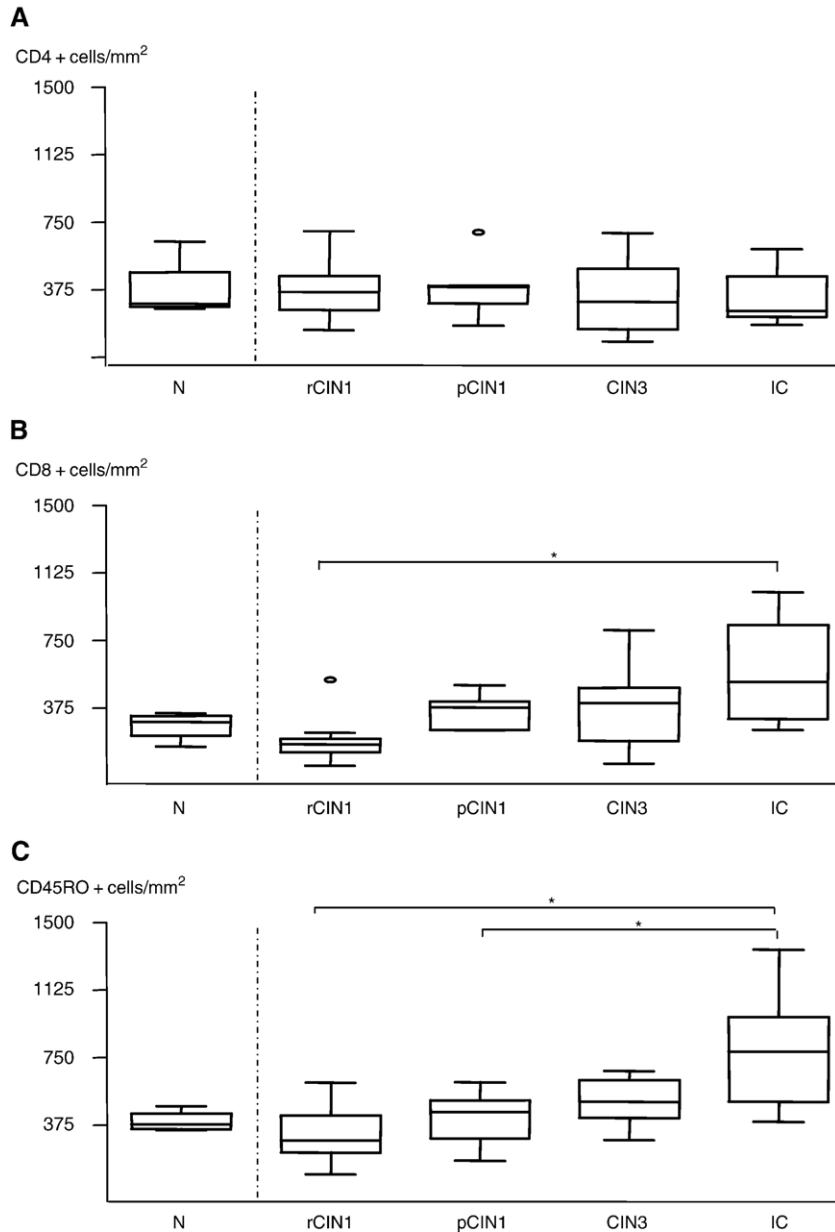


Fig. 2. Box and whisker plot showing quantification [median, first and third quartiles and range] of CD4+, CD8+ and CD45RO+ cells in the stroma. N: normal tissue, rCIN1: regressing cervical intraepithelial neoplasia 1, pCIN1: progressing CIN1, CIN3: cervical intraepithelial neoplasia 3, IC: invasive carcinoma. \* $P < 0.05$ .

*Infiltrating CD8+ and memory CD45RO+ cells were more numerous in invasive cancers than in dysplastic lesions*

Analysis of CD4+ cell densities in epithelium and stroma of dysplastic and carcinoma tissues is shown in Figs. 1C, E. The median densities of these cells were increased in the stroma of SIL compared with the normal cervix and were lower in carcinoma tissues compared to SIL tissues, though not reaching statistical significances (Fig. 2A).

As for densities of CD8+ cells, they increased with the grade of lesions (Figs. 1D, F, H). There were significantly ( $P < 0.05$ ) greater CD8+ lymphocyte counts within the stroma of carcinomas (517 [325–817]/mm<sup>2</sup>) compared with rCIN1 lesions (172 [130–205]/mm<sup>2</sup>) and also within the epithelium

(127 [76–236]/mm<sup>2</sup>) compared with rCIN1 (26 [16–31]/mm<sup>2</sup>) and pCIN1 lesions (68 [55–71]/mm<sup>2</sup>) (Figs. 2B, 3B).

Likewise, the ratio of CD4+ to CD8+ cells was significantly ( $P < 0.05$ ) decreased in the stroma of carcinoma (0.39 [0.20–0.53]) compared with CIN3 (0.93 [0.83–0.97]), pCIN1 (0.93 [0.92–1.06]) and rCIN1 (1.33 [1.12–1.40]), while it was not statistically different in the epithelium because of the dispersed values (Figs. 4A, B).

As for the infiltrating CD45RO+ cells, they were mainly found in the stroma, with a continuous distribution at the stromal/epithelial junction and to a lesser extent in the epithelium. Furthermore, the density of these cells was significantly ( $P < 0.05$ ) elevated in carcinoma stroma (782 [573–967]/mm<sup>2</sup>) compared with CIN1 tissues (291 [223–

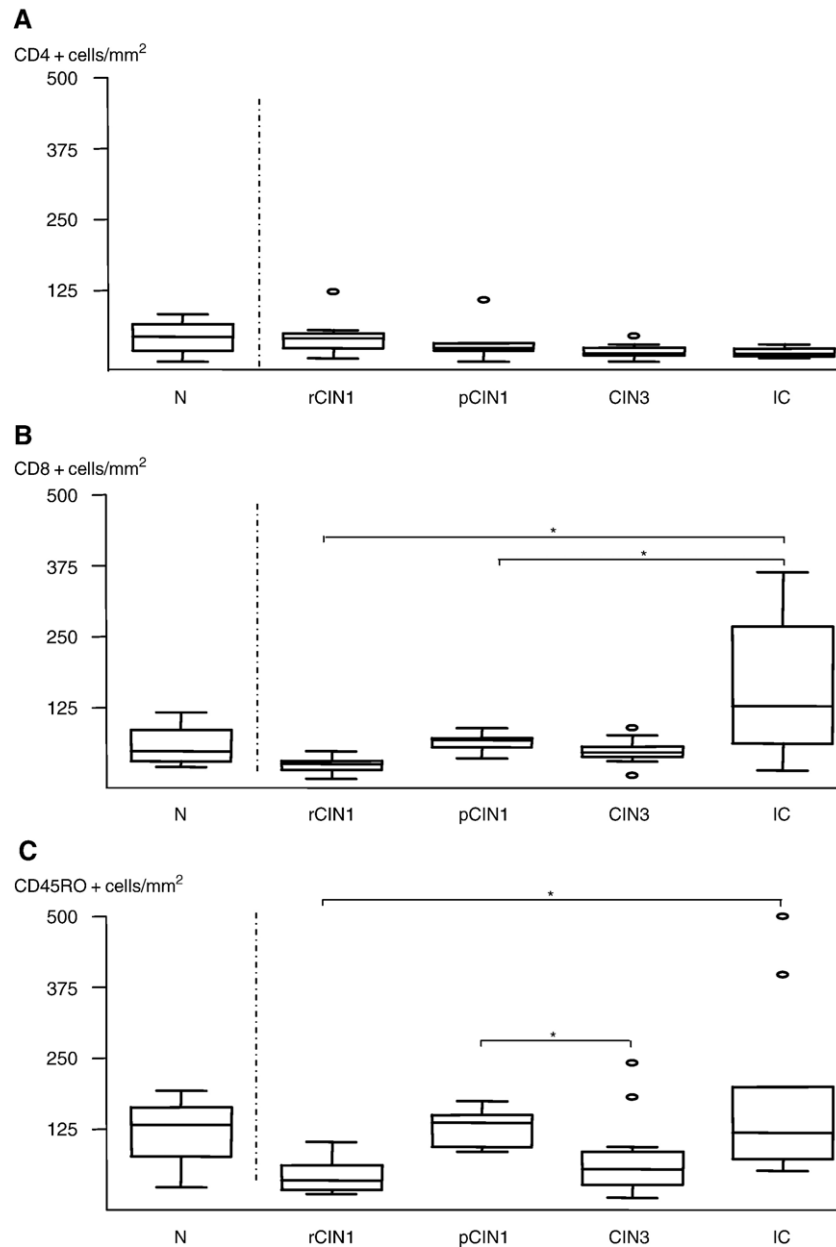


Fig. 3. Box and whisker plot showing quantification [median, first and third quartiles and range] of CD4+, CD8+ and CD45RO+ cells in the epithelium. N: normal tissue, rCIN1: regressing cervical intraepithelial neoplasia 1, pCIN1: progressing CIN1, CIN3: cervical intraepithelial neoplasia 3, IC: invasive carcinoma. \* $P < 0.05$ .

398]/mm<sup>2</sup> in rCIN1 and 447 [300–512]/mm<sup>2</sup> in pCIN1) (Figs. 1G, 2C). It was also higher than in CIN3, although the difference did not reach significance. Moreover, the carcinoma epithelium revealed a higher density (121 [76–181]/mm<sup>2</sup>) of CD45RO+ cells compared with rCIN1 (36 [20–62]/mm<sup>2</sup>). Otherwise, the density of infiltrating CD45RO+ cells was increased in pCIN1 compared with rCIN1 with a difference at the limit of significance and in CIN3 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3C).

Unfortunately, the CSA system did not permit to perform double labeling. However, we clearly identified the same cells stained with CD4 and CD45RO or CD8 and CD45RO monoclonal antibodies in serial sections of CIN3 and cancer (Fig. 5) and to a lesser extent in CIN1, suggesting the presence of memory CD4+ cells and memory CD8+ cells.

*CD4+, CD8+ and CD45RO+ cells were aggregated into clusters in CIN3*

Labeled T cells were sometimes organized into large stromal foci situated just beneath the basal cell layer (Figs. 1E, F). These clusters of lymphocytes suggestive of lymphoid follicles were observed in 70% (9/13) of CIN3 analyzed.

## Discussion

We performed this descriptive study to characterize the T lymphocyte subpopulations infiltrating well-defined precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix because very few and sparse data are available [32,33,36]. In particular, the



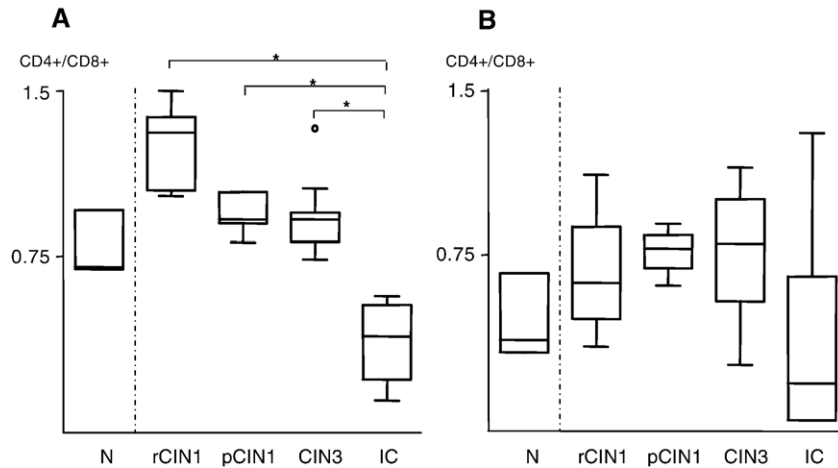


Fig. 4. Box and whisker plot showing values [median, first and third quartiles and range] of CD4+/CD8+ ratio in the stroma (A) and in the epithelium (B). N: normal tissue, rCIN1: regressing cervical intraepithelial neoplasia 1, pCIN1: progressing CIN1, CIN3: cervical intraepithelial neoplasia 3, IC: invasive carcinoma. \* $P < 0.05$ .

histological grade and/or the HPV status of the lesions selected for the previous studies were not always described in detail.

This study was linked with precise diagnostic biopsies and HPV genotyping, but it was limited by the sample size. However, the used statistical analysis permitted us to appreciate differences in both the number and phenotype of lymphocytes populating rCIN1, pCIN1, CIN3 and cervical carcinomas. On purpose, we did not study CIN2 because of the low reproducibility of histopathological diagnosis [42,43]. Clearly, from the present study, it appears that T lymphocytes distribution differs between pre-malignant and malignant lesions of the cervix.

We observed in normal tissues that T lymphocytes were mostly located in the stroma and to a lesser extent within the epithelium. These data are consistent with previous immuno-histochemistry studies [33,44]. Moreover, the values of CD4/

CD8 ratio in the stroma and epithelium agree with Bell's observation [32]. A large and well-defined control series has identified stromal CD4+ cells distributed just below the basement membrane or aggregated in clusters and intraepithelial CD4+ and CD8+ cells distributed in the basal and suprabasal layers, and it has been proposed that T-cell-mediated immune response has a role in cervical immune surveillance [45].

We chose to examine and quantify T-lymphocyte cells in CIN1 from women who have been closely followed-up [13]. Therefore, in the rCIN1 which have regressed during the observational period, a predominance of CD4+ cells was noted in the stroma as well as in the epithelium. Previous studies have documented that CD4+ cells were the most prominent in low-risk-HPV-associated warty lesions undergoing regression [31,46] as well as in regressing papillomas in animal models [47,48]. On the other hand, in patients with acquired CD4+ T-

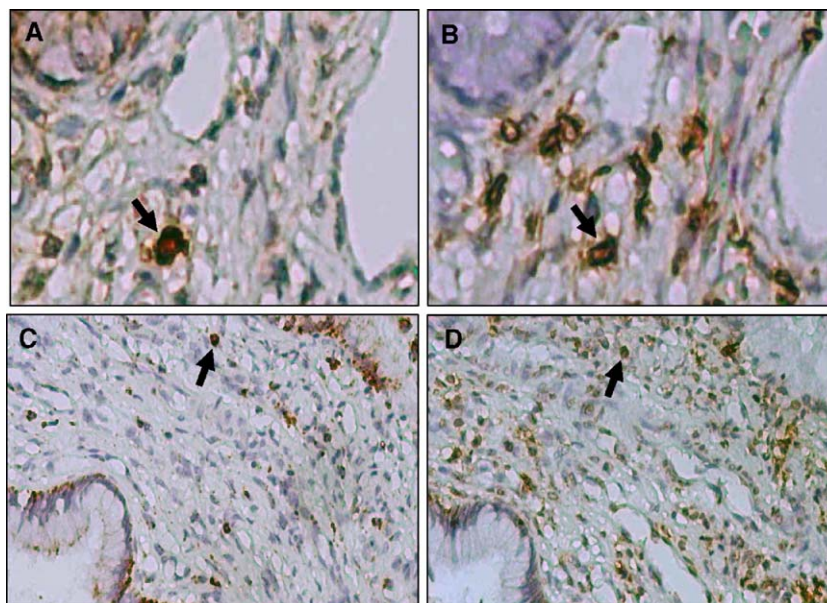


Fig. 5. Immunohistochemistry staining of lymphocyte subsets in serial cervical tissue sections with monoclonal antibody specific for CD4, CD45RO and CD8. Arrows point a cell expressing both CD4 and CD45RO (A and B respectively) and a cell expressing both CD8 and CD45RO (C and D respectively).

cell deficiency or advanced HIV infection, a greater prevalence of HPV-associated lesions and greater progression towards (pre)-invasive lesions were observed [49,50]. Thus, it is likely that helper responses are crucial for elimination of HR-HPV-infected cells, and accumulation of CD4<sup>+</sup> cells may represent a marker of regression. The effectiveness of CD4<sup>+</sup> cells in controlling HPV infection and favoring CIN regression must be taken in consideration for vaccination strategies [33].

Despite lack of significance in the T-cell densities between CIN1 that resolved and CIN1 that progressed to CIN3 during follow-up, we did observe more CD8<sup>+</sup> infiltrates in progressing CIN1 than in regressing CIN1, especially in the stroma compartment, lowering the CD4/CD8 ratio. Moreover, memory cells expressing the RO isoform of CD45 were more abundant in progressing lesions. It would be expected that infiltrating memory CD8<sup>+</sup> cells in early stages of dysplasia would have some cytolytic activity. However, these T cells have likely impaired effector functions, which allows the persistent lesion to induce yet more recruitment and so on [33].

In CIN3 lesions, the immunohistochemistry did not reveal major differences in cell densities when compared with pCIN1, at the exception of a lower density of epithelial CD45RO<sup>+</sup> cells. In addition, the CD4/CD8 ratios were similar in either stromal or epithelial compartments of pCIN1 and CIN3. Similarly, Edwards et al. also did not find specific lymphocyte subsets, either plasma cells or T cells, to be significantly increased in the high grade SIL compared with low grade SIL [33]. Nevertheless, we observed a peculiar reorganization of immune cells that form aggregates visible in the stroma. By their topology, these aggregates resemble lymphoid follicles, as recently described [37]. In their work, Kobayashi et al. also showed that E6 and E7 antigens were bound to interdigitating follicular dendritic cells within the germinal centers, suggesting that an immune response was initiated. They also described lymphoid aggregates consisting of densely clustered CD8<sup>+</sup> cells. The latter structures were rare in immunocompetent women, but they were widely found in HIV-infected patients associated with a worse disease outcome. Here, aggregates were observed in 70% of CIN3 analyzed. Their significance is not clear yet. An elegant report recently confirmed that CIN2/3 spontaneously regressed in almost 30% of cases [51]. Hence, we may raise the hypothesis that an initiation of immune response might take place in CIN3, but further activation signals necessary for immune amplification might be absent. Finally, memory CD8<sup>+</sup> cells might play a permissive role in the persistence and progression of HPV-induced lesions [52].

At last, and as described previously, we demonstrated a massive infiltration of CD8<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> cells in the stroma and epithelium of invasive carcinoma with lower CD4<sup>+</sup> cell counts and decreased CD4/CD8 ratios [32–34,53]. These data suggest that CD8<sup>+</sup> might encounter their target cells, the HR-HPV-infected epithelial cells. This is strikingly because those lymphocytes, of which phenotype is consistent with antigen-experienced cells, are not likely to be efficient to remove HR-HPV-infected/tumoral epithelial cells. Such observations, as above, raise the question why infiltrating memory CD8<sup>+</sup> cells are not functional. This could be because the mucosal HR-HPV

have a battery of immune evasion mechanism ([54], for review see [55]). Nevertheless, some authors have observed that tumor-infiltrating lymphocytes purified from cervical cancers presented NK activities against HPV-infected cell lines [34,56] or specific cytotoxic activities against HPV16 E7 [57]. Moreover, the MHC class I antigen presentation machinery is down-regulated in HR-HPV-infected epithelial cells so that their recognition and elimination by specific CTL may be impaired [58–60]. Finally, it has recently been demonstrated that some specific inhibitory KIR/HLA ligand pairs decrease the risk of developing neoplasia, while the presence of activating receptor KIR3DS1 results in increased risk of disease [61].

In conclusion, we showed that, during the *in vivo* natural history of HR-HPV infection, different subsets of lymphocytes are present to the site of antigen exposure, according to the regression/progression potential of virally infected cells. Further investigations will be required in order to define more precisely the phenotype and function of lymphocyte populations that infiltrate resolving or persistent lesions. The identification of HPV-specific T cell markers in the history of cervical disease would provide useful clues with regard to the multi-step events towards cancer. Then, combined prophylactic and therapeutic vaccines might offer the best strategies for significant reduction death from cervical cancer worldwide.

## Acknowledgments

The authors are indebted to S. Coumes-Marquet and Sabeha Biichlé for excellent technical assistance. SMB is the recipient of a predoctoral scholarship from the Conseil Régional de Franche-Comté (France). Part of this work was supported by grants from “La Ligue Contre le Cancer, Comité du Jura and Comité du Doubs”.

## References

- [1] Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(11):796–802.
- [2] Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EK, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 1999;354(9172):20–5.
- [3] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12–9.
- [4] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338(7):423–8.
- [5] Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102(5A):3–8.
- [6] Jamison JH, Kaplan DW, Hamman R, Eagar R, Beach R, Douglas Jr JM. Spectrum of genital human papillomavirus infection in a female adolescent population. *Sex Transm Dis* 1995;22(4):236–43.
- [7] Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papilloma-

- virus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180(5):1415–23.
- [8] Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendahl U, Wadell G, et al. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;341(22):1633–8.
  - [9] Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(18):1365–71.
  - [10] Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61(3):306–11.
  - [11] Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12(2):186–92.
  - [12] Brisson J, Bairati I, Morin C, Fortier M, Bouchard C, Christen A, et al. Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis* 1996;173(4):794–9.
  - [13] Dalstein V, Riethmuller D, Prétet JL, Le Bail Carval K, Sautière JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003;106(3):396–403.
  - [14] Ho GY, Studentsov Y, Hall CB, Bierman R, Beardsley L, Lempa M, et al. Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis* 2002;186(6):737–42.
  - [15] Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;393(6682):229–34.
  - [16] Humbey O, Aubin F, Cairey-Remonnay S, Riethmuller D, Prétet JL, Fest T, et al. TP53 polymorphism at exon 4 in Caucasian women from eastern France: lack of correlation with HPV status and grade of cervical precancerous lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;103(1):60–4.
  - [17] Koushik A, Platt RW, Franco EL. p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(1):11–22.
  - [18] Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002;89(2):229–40.
  - [19] Ozsaran AA, Ates T, Dikmen Y, Zeytinoglu A, Terek C, Erhan Y, et al. Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999;20(2):127–30.
  - [20] Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(3):226–36.
  - [21] Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJ, Verheijen RH, Stukart MJ, Meijer CJ, et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2000;88(1):92–8.
  - [22] Shepherd PS, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Luxton JC. Proliferative T cell responses to human papillomavirus type 16 L1 peptides in patients with cervical dysplasia. *J Gen Virol* 1996;77(Pt. 4):593–602.
  - [23] Luxton JC, Rowe AJ, Cridland JC, Coletart T, Wilson P, Shepherd PS. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J Gen Virol* 1996;77(Pt. 7):1585–93.
  - [24] Nimako M, Fiander AN, Wilkinson GW, Borysiewicz LK, Man S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res* 1997;57(21):4855–61.
  - [25] Steele JC, Mann CH, Rookes S, Rollason T, Murphy D, Freeth MG, et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *Br J Cancer* 2005;93(2):248–59.
  - [26] Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, et al. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(5):483–8.
  - [27] Edwards JN, Morris HB. Langerhans' cells and lymphocyte subsets in the female genital tract. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92(9):974–82.
  - [28] Goncalves MA, Donadi EA. Immune cellular response to HPV: current concepts. *Braz J Infect Dis* 2004;8(1):1–9.
  - [29] Bard E, Riethmuller D, Meillet D, Pretet JL, Schaal JP, Mougin C, et al. High-risk papillomavirus infection is associated with altered antibody responses in genital tract: non-specific responses in HPV infection. *Viral Immunol* 2004;17(3):381–9.
  - [30] Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 1994;102(6):768–74.
  - [31] Hong K, Greer CE, Ketter N, Van Nest G, Paliard X. Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts. *J Virol* 1997;71(9):6427–32.
  - [32] Bell MC, Edwards RP, Partridge EE, Kuykendall K, Conner W, Gore H, et al. CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. *J Clin Immunol* 1995;15(3):130–6.
  - [33] Edwards RP, Kuykendall K, Crowley-Nowick P, Partridge EE, Shingleton J, Mestecky J. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8-positive cells are recruited to invasion. *Cancer* 1995;76(8):1411–5.
  - [34] Ghosh AK, Moore M. Tumour-infiltrating lymphocytes in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1992;11(6):1910–6.
  - [35] Hilders CG, Houbiers JG, Krul EJ, Fleuren GJ. The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994;101(1):5–12.
  - [36] Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Singer A. Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94(1):16–21.
  - [37] Kobayashi A, Darragh T, Herndier B, Anastos K, Minkoff H, Cohen M, et al. Lymphoid follicles are generated in high-grade cervical dysplasia and have differing characteristics depending on HIV status. *Am J Pathol* 2002;160(1):151–64.
  - [38] Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, Bettinger D, Schaal JP, Carbillet JP, et al. Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999;8(3):157–64.
  - [39] Prétet J-L, Dalstein V, Monnier-Benoit S, Delp  t S, 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* 2004;31(2):140–7.
  - [40] Bettinger D, Bernard B, Riethmuller D, Greslin I, Gay C, Lab M, et al. Human papillomavirus detection by non isotopic in situ hybridization, in situ hybridization with signal amplification and in situ polymerase chain reaction. *Eur J Histochem* 1999;43(3):185–98.
  - [41] Siegel S, Castellane NJ. Non parametric statistics for behavioral sciences. New York: McGraw-Hill; 1988.
  - [42] Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001;285(11):1500–5.
  - [43] Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26(11):1389–99.
  - [44] Roncalli M, Sideri M, Gie P, Servida E. Immunophenotypic analysis of the transformation zone of human cervix. *Lab Invest* 1988;58(2):141–9.
  - [45] Poppe WA, Drijkoningen M, Ide PS, Lauweryns JM, Van F, Assche A. Lymphocytes and dendritic cells in the normal uterine cervix. An immunohistochemical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;81(2):277–82.
  - [46] Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* 1994;102(6):768–74.

- [47] Knowles G, O'Neil BW, Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* 1996;70(12): 8451–8.
- [48] Nicholls PK, Moore PF, Anderson DM, Moore RA, Parry NR, Gough GW, et al. Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology* 2001;283(1):31–9.
- [49] Palefsky JM. Human papillomavirus infection and anogenital neoplasia in human immunodeficiency virus-positive men and women. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998;23:15–20.
- [50] Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* 1994;57(6): 836–40.
- [51] Trimble CL, Piantadosi S, Gravitt P, Ronnett B, Pizer E, Elko A, et al. Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11 (13):4717–23.
- [52] Kuss I, Donnenberg AD, Gooding W, Whiteside TL. Effector CD8+ CD45RO–CD27– T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 2003;88 (2):223–30.
- [53] Sheu BC, Lin RH, Ho HN, Huang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol* 1997;56(1–239–48.
- [54] Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev, Cancer* 2002;2(1):59–65.
- [55] O'Brien PM, Campo MS. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? *Trends Microbiol* 2003;11(7): 300–5.
- [56] Hilders CG, Ras L, van Eendenburg JD, Nooyen Y, Fleuren GJ. Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer* 1994;57(6):805–13.
- [57] Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 1997;57(14):2943–50.
- [58] Evans M, Borysiewicz LK, Evans AS, Rowe M, Jones M, Gileadi U, et al. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol* 2001; 167(9):5420–8.
- [59] Connor ME, Stern PL. Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1990;46(6):1029–34.
- [60] Breitburd F, Ramoz N, Salmon J, Orth G. HLA control in the progression of human papillomavirus infections. *Semin Cancer Biol* 1996;7(6):359–71.
- [61] Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005;201(7):1069–75.



## 6. DISTRIBUTION DES HPV DANS LES HGSIL EN FRANCE

### Human Papillomavirus (HPV) Genotype Distribution in High Grade Cervical Lesions (CIN 2/3) in France (EDITH study).

Jean-Luc Prétet, Anne-Carole Jacquard, Xavier Carcopino, Sylvain Monnier-Benoit, Gerlinde Averous, Benoit Soubeyrand, Yann Leocmach, Didier Riethmuller, for the EDITH study group

[Manuscrit soumis à *International Journal of Cancer*]

Ces travaux ont été présentés sous forme affichée :

- ❖ **Au 23<sup>rd</sup> International Papillomavirus Conference**, à Prague (République Tchèque), du 1<sup>er</sup> au 7 septembre 2006  
*Human Papillomavirus (HPV) Genotype Distribution in High Grade Cervical Lesions (CIN2/3) in France: Results of the EDITH Study*  
Prétet J-L., Jacquard A-C., Carcopino X., Monnier-Benoit S., Averous A., Soubeyrand B., Leocmach Y., Riethmuller D.  
for the EDITH study group

## Introduction à la publication n°4

### *Introduction*

Si les mécanismes immunitaires semblent être défaillants dans le contrôle des cancers, l'induction d'une réponse humorale par le biais d'une vaccination à l'aide de VLP est tout à fait efficace contre le développement des lésions associées aux HPV, comme en témoignent les excellents résultats récemment publiés des essais de phase 3 des vaccins anti-HPV prophylactiques. Ainsi, les études ont montré une induction d'un fort titre d'anticorps anti-HPV et une protection de 100% contre le développement de lésions précancéreuses de haut grade (Gross, 2007). Les vaccins proposés ciblent l'HPV16 et l'HPV18, et la mesure de l'efficacité vaccinale passe par une connaissance des génotypes présents dans une population donnée. Or, les études montrent que la distribution des génotypes d'HPV dépend des zones géographiques, et cette distribution est mal connue en France.

### *Objectifs et Méthodes*

Afin de déterminer l'impact d'une vaccination prophylactique en France, nous avons participé à une étude nationale en collaboration avec la société Sanofi-Pasteur dans le cadre du vaccin HPV Gardasil® (Merck & Co) (étude E.D.I.T.H, pour Etude de la Distribution des types d'HPV en France). Ce vaccin tétravalent est dirigé contre 4 génotypes d'HPV : 6, 11, 16 et 18. Son efficacité sera donc attendue non seulement en ce qui concerne la prévention des lésions précancéreuses et cancéreuses associées aux génotypes 16 et 18, mais également en ce qui concerne la prévention des lésions de types condylomes acuminés externes associées le plus souvent aux génotypes 6 et 11.

Nous avons mis en place une méthodologie, basée sur l'utilisation du test INNO-LiPA Genotyping HPV test v2 (Innogenetics) afin de génotyper 493 lésions de types CIN2/3 provenant de 11 centres répartis sur le territoire français.

### *Résultats*

Nous avons montré que la prévalence d'HPV dans les CIN2/3 en France est de 98%. L'HPV16 (62%) est le génotype le plus fréquemment détecté dans ces lésions, suivi par les types 31 (15%), 33 (12%), 52 (9%), 51 (8%), 58 (7%), 35 et 18 (4%). Des infections multiples par au moins deux HPV HR différents sont observées dans 26% des échantillons, et les infections multiples par les types 16 et/ou 18 représentent 2,6% de la totalité des échantillons.

### *Conclusion*

De façon attendue, la distribution des génotypes d'HPV en France dans les CIN2/3 est globalement la même que celle observée en Europe, avec une prédominance de l'HPV16 dans les CIN2/3. Aucune étude épidémiologique de cette ampleur n'avait à ce jour étudié la répartition des génotypes dans ce type de lésions en France. L'étude E.D.I.T.H. a également permis le génotypage de 516 cancers du col de l'utérus en France (Prétet *et al.*, 2007a). En ce qui concerne la distribution du vaccin anti-HPV Gardasil®, il semble qu'elle soit parfaitement adaptée à la prévalence des

génotypes d'HPV en France, car ce vaccin ciblera plus de 80% des cancers du col de l'utérus et de ses lésions précurseurs.



**Human Papillomavirus (HPV) Genotype Distribution in High Grade Cervical Lesions (CIN 2/3) in France (EDITH\* study).**

Jean-Luc Prétet<sup>1</sup>, Anne-Carole Jacquard<sup>2</sup>, Xavier Carcopino<sup>3</sup>, Sylvain Monnier-Benoit<sup>1</sup>, Gerlinde Averous<sup>4</sup>, Benoit Soubeyrand<sup>2</sup>, Yann Leocmach<sup>2</sup>, Didier Riethmuller<sup>1</sup>, for the EDITH study group

<sup>1</sup> EA3181, IFR133, CHU Besançon, France

<sup>2</sup> Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France

<sup>3</sup> CHU Nord, Marseille, France

<sup>4</sup> CHU Strasbourg, France

\* Etude de la Distribution des Types d'HPV en France

Running title: HPV genotypes in CIN 2/3 in France

Keywords: Human Papillomavirus, CIN, HPV, prevalence, genotype

Abbreviations: CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HPV, human Papillomavirus; HR, high risk;

ICC, invasive cervical cancer; LR, low risk; VLP, virus-like particles

Address for Correspondence:

Jean Luc Prétet

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire

CHU J. Minjoz,

Boulevard Fleming

25030 Besançon

France

Tel : +33-(0)3 81 66 91 12

Email : jean\_luc.pretet@univ-fcomte.fr

**Abstract**

High grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3) have a high potential to progress to invasive cervical cancer (ICC). Pap testing including follow-up and treatment of CIN 2/3 is currently the best prevention of ICC, but is associated with morbidity, namely obstetrical adverse effects and psychological distress. Human Papillomavirus (HPV) is universally accepted as the necessary cause of ICC. The objective of the present study was to describe the type-specific prevalence of HPV in CIN 2/3 in France and hereby to locally estimate the potential benefit of an HPV 16/18 L1 virus-like particles (VLP) vaccine.

A total of 493 randomly selected formalin fixed and paraffin embedded CIN 2/3 specimens were analysed. Medical records were examined for patient related data. HPV were genotyped with the INNO-LiPA assay allowing the detection of 24 HPV genotypes.

The overall prevalence of LiPA detectable HPV was 98%. The most prevalent genotype was HPV 16 (62%) followed by HPV 31 (15%), 33 (12%), 52 (9%), 51 (8%), 58 (7%), 35 and 18 (4%). Multiple infection with at least two different High-Risk (HR) HPV genotypes was observed in 26% of all specimens including 2.6% with HPV 16 and 18 multiple infections.

The present study indicates that HPV 16 is by far the most common HPV type associated with CIN 2/3 in France. With an HPV 16 and 18 prevalence of 64%, HPV 16/18 L1 VLP vaccines would be expected to significantly reduce the burden associated with the management and treatment of CIN 2/3 in France.

## Introduction

Human Papillomavirus (HPV) is now recognized as the necessary cause of invasive cervical cancer (ICC) <sup>1, 2</sup>. Exposure to HPV is very common especially in young sexually active adults. Most infections are transient and characterized by spontaneous viral clearance but a small proportion may progress to cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and eventually to ICC. About 40% of CIN 2/3 persist or progress to ICC <sup>3, 4</sup>. These lesions are the necessary precursor of ICC and have been considered by WHO as the most relevant clinical endpoint for vaccine efficacy studies <sup>5</sup>. Genotype, viral persistence and viral load of high-risk HPV have been shown to be predictors for development of CIN 2/3 or ICC <sup>6</sup>. In a worldwide meta-analysis based on over 4000 cases of high-grade squamous intraepithelial lesions, Clifford et al. showed that HPV 16 and/or 18 were associated with 52% of CIN 2/3 <sup>7</sup>.

Secondary prevention based on cytological screening allows the detection of precancerous lesions. In France, about 40,000 women with a diagnosis of CIN are identified annually, of whom 24,000 with CIN 2/3 <sup>8</sup>. Even if a substantial proportion of CIN 2/3 lesions will not progress to ICC, surgical treatment of CIN 2/3 is currently the best prevention of ICC, but is associated with morbidity, namely obstetrical adverse effects and psychological distress <sup>9</sup>. Multivalent vaccines containing HPV 16 and 18 L1 virus-like particles (VLP) have been recently developed <sup>10</sup>. One of them has been proved to be highly efficacious in preventing HPV 16/18-related CIN 2/3 and is already licensed for the prevention of CIN 2/3 and ICC <sup>11</sup>. However, accurate geographical data on HPV type distribution are necessary to optimally assess the expected impact of vaccination. French prevalence data on HPV genotypes in CIN 2/3 are limited. A single study published in 1992 and based on 53 biopsies indicated that genotypes 16 and 18 were associated with 57 and 4% of CIN 2/3 cases, respectively <sup>12</sup>. Using a sensitive method that allows the detection of 24 HPV genotypes, the objective of the present study was to describe the type-specific prevalence of HPV in CIN 2/3 and hereby locally estimate the potential benefit of an HPV 16/18 L1 VLP vaccine in prevention of such cervical lesions.

Data on type specific prevalence of HPV in ICC cases are presented in a separate paper in this issue of the *International Journal of Cancer* <sup>13</sup>.

## **Patients and Methods**

A retrospective study was conducted in 13 French centres specialized in screening and/or treatment of CIN 2/3: 8 public hospitals and 5 private departments of pathology.

### *Inclusion/exclusion criteria*

To be included in the study, histological specimens had to present a CIN 2/3 diagnosis, to be fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin. Each CIN 2/3 specimen was locally confirmed by verification of the diagnosis in the medical records and by review of an independent pathologist. To optimise the quality of the extracted DNA, specimens collected before December 1<sup>st</sup>, 1995 and those fixed in Bouin's solution were excluded.

### *Histological specimens*

In each Centre, all histological specimens were reviewed in 2005 to confirm the diagnosis. These specimens were obtained through cervical conization or biopsy. From each specimen, five to ten tissue sections (5 µm thick) were performed and collected in a 2 mL tube receiving a unique identification code for anonymization.

### *Patient data*

The following information extracted from medical records was collected: year of histological specimen collection, patient's year and geographical department of birth, area of residence, and type of histological specimen (biopsy, conization).

### *DNA isolation*



Tissue sections were dewaxed with xylene (twice 500  $\mu$ L), washed with 100% ethanol and incubated with proteinase K (200  $\mu$ L/mL in Tris-EDTA buffer) overnight at 56°C. After proteinase K inactivation at 95°C for 10 min, samples were spun at 14,000g for 5 min and supernatant was harvested for PCR.

#### *HPV genotyping*

HPV genotyping was centrally performed at the Department of Cellular and Molecular Biology in Besançon. The INNO-LiPA HPV Genotyping v2 test (Innogenetics Inc.) allowing the detection of 24 High Risk (HR) and Low Risk (LR) HPV genotypes (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70 and 74) was used according to the manufacturer's instruction. Briefly, the PCR reaction with the biotinylated SPF10 primers was undertaken with 1/10 dilution of the supernatant. This dilution was proven to be the most effective to amplify HPV and to avoid any inhibition effect due to the rough method used for DNA isolation. Then, hybridization of biotinylated PCR products on nylon strips, stringent wash and colour development were performed automatically with the *Auto-LiPA* machine. The results were visually interpreted.

#### *Statistical analysis*

About 500 histological specimens of CIN 2/3 were necessary to detect the HPV genotype with lowest prevalence and a precision of 2%. The overall prevalence of HPV genotypes was calculated as well as the prevalence according to patient's age at histological diagnosis. HPV type-specific distribution was expressed as the proportion of HPV-DNA positive women among all CIN 2/3 cases. HPV 53, considered as "Intermediate Risk" <sup>14</sup> was included in the Low Risk group. Qualitative variables were studied using two-sided Chi-square or Fisher exact test as appropriate. Data analysis was conducted using SAS version 8.2. A p value below 0.05 was considered as statistically significant.

#### *Ethical consideration*

According to the French legislation (Public Health Code modified by the law n   2004-806, August 9, 2004 and the Huri  t-S  rusclat act 88-1138, December 20, 1988) and since this study only involved

data extracted from medical records and stored histological specimens, no informed consent from the patients was necessary.

## Results

A total of 493 CIN 2/3 histological specimens collected between 1999 and 2005 were included in the analysis. Samples' characteristics are given in Table 1. Median age at histological diagnosis was 39 years (range 21-85). One hundred and twenty-one specimens (25%) had a CIN 2 diagnosis whereas 372 (75%) had a CIN 3.

### *HPV prevalence and type distribution*

The overall prevalence of LiPA detectable HPV was 98% (484/493). Nine specimens (2%) were HPV negative. Among them, 8 had been collected by conization and one by biopsy. Five had a CIN 2 diagnosis and four a CIN 3. Although the difference was just above significance, median age at diagnosis seemed higher in HPV negative than among HPV positive cases (44 versus 39 years, respectively,  $p=0.07$ ).

HPV type distribution is presented in Table 2. Among women with single or multiple infections, the most common genotype was HPV 16 (307/493 i.e. 62% of all CIN 2/3 cases) followed by HPV 31 (76/493 i.e. 15%), HPV 33 (60/493 i.e. 12%), HPV 52 (9%), HPV 51 (8%), and HPV 58 (7%) (Figure 1). HPV 18 was associated with 4% of cases (21 cases). Presence of at least one high-risk (HR) type<sup>14</sup> was observed in 96% of all specimens (472/493).

HPV types 16 and/or 18 accounted for 64% of CIN 2/3 cases (2.6% of cases were co-infected with HPV 16 and 18).

### *Single infections*

Among all histological specimens, 68% (333/493) were mono-infected. Genotype distribution among HPV mono-infected samples is given in Table 2. Here again, HPV 16 was by far the most prevalent

type accounting for 41% of all specimens, followed by HPV 31 (9%) and HPV 33 (6%). Four samples were mono-infected by HPV 53 considered as an “Intermediate risk”<sup>14</sup>. Seven further cases (1.4%) were infected by a low-risk (LR) type only.

### *Multiple infections*

Thirty-one percent (151/493) of histological specimens had multiple infections (presence of at least two HPV types). Among them, 126 (26% of all samples) had a HR coinfection (presence of at least two HR genotypes). The most common coinfection patterns are presented in Table 3. HPV 16 + HR genotype excluding 18 was the most prevalent pattern (17%) and was mainly represented by HPV 16+33 (3.3%) and HPV 16+51 (2.8%). HPV 16 was present in 77% of all HR coinfections. Twenty-five histological specimens (5%) had a HR+LR coinfection, 11 of them involving HPV 16. Considering HPV 16 and 18 single infections, HPV 16/18 coinfections, and HPV 16+LR coinfections, HPV 16 and /or 18 were associated with 45% of CIN 2/3 specimens (220/493).

## **Discussion**

Based on almost 500 histological specimens collected throughout the country, the present study indicates that HPV DNA is present in 98% of CIN 2/3 cases suggesting that almost no high-grade lesion develop independently of any HPV infection. In France, HPV 16 is by far the most common HPV type associated with CIN 2/3. Considering either single or multiple infections, the observed prevalence of 62% seems higher than that previously reported<sup>7</sup>. In a worldwide meta-analysis based on about 4000 high-grade squamous intraepithelial lesions, Clifford et al. reported indeed an HPV 16 prevalence of 45%. However, considering European cases only, results of the meta-analysis indicate an HPV 16 prevalence of 53%. Moreover, our results are in accordance with a previous small French study on high-grade CIN, reporting an HPV 16 prevalence of 57%<sup>12</sup>.

As reported by Clifford et al., the second most common HPV type is HPV 31 although prevalence in our study is almost twice higher than that previously reported (15 versus 9%).

As already discussed by the authors, this difference could be explained by geographical variations. Another possible explanation for these discrepancies is linked to the sensitivity of the HPV detection method used. Considering HPV positive specimens only, our results are indeed in accordance with Clifford's European prevalence data (e.g. HPV 16 prevalence of 63% vs 60% in our study).

Introduced in developed countries in the 60s, secondary prevention of cervical cancer is based on the detection and treatment of precancerous lesions. Pap testing followed by surgical treatment of cervical lesions has been shown to significantly reduce cervical cancer-related mortality. In 2000, women born in 1950 in France (and who thus benefited from screening) had a twice lower risk of developing and dying from a cervical cancer compared with women born in 1928<sup>15</sup>. However, secondary prevention linked to the treatment of precancerous lesions is associated with significant morbidity especially characterized by obstetric adverse effects<sup>9</sup> as well as psychological distress.

HPV vaccines were primarily developed with the aim of reducing HPV-related cervical cancer<sup>16</sup>. We showed indeed that an HPV 16/18 L1 VLP vaccine would have a substantial beneficial impact on the prevalence of ICC in France<sup>13</sup>. A significant beneficial effect of vaccination is expected in countries where pap test is implemented by substantially decreasing the burden associated with CIN 2/3 morbidity. Allowing the distinction between HPV single and multiple infections, the present study makes it possible to assess the lowest expected impact of an HPV 16/18 L1 VLP vaccination on high-grade lesions. Based on a 100% vaccination coverage, an HPV 16/18 L1 VLP vaccine could prevent at least 45% of CIN 2/3 cases in France. If one further assumes that HPV 16 and 18 are causally related to the lesion in which they are found even in the presence of another HR HPV type, the potential benefit of vaccination could increase to 64%. As discussed in the ICC study<sup>13</sup>, an even higher impact could be expected if results showing that HPV 16/18 L1 VLP vaccines generate cross-neutralizing antibodies against HPV 31, 45<sup>17,18</sup>, and even against HPV 52 and 58<sup>17</sup> are confirmed.

In conclusion, this large-scale prevalence study provides accurate data on HPV type distribution among CIN 2/3 cases in France and hereby indicates that an HPV 16/18 L1 VLP vaccine would

locally prevent a substantial proportion of high-grade cervical lesions and a significant associated morbidity.

## Acknowledgements

We gratefully thank:

- Pierre Pradat, PhD, Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France, for writing the manuscript (pradat@univ-lyon1.fr)
- François-André Allaert, CENBIOTECH, Dijon, France, for data management and analysis
- Jean-François Charlot, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CHU J. Minjoz, Besançon, France, for technical assistance in genotyping
- All members of the EDITH Study Group for providing histological specimens:  
Bernadette Kantelip, CHU Jean Minjoz , Besançon; Jean-Pierre Bellocq, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg; Michèle Pellegrin, CHU Bordeaux, Bordeaux; Marie-Christine Sault, Centre Hospitalier du Pays d'Aix, Aix-en-Provence; François Denis, Sophie Alain and Véronique Fermeaux, CHU Dupuytren, Limoges; Patrice Mathevet and Annie Buénerd, Hôpital Edouard Herriot, Lyon; Régis Angonin, Centre hospitalier de Fleyriat, Bourg en Bresse; Roger Dachez, Laboratoire Claude Lévy, Paris; Olivier Aynaoud and Pascal Tranbaloc, Paris; Christine Bergeron, Laboratoire Pasteur Cerba, Saint Ouen l'aumône; Alain Petitjean, Centre de Pathologie, Besançon; Etienne Faure, Belfort.

This study was funded by Sanofi Pasteur MSD.

## References

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
2. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006;24S3:S1-S10.
3. Syrjanen KJ. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;65:45-53.
4. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186-92.
5. Pagliusi SR, Teresa Aguado M. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. *Vaccine* 2004;23:569-78.
6. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, Carbillet JP, Kantelip B, Schaal JP, Mougin C. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003;106:396-403.
7. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;89:101-5.
8. Bergeron C, Cohet C, Bou  e S, Lorans C, R  my V. Management of abnormal smears intraepithelial neoplasia and associated treatment costs in France. *Bull Epidemiol Hebd* 2007;1:4-6.
9. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2006;367:489-98.
10. Koutsky LA, Harper DM. Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S114-21.
11. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Hoyer J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgren K, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006;95:1459-66.
12. Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol* 1992;16:641-9.
13. Prétet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, Soubeyrand B, Leocmach Y, Riethmuller D. Human Papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France. *Int J Cancer* 2007 (submitted).
14. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.

15. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, Exbrayat C, Tretare B, Carli PM, Guizard AV, Troussard X, Bercelli P, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003;51:3-30.

16. Soper D. Reducing the Health Burden of HPV Infection Through Vaccination. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006;14:83084.

17. Bryan JT, Smith JF, Ruiz W, Brownlow MK, Brown MJ, Esser MT. Evaluation of antibodies induced by an HPV vaccine to cross-neutralize pseudovirions of vaccine-related HPV types. *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts) 2006;24:15008-.

18. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006;367:1247-55.

**Table 1: Samples' characteristics at inclusion (n=493).**

	Number of specimens (%)
Age of the patient at histological diagnosis (years)	
<30	67 (13.6)
30-39	196 (39.9)
40-49	151 (30.8)
50-59	50 (10.2)
60-69	10 (2.0)
>=70	17 (3.5)
NA*	2
Area of residence	
Paris area	128 (34.5)
North-West	3 (0.8)
North-East	61 (16.4)
South West	69 (18.6)
South East	109 (29.4)
Other	1 (0.3)
NA	122
Histological diagnosis	
CIN 2	121 (24.5)
CIN 3	372 (75.5)
Type of histological specimen	
biopsy	68 (13.9)
conization	420 (86.1)
NA	5

\* NA = non-available



**Table 2: Distribution of High Risk (HR) (A) and Low Risk (LR) (B) HPV genotypes in 493 histological specimens with high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3)**

A

HR HPV type	CIN 2/3	
	All infections	Single infections
	(single or multiple)*	
	n (%)	n (%)
16	307 (62.3)	199 (40.4)
31	76 (15.4)	41 (8.3)
33	60 (12.2)	27 (5.5)
52	43 (8.7)	13 (2.6)
51	38 (7.7)	12 (2.4)
58	32 (6.5)	15 (3.0)
18	21 (4.3)	3 (0.6)
35	21 (4.3)	7 (1.4)
68	14 (2.8)	3 (0.6)
39	12 (2.4)	2 (0.4)
45	6 (1.2)	0 (0.0)
59	1 (0.2)	0 (0.0)

B

LR HPV type	CIN 2/3	
	All infections	Single infections
	(single or multiple)*	
	n (%)	n (%)
6	14 (2.8)	0 (0.0)
66	11 (2.2)	3 (0.6)
53	10 (2.0)	4 (0.8)
11	7 (1.4)	1 (0.2)
Other	12 (2.4)	3 (0.6)

\*multiple infections were separated into constituent types

**Table 3: Type of High Risk HPV multiple infections among CIN 2/3 cases in France (n=126)\***

HPV types	CIN 2/3 n (%)
16 + 18	7 (1.4)
16 + other <sup>†</sup>	84 (17.6)
16 + 33	16 (3.2)
16 + 51	14 (2.8)
16 + 31	9 (1.8)
16 + 52	8 (1.6)
16 + 58	8 (1.6)
16 + 68	7 (1.4)
16 + 45	5 (1.0)
16 + other	17 (3.4)
18 + other <sup>‡</sup>	5 (1.0)
16 + 18 + other High Risk HPV	6 (1.2)
other High Risk HPV coinfection <sup>**</sup>	24 (4.9)

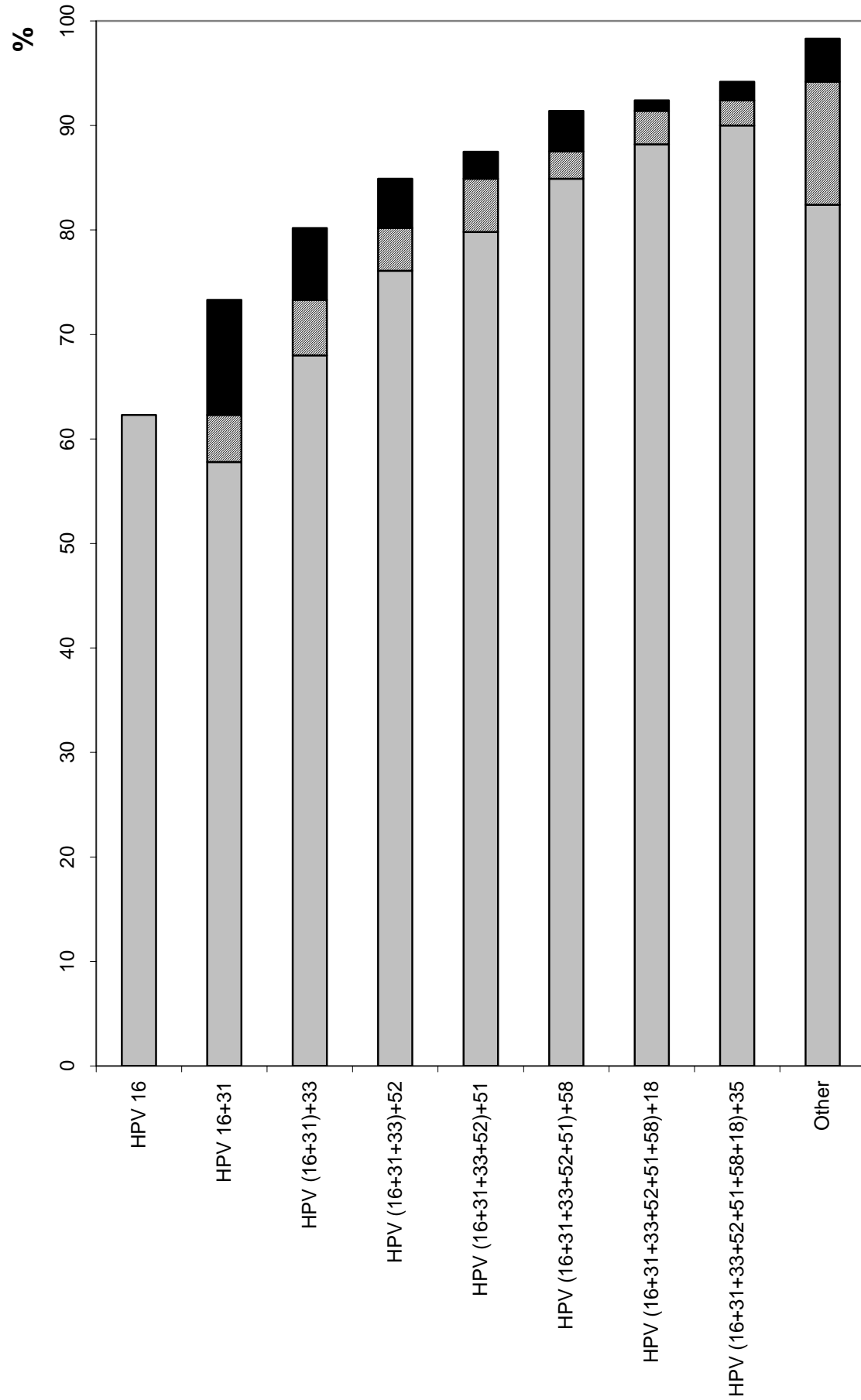
\* High Risk + Low Risk multiple infections were found in 25 specimens of which 11 involved

HPV 16

<sup>†</sup> other High Risk HPV excluding HPV 18

<sup>‡</sup> other High Risk HPV excluding HPV 16

<sup>\*\*</sup> excluding 16 and 18



**Figure 1: Cumulative prevalence of HPV genotypes (as single or multiple infections) among 493 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2/3 cases in France. Striped areas indicate coinfections.**

## Discussion et Conclusion

Le cancer du col de l'utérus est un véritable problème de santé publique puisqu'il représente à ce jour en terme de mortalité chez les femmes, le second cancer au monde. La majorité des cas est observée dans les pays en voie de développement où il représente la cause principale de mortalité chez les femmes. Dans les pays développés, l'incidence du cancer du col utérin a chuté depuis les années 1950 en raison du dépistage par le frottis cervico-utérin. Aujourd'hui, nous assistons à une stagnation de l'incidence de ce cancer, et même à une légère augmentation de l'incidence des adénocarcinomes (Franceschi *et al.*, 2006, Munoz *et al.*, 2006).

L'infection génitale par HPV est l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente au monde. Beaucoup de jeunes femmes infectées le sont juste après leurs premiers rapports sexuels, la prévalence de l'infection étant la plus importante pour le groupe d'âge des 19 à 24 ans. Chez les femmes âgées de 25 à 35 ans, le virus est détecté de façon séquentielle, et la détection intermittente de différents types est fréquente. Des travaux s'intéressant à l'exposition aux HPV et à l'apparition de pathologies associées, ont permis de définir un second pic d'infection, observé chez les femmes âgées de plus de 55 ans, au moment où l'incidence du cancer du col de l'utérus est la plus haute (Moscicki *et al.*, 2006, Scheurer *et al.*, 2005).

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'infection par un HPV à haut risque est nécessaire, mais pas suffisante pour induire le développement d'un cancer du col de l'utérus. La persistance de virus au sein de la cellule semble jouer un rôle majeur dans le processus de développement d'une tumeur. Cette persistance est modulée par différents facteurs, liés au virus et liés à la réponse immunitaire. A ce jour, aucune étude n'a pu proposer de façon pertinente une approche relationnelle entre l'histoire naturelle des lésions induites par HPV et les facteurs viraux et immunitaires modulant la persistance de l'agent causal dans cette pathologie (Munoz *et al.*, 2006).

Ainsi, l'identification de certains de ces facteurs pouvant influencer la progression des lésions vers des grades plus sévères, se révèle être une perspective de recherche tout à fait en accord avec les récents programmes de prévention du cancer du col de l'utérus. Ces marqueurs se distinguent de la simple détection des lésions qui a montré ses limites, et du simple test de détection d'HPV, qui malgré une excellente sensibilité, souffre d'une faible spécificité (Cuschieri *et al.*, 2005, Cuschieri & Cubie, 2005, Cuschieri *et al.*, 2007, Kitchener *et al.*, 2006, Stoler & Schiffman, 2001), et n'est donc que peu prédictif de l'évolution des lésions. La recherche de tels indicateurs nécessite d'une part une meilleure description de l'histoire naturelle des infections HPV et des lésions qui leur sont associées, et d'autre part la compréhension des mécanismes de carcinogenèse. Ces données sont à ce jour loin d'être parfaitement comprises et maîtrisées.

En se basant sur la contribution des HPV dans le développement du cancer du col de l'utérus, mon travail de thèse a permis, par les méthodologies adaptées, d'explorer des facteurs pouvant contrôler la persistance de l'infection virale HPV, et d'apprécier leur implémentation dans le dépistage de ce cancer. Nous avons ainsi étudié des facteurs liés au virus qui sont la charge virale, le statut physique du génome viral et le génotype d'HPV infectant. Enfin, et surtout parce que l'un des

éléments clés de la clairance virale est l'établissement d'une réponse immunitaire efficace, nous avons exploré la distribution des cellules immunitaires observées dans le tractus génital féminin lors de l'histoire naturelle des infections par HPV. Nous allons maintenant discuter de la façon dont ces facteurs peuvent constituer des marqueurs apportant une efficacité supplémentaire aux programmes de dépistage de ce cancer, et une meilleure connaissance de l'histoire naturelle des lésions génitales associées aux HPV.

## LA VALIDATION D'AMPLICOR®

Malgré le succès de la cytologie dans les programmes de dépistage du cancer du col utérin depuis les années 1950, cette technique possède des limitations importantes pour un test de laboratoire : la sensibilité clinique pour la détection des lésions "précurseurs" et du cancer du col de l'utérus est insuffisante (Cuzick *et al.*, 2006, Kitchener *et al.*, 2006). La détection de l'agent causal (HPV) comme outil de dépistage représente une avancée considérable dans la prévention des lésions associées à HPV. Cette approche a montré des performances diagnostiques tout à fait acceptables (Cuschieri & Cubie, 2005, Dalstein *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont montré l'intérêt de la détection des HPV comparativement à la cytologie en tant qu'outil de dépistage du cancer du col utérin et des lésions "précurseurs" (Dalstein *et al.*, 2004, Davies *et al.*, 2006). Il est aujourd'hui proposé que l'utilisation du test HPV seul pour un dépistage primaire représente une méthode plus sensible que la cytologie conventionnelle, et la détection d'HPV par l'utilisation d'un système validé, dans le cadre du dépistage primaire permet d'obtenir de meilleurs performances que celles obtenues par l'utilisation de la cytologie conventionnelle. La plupart des études font référence au test Hybrid Capture®, historiquement le premier test de détection d'HPV apparu sur le marché, et le plus utilisé. Aujourd'hui d'autres tests HPV se positionnent en concurrents de la trousse de Digene. C'est le cas du test de détection des HPV AMPLICOR® HPV MWP Test (Roche Diagnostic). Il est non quantitatif et permet de détecter les 13 génotypes identifiés par le test HCII® (van Ham *et al.*, 2005). Il est important que le développement d'un test HPV puisse être conduit avec une validation analytique et clinique afin de s'assurer que les résultats obtenus soit objectifs, reproductibles et pertinents pour le clinicien. Ainsi, il était indispensable d'évaluer les performances analytiques et cliniques du test AMPLICOR® en les comparant aux performances du test HCII® et de la cytologie.

Notre travail a consisté à comparer les performances analytiques du test AMPLICOR® avec celles du test HCII® pour la détection d'HPV HR à partir de 470 échantillons cervico-utérins de résidus de cytologie liquide de diagnostic différents (normaux, ASCUS, LGSIL, HGSIL). Nous avons montré une excellente concordance entre les résultats des deux tests (plus de 96%) pour tous les échantillons. Il semble probable, du fait qu'il soit basé sur une PCR, que le test AMPLICOR® ait une meilleure sensibilité analytique que le test HCII®. Comme en témoigne la détection d'ADN d'HPV dans l'échantillon provenant d'une HGSIL et pour lequel le test HCII® a donné un résultat négatif. Par ailleurs nos résultats ont montré que le test HCII® était capable de détecter – dans certains cas – les

infections par HPV53, alors que ce génotype n'est pas sensé être détecté par la trousse. Nous avons attribué ceci à une réaction croisée entre ce génotype et la sonde du type 56 (présente dans la trousse). Ces deux génotypes sont phylogénétiquement très proches, et nous pouvons penser que des séquences nucléotidiques similaires puissent être détectées par le test HCII® (de Villiers *et al.*, 2004). Ceci est très intéressant, car l'HPV53 est considéré par certains auteurs comme un génotype à « risque intermédiaire » ou à « haut risque probable », et non pas comme un HPV BR au même titre que le 6 et 11 par exemple (de Villiers *et al.*, 2004, Munoz *et al.*, 2003).

Il semble que l'avantage soit donné au test HCII® en ce qui concerne les études recueillant un nombre d'échantillons important. Effectivement, le test AMPLICOR® requiert une plus grande technicité (due à l'étape de PCR), et ne permet pas l'analyse simultanée de plus de 22 échantillons par manipulation, alors que le test HCII® offre la possibilité de traiter 88 échantillons par manipulation.

Toutefois, le test AMPLICOR® est intéressant pour les petites séries, et permet de vérifier la qualité du prélèvement, grâce à l'amplification simultanée d'un gène cellulaire (la  $\beta$ -globine), ce qui confère un avantage au vu du développement des types de prélèvements et de conservations des cellules cervico-utérines, ce qui n'est pas possible avec le test HCII®.

Une étude a récemment évalué les performances cliniques du test AMPLICOR® dans le dépistage des HGSIL (Monsonogo *et al.*, 2005). La spécificité clinique a été déterminée à 44%, et la sensibilité clinique s'est avérée être très proche (95,2%) de celle obtenue pour le test HCII® (94,6%) (Dalstein *et al.*, 2004). D'autres études ont aussi validé cliniquement ce test (Carozzi *et al.*, 2007, Halfon *et al.*, 2007, Monsonogo *et al.*, 2005, Poljak *et al.*, 2005, Sandri *et al.*, 2006, van Ham *et al.*, 2005).

Notre étude permet donc de conclure que le test AMPLICOR® peut-être recommandé au même titre que le test HCII® dans la détection des HPV HR. Maintenant l'évaluation de l'indice de coût/efficacité du test AMPLICOR® doit être complétée en considérant tous les facteurs économiques internationaux.

## LA CHARGE VIRALE

La particularité de l'infection par HPV est qu'elle est très fréquente, surtout chez les jeunes filles, et que dans la majorité des cas, l'infection et/ou les lésions associées vont disparaître spontanément (Baseman & Koutsky, 2005, Moscicki *et al.*, 2006). Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer d'autres marqueurs qui permettraient d'identifier parmi les infections par HPV celles qui sont « à risque de CIN2+ » – c'est-à-dire qui vont conduire à une progression vers des HGSIL ou des cancers– de celles qui sont « non à risque de CIN2+ » – c'est-à-dire qui vont se résoudre de façon spontanée et ne pas conduire à l'apparition de HGSIL ou de cancer (Snijders *et al.*, 2006, Snijders *et al.*, 2003). Beaucoup de virus établissant une infection persistante sont caractérisés par un taux continu, qu'il soit bas ou élevé, de répllication virale (par exemple, le VIH ou le virus de l'Hépatite B), ou par une période de réactivation d'une infection latente alternant avec des périodes en apparence sans maladie (par exemple, l'Herpès Simplex Virus). Aujourd'hui, il est admis qu'une infection persistante avec un HPV à haut risque est nécessaire au développement d'une lésion cervicale précurseur ou d'un cancer du col

de l'utérus (Moscicki *et al.*, 2006). L'utilisation potentielle de la détermination de la charge virale (CV) comme un facteur pronostique, et comme un outil diagnostique dans le cadre du dépistage du cancer du col de l'utérus continue à être controversée. De multiples études épidémiologiques ont montré une association entre la CV et le risque de développer un cancer du col de l'utérus (Brink *et al.*, 2006, Dalstein *et al.*, 2003, Ho *et al.*, 1995, Koutsky *et al.*, 1992, Moberg *et al.*, 2005, Snijders *et al.*, 2003, Wang & Hildesheim, 2003). Par ailleurs, très peu d'études longitudinales ont permis d'évaluer des profils d'évolution de la CV en fonction du risque de progression des lésions associées aux HPV. Ainsi, la valeur prédictive de la CV n'est pas déterminée de façon précise, et notamment une valeur « seuil » permettant de discriminer les infections « à risque de CIN2+ » des infections « non à risque de CIN2+ » n'est pas clairement établie aujourd'hui (Snijders *et al.*, 2003, van Duin *et al.*, 2002). L'explication peut être dans un premier temps donnée par la multitude de techniques utilisées permettant de déterminer ou d'estimer une CV, et les différences dans la détermination des statuts histologiques ou cytologiques des lésions. Par exemple, de nombreuses études se sont basées sur l'utilisation du test HCII® pour la détermination de « charges virales » (Dalstein *et al.*, 2003, Nindl *et al.*, 1998, Santos *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2002). Or ce test n'est pas spécifique d'un HPV en particulier, et il ne tient pas compte de la cellularité des échantillons, ce qui laisse penser que les valeurs de « CV » données par HCII® ne sont pas quantitatives (Bory *et al.*, 2002, Clavel *et al.*, 1998a, Clavel *et al.*, 1998b). Malgré tout, nous avons pu montrer au sein de notre équipe que nous pouvions définir des groupes à plus fort risque de développer des lésions de haut grade que d'autres, en utilisant des seuils de valeurs du test HCII® (Dalstein *et al.*, 2003).

Nous avons donc voulu savoir si les valeurs obtenues par le test HCII® donnaient une bonne estimation de la CV, et pour cela nous avons comparé ces « CV » avec celles obtenues par une méthode quantitative prenant en compte la cellularité de l'échantillon et le type d'HPV. Pour cela, nous avons développé une méthode de PCR en temps réel permettant d'estimer entre autre la cellularité des échantillons, en quantifiant en parallèle le gène de l'albumine. Ce gène est présent en deux exemplaires dans les cellules eucaryotes diploïdes, à la différence de gènes comme ceux de la  $\beta$ -globine ou la GAPDH, dont le nombre de copies peut varier de façon importante en raison de la présence de pseudo-gènes. De plus, cette PCR avait déjà été validée (Laurendeau *et al.*, 1999). Nous devons vérifier néanmoins que l'estimation du nombre de cellules dans nos prélèvements était bonne, car les échantillons de cellules cervico-utérines utilisés pour notre étude proviennent de prélèvements dénaturés par la soude, et ayant subi congélation et décongélation, ce qui peut endommager l'ADN. Ainsi, nous avons trouvé une bonne corrélation entre le nombre de cellules estimé par quantification spectrophotométrique de l'ADN et la quantification par PCR en temps réel.

Le test HCII® permet la détection de 13 types d'HPV HR, et nous avons développé une technique de quantification d'un seul génotype d'HPV. Devant la prévalence élevée de l'HPV16 dans les lésions précurseurs et les cancers du col de l'utérus (60%) – que nous avons aussi validé au travers de l'étude E.D.I.T.H. (Pretet *et al.*, 2007a, Pretet *et al.*, 2007b) –, nous avons porté notre choix sur ce génotype. Des amorces et une sonde d'hydrolyse (TaqMan™) spécifiques pour le gène E6 d'HPV16 ont été utilisées pour mettre au point cette technique. Dans un premier temps, nous avons validé la reproductibilité de la technique de PCR en temps réel E6 d'HPV16 qui présente une variabilité inter-



expérience de moins de 5% sur 9 manipulations indépendantes. Il paraissait important de vérifier la spécificité de l'amplification d'HPV16 lors de co-infections dans le cas d'un excès important d'ADN d'un ou de plusieurs autre(s) type(s) d'HPV par rapport à l'ADN d'HPV16. Ainsi la spécificité de la PCR en temps réel E6 HPV16 a été appréciée vis à vis des types d'HPV 18, 31, 33, 39, 52 et 56 (résultats non présentés dans ce manuscrit), et nous avons confirmé l'absence de réactions croisées

Enfin, nous avons mesuré la CV HPV16 dans 40 échantillons cervico-utérins et avons comparé les valeurs obtenues par la PCR temps réel à celles données par le test HCII®. Une bonne corrélation entre ces valeurs a été observée que ce soit en fonction de la CV HPV16 brute (en copies par volume de prélèvement) ou de la CV HPV16 normalisée par rapport au nombre de cellules (en copies par cellule). Il semble donc dans notre étude, que la correction de la cellularité des échantillons ne soit pas nécessaire pour mesurer une CV. Il est possible que la corrélation entre les valeurs données par les deux méthodes serait encore améliorée si des génotypes supplémentaires (les plus courants) avaient été pris en compte par la PCR en temps réel. Or, nous avons évalué le taux de co-infections de nos échantillons par une technique maison de génotypage (Hybridowell®, Argene, Varilhes, France), et nous avons trouvé un taux d'infections multiples faible dans cette série (12%). Ce travail suggère donc que les valeurs données par le test HCII® peuvent constituer une bonne estimation de la charge virale HPV HR, et permet de valider le fait que la CV soit prédictive de l'apparition de lésions de haut grade, comme l'a montré Dalstein *et al.* avec des seuils définis de valeurs de « CV » obtenues par le test HCII® (Dalstein *et al.*, 2003). Ces observations sont contradictoires à ce que Bory *et al.* ont pu montrer en utilisant des échantillons provenant de résidus de cytologie liquide (Bory *et al.*, 2002). Il est important d'insister sur le fait que notre étude a été réalisée à partir de prélèvements cervico-utérins dédiés spécifiquement à la détection des HPV (pour le test HCII®), et au sein d'une même équipe de gynécologues formés de la même manière à l'utilisation de la cytobrosse. Ceci permet de penser que nous réduisons considérablement la variabilité du nombre de cellules dans les prélèvements. Des précautions particulières doivent être prises avec les échantillons cervico-utérins provenant de résidus de cytologie liquide. Effectivement, en fonction du volume utilisé pour la cytologie liquide, le nombre de cellules résiduelles et la CV sont susceptibles d'être modifiés.

Par la suite, nous avons voulu évaluer la pertinence clinique de la CV HPV16, et de l'évolution de cette CV au cours de l'histoire naturelle des infections. L'objectif étant à nouveau de 1) déterminer quelles sont les infections « à risque de CIN2+ » et quelles sont les infections « non à risque de CIN2+ », 2) de déterminer un seuil de CV HPV16 discriminant ces deux types d'infections. La technique de quantification de la CV HPV16 validée, nous avons entrepris une étude rétrospective, qui nous a amené à distinguer deux groupes parmi 38 patientes : celles ayant développé des lésions précancéreuses de type CIN2/3 (« groupe cas »), et celles n'ayant pas développé de lésions et qui ont effectué la clairance de leur infection par HPV HR (valeur du test HCII® inférieure à 1 pg/mL) (« groupe témoins »). Chaque patiente a subi un prélèvement de cellules cervico-utérines tous les 6 mois environ. L'objectif de notre étude était 1) de comparer l'évolution de la CV HPV16 dans ces 2 groupes de patientes, représentant pour le « groupe cas » des infections « à risque de CIN2+ » et

pour le « groupe témoins » des infections « non à risque de CIN2+ », et 2) d'identifier d'éventuelles différences entre les profils obtenus.

En ce qui concerne l'analyse du prélèvement initial, c'est-à-dire correspondant à la première visite au cours de laquelle un test HPV a été effectué, aucune différence dans les valeurs de CV HPV16 n'a pu être observée entre le « groupe témoins » et le « groupe cas », même si une tendance se dessine : 63 *versus* 299 copies pour 1 000 cellules. Ceci renforce l'hypothèse qu'un seul test HPV – même quantitatif – à un moment donné peut ne pas être suffisant pour prédire l'apparition d'une HGSIL. Il est à noter que pour ces deux groupes il n'existe pas de différence entre les valeurs médianes de CV données par le test HCII®.

Une autre stratégie consiste à déterminer un seuil de CV permettant de différencier les infections « à risque de CIN2+ » des infections « non à risque de CIN2+ ». Nous avons choisi une valeur seuil de 200 copies pour 1 000 cellules parce qu'elle représente le seuil de détection de la trousse HCII® et parce que ce seuil est utilisé quotidiennement par les cliniciens dans le diagnostic des infections HPV. Effectivement, 1 pg de génomes HPV par mL représente 100 000 copies d'HPV par mL. Nous avons estimé en utilisant la PCR en temps réel ciblant le gène de l'albumine, qu'un prélèvement d'un mL correspond en moyenne à environ 500 000 cellules. Ainsi, 1 pg/mL d'HPV représente 100 000 copies d'HPV pour 500 000 cellules soit 200 copies d'HPV pour 1 000 cellules.

En choisissant ce seuil de CV HPV16 de 200 copies pour 1 000 cellules, nous avons montré qu'une femme ayant une CV initiale supérieure à ce seuil a un risque 3 fois plus important de développer une HGSIL qu'une femme ayant une CV inférieure à ce seuil. De plus, une femme qui présente une CV qui augmente entre les deux premiers points de suivi a un risque de développer une HGSIL 3 fois plus important qu'une femme qui ne présente pas d'augmentation de la CV entre ces deux points. Ainsi, nous avons montré que le seuil de CV HPV16 défini plus haut, et l'évolution de la CV entre les deux premiers points de suivi, pouvaient constituer des éléments prédictifs de l'apparition des lésions précurseurs sans pour autant connaître l'histoire naturelle de l'infection, c'est-à-dire à quel moment la femme se situe par rapport à son infection. Notre seuil a donc une valeur clinique qui est cohérente avec celle du test HCII®. Cette valeur se situe par ailleurs entre les seuils définis par van Duin *et al.* (van Duin *et al.*, 2002). Effectivement, dans cette étude, les Hollandais ont proposé une valeur de 24 000 copies d'HPV16 par prélèvement (c'est-à-dire environ 50 copies pour 1 000 cellules) pour les femmes ayant une cytologie normale, et 4 300 000 copies d'HPV16 par prélèvement (c'est-à-dire environ 8 000 copies pour 1 000 cellules) pour les femmes ayant des cytologies atypiques (Snijders *et al.*, 2003, van Duin *et al.*, 2002). Dans notre étude, nous disposons de prélèvements avec des anomalies cytologiques mineures et des prélèvements sans anomalie : notre seuil de 200 copies pour 1 000 cellules obtenu quelle que soit la cytologie initiale est donc cohérent.

Enfin, nous avons pu noter que des profils de CV différents étaient obtenus entre les deux groupes de femmes : les femmes ayant des infections « à risque de CIN2+ » présentent une augmentation de la CV et les femmes ayant des infections « non à risque de CIN2+ » présentent une diminution de la CV.

A ce titre, nous avons observé qu'une chute de la CV de 1 à 2 logarithmes entre deux points de suivi, pouvait constituer un facteur de bon pronostic. Cependant, nous avons constaté, pour certaines

patientes du « groupe témoins », que la clairance virale était précédée par un pic de CV ou par une longue phase de plateau (de 25 à 44 mois), durant laquelle la CV restait élevée. Nous pouvons supposer que le pic de CV constaté avant l'élimination du virus pourrait être responsable de la mise en place de la réponse immunitaire, nécessaire à l'élimination du virus. Il est aussi intéressant de noter qu'actuellement c'est la persistance virale qui semble être le facteur de risque le mieux identifié. Or, au vu de nos données, la notion de persistance, définie actuellement par 2 tests positifs à 12 mois d'intervalle (Einstein & Burk, 2001), peut être revisitée. En effet, Il y a de nombreux problèmes conceptuels dans l'approche de la persistance telle qu'elle est définie aujourd'hui. Dans cette définition, la durée de la persistance de l'infection n'est jamais constante, variant de 2 mois à 7 ans en fonction des études (Moscicki *et al.*, 2006). Un autre problème fondamental est que les observations d'une période d'infection (positivité) par un ou des HPV se font en fonction de points indéterminés de l'histoire naturelle de l'infection (Woodman *et al.*, 2007). Il est impossible de déterminer pour une patiente qui présente un test HPV positif lors de sa première visite, depuis combien de temps perdure l'infection. Dans ces circonstances, la distinction entre une infection persistante et une infection transitoire est délicate. Les études les plus informatives à ce sujet seraient donc celles qui ne prennent en compte que les infections incidentes. De façon intéressante, le terme d'infection transitoire peut-être donnée à tort lorsque l'ADN d'HPV n'est pas détecté de façon continu par des techniques actuelles, en raison d'une CV très faible. On peut par exemple imaginer que lors de périodes de latence le virus puisse être indétectable. La mise au point de techniques de détection d'HPV plus sensibles (notamment par des techniques de PCR en temps réel), et une amélioration de l'échantillonnage (permettant de recueillir localement d'autres cellules que celles des couches superficielles de l'épithélium utérin) s'inscrivent donc en perspective pour une meilleure discrimination des infections persistantes et transitoires (Woodman *et al.*, 2007). Enfin, les mécanismes de latence ne sont toujours pas élucidés aujourd'hui, et nous pouvons penser que certains marqueurs mériteraient d'être étudiés pour mieux caractériser les infections latentes. C'est le cas notamment du produit du transcrit E8<sup>E2C</sup> qui pourrait jouer un rôle primordial dans l'état de latence observée dans les cellules basales de l'épithélium infecté (Saito *et al.*, 1999, Stubenrauch *et al.*, 2000, Stubenrauch & Laimins, 1999, Stubenrauch *et al.*, 2001). Enfin, une femme ayant deux tests HPV positifs à quelques mois d'intervalle ne signifie pas automatiquement qu'elle ait une infection persistante, ni qu'elle ait un plus fort risque de développer des lésions cancéreuses. Effectivement, des phénomènes de clairance suivie par une réinfection par le même type ou par un autre type d'HPV ne sont pas à exclure, et la signification d'une telle évolution dans l'histoire naturelle des lésions est loin d'être claire.

Les données de notre étude, bien qu'obtenues sur une petite cohorte, montrent bien que la charge virale peut être un facteur prédictif de l'évolution des lésions du col de l'utérus. Plus précisément, la définition d'un seuil « à risque de CIN2+ », ainsi que l'appréciation de l'évolution de la CV entre deux points de suivi peuvent constituer des outils pertinents pour prédire l'apparition de lésions associées aux HPV. Ceci devra être vérifié sur de plus larges cohortes et de façon prospective. Ces résultats suggèrent aussi qu'outre la persistance et la CV, qui restent encore à mieux définir, d'autres facteurs déterminants et notamment ceux liés à l'état physique du virus pourraient

jouer de concert avec la CV dans le processus de carcinogenèse et seraient ainsi impliqués dans l'évolution des lésions.

## L'INTEGRATION VIRALE

Dans ce contexte, il était nécessaire d'étudier le statut physique des HPV (génome sous forme intégrée, épisomale ou les deux) au cours de l'histoire naturelle des lésions du col de l'utérus. En effet, l'intégration du génome viral au génome de la cellule hôte, semble constituer une étape clé pour la progression lésionnelle (Doorbar, 2005, Guo *et al.*, 2006, Munoz *et al.*, 2006, Peitsaro *et al.*, 2002, Wang & Hildesheim, 2003). Effectivement, ce phénomène entraîne souvent une délétion de tout ou d'une partie du gène E2, conduisant soit à la non expression de E2, soit à l'expression d'une protéine non fonctionnelle. Quoi qu'il en soit, le rôle de la protéine E2 est d'inhiber l'expression des oncoprotéines virale E6 et E7, responsables de l'immortalisation et de la transformation des cellules infectées. En l'absence de cette régulation nous pouvons supposer que le phénotype tumoral de la cellule est plus rapidement acquis. D'une manière générale, la proportion de lésions abritant des formes intégrées d'ADN d'HPV augmente avec la gravité de la lésion. Or, même s'il a été montré que des formes intégrées et épisomales d'HPV coexistaient au sein d'une même lésion, les lésions abritant une forte proportion de virus intégrés risqueraient plus de progresser vers un grade plus sévère (Peitsaro *et al.*, 2002). Aujourd'hui, les données résultantes des études sur l'intégration des HPV sont très hétérogènes, probablement en raison des technologies utilisées pour mesurer ce phénomène : Southern blotting, hybridation *in situ*, PCR ou PCR en temps réel. Par ailleurs, peu d'études à notre connaissance ont à ce jour fait référence à un taux d'intégration donné en pourcentage, dans les lésions du col de l'utérus.

Notre travail s'appuie donc sur trois questions, à savoir 1) comment se distribuent les échantillons en fonction de l'état physique des HPV au sein d'un même type de cytologie (des cytologies normales aux cancers ? 2) quelle est le pourcentage d'intégration en fonction des anomalies cytologiques (ou taux d'intégration) ? 3) Existe-t-il un lien entre la CV et l'intégration ? Notre étude nous a permis aussi de valider une méthodologie visant à mesurer des taux d'intégration du génome d'HPV16 dans des cellules cervico-utérines. Cette technique repose sur l'utilisation de deux PCR en temps réel : l'une ciblant le gène E6 d'HPV16 (décrite, validée et utilisée dans notre travail sur l'étude de l'évolution de la CV HPV16) définissant le nombre de copies virales totales (Monnier-Benoit *et al.*, 2006, Pretet *et al.*, 2004), et l'autre ciblant le gène E2 d'HPV16 définissant le nombre de copies épisomales (Peitsaro *et al.*, 2002).

Il fallait valider la technique de PCR en temps réel E2 HPV16 en termes de performances analytiques, en définissant tout d'abord des gammes d'étalonnage permettant la quantification absolue des formes épisomales d'HPV16. Nous avons utilisé des dilutions de plasmides pBR322-HPV16 (contenant la totalité du génome d'HPV16), et nous avons été confrontés à des problèmes de reproductibilité de cette PCR. Effectivement, en utilisant des dilutions de plasmides, nous n'obtenions pas une bonne adéquation entre les valeurs de CV théoriques et expérimentales, nous conduisant à

sur-estimer le nombre de copies de E2. Ce problème a été résolu en réalisant des dilutions de plasmides (définissant notre gamme d'étalonnage) dans une solution d'ADN de sperme de saumon. De cette manière nous avons mimé l'encombrement stérique modulant l'efficacité des PCR que l'on retrouve lors de l'amplification d'une séquence sur le génome humain. Les Cp obtenus correspondent alors aux concentrations théoriques, ce qui nous a permis d'avoir une PCR robuste et des courbes standard parfaitement linéaires.

Cette technique a montré une bonne sensibilité (100 copies d'HPV16 pour 100 000 cellules), une excellente spécificité, une efficacité constante et une très bonne reproductibilité (coefficient de variation des Cp des droites de calibration inférieur à 4%). Il était important de valider la technique dans le contexte de la quantification des formes épisomales et intégrées d'HPV. Nous avons mis au point un modèle théorique permettant de mimer les taux d'intégration, en mélangeant de l'ADN de cellules SiHa (2 copies d'HPV16 sous formes intégrées), avec des dilutions de plasmides pBR322-HPV16, représentant des formes épisomales. Les modèles théoriques utilisés représentaient des taux d'intégration allant de 0 à 100% d'intégration, par incrémentation de 10%. Une excellente corrélation entre les résultats obtenus par la mesure expérimentale, et les résultats théoriquement attendus a été observée ( $r^2=0,98$ ). Enfin, nous avons vérifié l'absence d'effet « d'inhibition » des formes intégrées sur la quantification des formes épisomales lorsque ces dernières étaient sous représentées dans l'échantillon. Nous avons montré que la technique permettait de détecter jusqu'à 1 copie épisomale pour 100 000 copies intégrées. Ceci nous a permis de valider notre technique de mesure et notre méthode de calcul de l'intégration d'HPV.

A partir de cette technique, l'objectif du travail a été de quantifier l'intégration du génome d'HPV16 dans des échantillons cervico-utérins (de cytologies normales, LGSIL, HGSIL, cancer invasifs ou ASCUS) destinés à des analyses différentes puisqu'ils provenaient, soit de prélèvements destinés au test HCII® (dans le milieu STM®), soit de résidus de cytologie liquide, soit de biopsies fixées au formaldéhyde et incluses en paraffine. Cette étude nous a permis de mettre en évidence les relations entre grade des lésions, intégration et charge virale. Nos observations sur le statut physique d'HPV16 dans les différentes lésions rejoignent celles des études précédentes : 1) des formes intégrées (dont des formes mixtes) sont présents dans tous les échantillons quelle que soit la cytologie ; 2) les formes mixtes sont majoritaires dans toutes les catégories étudiées ; 3) la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées (mixtes et intégrées seules) augmentent avec le grade de la lésion ; 4) il existe un lien entre la CV et l'intégration.

Le fait de détecter des formes intégrées dans les échantillons provenant de col normaux, suggère que l'intégration est un événement relativement précoce de la carcinogenèse induite par les HPVs et qu'il peut avoir lieu sans manifestation cytologique. Toutefois, la majorité des échantillons abrite des formes mixtes et deux hypothèses peuvent être formulées à ce propos : 1) soit la même cellule contient d'une part des formes intégrées et d'autre part des formes épisomales. Ceci pourrait impliquer aussi que plusieurs virus puissent pénétrer dans une même cellule, ce qui n'est pas démontré aujourd'hui. Dans ce cas le (s) virus sous forme épisomale pourrait (aient) produire la protéine E2 qui *trans*-inhiberait la forme intégrée du virus (Arias-Pulido *et al.*, 2006). Le risque évolutif serait dépendant du taux d'intégration. Mais ce contrôle de E2 sur la forme intégrée du virus au sein

d'une même cellule est un événement qui reste techniquement difficile à évaluer. 2) Certaines cellules contiennent des formes intégrées uniquement. Ces cellules présentent un fort risque d'imortalisation et de transformation, car il n'y aurait pas de processus de *trans*-inhibition par E2 défini ci-dessus (Van Tine *et al.*, 2004, Vinokurova *et al.*, 2005). D'autres cellules contiennent des formes épisomales uniquement, et présentent alors un faible risque évolutif. La réponse à ces questions passe automatiquement par la mise au point d'outils d'étude spécifique du statut physique d'HPV dans le noyau cellulaire, tels que la micro-dissection ou encore des techniques de PCR ciblant une seule cellule.

Nous avons montré que le taux d'intégration pourrait constituer un marqueur de malignité de la lésion, puisqu'une augmentation de ce taux d'intégration est retrouvée avec l'augmentation du grade des lésions. Les profils de taux d'intégration en fonction de la CV sont caractéristiques des lésions dont nous disposons pour l'étude. Il est intéressant de noter qu'en ce qui concerne les cancers, deux profils sont possibles ; soit de fortes CV et de faibles taux d'intégrations (inférieur à 60%), soit de faibles CV et un fort taux d'intégration. Ces deux facteurs semblent donc liés et on peut proposer l'hypothèse que de fortes CV puissent induire une plus forte probabilité d'intégration du génome viral. Ce phénomène n'a pour l'instant pas été décrit, mais on peut imaginer que de fortes CV puissent entraîner une certaine instabilité génomique qui favoriserait l'intégration. De plus, aucun élément ne nous permet d'affirmer aujourd'hui qu'une ou plusieurs protéines cellulaires ou virales soient nécessaires ou obligatoires pour induire l'intégration des HPV. La connaissance des mécanismes moléculaires de l'intégration et sa régulation est donc d'une importance capitale pour pouvoir répondre à ces questions. Ainsi, notre équipe est au cœur d'un projet interrégional (Cancéropôle Grand Est – CGE) et international (Krebsforschung am Deutschen Krebsforschungszentrum – DKFZ) dont l'un des axes est de mieux comprendre l'intégration des HPV et son rôle dans la carcinogenèse.

Au travers de ces résultats, il est intéressant de noter que les échantillons provenant d'ASCUS présentent un profil d'intégration intermédiaire. Ceci rejoint l'idée que l'ASCUS est l'interprétation cytologique de différents types de lésions, puisqu'il a été montré qu'un HPV était retrouvé dans 50% des ASCUS. On estime qu'environ 60% de ces frottis correspondent en fait à un col normal, 20 à 25% à une LGSIL, 10 à 15% à une HGSIL et que dans 1% des cas on peut trouver un cancer sous-jacent (Sherman *et al.*, 1999).

De telles données constituent un apport fondamental dans l'étude des facteurs prédictifs de l'évolution des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus, et permettent de compléter notre connaissance sur l'histoire naturelle de l'infection HPV. Or, ces résultats ne permettent pas de déterminer si le taux d'intégration (corrélé ou non avec la CV) mesuré en un temps donné, puisse constituer un élément prédictif de l'évolution des lésions précurseurs. Il reste à valider cette hypothèse au cours d'une étude prospective de façon similaire avec ce que nous avons fait pour la CV HPV16 afin de disposer de données dynamiques au cours de l'histoire naturelle de l'infection HPV et des lésions associées. La quantification de l'intégration dans les échantillons de l'étude portant sur la CV HPV16 n'a pu être réalisée durant ma thèse en raison de l'insuffisance de matériel disponible.

Compte tenu de l'approche méthodologique utilisée pour ce travail, il est nécessaire de formuler quelques limites. Il a été montré qu'une expression de E2 pouvait être observée en présence

d'intégration (Arias-Pulido *et al.*, 2006), et que dans certains cas la POL E1 était délétée lors de la linéarisation du génome d'HPV (Luft *et al.*, 2001). L'utilisation de la PCR ciblant E2 pour quantifier l'intégration virale pourrait alors sous-estimer la détection des formes intégrées, puisque des portions amplifiables de E2 pourraient persister. Une approche pertinente pour s'affranchir de ces obstacles et pour répondre également au problème de la prévalence des formes mixtes dans les échantillons, serait de nous intéresser à l'état transcriptionnel des HPV et notamment aux transcrits E2, E6 et E7. Effectivement, des études ont montré une corrélation entre la quantité de ces transcrits et le grade des lésions. De plus, un certain nombre de femmes infectées par HPV16 ne présentant pas d'anomalies cytologiques n'expriment pas de transcrits E6, ce qui permet de penser que la détection de transcrits E6 pourrait constituer facteur de bon pronostic de l'évolution d'une infection HPV ou d'une lésion. Enfin, il a été montré au cours d'un suivi de patientes de deux ans, en utilisant la trousse de détection d'ARNm E6/E7 d'HPV PreTect HPV-Proofer® (NorChip, Klokkestua, Norway) et une PCR consensus GP5+/6+ (détection de l'ADN d'HPV), que pour la même sensibilité clinique (86%) la spécificité clinique pour prédire l'apparition des CIN2+, du test de détection de l'ARN était plus élevée (85%) que celle de la PCR permettant de détecter l'ADN (50%) (Molden *et al.*, 2005a). Un travail sur l'étude des transcrits d'HPV est en cours au laboratoire dans le cadre du projet collaboratif entre le CGE et le DKFZ.

## L'IMMUNITE CELLULAIRE LOCALE

A côté des facteurs viraux dont nous venons de voir l'importance, les facteurs immunitaires liés à l'hôte s'avèrent aussi déterminants dans le devenir de l'infection à HPV (Stanley, 2006). L'épithélium du col de l'utérus fait partie du Système Immunitaire Commun des Muqueuses (SICM). Il est donc intéressant d'explorer particulièrement le système immunitaire muqueux associé à la sphère génitale féminine qui est le lieu de répllication virale et de l'apparition des lésions. Beaucoup d'éléments montrent que la réaction immunitaire de l'hôte est cruciale dans le contrôle de l'infection à HPV, comme par exemple le taux élevé de lésions précancéreuses et cancéreuses du col chez les patientes infectées par le VIH et notamment celles au stade SIDA et chez les greffées (Bosch *et al.*, 2006, Luron *et al.*, 2006, Nicol *et al.*, 2005, Trottier *et al.*, 2006). Des travaux concernant la réponse immunitaire liée à l'infection à HPV ont été menés dans notre équipe avec notamment le développement d'outils permettant d'explorer la réponse muqueuse humorale (Bard *et al.*, 2002, Bard *et al.*, 2004). Or, en raison du faible taux d'immunoglobuline mesurables au niveau du tractus génital, les limites techniques de l'exploration de la réponse anticorps spécifiques au niveau des sécrétions génitales apparaissent encore plus marquées.

Les données de la littérature, en ce qui concerne la réponse immunitaire locale sont actuellement peu fournies et ne permettent pas de dégager un réel consensus. En particulier les travaux réalisés sont le plus souvent hétérogènes en terme de caractérisation des lésions que ce soit sur le plan histo/cytologique ou virologique. Dans ce contexte nous avons voulu étudier une série d'échantillons parfaitement décrits histologiquement et virologiquement. Ainsi, nous n'avons pas utilisé de lésions de

type CIN2 dont le diagnostic est peu reproductible (Stoler & Schiffman, 2001) et tous les prélèvements ont été testés positifs pour HPV HR et négatif pour HPV BR, afin de s'affranchir des lésions condylomateuses. Le faible échantillonnage nous a conduit à utiliser des outils statistiques adaptés à ce type d'étude, en collaboration avec le Département d'Information Médicale de Besançon (Dr. F Mauny). Les différents groupes ont été comparés par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, et lorsque les groupes étaient statistiquement différents, les densités cellulaires, ainsi que les rapports cellules CD4+/cellules CD8+ ont été comparés par une méthode statistique de comparaison multiple (Siegel & Castelan, 1988). L'identification des cellules CD4+, CD8+ et CD45RO+ a été effectuée à l'aide d'une technique d'immunohistochimie couplée à des systèmes d'amplification de signal.

Nous avons montré que l'infiltrat de cellules immunitaires observé dans les CIN1 infectées par HPV HR et qui ont régressé était sensiblement du même type que celui décrit dans les lésions génitales induites par les HPV à bas risque. Effectivement, un infiltrat de cellules CD4+ a été observé dans les verrues génitales et aussi dans les lésions régressant dans des modèles animaux (papillomatoses orales chez le chien). Le rôle des cellules CD4+, qui sont potentiellement des lymphocytes T dit « helper » (LTh) est d'activer les cellules CD8+ (réponse Th1) ou bien encore d'activer les lymphocytes B (Th2). L'activation des macrophages induit normalement une réaction d'inflammation qui n'est pas observée dans les lésions précancéreuses et les cancers du col de l'utérus. On peut donc penser que le rôle des LTh serait préférentiellement tourné vers l'induction d'une réponse humorale. De plus, l'activation des Lymphocytes T Cytotoxiques (LTC), présentant le marqueur CD8 nécessite des cytokines, telles que l'IL-2 et l'activation des cellules dendritiques par les cellules T CD4+. Ainsi, nous pouvons supposer que l'infiltrat de cellules CD4+ soit nécessaire à l'établissement d'une réponse immunitaire cytotoxique (*via* les LTC). L'accumulation de cellules immunitaires de type CD4+ pourrait donc constituer un marqueur de bon pronostic associé à une régression des lésions. Le profil immunitaire semble être différent dans les CIN1 qui ont progressé avec une inversion du ratio CD4+/CD8+ (mais les différences ne sont pas significatives). Ce ratio diminue encore plus et de façon significative dans les CIN3 et les cancers invasifs. Ces modifications ont essentiellement été notées dans le stroma, ce qui montre une compartimentation des réponses immunitaires en fonction de l'épithélium ou du stroma.

Les cellules CD8+ et les cellules CD45RO+ (qui sont des cellules immunitaires mémoires), sont trouvées de façon plus abondante dans les lésions au fort potentiel de progression, et il est intéressant de noter que dans 70% des CIN3, les cellules immunitaires s'organisent en agrégats rappelant les formations lymphoïdes. Ceci a été également observé par Kobayashi *et al.* qui ont montré en plus que des antigènes E6 et E7 sont fixés aux cellules dendritiques folliculaires interdigitées (Kobayashi *et al.*, 2002). Il semblerait donc que l'initiation d'une réponse immunitaire puisse se faire au sein de ces structures, dans ce type de lésion. La signification de tels agrégats n'est pas claire encore aujourd'hui, et nous pouvons proposer l'hypothèse que l'initiation de la réponse immunitaire s'effectue dans les CIN3, mais que l'activation des signaux nécessaires à l'amplification de cette réponse est absente, et que finalement, les cellules mémoires CD8+ pourraient être tolérantes vis-à-vis d'antigènes d'HPV (Clifford *et al.*, 2006a, Stern, 2005, Wang & Hildesheim, 2003).



Dans le contexte d'un mécanisme propre aux HPV HR de tolérance ou d'échappement à la réponse immunitaire, l'infiltrat massif de cellules CD8<sup>+</sup> et CD45RO<sup>+</sup> observé dans les cancers pourrait bien suggérer que de telles cellules ne sont pas fonctionnelles. Cet infiltrat pourtant toujours décrit, ne peut pas empêcher la progression tumorale. Ce phénomène est décrit dans d'autres types de cancers. Il est généralement observé une faible présence des cellules immunocompétentes au sein des tumeurs. Il semblerait que la tumeur soit capable d'établir une « barrière » et d'exclure les éléments susceptibles d'empêcher la progression et l'invasion. En d'autres termes le système tumoral met en place une stratégie de tolérance face au système immunitaire. Les cellules cancéreuses secrètent plusieurs cytokines immunosuppressives telles que l'IL-4, l'IL-10, le TGFβ, l'INFγ, et il a été montré par des techniques d'immunohistochimie que seules les cellules tumorales et les cellules infectées par HPV exprimaient l'IL-10, ce qui signifie que l'expression de cette cytokine fait suite à la transformation des cellules par HPV (Alcocer-Gonzalez *et al.*, 2006). En revanche, les cellules cancéreuses du col de l'utérus n'expriment pas ou peu de cytokines aux caractéristiques pro-inflammatoires, telles que l'IL-12, l'IL-6 ou le TNFα (Alcocer-Gonzalez *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les cellules tumorales sont capables de produire des facteurs de tolérance qui leur permettent d'échapper à la surveillance immunitaire. En agissant sur la tumeur pour empêcher l'expression de tels facteurs, il est possible de rompre la tolérance et de provoquer l'élimination des cellules cancéreuses. Ainsi, il a été montré que les cellules dérivées du cancer du col de l'utérus exprimaient faiblement le marqueur CD80 (ou B7), nécessaire à l'activation des LT. Une étude a montré que l'activation de l'expression du CD80 à la surface des cellules CaSki, permettait l'activation des LTC (Kaufmann *et al.*, 1997). Plusieurs auteurs ont montré que les lymphocytes infiltrants les tumeurs (purifiés à partir de cancers du col de l'utérus), présentaient des activités Natural Killer (NK) contre les lignées cellulaires infectées par HPV ou encore des activités cytotoxiques contre les antigènes E7 d'HPV16. En revanche, il semble que la présentation des antigènes par les molécules du CMH I soit perturbée dans les cellules épithéliales infectées par les HPV HR. Ce qui expliquerait que ces cellules puissent échapper à leur reconnaissance et à leur élimination par les cellules T lymphocytaires spécifiques (Hildesheim & Wang, 2002, Stern, 2005).

D'autres investigations devront être engagées afin de décrire clairement les fonctionnalités des cellules immunitaires et l'identification de tels marqueurs pourrait avoir une véritable valeur prédictive de l'évolution des lésions induites par les HPV. Le développement d'outils permettant d'explorer les réponses immunitaires est très intéressant dans le suivi des patientes impliquées dans les programmes de vaccination thérapeutique contre les HPV. Effectivement ce type de vaccin vise à induire des cellules cytotoxiques capables de reconnaître et d'éliminer spécifiquement les cellules infectées et/ou tumorales. Pour être efficaces, ces lymphocytes T cytotoxiques doivent identifier des peptides viraux présentés par les molécules du CMH I des cellules infectées.

## LA VACCINATION ANTI-HPV

En attendant, une approche prometteuse consistant à stimuler la réponse immunitaire humorale *via* un vaccin thérapeutique efficace, la vaccination prophylactique est en place. En effet, les essais cliniques récents de vaccination contre l'HPV16 et 18 et pour la prévention des lésions de haut grade, et donc du cancer du col de l'utérus, ont donné d'excellents résultats, et il est à ce jour envisageable d'appliquer la vaccination prophylactique à grande échelle (Harper *et al.*, 2004, Harper *et al.*, 2006, Koutsky *et al.*, 2002, Villa, 2006, Villa *et al.*, 2005, Villa *et al.*, 2006b). Or, si l'on veut obtenir une efficacité suffisante pour réduire de façon significative l'incidence du cancer du col de l'utérus, le développement de ce vaccin pose la question du ou des génotypes d'HPV à cibler (Clifford *et al.*, 2006a, Koutsky & Harper, 2006). Des études épidémiologiques à l'échelle mondiale ont montré que les HPV16 et 18 sont trouvés dans environ 70% des cancers et près de 50% des lésions précancéreuses de haut grade (HGSIL) (Clifford *et al.*, 2006a, Clifford *et al.*, 2005a, Clifford *et al.*, 2003, Munoz *et al.*, 2004, Pretet *et al.*, 2007a, Pretet *et al.*, 2007b). Or, il s'avère que la distribution des génotypes d'HPV dépend des zones géographiques. Lorsque l'on s'intéresse aux cancers du col de l'utérus, le même type, HPV16, prédomine dans les 5 régions du globe : Afrique, Europe, Amérique du Nord, Amérique centrale et du Sud et Asie. Mais la prévalence de ce génotype dans les HGSIL varie entre ces régions : ce type est présent dans 34% des HGSIL en Asie, alors qu'il est détecté dans 52% de ces lésions en Europe. Il en est de même pour les autres types, notamment le génotype 18 et les types 31, 33, 35, 45, 52 et 58 (Clifford *et al.*, 2006a). La connaissance de la distribution des types d'HPV dans les différentes régions du globe présente donc un intérêt fondamental pour le développement des politiques vaccinales de prévention des lésions associées à ces virus, et en particulier dans la prévention du cancer du col de l'utérus (Lai *et al.*, 2007, Woodman *et al.*, 2007).

L'étude nationale sur la distribution des génotypes d'HPV en France (E.D.I.T.H.) s'inspire de cette constatation. Nos résultats ont permis de montrer que les types 16 et 18 sont détectés dans environ 80% des cancers du col de l'utérus et 60% des HGSIL. Cette étude est la première de cette ampleur, et les données recueillies sont cohérentes avec les données épidémiologiques au niveau Européen. Les deux vaccins anti-HPV, le Gardasil® (Merck & Co) (ciblant les types 16, 18, 11 et 6) et le Cervarix® (GlaxoSmithKline) (ciblant les types 16 et 18) semblent couvrir une large proportion de cas de lésions précancéreuses et de cancers du col de l'utérus. Les efficacités cliniques de ces vaccins ont d'ores et déjà montré d'excellents résultats lors des essais de phases II et III : de 90 à 100 % de protection contre les infections par les types d'HPV correspondants et contre le développement de lésions précancéreuses de haut grade associés aux HPV16 et 18 (Harper *et al.*, 2004, Harper *et al.*, 2006, Villa *et al.*, 2006a, Villa *et al.*, 2005).

L'efficacité théorique de ces vaccins est de 70% actuellement et elle peut être accrue par le nombre de génotypes ciblés par le vaccin. Mais la difficulté technique et le coût sont deux facteurs limitants, sans compter sur la difficulté d'évaluer la performance de ces vaccins contre des génotypes peu fréquents. Or, la protection croisée entre génotypes phylogénétiquement proches peut pallier ce problème dans la mesure où il existe des réactions croisées de réponses immunologiques entre les

types 16 et 31 (54% d'efficacité pour les infections incidentes), et entre les types 18 et 45 (94% d'efficacité pour les infections incidentes), ce qui pourrait contribuer à augmenter l'efficacité des vaccins tels qu'ils sont conçus actuellement (Harper *et al.*, 2006). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : 1) l'induction d'une réponse immunitaire contre les autres génotypes pourrait être due à l'adjuvant ASO4 (hydroxyde d'aluminium et lipide A détoxifié) du vaccin de GSK, Cervarix®. L'efficacité de ce vaccin passerait de 70% à 80%. 2) des interactions entre les HPV de différents types semblent exister au niveau des voies d'endocytose : l'infection par HPV16 favoriserait la co-infection par HPV58, de même que l'infection par HPV18 favoriserait les co-infections par HPV45, 39 et 31. Une protection HPV16 et 18 préviendrait donc des infections contre d'autres génotypes (Mendez *et al.*, 2005).

Le choix d'une stratégie vaccinale se heurte aussi à des difficultés tenant notamment au fait que l'on manque de recul pour évaluer la durée de protection conférée par le vaccin. En outre, il faut disposer d'un recul suffisant concernant l'efficacité vaccinale pour connaître la durée de la protection conférée (on estime actuellement que 3 injections confèrent une protection d'au moins 10 ans), pour décider si des rappels vaccinaux sont ou non nécessaires et à quel rythme. De plus, en France les données épidémiologiques sont insuffisantes concernant l'âge d'acquisition des infections HPV16, 18, 6 et 11, l'incidence et la prévalence des condylomes et des lésions associées aux HPV dans d'autres tissus. Actuellement notre laboratoire est impliqué dans un programme de génotypage des dysplasies légères et les condylomes externes (qui peuvent être une conséquence de l'infection par HPV BR au niveau du col de l'utérus). Ces études sur la distribution des génotypes dans les différentes lésions génitales vont permettre de déterminer la place respective des différents types d'HPV et le bénéfice de la vaccination pour limiter l'apparition de ce type de lésions.

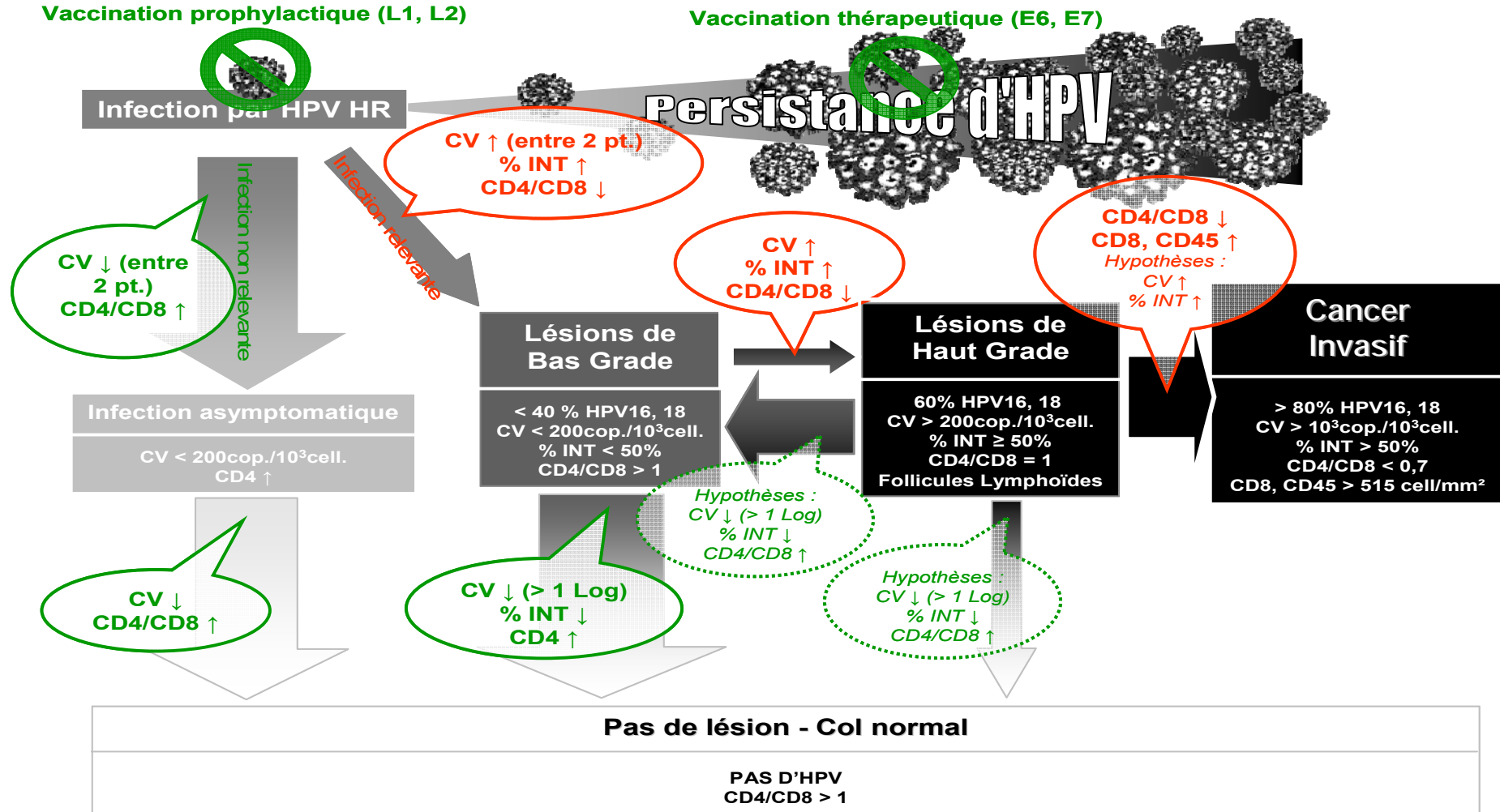
Enfin, la population à vacciner et l'âge idéal de cette vaccination sont encore en débat actuellement. L'option actuelle choisie dans les recommandations européennes du vaccin est de cibler les filles de 14 ans (avant les premiers rapports sexuels), avec un éventuel rattrapage des filles plus âgées. Ceci implique que cette population ainsi que les parents doivent être parfaitement informés sur l'infection par HPV par rapport aux autres infections sexuellement transmissibles (IST) (Kane *et al.*, 2006, Wright *et al.*, 2006). La vaccination des garçons n'est pas envisagée pour le moment, pourtant ils sont le réservoir et les vecteurs des HPV. L'efficacité d'une vaccination chez les hommes n'est pas démontrée à ce jour par rapport à l'apparition de lésions et le ratio coût/efficacité n'est pas en faveur d'une option ciblant les deux sexes. Mais on peut penser qu'elle serait pertinente dans la prévention des cancers péniens et de l'anus associés aux HPV et dans la mesure où des cancers autres que ceux d'origine ano-génitale semblent associés – d'une manière moins forte que pour le cancer du col de l'utérus – aux HPV et notamment aux HPV HR.

## CONCLUSION

En conclusion, le développement des outils techniques, passant notamment par la validation clinique des tests, permettant l'étude des facteurs liés au virus (génotypes, charge virale, intégration) et liés à l'hôte (réponses immunitaires) apporte une meilleure connaissance de l'histoire naturelle de l'infection par les HPV et des lésions qui leur sont associées. Ainsi, nous pouvons désormais proposer une histoire naturelle du cancer du col de l'utérus intégrant les différents facteurs mis en évidence lors de ce travail de thèse (**Figure 20**).

La recherche sur les HPV doit être poursuivie car nous avons vu que l'histoire naturelle de l'infection reste décrite encore de façon limitée et toutes les relations entre l'hôte et le pathogène ne sont pas clairement comprises à ce jour. Depuis l'autorisation de mise sur le marché du vaccin contre les HPV et surtout la prochaine publication des recommandations de la haute autorité de santé prévue pour été 2007, nous entrons dans l'ère vaccinale. Or, l'impact des campagnes de vaccination pourra être mesuré dans une trentaine d'année seulement du fait de l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus. En attendant, il est nécessaire de proposer des outils de dépistage pertinents et disposant d'une excellente spécificité clinique. Le vaccin ne protégeant pas de tous les génotypes, le suivi vaccinal par le génotypage semble être la prochaine grande étape de la recherche sur HPV.

Finalement, les vaccins, le dépistage et les facteurs prédictifs seront sans aucun doute complémentaires pendant plusieurs décennies dans le but de prévenir, surveiller, comprendre et ainsi traiter la quasi-totalité des cas du second cancer le plus fréquent chez la femme.



**Figure 20.** Histoire naturelle de l'infection par HPV et des lésions génitales associées

En rouge : facteurs de mauvais pronostics ; En vert : facteurs de bons pronostics ; En pointillé et/ou en italique : hypothèses

(CV = charge virale ; % INT = pourcentage d'intégration)



- (CDC, 1993). 1993 sexually transmitted diseases treatment guidelines. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* **42**, 1-102.
- (ALTS Group, 2003). A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol* **188**, 1393-400.
- Abba, M. C., Mouron, S. A., Gomez, M. A., Dulout, F. N. & Golijow, C. D. (2003). Association of human papillomavirus viral load with HPV16 and high-grade intraepithelial lesion. *Int J Gynecol Cancer* **13**, 154-8.
- Akgul, B., Cooke, J. C. & Storey, A. (2006). HPV-associated skin disease. *J Pathol* **208**, 165-75.
- Al-Bakkal, G., Ficarra, G., McNeill, K., Eversole, L. R., Sterrantino, G. & Birek, C. (1999). Human papilloma virus type 16 E6 gene expression in oral exophytic epithelial lesions as detected by in situ rtPCR. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **87**, 197-208.
- Alcocer-Gonzalez, J. M., Berumen, J., Tamez-Guerra, R., Bermudez-Morales, V., Peralta-Zaragoza, O., Hernandez-Pando, R., Moreno, J., Gariglio, P. & Madrid-Marina, V. (2006). In vivo expression of immunosuppressive cytokines in human papillomavirus-transformed cervical cancer cells. *Viral Immunol* **19**, 481-91.
- Almog, B., Gamzu, R., Kuperminc, M. J., Levin, I., Fainaru, O., Niv, J. & Bar-Am, A. (2003). Human papilloma virus testing in patient follow-up post cone biopsy due to high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* **88**, 345-50.
- Alonso, I., Torne, A., Puig-Tintore, L. M., Esteve, R., Quinto, L., Campo, E., Pahisa, J. & Ordi, J. (2006). Pre- and post-conization high-risk HPV testing predicts residual/recurrent disease in patients treated for CIN 2-3. *Gynecol Oncol* **103**, 631-6.
- Alotaibi, L., Provost, N., Gagnon, S., Franco, E. L. & Coutlee, F. (2006). Diversity of cutaneous human papillomavirus types in individuals with and without skin lesion. *J Clin Virol* **36**, 133-40.
- Ambros, P. F. & Karlic, H. I. (1987). Chromosomal insertion of human papillomavirus 18 sequences in HeLa cells detected by nonisotopic in situ hybridization and reflection contrast microscopy. *Hum Genet* **77**, 251-4.
- Andersson, S., Hansson, B., Norman, I., Gaberi, V., Mints, M., Hjerpe, A., Karlsen, F. & Johansson, B. (2006). Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16INK4a. *Int J Oncol* **29**, 705-11.
- Andersson, S., Mints, M., Sallstrom, J. & Wilander, E. (2005). The relative distribution of oncogenic types of human papillomavirus in benign, pre-malignant and malignant cervical biopsies. A study with human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequence analysis. *Cancer Detect Prev* **29**, 37-41.
- Arias-Pulido, H., Peyton, C. L., Joste, N. E., Vargas, H. & Wheeler, C. M. (2006). Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **44**, 1755-62.
- Armbruster-Moraes, E., Ioshimoto, L. M., Leao, E. & Zugaib, M. (1993). Detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in amniotic fluid during different periods of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **169**, 1074.
- Arora, R., Kumar, A., Prusty, B. K., Kailash, U., Batra, S. & Das, B. C. (2005). Prevalence of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) types 16 and 18 in healthy women with cytologically negative Pap smear. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **121**, 104-9.
- Aynaud, O., Ionesco, M. & Barrasso, R. (2003). Cytologic detection of human papillomavirus DNA in normal male urethral samples. *Urology* **61**, 1098-101.
- Aynaud, O., Piron, D., Bijaoui, G. & Casanova, J. M. (1999). Developmental factors of urethral human papillomavirus lesions: correlation with circumcision. *BJU Int* **84**, 57-60.

- Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A. & Howley, P. M. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**, 962-71.
- Bamshad, M., Wooding, S., Salisbury, B. A. & Stephens, J. C. (2004). Deconstructing the relationship between genetics and race. *Nat Rev Genet* **5**, 598-609.
- Banks, L., Matlashewski, G., Pim, D., Churcher, M., Roberts, C. & Crawford, L. (1987). Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization. *J Gen Virol* **68 (Pt 12)**, 3081-9.
- Banks, L., Moreau, F., Vousden, K., Pim, D. & Matlashewski, G. (1991). Expression of the human papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J Immunol* **146**, 2037-42.
- Bard, E., Riethmuller, D., Biichle, S., Meillet, D., Pretet, J. L., Mougin, C. & Seilles, E. (2002). Validation of a high sensitive immunoenzymatic assay to establish the origin of immunoglobulins in female genital secretions. *J Immunoassay Immunochem* **23**, 145-62.
- Bard, E., Riethmuller, D., Meillet, D., Pretet, J. L., Schaal, J. P., Mougin, C. & Seilles, E. (2004). High-risk papillomavirus infection is associated with altered antibody responses in genital tract: non-specific responses in HPV infection. *Viral Immunol* **17**, 381-9.
- Bartholomew, J. S., Glenville, S., Sarkar, S., Burt, D. J., Stanley, M. A., Ruiz-Cabello, F., Chengang, J., Garrido, F. & Stern, P. L. (1997). Integration of high-risk human papillomavirus DNA is linked to the down-regulation of class I human leukocyte antigens by steroid hormones in cervical tumor cells. *Cancer Res* **57**, 937-42.
- Baseman, J. G. & Koutsky, L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S16-24.
- Bass, C. A., Jungkind, D. L., Silverman, N. S. & Bondi, J. M. (1993). Clinical evaluation of a new polymerase chain reaction assay for detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens. *J Clin Microbiol* **31**, 2648-53.
- Bell, M. C., Edwards, R. P., Partridge, E. E., Kuykendall, K., Conner, W., Gore, H., Turbat-Herrera, E. & Crowley-Nowick, P. A. (1995). CD8+ T lymphocytes are recruited to neoplastic cervix. *J Clin Immunol* **15**, 130-6.
- Bernard, C., Mougin, C., Laurent, R. & Lab, M. (1994). Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. *Cancer Detect Prev* **18**, 273-82.
- Berumen, J., Ordonez, R. M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S. C., Estrada, R. A., Yunes, E., Garcia-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G. & Madrigal-de la Campa, A. (2001). Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1325-30.
- Berumen, J., Unger, E. R., Casas, L. & Figueroa, P. (1995). Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum Pathol* **26**, 676-81.
- Bettinger, D., Bernard, B., Riethmuller, D., Greslin, I., Gay, C., Lab, M., Seilles, E. & Mougin, C. (1999). Human papillomavirus detection by non isotopic in situ hybridization, in situ hybridization with signal amplification and in situ polymerase chain reaction. *Eur J Histochem* **43**, 185-98.
- Bierl, C., Karem, K., Poon, A. C., Swan, D., Tortolero-Luna, G., Follen, M., Wideroff, L., Unger, E. R. & Reeves, W. C. (2005). Correlates of cervical mucosal antibodies to human papillomavirus 16: results from a case control study. *Gynecol Oncol* **99**, S262-8.
- Bodaghi, S., Yamanegi, K., Xiao, S. Y., Da Costa, M., Palefsky, J. M. & Zheng, Z. M. (2005). Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 2862-7.



- Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., Walboomers, J. M., van den Muysenberg, A. J., Gunther, A. W., Scheper, R. J., Meijer, C. J. & Kummer, J. A. (1997). Assessment of cytotoxic T-lymphocyte phenotype using the specific markers granzyme B and TIA-1 in cervical neoplastic lesions. *Br J Cancer* **76**, 1353-60.
- Bory, J. P., Cucherousset, J., Lorenzato, M., Gabriel, R., Quereux, C., Birembaut, P. & Clavel, C. (2002). Recurrent human papillomavirus infection detected with the hybrid capture II assay selects women with normal cervical smears at risk for developing high grade cervical lesions: a longitudinal study of 3,091 women. *Int J Cancer* **102**, 519-25.
- Bosch, F. X. (2003). Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex* **45 Suppl 3**, S326-39.
- Bosch, F. X. & de Sanjose, S. (2002). Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol Rep* **4**, 175-83.
- Bosch, F. X. & de Sanjose, S. (2003). Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 3-13.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. & Shah, K. V. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* **55**, 244-65.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. & Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87**, 796-802.
- Bosch, F. X., Qiao, Y. L. & Castellsague, X. (2006). CHAPTER 2 The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *Int J Gynaecol Obstet* **94 Suppl 1**, S8-S21.
- Bourgault Villada, I., Moyal Barracco, M., Ziol, M., Chaboissier, A., Barget, N., Berville, S., Paniel, B., Jullian, E., Clerici, T., Maillere, B. & Guillet, J. G. (2004). Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res* **64**, 8761-6.
- Bousarghin, L., Hubert, P., Franzen, E., Jacobs, N., Boniver, J. & Delvenne, P. (2005). Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells. *J Gen Virol* **86**, 1297-305.
- Bousarghin, L., Touze, A., Combata-Rojas, A. L. & Coursaget, P. (2003a). Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J Gen Virol* **84**, 157-64.
- Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (2003b). Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol* **77**, 3846-50.
- Bousarghin, L., Touze, A., Yvonnet, B. & Coursaget, P. (2004). Positively charged synthetic peptides from structural proteins of papillomaviruses abrogate human papillomavirus infectivity. *J Med Virol* **73**, 474-80.
- Bradley, J., Coffey, P., Arrossi, S., Agurto, I., Bingham, A., Dzuba, I., Kleine, A. N., Lewis, R. & White, S. C. (2006). Women's perspectives on cervical screening and treatment in developing countries: experiences with new technologies and service delivery strategies. *Women Health* **43**, 103-21.
- Breitbart, F. & Coursaget, P. (1999). Human papillomavirus vaccines. *Semin Cancer Biol* **9**, 431-44.
- Brentjens, M. H., Yeung-Yue, K. A., Lee, P. C. & Tying, S. K. (2002). Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin* **20**, 315-31.
- Brestovac, B., Harnett, G. B., Smith, D. W., Frost, F. & Shellam, G. R. (2005). Multiplex nested PCR (MNP) assay for the detection of 15 high risk genotypes of human papillomavirus. *J Clin Virol* **33**, 116-22.
- Brink, A. A., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Berkhof, J. & Verheijen, R. H. (2006). HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **20**, 253-66.

- Brink, A. A., Zielinski, G. D., Steenberg, R. D., Snijders, P. J. & Meijer, C. J. (2005). Clinical relevance of human papillomavirus testing in cytopathology. *Cytopathology* **16**, 7-12.
- Brisson, J., Bairati, I., Morin, C., Fortier, M., Bouchard, C., Christen, A., Bernard, P., Roy, M. & Meisels, A. (1996). Determinants of persistent detection of human papillomavirus DNA in the uterine cervix. *J Infect Dis* **173**, 794-9.
- Brown, D. R., Bryan, J. T., Cramer, H., Katz, B. P., Handy, V. & Fife, K. H. (1994). Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata acuminata from immunosuppressed patients. *J Infect Dis* **170**, 759-65.
- Bryan, J. T., Taddeo, F., Skulsky, D., Jansen, K. U., Frain, B. M., Qadadri, B. & Brown, D. R. (2006). Detection of specific human papillomavirus types in paraffin-embedded sections of cervical carcinomas. *J Med Virol* **78**, 117-24.
- Burk, R. D. & DeSalle, R. (2006). The tango and tangle of human papillomavirus and the human genome. *J Natl Cancer Inst* **98**, 1026-7.
- Burk, R. D., Terai, M., Gravitt, P. E., Brinton, L. A., Kurman, R. J., Barnes, W. A., Greenberg, M. D., Hadjimichael, O. C., Fu, L., McGowan, L., Mortel, R., Schwartz, P. E. & Hildesheim, A. (2003). Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* **63**, 7215-20.
- Cairey-Remonnay, S., Humbey, O., Mouglin, C., Algros, M. P., Mauny, F., Kanitakis, J., Euvrard, S., Laurent, R. & Aubin, F. (2002). TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with human papillomavirus status. *J Invest Dermatol* **118**, 1026-31.
- Caldeira, S., de Villiers, E. M. & Tommasino, M. (2000). Human papillomavirus E7 proteins stimulate proliferation independently of their ability to associate with retinoblastoma protein. *Oncogene* **19**, 821-6.
- Cannizzaro, L. A., Durst, M., Mendez, M. J., Hecht, B. K. & Hecht, F. (1988). Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet* **33**, 93-8.
- Carozzi, F., Bisanzi, S., Sani, C., Zappa, M., Cecchini, S., Ciatto, S. & Confortini, M. (2007). Agreement between the AMPLICOR Human Papillomavirus Test and the Hybrid Capture 2 Assay in Detection of High-Risk Human Papillomavirus and Diagnosis of Biopsy-Confirmed High-Grade Cervical Disease. *J Clin Microbiol* **45**, 364-9.
- Carter, J., Sim, J., Land, R., Dalrymple, C., Abdel-Hadi, M. & Pather, S. (2006). Recurrence after treatment for high-grade dysplasia: should we modify our post-treatment surveillance protocols? *Aust N Z J Obstet Gynaecol* **46**, 360-2.
- Cartier, I. (2006). [Conventional swab versus swab in liquid medium: two techniques with equivalent performance. A review of the literature validates a study by the French Society of Cytology and the ANAES guidelines]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **35**, 321-3.
- Cason, J., Kambo, P. K., Best, J. M. & McCance, D. J. (1992). Detection of antibodies to a linear epitope on the major coat protein (L1) of human papillomavirus type-16 (HPV-16) in sera from patients with cervical intraepithelial neoplasia and children. *Int J Cancer* **50**, 349-55.
- Cason, J., Kaye, J. N., Jewers, R. J., Kambo, P. K., Bible, J. M., Kell, B., Shergill, B., Pakarian, F., Raju, K. S. & Best, J. M. (1995). Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. *J Med Virol* **47**, 209-18.
- Castellsague, X., Bosch, F. X., Munoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V., de Sanjose, S., Eluf-Neto, J., Ngelangel, C. A., Chichareon, S., Smith, J. S., Herrero, R., Moreno, V. & Franceschi, S. (2002). Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. *N Engl J Med* **346**, 1105-12.

- Castellsague, X., Ghaffari, A., Daniel, R. W., Bosch, F. X., Munoz, N. & Shah, K. V. (1997). Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. *J Infect Dis* **176**, 353-61.
- Castle, P. E., Schiffman, M., Scott, D. R., Sherman, M. E., Glass, A. G., Rush, B. B., Schussler, J. E., Wacholder, S. & Lorincz, A. T. (2005a). Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1311-4.
- Castle, P. E., Shields, T., Kirnbauer, R., Manos, M. M., Burk, R. D., Glass, A. G., Scott, D. R., Sherman, M. E. & Schiffman, M. (2002). Sexual behavior, human papillomavirus type 16 (HPV 16) infection, and HPV 16 seropositivity. *Sex Transm Dis* **29**, 182-7.
- Castle, P. E., Solomon, D., Schiffman, M. & Wheeler, C. M. (2005b). Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* **97**, 1066-71.
- Chan, S. Y., Bernard, H. U., Ong, C. K., Chan, S. P., Hofmann, B. & Delius, H. (1992a). Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *J Virol* **66**, 5714-25.
- Chan, S. Y., Ho, L., Ong, C. K., Chow, V., Drescher, B., Durst, M., ter Meulen, J., Villa, L., Luande, J., Mgaya, H. N. & et al. (1992b). Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* **66**, 2057-66.
- Chardonnet, Y., Bejui-Thivolet, F. & Viac, J. (1992). [Malpighian epithelia and papillomavirus infections]. *Pathol Biol (Paris)* **40**, 247-56.
- Chardonnet, Y., Viac, J., Staquet, M. J. & Thivolet, J. (1985). Cell-mediated immunity to human papillomavirus. *Clin Dermatol* **3**, 156-64.
- Cheah, P. L. & Looi, L. M. (1998). Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol* **20**, 1-10.
- Chen, C. M., Shyu, M. P., Au, L. C., Chu, H. W., Cheng, W. T. & Choo, K. B. (1994). Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol* **44**, 206-11.
- Chen, X. & Kwok, P. Y. (1999). Homogeneous genotyping assays for single nucleotide polymorphisms with fluorescence resonance energy transfer detection. *Genet Anal* **14**, 157-63.
- Chen, Z., Terai, M., Fu, L., Herrero, R., DeSalle, R. & Burk, R. D. (2005). Diversifying selection in human papillomavirus type 16 lineages based on complete genome analyses. *J Virol* **79**, 7014-23.
- Chenoy, R., Billingham, L., Irani, S., Rollason, T. P., Luesley, D. M. & Jordan, J. A. (1996). The effect of directed biopsy on the atypical cervical transformation zone: assessed by digital imaging colposcopy. *Br J Obstet Gynaecol* **103**, 457-62.
- Cheung, J. L., Lo, K. W., Cheung, T. H., Tang, J. W. & Chan, P. K. (2006). Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *J Infect Dis* **194**, 1706-12.
- Choo, K. B., Pan, C. C. & Han, S. H. (1987a). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* **161**, 259-61.
- Choo, K. B., Pan, C. C., Liu, M. S., Ng, H. T., Chen, C. P., Lee, Y. N., Chao, C. F., Meng, C. L., Yeh, M. Y. & Han, S. H. (1987b). Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J Med Virol* **21**, 101-7.

- Clavel, C., Bory, J. P., Rihet, S., Masure, M., Duval-Binninger, I., Putaud, I., Lorenzato, M., Quereux, C. & Birembaut, P. (1998a). Comparative analysis of human papillomavirus detection by hybrid capture assay and routine cytologic screening to detect high-grade cervical lesions. *Int J Cancer* **75**, 525-8.
- Clavel, C., Masure, M., Bory, J. P., Putaud, I., Mangeonjean, C., Lorenzato, M., Gabriel, R., Quereux, C. & Birembaut, P. (1999). Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer* **80**, 1306-11.
- Clavel, C., Masure, M., Bory, J. P., Putaud, I., Mangeonjean, C., Lorenzato, M., Nazeyrollas, P., Gabriel, R., Quereux, C. & Birembaut, P. (2001). Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions: a study of 7932 women. *Br J Cancer* **84**, 1616-23.
- Clavel, C., Masure, M., Levert, M., Putaud, I., Mangeonjean, C., Lorenzato, M., Nazeyrollas, P., Gabriel, R., Quereux, C. & Birembaut, P. (2000). Human papillomavirus detection by the hybrid capture II assay: a reliable test to select women with normal cervical smears at risk for developing cervical lesions. *Diagn Mol Pathol* **9**, 145-50.
- Clavel, C., Masure, M., Putaud, I., Thomas, K., Bory, J. P., Gabriel, R., Quereux, C. & Birembaut, P. (1998b). 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**, 737-40.
- Clementi, M., Menzo, S., Manzin, A. & Bagnarelli, P. (1995). Quantitative molecular methods in virology. *Arch Virol* **140**, 1523-39.
- Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M. L., Stefanon, B., Venzon, D. J., Shearer, G. M., De Palo, G. & Clerici, E. (1997). Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* **89**, 245-50.
- Clifford, G., Franceschi, S., Diaz, M., Munoz, N. & Villa, L. L. (2006a). Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S26-34.
- Clifford, G. M., Gallus, S., Herrero, R., Munoz, N., Snijders, P. J., Vaccarella, S., Anh, P. T., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Matos, E., Molano, M., Rajkumar, R., Ronco, G., de Sanjose, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Thomas, J. O., Tunsakul, S., Meijer, C. J. & Franceschi, S. (2005a). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* **366**, 991-8.
- Clifford, G. M., Goncalves, M. A. & Franceschi, S. (2006b). Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *Aids* **20**, 2337-44.
- Clifford, G. M., Rana, R. K., Franceschi, S., Smith, J. S., Gough, G. & Pimenta, J. M. (2005b). Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1157-64.
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Munoz, N. & Franceschi, S. (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* **88**, 63-73.
- Coleman, N., Birley, H. D., Renton, A. M., Hanna, N. F., Ryait, B. K., Byrne, M., Taylor-Robinson, D. & Stanley, M. A. (1994). Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* **102**, 768-74.
- Combita, A. L., Touze, A., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y., Munoz, N. & Coursaget, P. (2001). Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 183-8.
- Cooper, K., Herrington, C. S., Graham, A. K., Evans, M. F. & McGee, J. O. (1991a). In situ human papillomavirus (HPV) genotyping of cervical intraepithelial neoplasia in South African and British patients: evidence for putative HPV integration in vivo. *J Clin Pathol* **44**, 400-5.

- Cooper, K., Herrington, C. S., Stickland, J. E., Evans, M. F. & McGee, J. O. (1991b). Episomal and integrated human papillomavirus in cervical neoplasia shown by non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol* **44**, 990-6.
- Coutlee, F., Mayrand, M. H., Provencher, D. & Franco, E. (1997). The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* **8**, 123-41.
- Coutlee, F., Rouleau, D., Petignat, P., Ghattas, G., Kornegay, J. R., Schlag, P., Boyle, S., Hankins, C., Vezina, S., Cote, P., Macleod, J., Voyer, H., Forest, P., Walmsley, S. & Franco, E. (2006). Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMV primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* **44**, 1998-2006.
- Couturier, J., Sastre-Garau, X., Schneider-Maunoury, S., Labib, A. & Orth, G. (1991). Integration of papillomavirus DNA near myc genes in genital carcinomas and its consequences for proto-oncogene expression. *J Virol* **65**, 4534-8.
- Cox, J. T. (2003). The clinician's view: role of human papillomavirus testing in the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology Guidelines for the management of abnormal cervical cytology and cervical cancer precursors. *Arch Pathol Lab Med* **127**, 950-8.
- Cox, J. T. (2006). Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. *Obstet Gynecol Surv* **61**, S15-25.
- Crowley-Nowick, P. A., Bell, M., Edwards, R. P., McCallister, D., Gore, H., Kanbour-Shakir, A., Mestecky, J. & Partridge, E. E. (1995). Normal uterine cervix: characterization of isolated lymphocyte phenotypes and immunoglobulin secretion. *Am J Reprod Immunol* **34**, 241-7.
- Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M. & Lorincz, A. T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* **65**, 606-12.
- Culp, T. D., Cladel, N. M., Balogh, K. K., Budgeon, L. R., Mejia, A. F. & Christensen, N. D. (2006). Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo. *J Virol* **80**, 11381-4.
- Cuschieri, K. S., Beattie, G., Hassan, S., Robertson, K. & Cubie, H. (2005). Assessment of human papillomavirus mRNA detection over time in cervical specimens collected in liquid based cytology medium. *J Virol Methods* **124**, 211-5.
- Cuschieri, K. S. & Cubie, H. A. (2005). The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S34-42.
- Cuschieri, K. S., Graham, C., Moore, C. & Cubie, H. A. (2007). Human Papillomavirus testing for the management of low-grade cervical abnormalities in the UK--Influence of age and testing strategy. *J Clin Virol* **38**, 14-8.
- Cuzick, J., Mayrand, M. H., Ronco, G., Snijders, P. & Wardle, J. (2006). Chapter 10: New dimensions in cervical cancer screening. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S90-7.
- Cuzick, J., Szarewski, A., Terry, G., Ho, L., Hanby, A., Maddox, P., Anderson, M., Kocjan, G., Steele, S. T. & Guillebaud, J. (1995). Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* **345**, 1533-6.
- D'Souza, G., Sugar, E., Ruby, W., Gravitt, P. & Gillison, M. (2005). Analysis of the effect of DNA purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR. *J Clin Microbiol* **43**, 5526-35.
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Pretet, J. L., Le Bail Carval, K., Sautiere, J. L., Carbillet, J. P., Kantelip, B., Schaal, J. P. & Mouglin, C. (2003). 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**, 396-403.
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Sautiere, J. L., Pretet, J. L., Kantelip, B., Schaal, J. P. & Mouglin, C. (2004). Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population; benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* **40**, 1225-32.

- Dang, C., Koehler, A., Forschner, T., Sehr, P., Michael, K., Pawlita, M., Stockfleth, E. & Nindl, I. (2006). E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *Br J Dermatol* **155**, 129-36.
- Daniel, B., Mukherjee, G., Seshadri, L., Vallikad, E. & Krishna, S. (1995). Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J Gen Virol* **76 ( Pt 10)**, 2589-93.
- Das, B. C., Sharma, J. K., Gopalakrishna, V. & Luthra, U. K. (1992a). Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* **73 ( Pt 9)**, 2327-36.
- Das, B. C., Sharma, J. K., Gopalakrishna, V., Das, D. K., Singh, V., Gissmann, L., zur Hausen, H. & Luthra, U. K. (1992b). A high frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction. *J Med Virol* **36**, 239-45.
- Davey, D. D., Woodhouse, S., Styer, P., Stastny, J. & Mody, D. (2000). Atypical epithelial cells and specimen adequacy: current laboratory practices of participants in the college of American pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytology. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 203-11.
- Davies, P., Arbyn, M., Dillner, J., Kitchener, H. C., Meijer, C. J., Ronco, G. & Hakama, M. (2006). A report on the current status of European research on the use of human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* **118**, 791-6.
- de Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Peccatori, F., Gallee, M. P., Helmerhorst, T. J., Verheijen, R. H., Aarbiou, J., Mulder, W. M., Walboomers, J. M., Meijer, C. J., van de Vange, N. & Scheper, R. J. (1999a). Expression of CD3-zeta on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer* **79**, 1127-32.
- de Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Walboomers, J. M., Coursaget, P., Stukart, M. J., Dupuy, C., Kueter, E., Verheijen, R. H., Helmerhorst, T. J., Duggan-Keen, M. F., Stern, P. L., Meijer, C. J. & Scheper, R. J. (1999b). Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. I. Differential T-helper and IgG responses in relation to HPV infection and disease outcome. *J Gen Virol* **80 ( Pt 2)**, 399-408.
- de Jong, A., O'Neill, T., Khan, A. Y., Kwappenberg, K. M., Chisholm, S. E., Whittle, N. R., Dobson, J. A., Jack, L. C., St Clair Roberts, J. A., Offringa, R., van der Burg, S. H. & Hickling, J. K. (2002a). Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* **20**, 3456-64.
- de Jong, A., van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Franken, K. L., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Kenter, G., Vermeij, P., Melief, C. J. & Offringa, R. (2002b). Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* **62**, 472-9.
- De Marco, L., Gillio-Tos, A., Bonello, L., Ghisetti, V., Ronco, G. & Merletti, F. (2007). Detection of human papillomavirus type 16 integration in pre-neoplastic cervical lesions and confirmation by DIPS-PCR and sequencing. *J Clin Virol* **38**, 7-13.
- de Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., van den Brule, A. J., Meijer, C. J. & Snijders, P. J. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76 ( Pt 4)**, 1057-62.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-49.

- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17-27.
- Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M. & Thierry, F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol* **71**, 9343-9.
- Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. (1998). The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology* **242**, 378-86.
- Demeret, C., Yaniv, M. & Thierry, F. (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol* **68**, 7075-82.
- Depuydt, C. E., Benoy, I. H., Bailleul, E. J., Vandepitte, J., Vereecken, A. J. & Bogers, J. J. (2006). Improved endocervical sampling and HPV viral load detection by Cervex-Brush Combi. *Cytopathology* **17**, 374-81.
- Desaintes, C., Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. & Thierry, F. (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *Embo J* **16**, 504-14.
- Dillner, J. (1990). Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames. *Int J Cancer* **46**, 703-11.
- Dillner, J., Dillner, L., Utter, G., Eklund, C., Rotola, A., Costa, S. & DiLuca, D. (1990a). Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the L1 and L2 open reading frames. *Int J Cancer* **45**, 529-35.
- Dillner, J., Lehtinen, M., Bjorge, T., Luostarinen, T., Youngman, L., Jellum, E., Koskela, P., Gislefoss, R. E., Hallmans, G., Paavonen, J., Sapp, M., Schiller, J. T., Hakulinen, T., Thoresen, S. & Hakama, M. (1997). Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**, 1293-9.
- Dillner, L., Heino, P., Moreno-Lopez, J. & Dillner, J. (1991). Antigenic and immunogenic epitopes shared by human papillomavirus type 16 and bovine, canine, and avian papillomaviruses. *J Virol* **65**, 6862-71.
- Dillner, L., Moreno-Lopez, J. & Dillner, J. (1990b). Serological responses to papillomavirus group-specific antigens in women with neoplasia of the cervix uteri. *J Clin Microbiol* **28**, 624-7.
- Dong, G., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1994). Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* **68**, 1115-27.
- Dong, S. M., Pai, S. I., Rha, S. H., Hildesheim, A., Kurman, R. J., Schwartz, P. E., Mortel, R., McGowan, L., Greenberg, M. D., Barnes, W. A. & Sidransky, D. (2002). Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 3-6.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S7-15.
- Doorbar, J., Elston, R. C., Napthine, S., Raj, K., Medcalf, E., Jackson, D., Coleman, N., Griffin, H. M., Masterson, P., Stacey, S., Mengistu, Y. & Dunlop, J. (2000). The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* **74**, 10081-95.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**, 824-7.
- Dostatni, N., Thierry, F. & Yaniv, M. (1988). A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *Embo J* **7**, 3807-16.
- Dowhanick, J. J., McBride, A. A. & Howley, P. M. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**, 7791-9.
- Ducloux, D., Carron, P. L., Rebibou, J. M., Aubin, F., Fournier, V., Bresson-Vautrin, C., Blanc, D., Humbert, P. & Chalopin, J. M. (1998). CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients. *Transplantation* **65**, 1270-2.

- Duensing, S. & Munger, K. (2003a). Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 383-91.
- Duensing, S. & Munger, K. (2003b). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members. *J Virol* **77**, 12331-5.
- Duensing, S. & Munger, K. (2004). Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* **109**, 157-62.
- Dunne, E. F. & Markowitz, L. E. (2006). Genital human papillomavirus infection. *Clin Infect Dis* **43**, 624-9.
- Durst, M., Croce, C. M., Gissmann, L., Schwarz, E. & Huebner, K. (1987). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1070-4.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K. & Harlow, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* **66**, 6893-902.
- Eckert, L. O., Watts, D. H., Koutsky, L. A., Hawes, S. E., Stevens, C. E., Kuypers, J. & Kiviat, N. B. (1999). A matched prospective study of human immunodeficiency virus serostatus, human papillomavirus DNA, and cervical lesions detected by cytology and colposcopy. *Infect Dis Obstet Gynecol* **7**, 158-64.
- Edwards, R. P., Kuykendall, K., Crowley-Nowick, P., Partridge, E. E., Shingleton, H. M. & Mestecky, J. (1995). T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia. CD8- positive cells are recruited to invasion. *Cancer* **76**, 1411-5.
- Einstein, M. H. & Burk, R. D. (2001). Persistent human papillomavirus infection: definitions and clinical implications. *Papillomavirus Report* **12**, 119-123.
- Einstein, M. H. & Goldberg, G. L. (2002). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest* **20**, 1080-5.
- el Awady, M. K., Kaplan, J. B., O'Brien, S. J. & Burk, R. D. (1987). Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* **159**, 389-98.
- El Mehdaoui, S., Touze, A., Laurent, S., Sizaret, P. Y., Rasschaert, D. & Coursaget, P. (2000). Gene transfer using recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsids with genetically modified DNA encapsidation capacity by addition of packaging sequences from the L1 or L2 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* **74**, 10332-40.
- Elfgren, K., Kalantari, M., Moberger, B., Hagmar, B. & Dillner, J. (2000). A population-based five-year follow-up study of cervical human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* **183**, 561-7.
- Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S. & Borysiewicz, L. K. (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **57**, 2943-50.
- Evans, M., Borysiewicz, L. K., Evans, A. S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V. & Man, S. (2001). Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol* **167**, 5420-8.
- Evans, M. F., Adamson, C. S., von Walstrom, G. M. & Cooper, K. (2006). Use of multiple displacement amplification in the investigation of human papillomavirus physical status. *J Clin Pathol*.
- Fahey, M. T., Irwig, L. & Macaskill, P. (1995). Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* **141**, 680-9.
- Fang, L., Budgeon, L. R., Doorbar, J., Briggs, E. R. & Howett, M. K. (2006). The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology* **351**, 271-9.
- Ferber, M. J., Thorland, E. C., Brink, A. A., Rapp, A. K., Phillips, L. A., McGovern, R., Gostout, B. S., Cheung, T. H., Chung, T. K., Fu, W. Y. & Smith, D. I. (2003). Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* **22**, 7233-42.



- Ferenczy, A., Coutlee, F., Franco, E. & Hankins, C. (2003). Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *Cmaj* **169**, 431-4.
- Fife, K. H., Fan, L., Fritsch, M. H., Bryan, J. & Brown, D. R. (1996a). Association of human papillomavirus type 11 DNA with squamous cell carcinoma of the tongue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **122**, 1404-8.
- Fife, K. H., Katz, B. P., Roush, J., Handy, V. D., Brown, D. R. & Hansell, R. (1996b). Cancer-associated human papillomavirus types are selectively increased in the cervix of women in the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **174**, 1487-93.
- Fife, K. H., Rogers, R. E. & Zwickl, B. W. (1987). Symptomatic and asymptomatic cervical infections with human papillomavirus during pregnancy. *J Infect Dis* **156**, 904-11.
- Flores-Munguia, R., Siegel, E., Klimecki, W. T. & Giuliano, A. R. (2004). Performance assessment of eight high-throughput PCR assays for viral load quantitation of oncogenic HPV types. *J Mol Diagn* **6**, 115-24.
- Flores, E. R. & Lambert, P. F. (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7167-79.
- Flores, R., Papenfuss, M., Klimecki, W. T. & Giuliano, A. R. (2006). Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* **118**, 1187-93.
- Fontaine, J., Gravitt, P., Duh, L. M., Lefevre, J., Pourreaux, K., Hankins, C. & Coutlee, F. (2005). High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 2200-7.
- Forslund, O., Nordin, P., Andersson, K., Stenquist, B. & Hansson, B. G. (1997). DNA analysis indicates patient-specific human papillomavirus type 16 strains in Bowen's disease on fingers and in archival samples from genital dysplasia. *Br J Dermatol* **136**, 678-82.
- Franceschi, S. (2005). The IARC commitment to cancer prevention: the example of papillomavirus and cervical cancer. *Recent Results Cancer Res* **166**, 277-97.
- Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G. M., Snijders, P. J., Arslan, A., Anh, P. T., Bosch, F. X., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Lazcano-Ponce, E., Matos, E., Molano, M., Qiao, Y. L., Rajkumar, R., Ronco, G., de Sanjose, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Thomas, J. O., Meijer, C. J. & Munoz, N. (2006). Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer* **119**, 2677-84.
- Franceschi, S. & Mahe, C. (2005). Human papillomavirus testing in cervical cancer screening. *Br J Cancer* **92**, 1591-2.
- Franco, E. L. (1995). Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **87**, 779-80.
- Franco, E. L., Villa, L. L., Rahal, P. & Ruiz, A. (1994). Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1558-9.
- Franco, E. L., Villa, L. L., Sobrinho, J. P., Prado, J. M., Rousseau, M. C., Desy, M. & Rohan, T. E. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* **180**, 1415-23.
- Frisch, M., Biggar, R. J. & Goedert, J. J. (2000). Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1500-10.
- Gewin, L. & Galloway, D. A. (2001). E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol* **75**, 7198-201.
- Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T. & Galloway, D. A. (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* **18**, 2269-82.

- Ghosh, A. K. & Moore, M. (1992). Tumour-infiltrating lymphocytes in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* **28A**, 1910-6.
- Giannini, S. L., Hubert, P., Doyen, J., Boniver, J. & Delvenne, P. (2002). Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* **97**, 654-9.
- Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**, 995-1001.
- Gillison, M. L., Koch, W. M. & Shah, K. V. (1999). Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* **11**, 191-9.
- Gillison, M. L. & Shah, K. V. (2003). Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 57-65.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**, 1565-70.
- Gissmann, L. (1996). Immunologic responses to human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* **23**, 625-39.
- Gissmann, L., deVilliers, E. M. & zur Hausen, H. (1982). Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer* **29**, 143-6.
- Giuliani, L., Coletti, A., Syrjanen, K., Favalli, C. & Ciotti, M. (2006). Comparison of DNA sequencing and Roche Linear array in human papillomavirus (HPV) genotyping. *Anticancer Res* **26**, 3939-41.
- Glahder, J. A., Hansen, C. N., Vinther, J., Madsen, B. S. & Norrild, B. (2003). 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**, 3429-41.
- Goldie, S. J., Freedberg, K. A., Weinstein, M. C., Wright, T. C. & Kuntz, K. M. (2001). Cost effectiveness of human papillomavirus testing to augment cervical cancer screening in women infected with the human immunodeficiency virus. *Am J Med* **111**, 140-9.
- Goldie, S. J., Kim, J. J. & Wright, T. C. (2004). Cost-effectiveness of human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in women aged 30 years or more. *Obstet Gynecol* **103**, 619-31.
- Gomousa-Michael, M., Gialama, E., Gomousas, N. & Gialama, G. (2000). Genital human papillomavirus infection and associated penile intraepithelial neoplasia in males infected with the human immunodeficiency virus. *Acta Cytol* **44**, 305-9.
- Goodwin, E. C. & DiMaio, D. (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12513-8.
- Gravitt, P. E., Burk, R. D., Lorincz, A., Herrero, R., Hildesheim, A., Sherman, M. E., Bratti, M. C., Rodriguez, A. C., Helzlsouer, K. J. & Schiffman, M. (2003a). A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 477-84.
- Gravitt, P. E., Lacey, J. V., Jr., Brinton, L. A., Barnes, W. A., Kornegay, J. R., Greenberg, M. D., Greene, S. M., Hadjimichael, O. C., McGowan, L., Mortel, R., Schwartz, P. E., Zaino, R. & Hildesheim, A. (2001). Evaluation of self-collected cervicovaginal cell samples for human papillomavirus testing by polymerase chain reaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 95-100.
- Gravitt, P. E., Peyton, C., Wheeler, C., Apple, R., Higuchi, R. & Shah, K. V. (2003b). Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *J Virol Methods* **112**, 23-33.

- Grayson, W., Taylor, L. & Cooper, K. (1996). Detection of integrated high risk human papillomavirus in adenoid cystic carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* **49**, 805-9.
- Grce, M., Husnjak, K., Bozikov, J., Magdic, L., Zlacki, M., Lukac, J., Fistic, I., Sikanic-Dugic, N. & Pavelic, K. (2001). Evaluation of genital human papillomavirus infections by polymerase chain reaction among Croatian women. *Anticancer Res* **21**, 579-84.
- Grodzki, M., Besson, G., Clavel, C., Arslan, A., Franceschi, S., Birembaut, P., Tommasino, M. & Zehbe, I. (2006). Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 820-2.
- Gross, G. (2007). HPV-vaccination against cervical carcinoma: will it really work? *Med Microbiol Immunol*.
- Guo, M., Sneige, N., Silva, E. G., Jan, Y. J., Cogdell, D. E., Lin, E., Luthra, R. & Zhang, W. (2006). Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol*.
- Gustafsson, L., Ponten, J., Bergstrom, R. & Adami, H. O. (1997a). International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. *Int J Cancer* **71**, 159-65.
- Gustafsson, L., Ponten, J., Zack, M. & Adami, H. O. (1997b). International incidence rates of invasive cervical cancer after introduction of cytological screening. *Cancer Causes Control* **8**, 755-63.
- Ha, P. K. & Califano, J. A. (2004). The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 188-96.
- Ha, P. K., Pai, S. I., Westra, W. H., Gillison, M. L., Tong, B. C., Sidransky, D. & Califano, J. A. (2002). Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* **8**, 1203-9.
- Hagensee, M. E., Yaegashi, N. & Galloway, D. A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **67**, 315-22.
- Halfon, P., Trepo, E., Antoniotti, G., Bernot, C., Cart-Lamy, P., Khiri, H., Thibaud, D., Marron, J., Martineau, A., Penaranda, G., Benmoura, D. & Blanc, B. (2007). Prospective Evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR Human Papillomavirus (HPV) Tests for Detection of 13 High-Risk HPV Genotypes in Atypical Squamous Cells of Uncertain Significance. *J Clin Microbiol* **45**, 313-6.
- Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C., Ferris, D. G., Jenkins, D., Schuind, A., Zahaf, T., Innis, B., Naud, P., De Carvalho, N. S., Roteli-Martins, C. M., Teixeira, J., Blatter, M. M., Korn, A. P., Quint, W. & Dubin, G. (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* **364**, 1757-65.
- Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C. M., Moscicki, A. B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C. M., Jenkins, D., Schuind, A., Costa Clemens, S. A. & Dubin, G. (2006). Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* **367**, 1247-55.
- Hart, K. W., Williams, O. M., Thelwell, N., Fiander, A. N., Brown, T., Borysiewicz, L. K. & Gelder, C. M. (2001). Novel method for detection, typing, and quantification of human papillomaviruses in clinical samples. *J Clin Microbiol* **39**, 3204-12.
- Hawley-Nelson, P., Androphy, E. J., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1988). The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *Embo J* **7**, 525-31.
- Hazelbag, S., Fleuren, G. J., Baelde, J. J., Schuuring, E., Kenter, G. G. & Gorter, A. (2001). Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* **83**, 235-43.
- Hazelbag, S., Gorter, A., Kenter, G. G., van den Broek, L. & Fleuren, G. (2002). Transforming growth factor-beta1 induces tumor stroma and reduces tumor infiltrate in cervical cancer. *Hum Pathol* **33**, 1193-9.

- Hebner, C. M. & Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol* **16**, 83-97.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-94.
- Heinzel, P. A., Chan, S. Y., Ho, L., O'Connor, M., Balaram, P., Campo, M. S., Fujinaga, K., Kiviat, N., Kuypers, J., Pfister, H. & et al. (1995). Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* **33**, 1746-54.
- Helmerhorst, T. J. & Meijer, C. J. (2002). Cervical cancer should be considered as a rare complication of oncogenic HPV infection rather than a STD. *Int J Gynecol Cancer* **12**, 235-6.
- Hermonat, P. L., Han, L., Wendel, P. J., Quirk, J. G., Stern, S., Lowery, C. L. & Rechtin, T. M. (1997). Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. *Virus Genes* **14**, 13-7.
- Hernandez-Hernandez, D. M., Ornelas-Bernal, L., Guido-Jimenez, M., Apresa-Garcia, T., Alvarado-Cabrero, I., Salcedo-Vargas, M., Mohar-Betancourt, A. & Garcia-Carranca, A. (2003). Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* **90**, 310-7.
- Herrick, J., Conti, C., Teissier, S., Thierry, F., Couturier, J., Sastre-Garau, X., Favre, M., Orth, G. & Bensimon, A. (2005). Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* **65**, 1174-9.
- Herrington, C. S., Anderson, S. M., Bauer, H. M., Troncone, B., de Angelis, M. L., Noell, H., Chimera, J. A., Van Eyck, S. L. & McGee, J. O. (1995a). Comparative analysis of human papillomavirus detection by PCR and non-isotopic in situ hybridisation. *J Clin Pathol* **48**, 415-9.
- Herrington, C. S., Evans, M. F., Gray, W. & McGee, J. O. (1995b). Morphological correlation of human papillomavirus infection of matched cervical smears and biopsies from patients with persistent mild cervical cytological abnormalities. *Hum Pathol* **26**, 951-5.
- Herrington, C. S., Evans, M. F., Hallam, N. F., Charnock, F. M., Gray, W. & McGee, J. D. (1995c). Human papillomavirus status in the prediction of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in patients with persistent low-grade cervical cytological abnormalities. *Br J Cancer* **71**, 206-9.
- Hilders, C. G., Ras, L., van Eendenburg, J. D., Nooyen, Y. & Fleuren, G. J. (1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer* **57**, 805-13.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C., Wacholder, S., Herrero, R., Rodriguez, A., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Scarpidis, U., Lin, Q. Q., Terai, M., Bromley, R. L., Buetow, K., Apple, R. J. & Burk, R. D. (2001). Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**, 315-8.
- Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Gravitt, P. E., Glass, A. G., Greer, C. E., Zhang, T., Scott, D. R., Rush, B. B., Lawler, P., Sherman, M. E. & et al. (1994). Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* **169**, 235-40.
- Hildesheim, A. & Wang, S. S. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* **89**, 229-40.
- Ho, C. M., Chien, T. Y., Huang, S. H., Lee, B. H. & Chang, S. F. (2006). Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. *Gynecol Oncol* **102**, 54-60.
- Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J. & Burk, R. D. (1998a). Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* **338**, 423-8.

- Ho, G. Y., Burk, R. D., Klein, S., Kadish, A. S., Chang, C. J., Palan, P., Basu, J., Tachezy, R., Lewis, R. & Romney, S. (1995). Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* **87**, 1365-71.
- Ho, G. Y., Palan, P. R., Basu, J., Romney, S. L., Kadish, A. S., Mikhail, M., Wassertheil-Smoller, S., Runowicz, C. & Burk, R. D. (1998b). Viral characteristics of human papillomavirus infection and antioxidant levels as risk factors for cervical dysplasia. *Int J Cancer* **78**, 594-9.
- Ho, G. Y., Studentsov, Y., Hall, C. B., Bierman, R., Beardsley, L., Lempa, M. & Burk, R. D. (2002). Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV) infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis* **186**, 737-42.
- Ho, G. Y., Studentsov, Y. Y., Bierman, R. & Burk, R. D. (2004). Natural history of human papillomavirus type 16 virus-like particle antibodies in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 110-6.
- Ho, L., Chan, S. Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S. K., Villa, L. L. & Bernard, H. U. (1991). 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**, 1765-72.
- Ho, L., Terry, G., Londesborough, P., Cuzick, J., Lorenzato, F. & Singer, A. (2003). Human papillomavirus DNA detection in the management of women with twice mildly abnormal cytological smears. *J Med Virol* **69**, 118-21.
- Hocini, H., Barra, A., Belec, L., Iscaki, S., Preud'homme, J. L., Pillot, J. & Bouvet, J. P. (1995). Systemic and secretory humoral immunity in the normal human vaginal tract. *Scand J Immunol* **42**, 269-74.
- Hoffmann, M., Kahn, T., Mahnke, C. G., Goeroegh, T., Lippert, B. M. & Werner, J. A. (1998). Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol* **118**, 138-44.
- Holcomb, K. & Runowicz, C. D. (2005). Cervical cancer screening. *Surg Oncol Clin N Am* **14**, 777-97.
- Holm, R., Tanum, G., Karlsen, F. & Nesland, J. M. (1994). Prevalence and physical state of human papillomavirus DNA in anal carcinomas. *Mod Pathol* **7**, 449-53.
- Hong, K., Greer, C. E., Ketter, N., Van Nest, G. & Paliard, X. (1997). Isolation and characterization of human papillomavirus type 6-specific T cells infiltrating genital warts. *J Virol* **71**, 6427-32.
- Hopfl, R., Heim, K., Christensen, N., Zumbach, K., Wieland, U., Volgger, B., Widschwendter, A., Haimbuchner, S., Muller-Holzner, E., Pawlita, M., Pfister, H. & Fritsch, P. (2000). Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* **356**, 1985-6.
- Hopman, A. H., Kamps, M. A., Smedts, F., Speel, E. J., Herrington, C. S. & Ramaekers, F. C. (2005). HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* **115**, 419-28.
- Hopman, E. H., Rozendaal, L., Voorhorst, F. J., Walboomers, J. M., Kenemans, P. & Helmerhorst, T. J. (2000). High risk human papillomavirus in women with normal cervical cytology prior to the development of abnormal cytology and colposcopy. *Bjog* **107**, 600-4.
- Howell, L. P., Davis, R. L., Belk, T. I., Agdigos, R. & Lowe, J. (1998). The AutoCyte preparation system for gynecologic cytology. *Acta Cytol* **42**, 171-7.
- Howley, P. M. (1983). The molecular biology of papillomavirus transformation. Warner-Lambert Parke-Davis Award Lecture. *Am J Pathol* **113**, 414-21.
- Hudelist, G., Manavi, M., Pischinger, K. I., Watkins-Riedel, T., Singer, C. F., Kubista, E. & Czerwenka, K. F. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol* **92**, 873-80.

- Huibregtse, J. M. & Beaudenon, S. L. (1996). Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Semin Cancer Biol* **7**, 317-26.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* **10**, 4129-35.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1993a). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* **13**, 775-84.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1993b). Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 4918-27.
- Humbey, O., Cairey-Remonnay, S., Guerrini, J. S., Algros, M. P., Mougin, C., Bittard, H. & Aubin, F. (2003). Detection of the human papillomavirus and analysis of the TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in penile squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* **39**, 684-90.
- Ikenberg, H., Goppinger, A., Bauer, H. & Schmitt, B. (1997). Semiquantitative analysis of human papillomavirus DNA in cervical intraepithelial neoplasia by a differential polymerase chain reaction. *J Obstet Gynaecol* **17**, 176-9.
- Jacobs, M. V., Snijders, P. J., van den Brule, A. J., Helmerhorst, T. J., Meijer, C. J. & Walboomers, J. M. (1997). A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* **35**, 791-5.
- Jacobs, N., Giannini, S. L., Doyen, J., Baptista, A., Moutschen, M., Boniver, J. & Delvenne, P. (1998). Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Immunol* **111**, 219-24.
- Jenson, A. B., Rosenthal, J. D., Olson, C., Pass, F., Lancaster, W. D. & Shah, K. (1980). Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. *J Natl Cancer Inst* **64**, 495-500.
- Jones, D. L., Alani, R. M. & Munger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**, 2101-11.
- Jones, D. L. & Munger, K. (1997). Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* **71**, 2905-12.
- Josefsson, A. M., Magnusson, P. K., Ylitalo, N., Sorensen, P., Qwarforth-Tubbin, P., Andersen, P. K., Melbye, M., Adami, H. O. & Gyllenstein, U. B. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* **355**, 2189-93.
- Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U. & Keller, P. M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* **274**, 5810-22.
- Kadish, A. S., Timmins, P., Wang, Y., Ho, G. Y., Burk, R. D., Ketz, J., He, W., Romney, S. L., Johnson, A., Angeletti, R. & Abadi, M. (2002). Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 483-8.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. (2002). Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-51.
- Kahn, J. A. (2005). Vaccination as a prevention strategy for human papillomavirus-related diseases. *J Adolesc Health* **37**, S10-6.

- Kalantari, M., Blennow, E., Hagmar, B. & Johansson, B. (2001). Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* **10**, 46-54.
- Kanda, T., Onda, T., Zanma, S., Yasugi, T., Furuno, A., Watanabe, S., Kawana, T., Sugase, M., Ueda, K., Sonoda, T. & et al. (1992). Independent association of antibodies against human papillomavirus type 16 E1/E4 and E7 proteins with cervical cancer. *Virology* **190**, 724-32.
- Kane, M. A., Sherris, J., Coursaget, P., Aguado, T. & Cutts, F. (2006). Chapter 15: HPV vaccine use in the developing world. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S132-9.
- Kaufmann, A. M., Gissmann, L., Schreckenberger, C. & Qiao, L. (1997). Cervical carcinoma cells transfected with the CD80 gene elicit a primary cytotoxic T lymphocyte response specific for HPV 16 E7 antigens. *Cancer Gene Ther* **4**, 377-82.
- Kaye, J. N., Cason, J., Pakarian, F. B., Jewers, R. J., Kell, B., Bible, J., Raju, K. S. & Best, J. M. (1994). Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol* **44**, 415-21.
- Kim, K. Y. & Taylor, M. W. (2003). Identification of a novel promoter in the E2 open reading frame of the human papillomavirus type 18 genome. *J Med Virol* **69**, 122-31.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12180-4.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R., Durst, M., Gissmann, L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1993). Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* **67**, 6929-36.
- Kitchener, H. C., Castle, P. E. & Cox, J. T. (2006). Chapter 7: Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S63-70.
- Kiviat, N. B. & Koutsky, L. A. (1993). Specific human papillomavirus types as the causal agents of most cervical intraepithelial neoplasia: implications for current views and treatment. *J Natl Cancer Inst* **85**, 934-5.
- Kjaer, S. K., Chackerian, B., van den Brule, A. J., Svare, E. I., Paull, G., Walbomers, J. M., Schiller, J. T., Bock, J. E., Sherman, M. E., Lowy, D. R. & Meijer, C. L. (2001). High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 101-6.
- Kjaer, S. K., Munk, C., Winther, J. F., Jorgensen, H. O., Meijer, C. J. & van den Brule, A. J. (2005). Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1528-33.
- Kjaer, S. K., Svare, E. I., Worm, A. M., Walboomers, J. M., Meijer, C. J. & van den Brule, A. J. (2000). Human papillomavirus infection in Danish female sex workers. Decreasing prevalence with age despite continuously high sexual activity. *Sex Transm Dis* **27**, 438-45.
- Kleter, B., van Doorn, L. J., Schrauwen, L., Molijn, A., Sastrowijoto, S., ter Schegget, J., Lindeman, J., ter Harmsel, B., Burger, M. & Quint, W. (1999). Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* **37**, 2508-17.
- Klussmann, J. P., Weissenborn, S. & Fuchs, P. G. (2001a). Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **345**, 376; author reply 377.
- Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Eckel, H. E., Pfister, H. J. & Fuchs, P. G. (2003). Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* **192**, 129-32.

- Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehuelsing, M., Eckel, H. E., Dienes, H. P., Pfister, H. J. & Fuchs, P. G. (2001b). Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* **92**, 2875-84.
- Knowles, G., O'Neil, B. W. & Campo, M. S. (1996). Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol* **70**, 8451-8.
- Kobayashi, A., Darragh, T., Herndier, B., Anastos, K., Minkoff, H., Cohen, M., Young, M., Levine, A., Grant, L. A., Hyun, W., Weinberg, V., Greenblatt, R. & Smith-McCune, K. (2002). Lymphoid follicles are generated in high-grade cervical dysplasia and have differing characteristics depending on HIV status. *Am J Pathol* **160**, 151-64.
- Koliopoulos, G., Arbyn, M., Martin-Hirsch, P., Kyrgiou, M., Prendiville, W. & Paraskevaidis, E. (2007). Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol* **104**, 232-46.
- Kono, K., Rensing, M. E., Brandt, R. M., Melief, C. J., Potkul, R. K., Andersson, B., Petersson, M., Kast, W. M. & Kiessling, R. (1996). Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res* **2**, 1825-8.
- Konya, J., Eklund, C., af Geijerstam, V., Yuan, F., Stuber, G. & Dillner, J. (1997). Identification of a cytotoxic T-lymphocyte epitope in the human papillomavirus type 16 E2 protein. *J Gen Virol* **78** ( Pt 10), 2615-20.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**, 3-8.
- Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M. & Jansen, K. U. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**, 1645-51.
- Koutsky, L. A. & Harper, D. M. (2006). Chapter 13: Current findings from prophylactic HPV vaccine trials. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S114-21.
- Koutsky, L. A., Holmes, K. K., Critchlow, C. W., Stevens, C. E., Paavonen, J., Beckmann, A. M., DeRouen, T. A., Galloway, D. A., Vernon, D. & Kiviat, N. B. (1992). A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* **327**, 1272-8.
- Kraus, I., Molden, T., Holm, R., Lie, A. K., Karlsen, F., Kristensen, G. B. & Skomedal, H. (2006). Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas. *J Clin Microbiol* **44**, 1310-7.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**, 95-125.
- Kuhne, C. & Banks, L. (1998). E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem* **273**, 34302-9.
- Kulasingam, S. L., Hughes, J. P., Kiviat, N. B., Mao, C., Weiss, N. S., Kuypers, J. M. & Koutsky, L. A. (2002). Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *Jama* **288**, 1749-57.
- Kulmala, S. M., Syrjanen, S. M., Gyllensten, U. B., Shabalova, I. P., Petrovichev, N., Tosi, P., Syrjanen, K. J. & Johansson, B. C. (2006). Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* **59**, 513-7.
- Kutteh, W. H., Moldoveanu, Z. & Mestecky, J. (1998). Mucosal immunity in the female reproductive tract: correlation of immunoglobulins, cytokines, and reproductive hormones in human cervical mucus around the time of ovulation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14 Suppl 1**, S51-5.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B. & Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove



- binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* **28**, 655-61.
- Lai, C. H., Huang, H. J., Hsueh, S., Chao, A., Lin, C. T., Huang, S. L., Chao, F. Y., Qiu, J. T., Hong, J. H., Chou, H. H., Chang, T. C. & Chang, C. J. (2007). Human papillomavirus genotype in cervical cancer: A population-based study. *Int J Cancer*.
- Laurendeau, I., Bahuau, M., Vodovar, N., Larramendy, C., Olivi, M., Bieche, I., Vidaud, M. & Vidaud, D. (1999). TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin Chem* **45**, 982-6.
- Lazcano-Ponce, E., Alonso, P., Ruiz-Moreno, J. A. & Hernandez-Avila, M. (2003). Recommendations for cervical cancer screening programs in developing countries. The need for equity and technological development. *Salud Publica Mex* **45 Suppl 3**, S449-62.
- Lefevre, J., Hankins, C., Money, D., Rachlis, A., Pourreaux, K. & Coutlee, F. (2004). Human papillomavirus type 16 viral load is higher in human immunodeficiency virus-seropositive women with high-grade squamous intraepithelial lesions than in those with normal cytology smears. *J Clin Microbiol* **42**, 2212-5.
- Lefevre, J., Hankins, C., Pourreaux, K., Voyer, H. & Coutlee, F. (2003). Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and beta-globin DNA in cervicovaginal lavages. *J Virol Methods* **114**, 135-44.
- Levine, L., Lucci, J. A., 3rd & Dinh, T. V. (2003). Atypical glandular cells: new Bethesda Terminology and Management Guidelines. *Obstet Gynecol Surv* **58**, 399-406.
- Li, C. C., Shah, K. V., Seth, A. & Gilden, R. V. (1987). Identification of the human papillomavirus type 6b L1 open reading frame protein in condylomas and corresponding antibodies in human sera. *J Virol* **61**, 2684-90.
- Liaw, K. L., Hildesheim, A., Burk, R. D., Gravitt, P., Wacholder, S., Manos, M. M., Scott, D. R., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Glass, A. G., Anderson, S. M. & Schiffman, M. (2001). A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* **183**, 8-15.
- Lillo, F. B., Lodini, S., Ferrari, D., Stayton, C., Taccagni, G., Galli, L., Lazzarin, A. & Uberti-Foppa, C. (2005). Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. *Clin Infect Dis* **40**, 451-7.
- Lindeque, B. G. (2005). Management of cervical premalignant lesions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **19**, 545-61.
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**, 357-62.
- Londesborough, P., Ho, L., Terry, G., Cuzick, J., Wheeler, C. & Singer, A. (1996). Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* **69**, 364-8.
- Longworth, M. S. & Laimins, L. A. (2004). The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **78**, 3533-41.
- Longworth, M. S., Wilson, R. & Laimins, L. A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *Embo J* **24**, 1821-30.
- Lorincz, A. T., Castle, P. E., Sherman, M. E., Scott, D. R., Glass, A. G., Wacholder, S., Rush, B. B., Gravitt, P. E., Schussler, J. E. & Schiffman, M. (2002). Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* **360**, 228-9.

- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W. & Kurman, R. J. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328-37.
- Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1999). Papillomaviruses: prophylactic vaccine prospects. *Biochim Biophys Acta* **1423**, M1-8.
- Lu, C. H., Liu, F. S., Kuo, C. J., Chang, C. C. & Ho, E. S. (2006). Prediction of persistence or recurrence after conization for cervical intraepithelial neoplasia III. *Obstet Gynecol* **107**, 830-5.
- Luft, F., Klaes, R., Nees, M., Durst, M., Heilmann, V., Melsheimer, P. & von Knebel Doeberitz, M. (2001). Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* **92**, 9-17.
- Lukaszuk, K., Liss, J., Wozniak, I., Emerich, J. & Wojcikowski, C. (2003). Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **41**, 608-12.
- Luron, L., Avril, M. F., Sarasin, A. & Daya-Grosjean, L. (2006). Prevalence of human papillomavirus in skin tumors from repair deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Lett.*
- Luxton, J. C., Rose, R. C., Coletart, T., Wilson, P. & Shepherd, P. S. (1997). Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen Virol* **78 ( Pt 4)**, 917-23.
- Luxton, J. C., Rowe, A. J., Cridland, J. C., Coletart, T., Wilson, P. & Shepherd, P. S. (1996). Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J Gen Virol* **77 ( Pt 7)**, 1585-93.
- Maciag, P. C., Schlecht, N. F., Souza, P. S., Franco, E. L., Villa, L. L. & Petzl-Erler, M. L. (2000). Major histocompatibility complex class II polymorphisms and risk of cervical cancer and human papillomavirus infection in Brazilian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 1183-91.
- Maciag, P. C., Schlecht, N. F., Souza, P. S., Rohan, T. E., Franco, E. L. & Villa, L. L. (2002). Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. *J Infect Dis* **186**, 164-72.
- Maden, C., Sherman, K. J., Beckmann, A. M., Hislop, T. G., Teh, C. Z., Ashley, R. L. & Daling, J. R. (1993). History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer. *J Natl Cancer Inst* **85**, 19-24.
- Malejczyk, J., Malejczyk, M., Breitburd, F., Majewski, S., Schwarz, A., Expert-Besancon, N., Jablonska, S., Orth, G. & Luger, T. A. (1996). Progressive growth of human papillomavirus type 16-transformed keratinocytes is associated with an increased release of soluble tumour necrosis factor (TNF) receptor. *Br J Cancer* **74**, 234-9.
- Malek, R. S., Goellner, J. R., Smith, T. F., Espy, M. J. & Cupp, M. R. (1993). Human papillomavirus infection and intraepithelial, in situ, and invasive carcinoma of penis. *Urology* **42**, 159-70.
- Mann, V. M., de Lao, S. L., Brenes, M., Brinton, L. A., Rawls, J. A., Green, M., Reeves, W. C. & Rawls, W. E. (1990). Occurrence of IgA and IgG antibodies to select peptides representing human papillomavirus type 16 among cervical cancer cases and controls. *Cancer Res* **50**, 7815-9.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**, 7874-87.
- Marais, D. J., Sampson, C., Jefftha, A., Dhaya, D., Passmore, J. A., Denny, L., Rybicki, E. P., Van Der Walt, E., Stephen, L. X. & Williamson, A. L. (2006). More men than women make mucosal IgA antibodies to Human papillomavirus type 16 (HPV-16) and HPV-18: a study of oral HPV and oral HPV antibodies in a normal healthy population. *BMC Infect Dis* **6**, 95.

- Martinez-Lopez, J., Lahuerta, J. J., Salama, P., Ayala, R. & Bautista, J. M. (2004). The use of fluorescent molecular beacons in real time PCR of IgH gene rearrangements for quantitative evaluation of multiple myeloma. *Clin Lab Haematol* **26**, 31-5.
- McBride, A. A. & Howley, P. M. (1991). Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol* **65**, 6528-34.
- McBride, A. A., Romanczuk, H. & Howley, P. M. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* **266**, 18411-4.
- McCluggage, W. G., Walsh, M. Y., Thornton, C. M., Hamilton, P. W., Date, A., Caughley, L. M. & Bharucha, H. (1998). Inter- and intra-observer variation in the histopathological reporting of cervical squamous intraepithelial lesions using a modified Bethesda grading system. *Br J Obstet Gynaecol* **105**, 206-10.
- McGlennen, R. C. (2000). Human papillomavirus oncogenesis. *Clin Lab Med* **20**, 383-406.
- McKay, S. P., Gregoire, L., Lonardo, F., Reidy, P., Mathog, R. H. & Lancaster, W. D. (2005). Human papillomavirus (HPV) transcripts in malignant inverted papilloma are from integrated HPV DNA. *Laryngoscope* **115**, 1428-31.
- McMillan, N. A., Payne, E., Frazer, I. H. & Evander, M. (1999). Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**, 271-9.
- Meijerink, J., Mandigers, C., van de Locht, L., Tonnissen, E., Goodsaid, F. & Raemaekers, J. (2001). A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn* **3**, 55-61.
- Meisels, A. (1976). [Role of exogenous factors in the development of intraepithelial lesions of the uterine cervix (author's transl)]. *Arch Anat Cytol Pathol* **24**, 87-92.
- Melbye, M., Smith, E., Wohlfahrt, J., Osterlind, A., Orholm, M., Bergmann, O. J., Mathiesen, L., Darragh, T. M. & Palefsky, J. M. (1996). Anal and cervical abnormality in women--prediction by human papillomavirus tests. *Int J Cancer* **68**, 559-64.
- Mellin, H., Dahlgren, L., Munck-Wikland, E., Lindholm, J., Rabbani, H., Kalantari, M. & Dalianis, T. (2002). Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* **102**, 152-8.
- Melnikow, J., Nuovo, J., Willan, A. R., Chan, B. K. & Howell, L. P. (1998). Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* **92**, 727-35.
- Mendez, F., Munoz, N., Posso, H., Molano, M., Moreno, V., van den Brule, A. J., Ronderos, M., Meijer, C. & Munoz, A. (2005). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types and possible implications for the prevention of cervical cancer by HPV vaccines. *J Infect Dis* **192**, 1158-65.
- Mestecky, J. & Fultz, P. N. (1999). Mucosal immune system of the human genital tract. *J Infect Dis* **179 Suppl 3**, S470-4.
- Mincheva, A., Gissmann, L. & zur Hausen, H. (1987). Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med Microbiol Immunol* **176**, 245-56.
- Moberg, M., Gustavsson, I. & Gyllensten, U. (2003). Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* **41**, 3221-8.
- Moberg, M., Gustavsson, I. & Gyllensten, U. (2004). Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *Int J Cancer* **112**, 854-9.
- Moberg, M., Gustavsson, I., Wilander, E. & Gyllensten, U. (2005). High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. *Br J Cancer* **92**, 891-4.

- Molano, M., Van den Brule, A., Plummer, M., Weiderpass, E., Posso, H., Arslan, A., Meijer, C. J., Munoz, N. & Franceschi, S. (2003). Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* **158**, 486-94.
- Molden, T., Kraus, I., Karlsen, F., Skomedal, H. & Hagmar, B. (2006). Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol* **100**, 95-100.
- Molden, T., Kraus, I., Karlsen, F., Skomedal, H., Nygard, J. F. & Hagmar, B. (2005a). Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 367-72.
- Molden, T., Nygard, J. F., Kraus, I., Karlsen, F., Nygard, M., Skare, G. B., Skomedal, H., Thoresen, S. O. & Hagmar, B. (2005b). Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPV-proofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer* **114**, 973-6.
- Monnier-Benoit, S., Dalstein, V., Riethmuller, D., Lalaoui, N., Mougin, C. & Pretet, J. L. (2006). Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J Clin Virol* **35**, 270-7.
- Monsonogo, J. (2007). [Prevention of cervical cancer: screening, progress and perspectives]. *Presse Med* **36**, 92-111.
- Monsonogo, J., Autillo-Touati, A., Bergeron, C., Dachez, R., Liaras, J., Saurel, J., Zerat, L., Chatelain, P. & Mottot, C. (2001). Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-centre study. *Br J Cancer* **84**, 360-6.
- Monsonogo, J., Bohbot, J. M., Pollini, G., Krawec, C., Vincent, C., Merignargues, I., Haroun, F., Sednaoui, P., Monfort, L., Dachez, R. & Syrjanen, K. (2005). Performance of the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol* **99**, 160-8.
- Monsonogo, J., Pintos, J., Semaille, C., Beumont, M., Dachez, R., Zerat, L., Bianchi, A. & Franco, E. (2006). Human papillomavirus testing improves the accuracy of colposcopy in detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* **16**, 591-8.
- Moscicki, A. B. (1998). Genital infections with human papillomavirus (HPV). *Pediatr Infect Dis J* **17**, 651-2.
- Moscicki, A. B., Ellenberg, J. H., Farhat, S. & Xu, J. (2004a). Persistence of human papillomavirus infection in HIV-infected and -uninfected adolescent girls: risk factors and differences, by phylogenetic type. *J Infect Dis* **190**, 37-45.
- Moscicki, A. B., Schiffman, M., Kjaer, S. & Villa, L. L. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S42-51.
- Moscicki, A. B., Shiboski, S., Hills, N. K., Powell, K. J., Jay, N., Hanson, E. N., Miller, S., Canjura-Clayton, K. L., Farhat, S., Broering, J. M. & Darragh, T. M. (2004b). Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* **364**, 1678-83.
- Moses, S., Bailey, R. C. & Ronald, A. R. (1998). Male circumcision: assessment of health benefits and risks. *Sex Transm Infect* **74**, 368-73.
- Muller, M., Gausepohl, H., de Martynoff, G., Frank, R., Brasseur, R. & Gissmann, L. (1990). Identification of seroreactive regions of the human papillomavirus type 16 protein E4, E6, E7 and L1. *J Gen Virol* **71 (Pt 11)**, 2709-17.
- Muller, M., Gissmann, L., Cristiano, R. J., Sun, X. Y., Frazer, I. H., Jenson, A. B., Alonso, A., Zentgraf, H. & Zhou, J. (1995a). Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* **69**, 948-54.

- Muller, M., Viscidi, R. P., Ulken, V., Bavinck, J. N., Hill, P. M., Fisher, S. G., Reid, R., Munoz, N., Schneider, A., Shah, K. V. & et al. (1995b). Antibodies to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus (HPV) type 16 in patients with HPV-associated diseases and in the normal population. *J Invest Dermatol* **104**, 138-41.
- Munger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M. & Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**, 11451-60.
- Munger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M. & Zacny, V. L. (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**, 7888-98.
- Munger, K. & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* **89**, 213-28.
- Munger, K. & Phelps, W. C. (1993). The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta* **1155**, 111-23.
- Munger, K., Phelps, W. C., Bubbs, V., Howley, P. M. & Schlegel, R. (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**, 4417-21.
- Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E. & Howley, P. M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J* **8**, 4099-105.
- Munger, K., Yee, C. L., Phelps, W. C., Pietenpol, J. A., Moses, H. L. & Howley, P. M. (1991). Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J Virol* **65**, 3943-8.
- Munoz, N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* **19**, 1-5.
- Munoz, N., Bosch, F. X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K. V. & Meijer, C. J. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* **111**, 278-85.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**, 518-27.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Tafur, L., Izarzugaza, I., Gili, M., Viladiu, P., Navarro, C., Martos, C., Ascunce, N. & et al. (1992). The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* **52**, 743-9.
- Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A. B. & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* **24S3**, S1-S10.
- Nakagawa, M., Stites, D. P., Farhat, S., Judd, A., Moscicki, A. B., Canchola, A. J., Hilton, J. F. & Palefsky, J. M. (1996). T-cell proliferative response to human papillomavirus type 16 peptides: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 205-10.
- Nakagawa, M., Stites, D. P., Farhat, S., Sisler, J. R., Moss, B., Kong, F., Moscicki, A. B. & Palefsky, J. M. (1997). Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis* **175**, 927-31.
- Nakagawa, M., Stites, D. P., Palefsky, J. M., Kneass, Z. & Moscicki, A. B. (1999). CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**, 494-8.
- Nakagawa, M., Viscidi, R., Deshmukh, I., Costa, M. D., Palefsky, J. M., Farhat, S. & Moscicki, A. B. (2002). Time course of humoral and cell-mediated immune responses to human papillomavirus type 16 in infected women. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 877-82.

- Nanda, K., McCrory, D. C., Myers, E. R., Bastian, L. A., Hasselblad, V., Hickey, J. D. & Matchar, D. B. (2000). Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med* **132**, 810-9.
- Narechania, A., Chen, Z., DeSalle, R. & Burk, R. D. (2005). Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *J Virol* **79**, 15503-10.
- Nazarenko, I. A., Bhatnagar, S. K. & Hohman, R. J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res* **25**, 2516-21.
- Nelson, L. M., Rose, R. C., LeRoux, L., Lane, C., Bruya, K. & Moroianu, J. (2000). Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein. *J Cell Biochem* **79**, 225-38.
- Nelson, L. M., Rose, R. C. & Moroianu, J. (2003). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 interacts with Kap beta2 and Kap beta3 nuclear import receptors. *Virology* **306**, 162-9.
- Nicholls, P. K., Doorbar, J., Moore, R. A., Peh, W., Anderson, D. M. & Stanley, M. A. (2001a). Detection of viral DNA and E4 protein in basal keratinocytes of experimental canine oral papillomavirus lesions. *Virology* **284**, 82-98.
- Nicholls, P. K., Moore, P. F., Anderson, D. M., Moore, R. A., Parry, N. R., Gough, G. W. & Stanley, M. A. (2001b). Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Virology* **283**, 31-9.
- Nicholls, P. K. & Stanley, M. A. (2000). The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol* **73**, 101-27.
- Nicol, A. F., Fernandes, A. T. & Bonecini-Almeida Mda, G. (2005). Immune response in cervical dysplasia induced by human papillomavirus: the influence of human immunodeficiency virus-1 co-infection -- review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 1-12.
- Niedergang, F., Didierlaurent, A., Kraehenbuhl, J. P. & Sirard, J. C. (2004). Dendritic cells: the host Achilles heel for mucosal pathogens? *Trends Microbiol* **12**, 79-88.
- Nindl, I., Lorincz, A., Mielzynska, I., Petry, U., Baur, S., Kirchmayr, R., Michels, W. & Schneider, A. (1998). Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol* **10**, 49-56.
- Nindl, I., Rindfleisch, K., Lotz, B., Schneider, A. & Durst, M. (1999a). 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**, 203-7.
- Nindl, I., Rindfleisch, K., Teller, K., Schneider, A. & Durst, M. (1999b). Cervical cancer, HPV 16 E6, variant genotypes, and serology. *Lancet* **353**, 152.
- Okabayashi, M., Angell, M. G., Christensen, N. D. & Kreider, J. W. (1991). Morphometric analysis and identification of infiltrating leucocytes in regressing and progressing Shope rabbit papillomas. *Int J Cancer* **49**, 919-23.
- Oringer, R. J., Fiorellini, J. P., Koch, G. G., Sharp, T. J., Nevins, M. L., Davis, G. H. & Howell, T. H. (1997). Comparison of manual and automated probing in an untreated periodontitis population. *J Periodontol* **68**, 1156-62.
- Orth, G. & Favre, M. (1985). Human papillomaviruses. Biochemical and biologic properties. *Clin Dermatol* **3**, 27-42.
- Ostor, A. G. (1993a). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* **12**, 186-92.
- Ostor, A. G. (1993b). Studies on 200 cases of early squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Pathol* **12**, 193-207.

- Pakarian, F., Kaye, J., Cason, J., Kell, B., Jewers, R., Derias, N. W., Raju, K. S. & Best, J. M. (1994). Cancer associated human papillomaviruses: perinatal transmission and persistence. *Br J Obstet Gynaecol* **101**, 514-7.
- Palefsky, J. M., Minkoff, H., Kalish, L. A., Levine, A., Sacks, H. S., Garcia, P., Young, M., Melnick, S., Miotti, P. & Burk, R. (1999). Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* **91**, 226-36.
- Park, J. S., Hwang, E. S., Park, S. N., Ahn, H. K., Um, S. J., Kim, C. J., Kim, S. J. & Namkoong, S. E. (1997). Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol* **65**, 121-9.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**, 153-6.
- Patel, H. S., Silver, A. R. & Northover, J. M. (2007). Anal cancer in renal transplant patients. *Int J Colorectal Dis* **22**, 1-5.
- Peitsaro, P., Johansson, B. & Syrjänen, S. (2002). 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**, 886-91.
- Perrons, C., Jelley, R., Kleter, B., Quint, W. & Brink, N. (2005). Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybrid capture II and SPF10/LiPA. *J Clin Virol* **32**, 278-85.
- Peter, M., Rosty, C., Couturier, J., Radvanyi, F., Teshima, H. & Sastre-Garau, X. (2006). MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* **25**, 5985-93.
- Petry, K. U., Menton, S., Menton, M., van Loenen-Frosch, F., de Carvalho Gomes, H., Holz, B., Schopp, B., Garbrecht-Buettner, S., Davies, P., Boehmer, G., van den Akker, E. & Iftner, T. (2003). Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8466 patients. *Br J Cancer* **88**, 1570-7.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pfister, H. (2003). Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 52-6.
- Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K. & Howley, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**, 539-47.
- Poljak, M., Fujs, K., Seme, K., Kocjan, B. J. & Vrtacnik-Bokal, E. (2005). Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* **14**, 147-52.
- Popescu, N. C. & DiPaolo, J. A. (1990). Integration of human papillomavirus 16 DNA and genomic rearrangements in immortalized human keratinocyte lines. *Cancer Res* **50**, 1316-23.
- Popescu, N. C., DiPaolo, J. A. & Amsbaugh, S. C. (1987). Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **44**, 58-62.
- Prétet, J.-L., Dalstein, V., Monnier-Benoit, S., Delpeut, S. & Mougin, C. (2004). 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**, 140-7.
- Pretet, J. L., Dalstein, V., Monnier-Benoit, S., Delpeut, S. & Mougin, C. (2004). 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**, 140-7.
- Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Carcopino, X., Charlot, J. F., Bouhour, D., Kantelip, B., Soubeyrand, B., Leocmach, Y. & Riethmuller, D. (2007a). Human Papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France. For the E.D.I.T.H. study group. *Int J Cancer*, Submitted.

- Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Carcopino, X., Monnier-Benoit, S., Averous, G., Soubeyrand, B., Leocmach, Y. & Riethmuller, D. (2007b). Human Papillomavirus (HPV) genotype distribution in High Grade Cervical Lesions (CIN 2/3) in France. For the E.D.I.T.H. study group. *Int J Cancer*, submitted.
- Puranen, M., Yliskoski, M., Saarikoski, S., Syrjanen, K. & Syrjanen, S. (1996). Vertical transmission of human papillomavirus from infected mothers to their newborn babies and persistence of the virus in childhood. *Am J Obstet Gynecol* **174**, 694-9.
- Puranen, M. H., Yliskoski, M. H., Saarikoski, S. V., Syrjanen, K. J. & Syrjanen, S. M. (1997). Exposure of an infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. *Am J Obstet Gynecol* **176**, 1039-45.
- Purola, E. & Savia, E. (1977). Cytology of gynecologic condyloma acuminatum. *Acta Cytol* **21**, 26-31.
- Ragin, C. C., Reshmi, S. C. & Gollin, S. M. (2004). Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int J Cancer* **110**, 701-9.
- Rapp, L. & Chen, J. J. (1998). The papillomavirus E6 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1378**, F1-19.
- Rasmussen, T., Poulsen, T. S., Honore, L. & Johnsen, H. E. (2000). Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Hematol* **28**, 1039-45.
- Ratnam, S., Franco, E. L. & Ferenczy, A. (2000). Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 945-51.
- Reid, R. (1987). Human papillomaviral infection. The key to rational triage of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol Clin North Am* **14**, 407-29.
- Reid, R., Greenberg, M. D., Lorincz, A., Jenson, A. B., Lavery, C. R., Husain, M., Daoud, Y., Zado, B., White, T., Cantor, D. & et al. (1991). Should cervical cytologic testing be augmented by cervicography or human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection? *Am J Obstet Gynecol* **164**, 1461-9; discussion 1469-71.
- Remontet, L., Esteve, J., Bouvier, A. M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Exbrayat, C., Tretare, B., Carli, P. M., Guizard, A. V., Troussard, X., Bercelli, P., Colonna, M., Halna, J. M., Hedelin, G., Mace-Lesec'h, J., Peng, J., Buemi, A., Velten, M., Jouglu, E., Arveux, P., Le Bodic, L., Michel, E., Sauvage, M., Schwartz, C. & Faivre, J. (2003). Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* **51**, 3-30.
- Resnick, R. M., Cornelissen, M. T., Wright, D. K., Eichinger, G. H., Fox, H. S., ter Schegget, J. & Manos, M. M. (1990). Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* **82**, 1477-84.
- Ressing, M. E., Offringa, R., Toes, R. E., Ossendorp, F., de Jong, J. H., Brandt, R. M., Kast, W. M. & Melief, C. J. (1996a). Immunotherapy of cancer by peptide-based vaccines for the induction of tumor-specific T cell immunity. *Immunotechnology* **2**, 241-51.
- Ressing, M. E., van Driel, W. J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M. P., Hartman, M., Anholts, J. D., Schreuder, G. M., ter Harsel, W. B., Fleuren, G. J., Trimbois, B. J., Kast, W. M. & Melief, C. J. (1996b). Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A \*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* **56**, 582-8.
- Richardson, H., Kelsall, G., Tellier, P., Voyer, H., Abrahamowicz, M., Ferenczy, A., Coutlee, F. & Franco, E. L. (2003). The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 485-90.
- Richart, R. M. (1975). Letter: Identity of cervical dysplasias. *Lancet* **1**, 451.
- Richart, R. M., Masood, S., Syrjanen, K. J., Vassilakos, P., Kaufman, R. H., Meisels, A., Olszewski, W. T., Sakamoto, A., Stoler, M. H., Vooijs, G. P. & Wilbur, D. C. (1998). Human papillomavirus. International Academy of Cytology Task Force summary. Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: An International Expert Conference and Tutorial. *Acta Cytol* **42**, 50-8.



- Richart, R. M. & Wright, T. C., Jr. (1992). Human papillomavirus. *Curr Opin Obstet Gynecol* **4**, 662-9.
- Riethmuller, D., Gay, C., Bertrand, X., Bettinger, D., Schaal, J. P., Carbillet, J. P., Lassabe, C., Arveux, P., Seilles, E. & Mouglin, C. (1999). Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by Hybrid Capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* **8**, 157-64.
- Riethmuller, D. & Seilles, E. (2000). [Immunity of the female genital tract mucosa and mechanisms of papillomavirus evasion]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **29**, 729-740.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**, 154-60.
- Rodrigo, J. P., Suarez, C., Gonzalez, M. V., Lazo, P. S., Ramos, S., Coto, E., Alvarez, I., Garcia, L. A. & Martinez, J. A. (2001). Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope* **111**, 1297-301.
- Rodriguez, A. C., Burk, R., Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Solomon, D., Guillen, D., Alfaro, M., Viscidi, R., Morales, J., Hutchinson, M., Wacholder, S. & Schiffman, M. (2007). The Natural History of Human Papillomavirus Infection and Cervical Intraepithelial Neoplasia Among Young Women in the Guanacaste Cohort Shortly After Initiation of Sexual Life. *Sex Transm Dis*.
- Rose, R., Bonnez, W. & Reichman, R. (2006). Finding a vaccine for human papillomavirus. *Lancet* **367**, 985.
- Rose, R. C., Bonnez, W., Da Rin, C., McCance, D. J. & Reichman, R. C. (1994a). Serological differentiation of human papillomavirus types 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J Gen Virol* **75** ( Pt 9), 2445-9.
- Rose, R. C., Reichman, R. C. & Bonnez, W. (1994b). Human papillomavirus (HPV) type 11 recombinant virus-like particles induce the formation of neutralizing antibodies and detect HPV-specific antibodies in human sera. *J Gen Virol* **75** ( Pt 8), 2075-9.
- Rousseau, M. C., Abrahamowicz, M., Villa, L. L., Costa, M. C., Rohan, T. E. & Franco, E. L. (2003a). Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 1029-37.
- Rousseau, M. C., Pereira, J. S., Prado, J. C., Villa, L. L., Rohan, T. E. & Franco, E. L. (2001). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis* **184**, 1508-17.
- Rousseau, M. C., Villa, L. L., Costa, M. C., Abrahamowicz, M., Rohan, T. E. & Franco, E. (2003b). Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis* **30**, 581-7.
- Russell, M. W., Hedges, S. R., Wu, H. Y., Hook, E. W., 3rd & Mestecky, J. (1999). Mucosal immunity in the genital tract: prospects for vaccines against sexually transmitted diseases--a review. *Am J Reprod Immunol* **42**, 58-63.
- Saito, J., Fukuda, T., Hoshiai, H. & Noda, K. (1999). High-risk types of human papillomavirus associated with the progression of cervical dysplasia to carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* **25**, 281-6.
- Sanchez-Lanier, M., Triplett, C. & Campion, M. (1994). Possible role for human papillomavirus 16 in squamous cell carcinoma of the finger. *J Med Virol* **44**, 369-78.
- Sandri, M. T., Lentati, P., Benini, E., Dell'Orto, P., Zorzino, L., Carozzi, F. M., Maisonneuve, P., Passerini, R., Salvatici, M., Casadio, C., Boveri, S. & Sideri, M. (2006). Comparison of the Digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Clin Microbiol* **44**, 2141-6.

- Sano, T., Hikino, T., Niwa, Y., Kashiwabara, K., Oyama, T., Fukuda, T. & Nakajima, T. (1998). In situ hybridization with biotinylated tyramide amplification: detection of human papillomavirus DNA in cervical neoplastic lesions. *Mod Pathol* **11**, 19-23.
- Santos, A. L., Derchain, S. F., Martins, M. R., Sarian, L. O., Martinez, E. Z. & Syrjanen, K. J. (2003). Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *Sao Paulo Med J* **121**, 238-43.
- Sashiyama, H., Shino, Y., Sakao, S., Shimada, H., Kobayashi, S., Ochiai, T. & Shirasawa, H. (2002). Alteration of integrin expression relates to malignant progression of human papillomavirus-immortalized esophageal keratinocytes. *Cancer Lett* **177**, 21-8.
- Saslow, D., Runowicz, C. D., Solomon, D., Moscicki, A. B., Smith, R. A., Eyre, H. J. & Cohen, C. (2002). American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *CA Cancer J Clin* **52**, 342-62.
- Saslow, D., Runowicz, C. D., Solomon, D., Moscicki, A. B., Smith, R. A., Eyre, H. J. & Cohen, C. (2003). American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. *J Low Genit Tract Dis* **7**, 67-86.
- Sastre-Garau, X., Couturier, J., Favre, M. & Orth, G. (1995). 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**, 475-8.
- Sastre-Garau, X., Favre, M., Couturier, J. & Orth, G. (2000). 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**, 1983-93.
- Schaffer, P., Sancho-Garnier, H., Fender, M., Dellenbach, P., Carbillet, J. P., Monnet, E., Gauthier, G. P. & Garnier, A. (2000). Cervical cancer screening in France. *Eur J Cancer* **36**, 2215-20.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-36.
- Scheffner, M. & Whitaker, N. J. (2003). Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol* **13**, 59-67.
- Scheurer, M. E., Guillaud, M., Tortolero-Luna, G., McAulay, C., Follen, M. & Adler-Storthz, K. (2007). Human papillomavirus-related cellular changes measured by cytometric analysis of DNA ploidy and chromatin texture. *Cytometry B Clin Cytom.*
- Scheurer, M. E., Tortolero-Luna, G. & Adler-Storthz, K. (2005). Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* **15**, 727-46.
- Schiffman, M. & Castle, P. E. (2003a). Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med* **127**, 930-4.
- Schiffman, M., Hildesheim, A., Herrero, R. & Bratti, C. (2000). Human papillomavirus testing as a screening tool for cervical cancer. *Jama* **283**, 2525-6.
- Schiffman, M. & Solomon, D. (2003). Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* **127**, 946-9.
- Schiffman, M. H., Bauer, H. M., Hoover, R. N., Glass, A. G., Cadell, D. M., Rush, B. B., Scott, D. R., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Wacholder, S. & et al. (1993). Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **85**, 958-64.
- Schiffman, M. H. & Castle, P. (2003b). Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **95**, E2.

- Schiffman, M. H., Kiviat, N. B., Burk, R. D., Shah, K. V., Daniel, R. W., Lewis, R., Kuypers, J., Manos, M. M., Scott, D. R., Sherman, M. E. & et al. (1995). Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J Clin Microbiol* **33**, 545-50.
- Schlecht, N. F., Platt, R. W., Duarte-Franco, E., Costa, M. C., Sobrinho, J. P., Prado, J. C., Ferenczy, A., Rohan, T. E., Villa, L. L. & Franco, E. L. (2003a). Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1336-43.
- Schlecht, N. F., Platt, R. W., Negassa, A., Duarte-Franco, E., Rohan, T. E., Ferenczy, A., Villa, L. L. & Franco, E. L. (2003b). Modeling the time dependence of the association between human papillomavirus infection and cervical cancer precursor lesions. *Am J Epidemiol* **158**, 878-86.
- Schneider-Maunoury, S., Croissant, O. & Orth, G. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J Virol* **61**, 3295-8.
- Schneider, A., Hoyer, H., Lotz, B., Leistritz, S., Kuhne-Heid, R., Nindl, I., Muller, B., Haerting, J. & Durst, M. (2000). Screening for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* **89**, 529-34.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. & zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-4.
- Sedlacek, T. V., Lindheim, S., Eder, C., Hasty, L., Woodland, M., Ludomirsky, A. & Rando, R. F. (1989). Mechanism for human papillomavirus transmission at birth. *Am J Obstet Gynecol* **161**, 55-9.
- Seillès, E., Greslin, I. & Mougin, C. (1999). [Biology of papillomavirus infections. IV. Sero-epidemiological data]. *Ann Biol Clin (Paris)* **57**, 393-400.
- Selinka, H. C., Giroglou, T. & Sapp, M. (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**, 279-287.
- Sellers, J. W., Nieminen, P., Vesterinen, E. & Paavonen, J. (1990). Observer variability in the scoring of colpophotographs. *Obstet Gynecol* **76**, 1006-8.
- Selvakumar, R., Schmitt, A., Iftner, T., Ahmed, R. & Wettstein, F. O. (1997). Regression of papillomas induced by cottontail rabbit papillomavirus is associated with infiltration of CD8+ cells and persistence of viral DNA after regression. *J Virol* **71**, 5540-8.
- Shafiti-Keramati, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K. & Kirnbauer, R. (2003). Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* **77**, 13125-35.
- Sherman, M. E., Schiffman, M. H., Lorincz, A. T., Herrero, R., Hutchinson, M. L., Bratti, C., Zahniser, D., Morales, J., Hildesheim, A., Helgesen, K., Kelly, D., Alfaro, M., Mena, F., Balmaceda, I., Mango, L. & Greenberg, M. (1997). Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. *Cancer* **81**, 89-97.
- Sherman, M. E., Tabbara, S. O., Scott, D. R., Kurman, R. J., Glass, A. G., Manos, M. M., Burk, R. D., Rush, B. B. & Schiffman, M. (1999). "ASCUS, rule out HSIL": cytologic features, histologic correlates, and human papillomavirus detection. *Mod Pathol* **12**, 335-42.
- Sheu, B. C., Chiou, S. H., Chang, W. C., Chow, S. N., Lin, H. H., Chen, R. J., Huang, S. C., Ho, H. N. & Hsu, S. M. (2005). Integration of high-risk human papillomavirus DNA correlates with HLA genotype aberration and reduced HLA class I molecule expression in human cervical carcinoma. *Clin Immunol* **115**, 295-301.
- Sheu, B. C., Lin, R. H., Ho, H. N. & Huang, S. C. (1997). Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol* **56**, 39-48.
- Shibata, D., Fu, Y. S., Gupta, J. W., Shah, K. V., Arnheim, N. & Martin, W. J. (1988). Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the polymerase chain reaction. *Lab Invest* **59**, 555-9.

- Shirasawa, H., Tomita, Y., Fuse, A., Yamamoto, T., Tanzawa, H., Sekiya, S., Takamizawa, H. & Simizu, B. (1989). Structure and expression of an integrated human papillomavirus type 16 genome amplified in a cervical carcinoma cell line. *J Gen Virol* **70** ( Pt 7), 1913-9.
- Shirasawa, H., Tomita, Y., Kubota, K., Kasai, T., Sekiya, S., Takamizawa, H. & Simizu, B. (1986). Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol* **67** ( Pt 9), 2011-5.
- Shirasawa, H., Tomita, Y., Sekiya, S., Takamizawa, H. & Simizu, B. (1987). Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol* **68** ( Pt 2), 583-91.
- Si, H. X., Tsao, S. W., Poon, C. S., Wong, Y. C. & Cheung, A. L. (2005). Physical status of HPV-16 in esophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Virol* **32**, 19-23.
- Siegel, S. & Castelane, N. J. (1988). Non parametric statistics for behavioral sciences, McGraw-Hill edn. Edited by 2. New York.
- Sigstad, E., Lie, A. K., Luostarinen, T., Dillner, J., Jellum, E., Lehtinen, M., Thoresen, S. & Abeler, V. (2002). A prospective study of the relationship between prediagnostic human papillomavirus seropositivity and HPV DNA in subsequent cervical carcinomas. *Br J Cancer* **87**, 175-80.
- Silins, I., Avall-Lundqvist, E., Tadesse, A., Jansen, K. U., Stendahl, U., Lenner, P., Zumbach, K., Pawlita, M., Dillner, J. & Frankendal, B. (2002). Evaluation of antibodies to human papillomavirus as prognostic markers in cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* **85**, 333-8.
- Silins, I., Wang, Z., Avall-Lundqvist, E., Frankendal, B., Vikmanis, U., Sapp, M., Schiller, J. T. & Dillner, J. (1999). Serological evidence for protection by human papillomavirus (HPV) type 6 infection against HPV type 16 cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* **80** ( Pt 11), 2931-6.
- Sillman, F. H., Sentovich, S. & Shaffer, D. (1997). Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. *Ann Transplant* **2**, 59-66.
- Slebos, R. J., Yi, Y., Ely, K., Carter, J., Evjen, A., Zhang, X., Shyr, Y., Murphy, B. M., Cmelak, A. J., Burkey, B. B., Netterville, J. L., Levy, S., Yarbrough, W. G. & Chung, C. H. (2006). Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**, 701-9.
- Snijders, P. J., Hogewoning, C. J., Hesselink, A. T., Berkhof, J., Voorhorst, F. J., Bleeker, M. C. & Meijer, C. J. (2006). Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. *Int J Cancer* **119**, 1102-7.
- Snijders, P. J., Meijer, C. J. & Walboomers, J. M. (1991). Degenerate primers based on highly conserved regions of amino acid sequence in papillomaviruses can be used in a generalized polymerase chain reaction to detect productive human papillomavirus infection. *J Gen Virol* **72** ( Pt 11), 2781-6.
- Snijders, P. J., van den Brule, A. J. & Meijer, C. J. (2003). The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. *J Pathol* **201**, 1-6.
- Soares, V. R., Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Vaheri, A. & Paavonen, J. (1990). Human papillomavirus DNA in unselected pregnant and non-pregnant women. *Int J STD AIDS* **1**, 276-8.
- Soler, C., Allibert, P., Chardonnet, Y., Cros, P., Mandrand, B. & Thivolet, J. (1991). Detection of human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **35**, 143-57.
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr. & Young, N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama* **287**, 2114-9.

- Song, S., Pitot, H. C. & Lambert, P. F. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *J Virol* **73**, 5887-93.
- Song, S. H., Lee, J. K., Oh, M. J., Hur, J. Y., Park, Y. K. & Saw, H. S. (2006). Risk factors for the progression or persistence of untreated mild dysplasia of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* **16**, 1608-13.
- Soutter, W. P. (1988). Viral infection, human papillomavirus DNA, and cervical neoplasia. *Br Med J (Clin Res Ed)* **296**, 789.
- Soutter, W. P. & Kesic, V. (1994). Treatment of cervical intraepithelial neoplasia reverses CD4/CD8 lymphocyte abnormalities in peripheral venous blood. *Int J Gynecol Cancer* **4**, 279-282.
- Stacey, S. N., Bartholomew, J. S., Ghosh, A., Stern, P. L., Mackett, M. & Arrand, J. R. (1992). Expression of human papillomavirus type 16 E6 protein by recombinant baculovirus and use for detection of anti-E6 antibodies in human sera. *J Gen Virol* **73** ( Pt 9), 2337-45.
- Stacey, S. N., Ghosh, A., Bartholomew, J. S., Tindle, R. W., Stern, P. L., Mackett, M. & Arrand, J. R. (1993). Expression of human papillomavirus type 16 E7 protein by recombinant baculovirus and use for the detection of E7 antibodies in sera from cervical carcinoma patients. *J Med Virol* **40**, 14-21.
- Stanley, M. (1998). The immunology of genital human papilloma virus infection. *Eur J Dermatol* **8**, 8-12; discussion 20-2.
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* **24 Suppl 1**, S16-22.
- Stanley, M. A. (2001). Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* **52**, 45-59.
- Stern, P. L. (2005). Immune control of human papillomavirus (HPV) associated anogenital disease and potential for vaccination. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S72-81.
- Stevens, M. P., Garland, S. M. & Tabrizi, S. N. (2006a). Human papillomavirus genotyping using a modified linear array detection protocol. *J Virol Methods* **135**, 124-6.
- Stevens, M. P., Rudland, E., Garland, S. M. & Tabrizi, S. N. (2006b). Assessment of MagNA pure LC extraction system for detection of human papillomavirus (HPV) DNA in PreservCyt samples by the Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY HPV tests. *J Clin Microbiol* **44**, 2428-33.
- Stoler, M. H. (2000). Advances in cervical screening technology. *Mod Pathol* **13**, 275-84.
- Stoler, M. H. (2003). Testing for human papillomavirus: data driven implications for cervical neoplasia management. *Clin Lab Med* **23**, 569-83, v.
- Stoler, M. H. & Schiffman, M. (2001). Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *Jama* **285**, 1500-5.
- Strickler, H. D., Palefsky, J. M., Shah, K. V., Anastos, K., Klein, R. S., Minkoff, H., Duerr, A., Massad, L. S., Celentano, D. D., Hall, C., Fazzari, M., Cu-Uvin, S., Bacon, M., Schuman, P., Levine, A. M., Durante, A. J., Gange, S., Melnick, S. & Burk, R. D. (2003). Human papillomavirus type 16 and immune status in human immunodeficiency virus-seropositive women. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1062-71.
- Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T. & Laimins, L. A. (2000). The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* **74**, 1178-86.
- Stubenrauch, F. & Laimins, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* **9**, 379-86.
- Stubenrauch, F., Zobel, T. & Iftner, T. (2001). The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* **75**, 4139-49.
- Studentsov, Y. Y., Schiffman, M., Strickler, H. D., Ho, G. Y., Pang, Y. Y., Schiller, J., Herrero, R. & Burk, R. D. (2002). Enhanced enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to virus-like particles of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* **40**, 1755-60.

- Sun, C. A., Lai, H. C., Chang, C. C., Neih, S., Yu, C. P. & Chu, T. Y. (2001). The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol* **83**, 95-9.
- Sun, C. A., Liu, J. F., Wu, D. M., Nieh, S., Yu, C. P. & Chu, T. Y. (2002). Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* **76**, 41-7.
- Sun, X. W., Kuhn, L., Ellerbrock, T. V., Chiasson, M. A., Bush, T. J. & Wright, T. C., Jr. (1997). Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* **337**, 1343-9.
- Suzuk, L., Noffsinger, A. E., Hui, Y. Z. & Fenoglio-Preiser, C. M. (1996). Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **78**, 704-10.
- Suzuki, H., Komiya, A., Aida, S., Ito, H., Yatani, R. & Shimazaki, J. (1996). Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. *Prostate* **28**, 318-24.
- Suzuki, H., Sato, N., Kodama, T., Okano, T., Isaka, S., Shirasawa, H., Simizu, B. & Shimazaki, J. (1994a). Detection of human papillomavirus DNA and state of p53 gene in Japanese penile cancer. *Jpn J Clin Oncol* **24**, 1-6.
- Suzuki, T., Shidara, K., Hara, F. & Nakajima, T. (1994b). High frequency of p53 abnormality in laryngeal cancers of heavy smokers and its relation to human papillomavirus infection. *Jpn J Cancer Res* **85**, 1087-93.
- Svanvik, N., Westman, G., Wang, D. & Kubista, M. (2000). Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution. *Anal Biochem* **281**, 26-35.
- Swan, D. C., Tucker, R. A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M. F., Wideroff, L., Unger, E. R., Nisenbaum, R. A., Reeves, W. C. & Icenogle, J. P. (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* **37**, 1030-4.
- Syrjanen, K. J. (1986). Human papillomavirus (HPV) infections of the female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Pathol Annu* **21 Pt 1**, 53-89.
- Syrjanen, K. J. (1996). Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **65**, 45-53.
- Syrjanen, S. (2003). Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol* **192**, 123-8.
- Syrjanen, S. M. & Syrjanen, K. J. (1999). New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* **31**, 175-87.
- Tan, H. H. & Goh, C. L. (2006). Viral infections affecting the skin in organ transplant recipients: epidemiology and current management strategies. *Am J Clin Dermatol* **7**, 13-29.
- Tan, S. H., Gloss, B. & Bernard, H. U. (1992). During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* **20**, 251-6.
- Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M. & Ito, Y. (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol* **63**, 1465-9.
- Tay, S. K., Jenkins, D., Maddox, P. & Singer, A. (1987). Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynaecol* **94**, 16-21.
- Tenti, P., Zappatore, R., Migliora, P., Spinillo, A., Maccarini, U., De Benedittis, M., Vesentini, N., Marchitelli, G., Silini, E. & Carnevali, L. (1997). Latent human papillomavirus infection in pregnant women at term: a case-control study. *J Infect Dis* **176**, 277-80.
- Thomas, K. K., Hughes, J. P., Kuypers, J. M., Kiviat, N. B., Lee, S. K., Adam, D. E. & Koutsky, L. A. (2000). Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types. *J Infect Dis* **182**, 1097-102.

- Tonon, S. A., Picconi, M. A., Bos, P. D., Zinovich, J. B., Galuppo, J., Alonio, L. V. & Teyssie, A. R. (2001). Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol* **21**, 129-34.
- Touze, A. & Coursaget, P. (1998). In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res* **26**, 1317-23.
- Touze, A., Dupuy, C., Mahe, D., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (1998a). Production of recombinant virus-like particles from human papillomavirus types 6 and 11, and study of serological reactivities between HPV 6, 11, 16 and 45 by ELISA: implications for papillomavirus prevention and detection. *FEMS Microbiol Lett* **160**, 111-8.
- Touze, A., El Mehdaoui, S., Sizaret, P. Y., Mougin, C., Munoz, N. & Coursaget, P. (1998b). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 16 variants affects yield of virus-like particles produced in an insect cell expression system. *J Clin Microbiol* **36**, 2046-51.
- Touze, A., Mahe, D., El Mehdaoui, S., Dupuy, C., Combata-Rojas, A. L., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y. & Coursaget, P. (2000). The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity. *FEMS Microbiol Lett* **189**, 121-7.
- Trottier, H. & Franco, E. L. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* **24 Suppl 1**, S1-15.
- Trottier, H., Mahmud, S., Costa, M. C., Sobrinho, J. P., Duarte-Franco, E., Rohan, T. E., Ferenczy, A., Villa, L. L. & Franco, E. L. (2006). Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 1274-80.
- Tseng, C. J., Liang, C. C., Soong, Y. K. & Pao, C. C. (1998). Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol* **91**, 92-6.
- Tsukui, T., Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Lucci, J., 3rd, Contois, D., Lawler, P., Rush, B. B., Lorincz, A. T., Corrigan, A., Burk, R. D., Qu, W., Marshall, M. A., Mann, D., Carrington, M., Clerici, M., Shearer, G. M., Carbone, D. P., Scott, D. R., Houghten, R. A. & Berzofsky, J. A. (1996). Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* **56**, 3967-74.
- Tu, J. J., Kuhn, L., Denny, L., Beattie, K. J., Lorincz, A. & Wright, T. C., Jr. (2006). Molecular variants of human papillomavirus type 16 and risk for cervical neoplasia in South Africa. *Int J Gynecol Cancer* **16**, 736-42.
- Tyagi, S. (1996). Taking DNA probes into a protein world. *Nat Biotechnol* **14**, 947-8.
- Uchimura, N. S., Ribalta, J. C., Focchi, J., Simoes, M. J., Uchimura, T. T. & Silva, E. S. (2004). Evaluation of Langerhans' cells in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Obstet Gynecol* **31**, 260-2.
- Ueda, Y., Enomoto, T., Miyatake, T., Ozaki, K., Yoshizaki, T., Kanao, H., Ueno, Y., Nakashima, R., Shroyer, K. R. & Murata, Y. (2003). Monoclonal expansion with integration of high-risk type human papillomaviruses is an initial step for cervical carcinogenesis: association of clonal status and human papillomavirus infection with clinical outcome in cervical intraepithelial neoplasia. *Lab Invest* **83**, 1517-27.
- Unger, E. R., Vernon, S. D., Lee, D. R., Miller, D. L. & Reeves, W. C. (1998). Detection of human papillomavirus in archival tissues. Comparison of in situ hybridization and polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* **46**, 535-40.
- van den Brule, A. J., Meijer, C. J., Bakels, V., Kenemans, P. & Walboomers, J. M. (1990a). Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **28**, 2739-43.

- van den Brule, A. J., Snijders, P. J., Gordijn, R. L., Bleker, O. P., Meijer, C. J. & Walboomers, J. M. (1990b). General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* **45**, 644-9.
- van Duin, M., Snijders, P. J., Schrijnemakers, H. F., Voorhorst, F. J., Rozendaal, L., Nobbenhuis, M. A., van den Brule, A. J., Verheijen, R. H., Helmerhorst, T. J. & Meijer, C. J. (2002). Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int J Cancer* **98**, 590-5.
- van Ham, M. A., Bakkers, J. M., Harbers, G. K., Quint, W. G., Massuger, L. F. & Melchers, W. J. (2005). comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the Roche AMPLICOR HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol* **43**, 2662-7.
- van Hamont, D., van Ham, M. A., Bakkers, J. M., Massuger, L. F. & Melchers, W. J. (2006). Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol* **44**, 3122-9.
- Van Tine, B. A., Dao, L. D., Wu, S. Y., Sonbuchner, T. M., Lin, B. Y., Zou, N., Chiang, C. M., Broker, T. R. & Chow, L. T. (2004). Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4030-5.
- Vandenvelde, C., Verstraete, M. & Van Beers, D. (1990). Fast Multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis. *J Virol Methods* **30**, 215-27.
- Vernon, S. D., Unger, E. R. & Williams, D. (2000). Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J Clin Microbiol* **38**, 651-5.
- Villa, L. L. (2006). Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Rev Chilena Infectol* **23**, 157-63.
- Villa, L. L., Ault, K. A., Giuliano, A. R., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Brown, D. R., Ferenczy, A., Harper, D. M., Koutsky, L. A., Kurman, R. J., Lehtinen, M., Malm, C., Olsson, S. E., Ronnett, B. M., Skjeldestad, F. E., Steinwall, M., Stoler, M. H., Wheeler, C. M., Taddeo, F. J., Yu, J., Lupinacci, L., Railkar, R., Marchese, R., Esser, M. T., Bryan, J., Jansen, K. U., Sings, H. L., Tamms, G. M., Saah, A. J. & Barr, E. (2006a). Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine* **24**, 5571-83.
- Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Ault, K. A., Giuliano, A. R., Wheeler, C. M., Koutsky, L. A., Malm, C., Lehtinen, M., Skjeldestad, F. E., Olsson, S. E., Steinwall, M., Brown, D. R., Kurman, R. J., Ronnett, B. M., Stoler, M. H., Ferenczy, A., Harper, D. M., Tamms, G. M., Yu, J., Lupinacci, L., Railkar, R., Taddeo, F. J., Jansen, K. U., Esser, M. T., Sings, H. L., Saah, A. J. & Barr, E. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* **6**, 271-8.
- Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Paavonen, J., Iversen, O. E., Olsson, S. E., Hoyer, J., Steinwall, M., Riis-Johannessen, G., Andersson-Ellstrom, A., Elfgrén, K., Krogh, G., Lehtinen, M., Malm, C., Tamms, G. M., Giacoletti, K., Lupinacci, L., Railkar, R., Taddeo, F. J., Bryan, J., Esser, M. T., Sings, H. L., Saah, A. J. & Barr, E. (2006b). High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* **95**, 1459-66.
- Villa, L. L. & Denny, L. (2006). CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynaecol Obstet* **94 Suppl 1**, S71-80.
- Villa, L. L., Sichero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T. & Franco, E. L. (2000). Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* **81**, 2959-68.



- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Einenkel, J., Klaes, R., Ziegert, C., Melsheimer, P., Sartor, H., Horn, L. C., Hockel, M. & von Knebel Doeberitz, M. (2005). Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. *J Natl Cancer Inst* **97**, 1816-21.
- Voglino, G., Poso, F., Privitera, S., Parisio, F., Ghiringhello, B., Gordini, G., Chiara, G., Massobrio, M. & Fessia, L. (2000). [The role of human papillomavirus in cyto-histological practice: distribution and prevalence of high-risk strains (16, 18, 31, 33, and 35) in intraepithelial lesions and neoplasia of the uterine cervix]. *Pathologica* **92**, 516-23.
- Volpers, C., Unckell, F., Schirmacher, P., Streeck, R. E. & Sapp, M. (1995). Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J Virol* **69**, 3258-64.
- von Knebel Doeberitz, M. (2002). New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* **38**, 2229-42.
- Vousden, K. H., Androphy, E. J., Schiller, J. T. & Lowy, D. R. (1989). Mutational analysis of bovine papillomavirus E6 gene. *J Virol* **63**, 2340-2.
- Vousden, K. H., Doniger, J., DiPaolo, J. A. & Lowy, D. R. (1988). The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res* **3**, 167-75.
- Wabinga, H. R., Parkin, D. M., Wabwire-Mangen, F. & Namboze, S. (2000). Trends in cancer incidence in Kyadondo County, Uganda, 1960-1997. *Br J Cancer* **82**, 1585-92.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. & Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**, 12-9.
- Wallin, K. L., Wiklund, F., Angstrom, T., Bergman, F., Stendahl, U., Wadell, G., Hallmans, G. & Dillner, J. (1999). Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N Engl J Med* **341**, 1633-8.
- Wang-Johanning, F., Lu, D. W., Wang, Y., Johnson, M. R. & Johanning, G. L. (2002). Quantitation of human papillomavirus 16 E6 and E7 DNA and RNA in residual material from ThinPrep Papanicolaou tests using real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer* **94**, 2199-210.
- Wang, S. S. & Hildesheim, A. (2003). Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 35-40.
- Wang, X., Zhu, Q. & Rao, H. (1998). Maternal-fetal transmission of human papillomavirus. *Chin Med J (Engl)* **111**, 726-7.
- Watanabe, S., Kanda, T. & Yoshiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J Virol* **63**, 965-9.
- Watanabe, S. & Yoshiike, K. (1988a). Transformation of rat 3Y1 cells by a deletion DNA of human papillomavirus type 16 molecularly cloned from genomic DNA of a cervical carcinoma. *J Gen Virol* **69** (Pt 6), 1431-5.
- Watanabe, S. & Yoshiike, K. (1988b). Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *Int J Cancer* **41**, 896-900.
- Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., Joe, J., Camp, R. L., Rimm, D. L. & Psyrri, A. (2006). Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* **24**, 736-47.
- Weissenborn, S. J., Funke, A. M., Hellmich, M., Mallmann, P., Fuchs, P. G., Pfister, H. J. & Wieland, U. (2003). Oncogenic human papillomavirus DNA loads in human immunodeficiency virus-positive women with high-grade cervical lesions are strongly elevated. *J Clin Microbiol* **41**, 2763-7.

- Wells, S. I., Francis, D. A., Karpova, A. Y., Dowhanick, J. J., Benson, J. D. & Howley, P. M. (2000). Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *Embo J* **19**, 5762-71.
- Wentzensen, N., Vinokurova, S. & von Knebel Doeberitz, M. (2004). 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**, 3878-84.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T. & Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* **17**, 804-7.
- Wilson, R., Fehrman, F. & Laimins, L. A. (2005). Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **79**, 6732-40.
- Wingo, P. A., Ries, L. A., Rosenberg, H. M., Miller, D. S. & Edwards, B. K. (1998). Cancer incidence and mortality, 1973-1995: a report card for the U.S. *Cancer* **82**, 1197-207.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A. & Balis, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176-81.
- Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T. P. & Young, L. S. (2001). Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* **357**, 1831-6.
- Woodman, C. B., Collins, S. I. & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* **7**, 11-22.
- Wright, T. C., Bosch, F. X., Franco, E. L., Cuzick, J., Schiller, J. T., Garnett, G. P. & Meheus, A. (2006). Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. *Vaccine* **24 Suppl 3**, S251-61.
- Xi, L. F., Carter, J. J., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Lee, S. K., Adam, D. E., Kiviat, N. B. & Koutsky, L. A. (2002). Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 343-51.
- Xi, L. F., Kiviat, N. B., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Ho, J. & Koutsky, L. A. (2006). Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst* **98**, 1045-52.
- Yamada, T., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Munoz, N., Bosch, F. X. & Wheeler, C. M. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* **71**, 2463-72.
- Ylitalo, N., Josefsson, A., Melbye, M., Sorensen, P., Frisch, M., Andersen, P. K., Sparen, P., Gustafsson, M., Magnusson, P., Ponten, J., Gyllenstein, U. & Adami, H. O. (2000). A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res* **60**, 6027-32.
- Yoshinouchi, M., Hongo, A., Nakamura, K., Kodama, J., Itoh, S., Sakai, H. & Kudo, T. (1999). Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *J Clin Microbiol* **37**, 3514-7.
- Youde, S. J., Dunbar, P. R., Evans, E. M., Fiander, A. N., Borysiewicz, L. K., Cerundolo, V. & Man, S. (2000). Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A\*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* **60**, 365-71.
- Zehbe, I., Rylander, E., Strand, A. & Wilander, E. (1992). In situ hybridization for the detection of human papillomavirus (HPV) in gynaecological biopsies. A study of two commercial kits. *Anticancer Res* **12**, 1383-8.

- Zerbini, M., Venturoli, S., Cricca, M., Gallinella, G., De Simone, P., Costa, S., Santini, D. & Musiani, M. (2001). Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *J Clin Pathol* **54**, 377-80.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. & Jansen-Durr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**, 2323-30.
- Zhang, B. (2004). Design of FRET-based GFP probes for detection of protease inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 674-8.
- Zheng, Z. M. & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* **11**, 2286-302.
- Zhou, J., Gissmann, L., Zentgraf, H., Muller, H., Picken, M. & Muller, M. (1995). Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology* **214**, 167-76.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Davies, H., Crawford, L., Park, D. & Frazer, I. H. (1992). Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology* **189**, 592-9.
- Zhou, J., Sun, X. Y. & Frazer, I. H. (1993). Glycosylation of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* **194**, 210-8.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Louis, K. & Frazer, I. H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* **68**, 619-25.
- Zoodsma, M., Nolte, I. M., Schipper, M., Oosterom, E., van der Steege, G., de Vries, E. G., te Meerman, G. J. & van der Zee, A. G. (2005a). Analysis of the entire HLA region in susceptibility for cervical cancer: a comprehensive study. *J Med Genet* **42**, e49.
- Zoodsma, M., Nolte, I. M., Schipper, M., Oosterom, E., van der Steege, G., de Vries, E. G., Te Meerman, G. J. & van der Zee, A. G. (2005b). Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Gynecol Cancer* **15 Suppl 3**, 282-90.
- Zoodsma, M., Nolte, I. M., Te Meerman, G. J., De Vries, E. G. & Van der Zee, A. G. (2005c). HLA genes and other candidate genes involved in susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease. *Int J Oncol* **26**, 769-84.
- zur Hausen, H. (1996a). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1288**, F55-78.
- zur Hausen, H. (1996b). Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. *J Cancer Res Clin Oncol* **122**, 3-13.
- zur Hausen, H., Gissmann, L., Steiner, W., Dippold, W. & Dreger, I. (1975). Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*, 569-71.



# La vaccination contre les infections à papillomavirus

Deux vaccins prophylactiques contre les infections à papillomavirus chez la femme vont être commercialisés. Leur action devrait aboutir à une diminution très significative du nombre de cancers du col utérin dans le monde.

Jean-Luc Prétet\*, Eva Alvarez \*\*, Sylvain Monnier-Benoît \*, Antoine Touzé \*\*

La place de la vaccination dans la prévention et le traitement des maladies infectieuses est tout à fait pertinente. Dès lors, le fait que les papillomavirus (*human papillomavirus* [HPV]) soient responsables de lésions bénignes et malignes, en particulier au niveau du col utérin, permet de proposer des stratégies thérapeutiques ou de prévention fondées sur la vaccination contre l'agent responsable de ces pathologies. En réalité, l'impact d'une telle vaccination pourrait être plus important que prévu, car de nombreux carcinomes, autres que ceux du col utérin, sont associés à certains HPV.

Si la diversité génétique des papillomavirus est très importante, il faut avoir à l'esprit que le ciblage d'un nombre limité de génotypes (16, 31, 33, 18 et 45) permettrait, en théorie, d'éviter plus de 85 % des cancers. Bien entendu, ce sont aussi de nombreuses lésions précancéreuses qui pourraient être évitées, ce qui aurait pour effet de diminuer les coûts liés au dépistage et aux traitements chirurgicaux.

Deux approches vaccinales sont envisageables (fig. 1).

**La vaccination thérapeutique** vise à stimuler la production de cellules CD8 cytotoxiques ou lymphocytes T

cytotoxiques (CTL) [immunité à médiation cellulaire] capables d'éliminer spécifiquement les cellules infectées et/ou tumorales. L'élimination de ces cellules nécessite que les CTL reconnaissent les cellules infectées qui présentent des peptides viraux chargés sur leurs molécules du système du complexe majeur d'histocompatibilité de

## CE QUI EST NOUVEAU

- ➔ Avec une efficacité de 100 % contre le développement de lésions de haut grade associées aux HPV 16 et 18, le vaccin prophylactique devrait, en théorie, diminuer de 60 à 70 % le nombre de cancers du col utérin dans le monde.
- ➔ Quelques vaccins thérapeutiques sont très performants dans des modèles murins, ce qui laisse de bons espoirs, mais leur efficacité chez l'homme reste à démontrer.
- ➔ Des vaccins mixtes pourraient avoir des indications prophylactiques ou thérapeutiques.

\* EA3181, IFR 133, université de Franche-Comté, laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, CHU Jean-Minjoz, 25030 Besançon Cedex.

\*\* Inserm U618, université François-Rabelais, 37200 Tours Cedex. Courriel : jean\_luc.pretet@univ-fcomte.fr

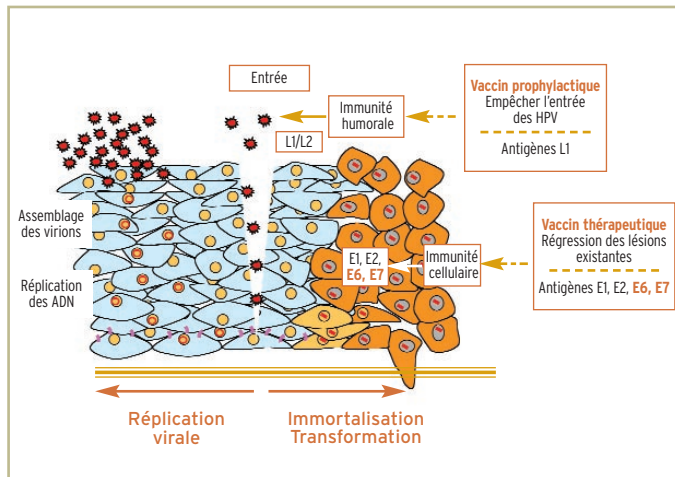


Figure 1

**Stratégies vaccinales.**

**La vaccination prophylactique** vise à induire la production d'immunoglobulines neutralisantes au niveau génital. Les papillomavirus ne pourront plus accéder à leurs cellules cibles ni les infecter. Les immunoglobulines, pour être efficaces, doivent être spécifiques des protéines de la capside virale. C'est pourquoi des pseudoparticules virales (*virus-like particles*) fabriquées à partir de la protéine majeure de capside L1 sont utilisées dans les vaccins.

**La vaccination thérapeutique** vise à induire des cellules cytotoxiques capables de reconnaître et d'éliminer spécifiquement les cellules infectées et/ou tumorales (en orange). Pour être efficaces, ces lymphocytes T cytotoxiques (CTL) doivent identifier des peptides viraux présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I des cellules infectées. Ces peptides seront issus des protéines virales précoces E6 ou E7.

classe I (CMHI). Plusieurs candidats vaccins sont à l'essai et utilisent comme antigènes essentiellement les protéines précoces E6 et E7 dont l'expression est étroitement liée à la progression tumorale. Pour qu'un vaccin thérapeutique soit efficace, il est nécessaire que l'épitope reconnu par les CTL puisse être présenté par un haplotype de CMHI exprimé par une majorité de la population.

**La vaccination prophylactique** vise à induire une immunité humorale qui, via la production d'immunoglobulines au niveau génital, est capable de neutraliser les HPV, les empêchant d'infecter leurs cellules cibles. Les antigènes vaccinaux sont dans ce cas dérivés de la protéine de la capside L1 et/ou L2 qui sont essentielles à l'entrée cellulaire des HPV. GlaxoSmithKline élabore un vaccin bivalent, Cervarix, ciblant les génotypes 16 et 18. Merck & Co et Aventis Pasteur MSD ont développé un vaccin tétravalent, Gardasil\*, dirigé contre quatre génotypes d'HPV : 16, 18, 6 et 11. Dans ce cas, non seulement le vaccin sera utile dans la prévention des lésions précancéreuses et cancéreuses mais aussi dans la prévention des condylomes acuminés externes.

Ces deux vaccins, dont les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau, sont composés de pseudo-particules virales (*virus-like particles* [VLP]) produites in vitro dans des cellules eucaryotes par expression de la protéine majeure de capside L1. En effet, cette protéine est capable de s'auto-assembler en VLP qui miment parfaitement la structure et l'antigénicité des capsides virales (fig. 2).

## LA VACCINATION THÉRAPEUTIQUE

Son objectif est de cibler une réponse immunitaire cellulaire contre des épitopes viraux présentés par les cellules infectées. Des travaux menés dans des modèles animaux, ou à partir de cellules mononuclées du sang périphérique d'individus sains, ont permis d'identifier un certain nombre d'épitopes immunodominants dans E6, E7 et E2 reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques en association avec le HLA-A2 ou HLA-B18.

## Vaccins peptidiques et protéiques

L'identification des épitopes immunodominants a mené au développement de ce type de vaccin. Ainsi, l'immunisation de souris transgéniques exprimant HLA-A2 avec trois peptides E7 (E7<sub>11-20</sub>, E7<sub>82-90</sub>, E7<sub>86-93</sub>) a permis d'obtenir une induction de CTL in vivo démontrant le caractère immunogène de ces peptides. Cependant, l'utilisation de ces peptides dans des essais cliniques n'a pas donné des réponses CTL significatives.<sup>1-4</sup>

Dans la mesure où les peptides vaccinaux sont souvent restreints à certains haplotypes du CMHI, en particulier le HLA-A\*201, des vaccins protéiques à base des protéines entières de E6 ou de E7 ont été élaborés. Des CTL sont bien induits dans des modèles murins, et une protéine de fusion E6/E7 administrée à des volontaires sains a permis de mettre en évidence une forte réponse cellulaire et humorale. Une étude restreinte dont la préparation vaccinale contenait E7 a montré une réponse cellulaire chez 3/5 des patientes ayant un cancer invasif, mais aucun bénéfice clinique n'a été constaté.<sup>5</sup>

Récemment, l'utilisation d'une protéine E7 couplée à l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis* a permis, chez la souris, une régression de tumeurs implantées dans 100 % des cas. L'effet adjuvant de la protéine bactérienne, qui permet de cibler les cellules dendritiques, serait en partie responsable de cette excellente activité thérapeutique.<sup>6</sup> De la même façon, une protéine E7 fusionnée à une protéine de choc thermique injectée à des patientes ayant des lésions classées CIN 3 (néoplasie cervicale intraépithéliale de grade 3) a donné des résultats encourageants, une réponse clinique complète ayant été observée chez 15 patientes sur 31.

\* La date de première autorisation de Gardasil est le 20/09/06. C'est un vaccin pour la prévention des dysplasies de haut grade du col de l'utérus (CIN 2/3), des cancers du col de l'utérus, des dysplasies de haut grade de la vulve (VIN 2/3) et des verrues génitales externes (condylomes acuminés) dus aux papillomavirus de type 6, 11, 16 et 18 (extrait du RCP). Le vaccin devra être utilisé sur la base des recommandations officielles qui ne sont pas encore publiées au moment de l'écriture de cet article.

### Vaccins vivants recombinants

Ce type de vaccin permet d'induire des réponses immunitaires plus importantes que les vaccins inertes. En revanche, leur utilisation est délicate, car la démonstration de leur innocuité est un préalable à toute utilisation chez l'homme : le risque infectieux doit être nul et les protéines vaccinales produites in vivo (E6 et E7) ne doivent avoir aucune activité oncogène.

Des vecteurs bactériens atténués comme *Salmonella typhimurium*,<sup>7</sup> *Listeria monocytogenes*<sup>8</sup> ou encore *Lactococcus lactis*<sup>9</sup> (dans ce cas le vaccin a été administré par voie nasale) ont été modifiés pour exprimer la protéine E7 d'HPV 16. Ils ont permis de protéger des souris contre le développement de tumeurs greffées, et ont permis la régression de tumeurs déjà installées.

Des virus recombinants ont aussi été utilisés avec de bons résultats : par exemple, le virus de la vaccine exprimant E6 ou E7 d'HPV 16 ou 18, des adénovirus recombinants pour E7 ou le virus de la forêt de Semliki, qui sont capables d'induire des CTL et dans certains cas d'empêcher la formation de tumeurs dans des modèles murins.<sup>10-12</sup> En revanche, l'immunisation par injection de virus de la vaccine recombinante chez 20 femmes porteuses d'un cancer du col avancé n'a permis d'obtenir une réponse cytotoxique que chez quatre d'entre elles et aucune régression tumorale n'a été constatée.

### Vaccins ADN

L'immunisation de souris à l'aide de plasmide codant E7 limite la croissance de tumeurs exprimant cette protéine.<sup>13-14</sup> La fusion d'une protéine de choc thermique bactérienne permet d'amplifier les réponses CTL spécifiques. De façon à se prémunir contre la restriction du CMH, des constructions codant plusieurs épitopes de E7 ont été réalisées et utilisées avec succès dans le modèle murin. Une étude clinique utilisant un plasmide codant une partie de E7 chez douze hommes porteurs de lésions anales a montré une réponse CTL chez dix d'entre eux et une régression histologique partielle chez seulement trois patients. Une étude en double aveugle contre placebo a montré un taux de résolution de lésions de haut grade supérieur au placebo uniquement chez les patientes de moins de 25 ans.<sup>15</sup>

### LA VACCINATION PROPHYLACTIQUE

Parce que la production des HPV in vitro est très difficile, car dépendante de l'état de différenciation des cellules, le développement de vaccins prophylactiques à base de virus atténués ou tués a été relativement lent. Une avancée fondamentale a été la découverte de l'auto-assemblage de la protéine majeure de capsid L1 en VLP lorsqu'elle est produite in vitro.<sup>16</sup> Ces VLP sont des candidats vaccins idéaux, car elles sont parfaitement inoffensives (dépourvues d'ADN viral et donc d'oncogènes), très immunogènes

(100 % de séroconversion et induction de forts titres d'anticorps sériques chez les humains) et n'induisent peu ou pas d'effets secondaires.

### Les modèles animaux

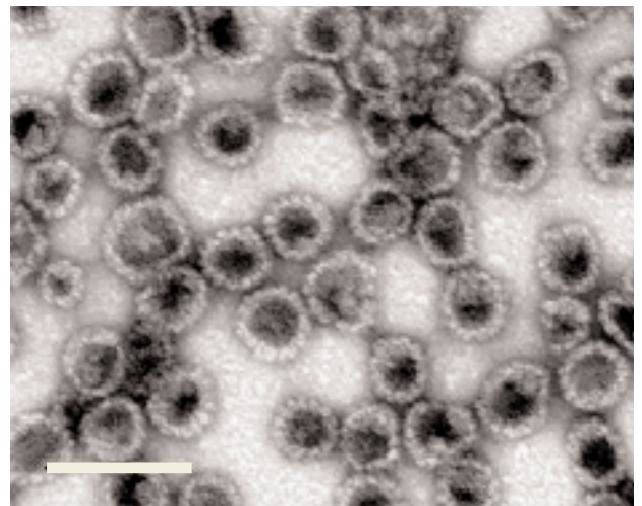
Il n'existe pas de bon modèle animal de l'infection humaine par les HPV. Néanmoins, plusieurs essais menés chez le chien, le lapin ou encore le veau ont permis de montrer l'excellente immunogénicité de ces VLP et des protections très efficaces contre le développement des lésions associées aux papillomavirus animaux correspondants.<sup>16</sup>

### Essais chez les humains

Forts de ces constatations, des essais de phase I menés chez les humains ont permis de montrer que les VLP induisaient de forts titres d'anticorps sériques et avaient peu d'effets secondaires. Les derniers résultats indiquent que les titres d'anticorps restaient supérieurs à ceux induits par une infection naturelle, cinq ans après la vaccination.

Le premier essai en double aveugle a été réalisé sur une cohorte de 1 500 jeunes femmes dont la moitié étaient vaccinées avec des VLP constituées de la protéine L1 de l'HPV 16. Une efficacité de 100 % contre les infections persistantes a été obtenue.<sup>17</sup> La preuve du concept étant faite, deux essais cliniques de phase II ont été entrepris dont les résultats ont été récemment publiés.<sup>18-19</sup> Les schémas de vaccination sont similaires avec trois injections intramusculaires de la préparation vaccinale aux mois 0, 1 ou 2 et 6.

Chez 1 113 femmes, le vaccin bivalent (HPV 16 et 18) a montré une efficacité de 91,6 % contre les infections incidentes, de 100 % contre les infections persistantes et de 92,9 % contre l'apparition de toute anomalie cyto-



**Figure 2** Pseudoparticules virales de papillomavirus de type 16 obtenues par expression de la protéine L1 en cellules d'insecte. La barre représente 100 nm.



## Caractéristiques des deux vaccins prophylactiques

	VACCIN BIVALENT	VACCIN TÉTRAVALENT
■ Protéine	L1	L1
■ Type	VLP	VLP
■ Système de production	Cellules d'insectes / baculovirus	Levures
■ Génotypes d'HPV inclus	16, 18	6, 11, 16, 18
■ Adjuvant	AS04 : hydroxyde d'aluminium et lipide A détoxifié	Hydroxyphosphate d'aluminium
■ Dose et voie d'administration	0,5 mL intramusculaire	0,5 mL intramusculaire
■ Calendrier	0, 1, 6 mois	0, 2, 6 mois
■ Nom commercial	Cervarix	Gardasil

**Tableau** VLP : virus-like particles.

gique associée à HPV 16 ou 18.<sup>18</sup> L'efficacité reste de 100 % contre une lésion de haut grade associée à ces deux génotypes. L'analyse des réactions croisées induites contre d'autres génotypes d'HPV à haut risque montre une efficacité contre toute infection incidente de 94 % pour l'HPV 45 et de 55 % pour l'HPV 31 (les génotypes les plus proches des HPV 18 et 16 respectivement).<sup>20</sup>

Le vaccin tétravalent (HPV 16, 18, 6, 11), testé pendant trois ans sur 277 femmes, a montré une efficacité de 100 % contre des lésions induites par les HPV 16, 18, 6 et 11 et de 89 % contre une infection persistante par l'un de ces génotypes.<sup>19</sup> L'efficacité est parfaite contre l'HPV 6 et atteint 86 à 89 % contre les infections par HPV 16 ou 18. L'analyse intermédiaire des données d'un essai de phase III incluant plus de 20 000 femmes montre qu'aucune lésion de haut grade associée avec un des deux génotypes à haut risque n'a été constatée. De la même façon, une excellente efficacité (99 %) contre le développement de lésions génitales externes (condylomes, dysplasies vulvaires) a été récemment observée.

## LES VACCINS MIXTES OU CHIMÉRIQUES

Depuis quelques années, des vaccins dits mixtes ou chimériques,<sup>21</sup> qui doivent à la fois stimuler l'immunité humorale et cellulaire, ont vu le jour. Plusieurs formats sont développés parmi lesquels des VLP modifiées génétiquement pour qu'elles incorporent tout ou partie de certaines protéines précoces des HPV (principalement E7). La difficulté réside dans le choix du site d'insertion de la protéine précoce dans la protéine de capsid et de la taille du fragment de la protéine précoce à insérer de façon à conserver les propriétés d'auto-assemblage et d'immunogénicité des VLP sauvages.

Quelques essais dans des modèles murins ont montré que ces vaccins permettaient soit d'éviter le développement de nouvelles tumeurs soit de ralentir la croissance tumorale mais rarement les deux effets simultanés. Chez l'homme, quelques essais ont été entrepris. Peu de bénéfices cliniques ont été enregistrés, même si des réponses cytotoxiques ont pu être mesurées. Malgré les difficultés techniques à surmonter pour élaborer un vaccin mixte efficace, il serait très attractif, car il pourrait être proposé aussi bien dans un but prophylactique que thérapeutique.

## QUESTIONS POSÉES PAR LA VACCINATION PROPHYLACTIQUE

La prochaine mise à disposition de vaccins prophylactiques anti-HPV permet d'envisager une vaccination large de la population féminine. Ce type de vaccination s'intègre uniquement dans la prévention primaire, la démonstration de l'efficacité des vaccins thérapeutiques devant encore être faite. Même si les vaccins prophylactiques anti-HPV 16 et 18 induisent quelques réactions croisées, un certain nombre de cancers (20 à 30 %) liés à d'autres génotypes ne pourront pas être évités. Par ailleurs, la durée de l'efficacité du vaccin n'est pas connue et la question d'un rappel se pose.

Qui et à quel âge doit-on vacciner ? Les jeunes filles constituent la population cible privilégiée. De façon idéale, la première dose de vaccin devrait être administrée à l'âge de 10-13 ans avant les premiers rapports sexuels, âge des premières règles, moment propice pour aborder les problèmes gynécologiques et de prévention des maladies sexuellement transmissibles. Les études d'impact social de cette vaccination ont établi que la grande majorité des parents concernés sont favorables à cette information et à la vaccina-

## POUR LA PRATIQUE

- ➔ Le vaccin thérapeutique qui vise à éliminer les lésions établies n'est pas encore disponible.
- ➔ Le vaccin prophylactique, d'ores et déjà disponible aux États-Unis, devrait faire son apparition sur le marché français fin 2006.
- ➔ Le vaccin bivalent vise à éviter les lésions précancéreuses et cancéreuses associées aux HPV 16 et 18. Le vaccin tétravalent permettra en plus de lutter contre les condylomes acuminés externes. L'adjuvant est différent entre les deux préparations vaccinales.
- ➔ Pour être efficace, le vaccin prophylactique doit être proposé aux jeunes femmes avant leur premier rapport sexuel. Médecins généralistes, gynécologues, dermatologues, pédiatres pourraient être impliqués dans cette vaccination.
- ➔ Les bénéfices de la vaccination prophylactique seront visibles dans plusieurs années compte tenu de la latence entre l'infection et le développement d'un cancer du col utérin. Le dépistage des lésions précancéreuses du col utérin doit se poursuivre.



## INFECTIONS À PAPILLOMAVIRUS VACCINATION

tion. Toutefois, il semble que les jeunes adolescentes se sentent moins concernées, du fait de leur ignorance des risques liés aux papillomavirus. Des efforts dans la communication autour de ces infections et de la vaccination doivent être faits, et plusieurs spécialités médicales (généraliste, pédiatre, gynécologue, dermatologue) doivent être impliquées.

Quels sont les effets de la vaccination chez les femmes ayant des infections persistantes ? Doit-on vacciner ou revacciner les femmes plus âgées déjà infectées mais indemnes de lésions ? Doit-on vacciner les hommes, qui sont considérés comme le réservoir et transmettent les HPV ?

L'impact réel de la vaccination prophylactique sur l'incidence des cancers associés aux papillomavirus ne sera connu que dans plusieurs années en raison du temps de latence très long entre l'infection et le développement du cancer. En attendant, les efforts pour améliorer le dépistage ne doivent pas être interrompus.

Enfin, le coût de ces vaccins sera sûrement un frein à leur mise à disposition dans les pays en voie de développement dans lesquels, pourtant, la prévalence du cancer du col de l'utérus est au moins dix fois plus importante qu'en Europe ou aux États-Unis. ■

*Jean-Luc Prétet déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.*

### SUMMARY Vaccination against human papillomavirus infections

The aim of vaccination against human papillomaviruses is to fight against benign lesions as well as cancers. Two vaccine strategies have been developed: therapeutic vaccines that induce cytotoxic T cells with the ability to eliminate infected/tumoral cells, and prophylactic vaccines that induce the production of neutralizing antibodies preventing HPV to infect their target cells. While the therapeutic strategies give good results in mouse model, their efficiency in human remains to be demonstrated. In contrast, data regarding prophylactic vaccines, already promising in animal models, show a significant benefit as no HPV16 nor 18 associated high grade lesions of the cervix occurred in vaccinated subjects participating to ongoing clinical trials. Who is going to vaccinate? What is the best target population to vaccinate, at which age? With or without a booster? And what about developing countries? Several issues remain to be addressed for an efficient implementation of HPV vaccination.

*Rev Prat 2006 ; 56 : 1914-8*

### RÉSUMÉ La vaccination contre les infections à papillomavirus

La vaccination contre les papillomavirus (HPV) doit permettre de lutter contre les lésions bénignes et les cancers. Deux approches sont possibles : thérapeutique, qui vise à induire des cellules T cytotoxiques capables d'éliminer des cellules infectées et/ou tumorales ; prophylactique, qui recherche la production d'anticorps capables de neutraliser les HPV avant qu'ils ne pénètrent dans les cellules cibles. Si de très bons résultats sont obtenus avec la vaccination thérapeutique dans des modèles animaux, son efficacité chez l'homme est loin d'être démontrée. En revanche, les données concernant la vaccination prophylactique, déjà très prometteuses chez l'animal, sont également excellentes chez l'homme, puisqu'à ce jour aucune lésion de haut grade du col utérin associée à HPV 16 ou 18 n'a été observée chez les femmes vaccinées. Qui vaccine ? Qui doit-on vacciner ? À quel âge ? Avec ou sans rappel ? Et quid des pays en voie de développement ? Autant de questions à résoudre pour que l'efficacité vaccinale soit maximale.

### RÉFÉRENCES

1. Steller MA, Gurski KJ, Murakami M, et al. Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* 1998;4:2103-9.
2. van Driel WJ, Rensing ME, Kenter GG, et al. Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer* 1999;35:946-52.
3. Rensing ME, van Driel WJ, Celis E, et al. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A \*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* 1996;56:582-8.
4. Muterspach L, Wilczynski S, Roman L, et al. A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive. *Clin Cancer Res* 2000;6:3406-16.
5. Frazer IH, Thomas R, Zhou J, et al. Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev* 1999;168:131-42.
6. Preville X, Ladant D, Timmerman B, Leclerc C. Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Res* 2005;65:641-9.
7. Londono LP, Chatfield S, Tindle RW, et al. Immunisation of mice using Salmonella typhimurium expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine* 1996;14:545-52.
8. Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y. Two Listeria monocytogenes vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol* 2001;167:6471-9.
9. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, et al. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* 2005;175:7297-302.
10. Boursnell ME, Rutherford E, Hickling JK, et al. Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* 1996;14:1485-94.
11. Daemen T, Riezebos-Brilman A, Bungener L, Regts J, Dontje B, Wilschut J. Eradication of established HPV16-transformed tumours after immunisation with recombinant Semliki Forest virus expressing a fusion protein of E6 and E7. *Vaccine* 2003;21:1082-8.
12. Meneguzzi G, Cerni C, Kieny MP, Lathe R. Immunization against human papillomavirus type 16 tumor cells with recombinant vaccinia viruses expressing E6 and E7. *Virology* 1991;181:62-9.
13. Tuting T, Gambotto A, DeLeo A, Lotze MT, Robbins PD, Storkus WJ. Induction of tumor antigen-specific immunity using plasmid DNA immunization in mice. *Cancer Gene Ther* 1999;6:73-80.
14. Shi W, Bu P, Liu J, Polack A, Fisher S, Qiao L. Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol* 1999;73:7877-81.
15. Garcia F, Petry KU, Muterspach L, et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2004;103:317-26.
16. Breitburd F, Coursaget P. Human papillomavirus vaccines. *Semin Cancer Biol* 1999;9:431-44.
17. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002;347:1645-51.
18. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus. *Lancet* 2004;364:1757-65.
19. Villa LL, Costa RL, Petta CA, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005;6:271-8.
20. Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006;367:1247-55.
21. Greenstone HL, Nieland JD, de Visser KE, et al. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1800-5.