

Université de Franche-Comté
Faculté de Médecine et de Pharmacie
Année Universitaire 2008-2009

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 15 Avril 2009,
par Maëlle SAUNIER
Née le 16 Septembre 1981 à Mâcon (Saône-et-Loire)

**Charge virale et intégration du génome d'HPV16 au cours de
l'histoire naturelle des lésions du col de l'utérus**

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Dr. Jean-Luc Prétet	Université de Franche-Comté (Besançon)
Rapporteurs :	Pr. Patrice Morand	Université Joseph Fourier (Grenoble)
	Dr. Michel Segondy	Université Montpellier 1
Examineurs :	Pr. Christine Clavel	Université de Reims Champagne-Ardenne
	Pr. Patrice Mathevet	Université Lyon 1
	Dr. Eric Peltier	Novacyt (Paris)
	Pr. Elisabeth Schwarz	DKFZ (Heidelberg, Allemagne)

PERMIS D'IMPRIMER

THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° 25.09.02

Présentée par Madame, Monsieur, SAUNIER Naëlle

Né(e) le 16/09/1981

et ayant pour titre :

Charge virale et intégration d'HPV16 au cours de l'histoire naturelle des lésions du col de l'utérus

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le 6 5 07

Le Directeur de l'U.F.R. S.M.P.

Le Directeur de Thèse,

Mme PREZET



Le Professeur E. SAMAIN

Résumé

Les Papillomavirus Humains à haut risque (HPV-HR) sont les agents étiologiques du cancer du col de l'utérus. Si une infection par un HPV-HR est nécessaire, elle n'est pas suffisante pour induire des lésions (pré)cancéreuses. Cette infection doit persister avec un même type d'HPV-HR durant plusieurs années pour conduire à l'apparition de lésions précancéreuses, et cette persistance peut être influencée par plusieurs facteurs liés à l'hôte (mise en place des réponses immunitaires), à l'environnement (tabagisme, parité...) ou au virus (génotype, charge virale, intégration virale). Ainsi, la détection d'un HPV-HR, même si elle permet d'identifier les femmes à risque, n'est pas suffisante pour prédire le développement de lésions précancéreuses du col de l'utérus.

Il existe un lien étroit entre l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus et l'histoire naturelle de l'infection par HPV. Si l'histoire naturelle des lésions est bien décrite sur le plan histologique et cytologique, l'histoire naturelle de l'infection est encore mal connue. Or une meilleure compréhension de l'histoire de l'infection est nécessaire pour identifier des marqueurs pertinents permettant d'identifier les lésions prévalentes et incidentes du col de l'utérus. Pour mieux comprendre les mécanismes de l'infection nous avons étudié certains paramètres viraux tels que le génotype, la charge virale et l'intégration de papillomavirus humains. Nous avons souhaité décrire l'évolution de facteurs viraux au cours de l'histoire naturelle des lésions et de définir leur implication dans l'évolution de l'infection vers le cancer du col de l'utérus qui est une conséquence rare de cette infection.

Nous avons montré dans une première étude qu'HPV16 était le second génotype le plus prévalent dans les lésions de bas grade en France et que ce génotype pourrait être associé à des lésions de mauvais pronostic. Puis nous avons montré dans 2 études, menées sur 2 sites différents, que la charge virale et l'intégration du génome d'HPV16 étaient corrélées au grade des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus et que la charge virale permettait d'identifier les lésions prévalentes de haut grade. Par ailleurs, nous avons mené un travail de validation intersites de la technique de PCR temps-réel permettant la détermination de la charge virale d'HPV16. Nous avons observé que la technique était robuste et que les variations de charges virales étaient minimales entre les deux sites, sous réserve qu'un soin particulier soit apporté à la conception des gammes d'étalonnage. Enfin, nous avons développé une technique de PCR temps-réel duplex permettant la quantification simultanée de l'ADN d'HPV16 et 18 qui sont les génotypes les plus fréquemment retrouvés dans les cancers du col de l'utérus. La comparaison entre les résultats de charge virale obtenus en PCR duplex 16/18 et ceux obtenus en PCR simplex 16/PCR simplex 18, ont révélés que la PCR duplex était une méthode précise pour la quantification de l'ADN de ces 2 génotypes.

Abstract

High-risk Human Papillomavirus (HR-HPV) are etiologic agents of cervical cancer. Even though HR-HPV infection is necessary, it is not sufficient to induce precancerous and cancerous lesions. Indeed, the infection must persist for several years to cause precancerous lesions, and this persistence is modulated by factors linked to the host (immune response setup), to the environment (smoking) and to the virus (genotype, viral load, integration). So even if the detection of an HR-HPV allows the identification of women at risk, it is not sufficient to predict precancerous and cancerous lesion development.

Infection natural history is linked with lesion history but if lesion natural history is well described on the histology and cytology side, the infection natural history has been poorly described. Nevertheless, a better understanding of the infection natural history is necessary to identify pertinent markers of prevalent and incident lesions. So we decided to describe viral factors such as genotype, viral load and integration, and to define their involvement in the evolution of the infection toward cervical cancer.

In a first study, we showed that HPV16 is the second most prevalent genotype in low grade lesions in France and that this genotype might be associated with poor prognosis lesions. Then, we showed, in 2 studies performed on 2 sites, that both viral load and integration were correlated with lesion grade, and that viral load may allow the identification of prevalent high grade lesions. In an intersite validation study we showed that variation of viral load measurement between the 2 sites were slight, as long as standards preparation was meticulous. In a last study, we developed a real time duplex PCR allowing the simultaneous determination of HPV16 and 18 viral loads, which are the most prevalent genotypes in cervical cancers. Comparison between viral loads obtained with this duplex PCR were very close from those obtained with simplex PCR targeting these 2 types, meaning that duplex PCR is a precise method for DNA quantification of HPV16 and 18.

Remerciements :

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein de l'équipe d'accueil EA3181 « Carcinogenèse épithéliale : marqueurs prédictifs et pronostiques » (Université de Franche-Comté et IFR133) dirigée par Madame le Professeur Christiane Mougin. Je la remercie vivement de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans de si bonnes conditions.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Jean-Luc Prétet, de m'avoir guidée et soutenue pendant ces quatre années. Je tiens aussi à lui exprimer ma gratitude pour sa présence et ses conseils, ainsi que pour m'avoir transmis sa rigueur et son enthousiasme.

Je tiens à remercier la Région Franche-Comté pour le financement de cette thèse sans lequel rien n'aurait été possible.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à

Monsieur le Professeur Patrice Morand, rapporteur,

Monsieur le Docteur Michel Segondy, rapporteur,

Madame le Professeur Christine Claver, examinateur,

Monsieur le Professeur Patrice Mathevet, examinateur,

Monsieur le Docteur Eric Peltier, examinateur,

Madame le Professeur Elisabeth Schwarz, examinateur,

pour avoir accepté de siéger dans le jury de cette thèse, et consacré leur temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail.

Un très grand merci à tous les membres, anciens et actuels, de l'EA3181 et du laboratoire de biologie cellulaire du CHU Jean Minjot : Sylvain mon mentor et le petit bonhomme en mousse, Jeff l'exilé et ses jolies photos, Claudine la reine des Mo. et ses fous rires, Magali et ses gentils post-it, Sylviane et Evelyne les plus gentilles, Manue et notre gastronomie du lundi, Cédric mon padawan ; mais aussi Sylvie, Isabelle, Fatima, Mohammed, JS, Emilie, Zélie, Sophie, Nicolas, Guillaume, Anne, Laurence, Françoise, Eva, Pascale, Hélène ; et enfin Marie-Laure et ses supers pouvoirs, avec qui j'ai partagé mon bureau ces quatre dernières années, merci pour ton soutien mais aussi pour tous ces bons moments, « this week.... is gonna be.... a GOOD week ! »

Enfin, je tiens à remercier mes parents, ma sœur (ma DA préférée !), ma famille et mes amis, Marielle, Oriana, c'est grâce à vous que je suis arrivée au bout de cette thèse.

Figures.....	3
Tableaux.....	4
Abréviations.....	5
Partie 1 : Revue de la littérature.....	6
1. Papillomavirus et cancer du col de l'utérus :.....	7
1.1. Généralités sur les HPV :	7
1.2. Causalité HPV/cancer du col de l'utérus :.....	9
1.3. Histoire naturelle de l'infection à HPV et des lésions associées :.....	11
1.3.1. Contamination et transmission :	11
1.3.2. Entrée cellulaire et réplication virale :.....	12
1.3.3. Les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus :	14
1.3.4. Evolution des lésions précancéreuses du col de l'utérus :.....	16
1.4. Stratégies de dépistage des lésions du col de l'utérus :	18
1.4.1. Techniques de dépistage :	18
1.4.2. Organisation du dépistage en France :.....	21
1.5. Infection à HPV et persistance :	23
1.5.1. Facteurs liés à l'environnement :	23
1.5.2. Facteurs liés à l'hôte :.....	24
1.5.3. Facteurs viraux :	24
2. Facteurs viraux influençant la persistance de l'infection :	25
2.1. Infection par un HPV-HR :.....	25
2.1.1. Méthodes d'étude :.....	25
2.1.2. Apport de la détection des HPV-HR dans le dépistage du cancer du col de l'utérus :.....	27
2.2. Génotypes et variants :	29
2.2.1. Méthodes d'étude :.....	30
2.2.2. Classification des génotypes selon leur risque oncogène :.....	32
2.2.3. Distribution des génotypes :.....	32
2.2.4. Génotype et persistance :.....	34
2.2.5. Variants :	34
2.2.6. Co-infections :.....	35

2.2.7.	Apport du génotypage dans le dépistage et le suivi des lésions précancéreuses et cancéreuses :.....	36
2.3.	Charge virale :.....	37
2.3.1.	Méthodes d'études :	37
2.3.2.	Charge virale et stade lésionnel :.....	42
2.3.3.	Charge virale et risque de développement de lésions :.....	43
2.4.	Intégration :.....	45
2.4.1.	Protéines virales et carcinogenèse :.....	45
2.4.2.	Mutagenèse insertionnelle :.....	54
2.4.3.	Méthodes d'étude du statut physique du génome viral :	54
2.4.4.	Statut physique et lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus :.....	56
2.5.	Expression des protéines virales :	61
2.5.1.	Transcription :	61
2.5.2.	Traduction :	64
2.5.3.	Expression des transcrits E6/E7 :.....	65
3.	La vaccination :.....	70
4.	Objectifs :	74
Partie 2 : Travaux personnels		75
1.	Publication n°1 :	76
2.	Publications n°2 :.....	85
3.	Publication n°3 :	96
4.	Publication n°4 :	103
Partie 3 : Discussion et perspectives		111
Bibliographie		127
Annexes		151
	Publication n°5 :	152
	Publication n°6 :	160
	Publication n°7 :	167
	Publication n°8 :	175

Figures

Figure 1 : Organisation du génome des HPV - Exemple d'HPV16.....	8
Figure 2 : Représentation schématique de la jonction pavimento-cylindrique.....	14
Figure 3 : Aspects histologiques des lésions du col de l'utérus	15
Figure 4 : Schématisation de l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus	17
Figure 5 : Arbre phylogénétique des Papillomavirus.....	29
Figure 6 : Cinétique d'une réaction de PCR.....	38
Figure 7 : Principe de la quantification absolue par PCR en temps-réel.....	40
Figure 8 : Principe des sondes à hydrolyse Taqman.....	41
Figure 9 : Régulation de la transcription par la protéine virale E2..	46
Figure 10 : Modèle de l'intégration médiée par une réplication « en peau d'oignon »	52
Figure 11 : Carcinogénèse médiée par E7 et E6	53
Figure 12 : PCR Temps-réel E6 et E2	55
Figure 13 : Pourcentage d'échantillons abritant des formes intégrées en fonction du grade de la lésion ...	57
Figure 14 : Moyenne des pourcentages d'échantillons abritant des formes épisomales seules, mixtes et intégrées seules, selon le grade de la lésion.	59
Figure 15 : Estimation de Kaplan-Meier de la survie des patientes atteintes de cancer cervico-utérins.	59
Figure 16 : Epissage alternatif depuis le promoteur précoce chez HPV16	61
Figure 17 : Epissage alternatif depuis le promoteur tardif chez HPV16.	62
Figure 18 : Les transcrits d'HPV16.....	63
Figure 19 : Transcrits de E6FL, E6*I et E6*II.....	64
Figure 20 : Concordance inter-laboratoire pour la quantification de E6 HPV16 (étude préliminaire)	97
Figure 21 : Concordance intra- et inter-manipulateur à Besançon	99
Figure 22 : Concordance intra- et inter-manipulateur à Reims.....	100
Figure 23 : Concordance inter-laboratoire pour la quantification des gènes E6 et Albumine.	100
Figure 24 : Concordance inter-laboratoire pour la mesure de la charge virale normalisée.	101
Figure 25 : Répartition des moyennes des différences	101
Figure 26 : Sensibilité de la PCR ciblant E6 d'HPV16.	105
Figure 27 : Exemple de déviations obtenues pour les PCR 16 et 18 en simplex et en duplex.....	106
Figure 28 : Validation de la PCR duplex HPV16/18 sur des échantillons mono-infectés.	108
Figure 29 : Validation de la PCR duplex HPV16/18 sur des échantillons co-infectés par HPV16 et 18.....	109
Figure 30 : Seuils de charge virale et risques de lésions prévalentes et incidentes.	120

Tableaux

Tableau 1: OR des 4 HPV les plus fréquents (Munoz <i>et al.</i> , 2003)	9
Tableau 2 : Potentiel évolutif des lésions CIN1, CIN2 et CIN3	17
Tableau 3 : Classification de Bethesda	19
Tableau 4 : Pourcentage d'échantillons abritant des formes intégrées en fonction du grade de la lésion dans différentes études de la littérature.	57
Tableau 5 : Pourcentage d'échantillons abritant des formes épisomales seules, mixtes et intégrées seules, selon le grade de la lésion dans différentes études de la littérature.	58
Tableau 6 : Caractéristiques des études d'efficacité des vaccins (Schiller <i>et al.</i> , 2008)	71
Tableau 7 : Effet prophylactique des vaccins contre les infections et les lésions liées aux HPV ciblés	72
Tableau 8 : Variabilité, exprimée en pourcentage, de la mesure du nombre de copies d'HPV16 par rapport aux valeurs théoriques ($[\log \text{ valeur expérimentale} / \log \text{ valeur théorique}] \times 100$).	107
Tableau 9 : Variabilité, exprimée en pourcentage, de la mesure du nombre de copies d'HPV18 par rapport aux valeurs théoriques ($[\log \text{ valeur expérimentale} / \log \text{ valeur théorique}] \times 100$).	107
Tableau 10 : Corrélation cytohistologique des lésions du col de l'utérus	121

Abréviations

A

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

ADNc : ADN Complémentaire

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

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

APOT : Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN Messenger

ARNt : ARN de Transfert

ASC-H : Atypical Squamous Cells that cannot exclude HSIL

ASC-US : Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance

C

CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia

Cp : Crossing Point

Ct : Crossing Treshold

E

E6AP : E6-Associated Protein

E6FL : E6 Full Length

F

FRET : Förster ou Fluorescent Resonance Energy Transfer

H

HC2 : Hybrid Capture II

HIS : Hybridation *In Situ*

HPV : Human PapillomaVirus

HPV-BR : HPV Bas Risque

HPV-HR : HPV Haut Risque

HSIL : High grade Squamous Intraepithelial Lesion

L

LCR : Long Control Region

LIEBG : Lesion IntraEpithéliale de Bas Grade

LIEHG : Lesion IntraEpithéliale de Haut Grade

LSIL : Low grade Squamous Intraepithelial Lesion

O

OR : Odd Ratio

P

PCR : Polymerase Chain Reaction

POL : Phase Ouverte de Lecture

pRb : Retino-Blastoma tumor supressor Protein

V

VLP : Virus Like Particles

VPN : Valeur Prédictive Négative

UV : Ultra Violet

PARTIE 1 : Revue de la littérature

En 2005, dans le monde, 500 000 nouveaux cas de cancer du col de l'utérus ont été diagnostiqués et 260 000 décès ont été imputés à ce cancer (Parkin *et al.*, 2005). Il s'agit du 2^{ième} cancer au niveau mondial et du 1^{ier} cancer féminin dans les pays en voie de développement où 80% des cas sont identifiés. Dans les pays développés, ce cancer est le 7^{ième} à 9^{ième} cancer féminin en terme d'incidence (Clifford *et al.*, 2005a, Parkin, 2001, Pecorelli *et al.*, 2003). Cette différence est étroitement liée à la mise en place de politiques de dépistage des lésions précancéreuses du col de l'utérus. Par exemple en France, le dépistage a permis de réduire le nombre de nouveaux cas par an de 6000 en 1975 à 3000 en 2005 (Belot *et al.*, 2008). Le nombre de décès a par conséquent chuté de 2500 en 1975 à 1600 en 1995, à 1000 en 2005 (Belot *et al.*, 2008, Monsonego, 2007). Aujourd'hui, le cancer du col de l'utérus est, en France, le 10^{ième} cancer en terme de fréquence et le 15^{ième} en terme de mortalité (Belot *et al.*, 2008, Remontet *et al.*, 2003).

Si de nombreux cancers peuvent être expliqués par des caractéristiques personnelles ou des prédispositions génétiques, il est admis que des facteurs environnementaux sont à l'origine de la majorité des cancers. Le rôle de l'environnement dans l'apparition des cancers a été suspecté depuis longtemps. La prévalence élevée des cancers du scrotum chez les ramoneurs rapportée au 18^{ème} siècle a été associée à l'environnement professionnel. Plus récemment, d'autres associations entre facteurs d'exposition et risque de survenue d'un cancer ont été établies : c'est le cas par exemple du tabac et du cancer broncho-pulmonaire, des rayonnements UV et du mélanome. Parmi les facteurs environnementaux, on peut distinguer les facteurs chimiques comme la dioxine, les facteurs physiques comme les UV et les agents infectieux à l'origine de différents cancers. En 1999, zur Hausen a estimé que 15% des cancers étaient induits par des agents infectieux parmi lesquels les virus occupent une place prépondérante (zur Hausen, 1999). Le lien agent infectieux et cancer a été montré dans un certain nombre de cas : *Helicobacter pylori* et cancers gastriques, schistosome et cancer de la vessie, virus de l'hépatite B ou C et carcinome hépatique, virus d'Epstein-Barr et lymphome de Burkitt ou encore herpès virus type-8 et sarcome de Kaposi.

Le cancer du col de l'utérus est quant à lui causé par le papillomavirus humain (HPV). Le cancer est une conséquence rare de l'infection par un HPV mais l'infection est nécessaire au développement du cancer. Ceci représente une opportunité dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses puisqu'il est non seulement possible de rechercher des anomalies cellulaires mais aussi la présence d'une infection.

1. Papillomavirus et cancer du col de l'utérus :

1.1. Généralités sur les HPV :

Les papillomavirus (PV) appartiennent à la famille des *Papillomaviridae* et à l'heure actuelle 118 types ont été décrits et intégralement séquencés (de Villiers *et al.*, 2004). Ils infectent de nombreuses espèces de vertébrés supérieurs (léporidés, murins, canidés, félins, primates cervidés, ovins, bovins, équidés) et sont spécifiques de leur hôte (Jenson *et al.*, 1980) et il n'y a pas de transmission inter espèce (Jenson *et al.*, 1980). Quarante-deux papillomavirus, les PapillomaVirus Humain ou HPV (Human PapillomaVirus), sont spécifiques de l'Homme et appartiennent aux genres alpha, bêta, gamma, mu et nu.

Les HPV ont un tropisme pour les épithéliums malpighiens pluristratifiés de la peau et/ou des muqueuses. Ainsi, ils ont longtemps été classés selon leur tropisme muqueux ou cutané.

- au niveau cutané, on retrouve principalement des HPV appartenant aux genres bêta, gamma, mu et nu. Ils sont responsables de lésions bénignes, comme les verrues vulgaires (HPV1, 2 et 4) et ils sont aussi impliqués dans le développement de certains cancers de la peau (Aubin *et al.*, 2003). En effet, les HPV du genre bêta (en particulier HPV5 et 8) sont fréquemment retrouvés dans les carcinomes épidermoïdes de la peau chez des patients souffrant d'épidermodysplasie verruciforme. Par ailleurs, plus de 50% des patients greffés d'organe vont développer un cancer de la peau non mélanique et l'ADN d'HPV bêta est détecté dans plus de 90% de ces tumeurs.
- au niveau des muqueuses, on trouve principalement des HPV appartenant au genre alpha. Les HPV dits muqueux peuvent être classés selon leur potentiel oncogénique. Les HPV dits à Bas Risque (HPV-BR), comme HPV6 et HPV11, sont le plus souvent responsables de lésions bénignes telles que des condylomes acuminés alors que les HPV dits à Haut Risque (HPV-HR), comme HPV16 et HPV18, sont associés au développement de lésions précancéreuses et cancéreuses.

Les papillomavirus sont des virus de petite taille (50 à 55nm de diamètre), non enveloppés et leur capsid est composée de 72 capsomères disposés selon une symétrie icosaédrique (Brentjens *et al.*, 2002, Zheng & Baker, 2006). Le génome des HPV est constitué d'une molécule d'ADN double-brin de 7500 à 8000 paires de bases (Figure 1). Dix pourcent de ce génome constituent une région non-codante appelée LCR pour Long Control Region qui contient l'origine de réplication et des séquences régulatrices permettant l'activation ou la répression de la réplication virale et de la transcription. Cette région abrite notamment le promoteur des gènes précoces (p97 pour HPV16 et p105 pour HPV18)

Les différentes phases ouvertes de lecture (POL), qui sont portées par un seul brin, sont regroupées en 2 régions : E (Early) et L (Late). La région E, dont les POL couvrent près de 50% du génome, code des protéines non structurales exprimées de façon précoce. La région L code des protéines de capsid : L1 et L2 respectivement décrites comme protéine majeure et mineure.

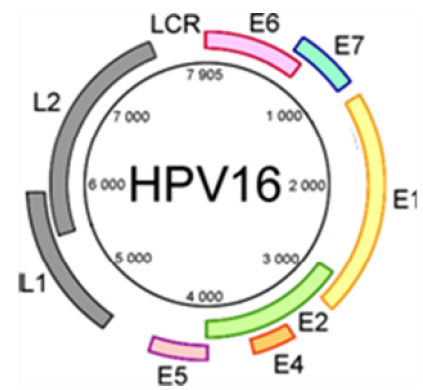


Figure 1 : Organisation du génome des HPV - Exemple d'HPV16

1.2. Causalité HPV/cancer du col de l'utérus :

Le lien de causalité entre les infections à HPV et le cancer du col de l'utérus est reconnu depuis les années 1990. De nombreuses études épidémiologiques ont démontré que des HPV étaient présents dans 90% à 100% des cancers du col de l'utérus (Bosch & de Sanjose, 2002, Bosch & de Sanjose, 2007, Bosch *et al.*, 1995, Herrington *et al.*, 1995, Munoz, 2000, Walboomers *et al.*, 1999). La preuve absolue d'un lien de causalité entre un facteur de risque et la survenue d'un cancer est fondée sur un ensemble de critères définis par Hill en 1965 (Hill, 1965). Le lien de causalité infection à HPV et cancer du col de l'utérus, a été évalué selon ces 9 critères (Bosch *et al.*, 2002) :

- **Force de l'association** : l'association entre la présence d'HPV et le cancer du col est l'une des plus fortes jamais observée pour un cancer humain. En effet, les odd ratios (OR = [Nbre d'exposés malades x Nbre d'exposés non malades]/[Nbre de non-exposés malades x Nbre de non-exposés non malades]) varient de 50 à 500 selon les études et selon les types d'HPV (de Roda Husman *et al.*, 1995, Gravitt & Manos, 1992, Munoz *et al.*, 2003, van den Brule *et al.*, 1990a). Les OR correspondant aux HPV les plus fréquemment détectés dans les cancers du col de l'utérus sont présentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1: OR des 4 HPV les plus fréquents (Munoz *et al.*, 2003)

Type	OR (95%CI)
HPV16	435 (278-679)
HPV18	248 (138-446)
HPV45	198 (92-426)
HPV31	124 (54-286)
Mono-infection tout type d'HPV	173 (122-244)

- **Temporalité de l'association** : ce critère se réfère au fait que la cause doit précéder l'effet (apparition de la maladie). Ceci est vérifié dans notre cas car l'infection par HPV précède l'apparition du cancer cervico-utérin de plusieurs années (Jacobs *et al.*, 2000, Zielinski *et al.*, 2001).
- **Constance et reproductibilité de l'association** : ce critère se réfère à l'observation répétée dans plusieurs études de l'association considérée entre facteur d'exposition et maladie. De nombreuses études démontrent cette association dans différents pays et différentes populations. A ce jour, il n'existe pas d'études publiées remettant en cause la causalité entre HPV et cancer du col de l'utérus.

- **Spécificité de l'association** : ce critère signifie qu'une cause ne doit conduire qu'à un seul effet. La plupart des études montrent qu'il n'y a pas d'autre facteur de risque indépendant du cancer du col de l'utérus que l'infection à HPV. En revanche, des cofacteurs peuvent modifier le risque des femmes infectées par HPV (facteurs environnementaux et facteurs liés à l'hôte, voir chapitre 2).
- **Relation dose-effet** : ce critère consiste en la présence d'une relation entre le niveau d'exposition au facteur considéré (ou dose) et le risque de développer la maladie étudiée (ou effet). Dans le cas du cancer du col de l'utérus, ce critère est vérifié puisque on sait que plus le nombre de partenaire sexuel est élevé (dose) plus le risque de développer une infection et donc une lésion du col de l'utérus est élevé (effet). De plus, le risque de cancer cervical pourrait être lié à la charge virale HPV. Les technologies permettant d'estimer la charge virale sont en cours de validation, et la compliance avec le critère de relation dose/effet nécessite d'être validée de façon plus poussée.
- **Plausibilité biologique de l'association et Cohérence biologique** : ces critères déterminent si l'association considérée est cohérente par rapport aux connaissances biologiques générales. L'association HPV et cancer cervico-utérin est plausible et cohérente avec les données actuelles (observations chez l'humain, expérience *in vitro* et *in vivo*). Les mécanismes de carcinogenèse liés à l'infection par HPV sont bien décrits et compris ; ils seront abordés dans le chapitre 2.4.1.
- **Présence de données expérimentales** : chez l'animal, il a été démontré que les PV étaient capables d'induire des papillomes et des cancers (Campo, 2002)
- **Analogie** : il s'agit de l'analogie par rapport à d'autres relations causales et à leurs mécanismes. L'association HPV/cancer du col de l'utérus est similaire à celle observée dans d'autres cancers : papillome et carcinome induits par les Papillomavirus chez l'animal, SV40 et tumeurs chez l'animal, hépatite C et cancer du foie chez l'Homme.

La revue des 9 critères de causalité indique que l'association entre HPV et le cancer du col de l'utérus est de nature causale.

1.3. Histoire naturelle de l'infection à HPV et des lésions associées :

1.3.1. Contamination et transmission :

Dans le monde, le nombre de sujets porteurs d'infection génitale à HPV est estimé à 300 millions. La contamination par HPV se fait principalement lors de rapports sexuels (Kjaer *et al.*, 2001). Les hommes, qui sont porteurs d'HPV dans 20 à 73% des cas (Dunne *et al.*, 2006), sont les principaux vecteurs des HPV chez la femme. Par conséquent, les infections à HPV au niveau génital sont exceptionnelles chez les femmes vierges (Andersson-Ellstrom *et al.*, 1994). La prévention de la transmission est très difficile car le virus peut être présent sur la plupart de la zone anogénitale. Cependant, l'utilisation d'un préservatif semble réduire les infections de 70% (Winer *et al.*, 2006). Enfin, en raison de la forte contagiosité du virus, plus de 60% des partenaires sexuels de personnes infectées par l'HPV développent des lésions viro-induites tels que des condylomes (Frega *et al.*, 1999).

Dans les infections à HPV, un phénomène d'auto-inoculation a aussi été rapporté. En effet, le virus peut se propager à d'autres sites après desquamation des cellules infectées. Ceci expliquerait le caractère multifocal de certaines lésions.

Enfin, il a été démontré que la transmission verticale de la mère à l'enfant est possible lors d'accouchement par voie basse (Cason *et al.*, 1995, Medeiros *et al.*, 2005). Il est estimé que 4 à 72% des nouveau-nés sont porteurs d'HPV si la mère est elle-même infectée. La transmission mère-enfant peut être directe, par contact entre les lésions maternelles et le fœtus (Puranen *et al.*, 1996), ou indirecte, par voie placentaire (Rombaldi *et al.*, 2008, Tseng *et al.*, 1998). Même si des HPV à haut risque peuvent être retrouvés chez le nouveau-né, ce sont le plus souvent des HPV à bas risque tels que HPV6 et HPV11. Dans de rares cas, ces HPV peuvent être responsables de papillomatose laryngée chez l'enfant. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de tumeurs bénignes, appelées papillomes, qui peuvent toucher tout le larynx, la trachée et les poumons

1.3.2. Entrée cellulaire et réplication virale :

Lors d'une infection, les papillomavirus humains atteignent leurs cellules cibles, les cellules basales de l'épithélium, soit au niveau de la jonction endo-exocol, soit à la faveur d'une microlésion (Orth & Favre, 1985). La particule virale se fixe alors à la cellule via 2 types de récepteur (Bousarghin *et al.*, 2003a): des récepteurs de type glycosaminoglycane (Combita *et al.*, 2001, Giroglou *et al.*, 2001, Selinka *et al.*, 2002, Shafti-Keramat *et al.*, 2003), et des récepteurs de type intégrine- $\alpha 6$ (Evander *et al.*, 1997, McMillan *et al.*, 1999). Après reconnaissance avec le récepteur, le virus entre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines (HPV16 et 58) (Bousarghin *et al.*, 2003b) ou des cavéoles (HPV31 et 33) (Bousarghin *et al.*, 2003b, Selinka *et al.*, 2002). La particule virale endocytée est alors acheminée vers le noyau grâce à des interactions entre les protéines virales E4, E1 et L1 et le réseau de microtubules et de filaments d'actine. Au niveau du noyau, l'ADN viral décapsidé entre dans le noyau grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire présents sur les protéines L1 par un mécanisme encore mal connu mais dépendant de la protéine virale L2 (Bousarghin *et al.*, 2002, Doorbar, 2005, Nelson *et al.*, 2000, Nelson *et al.*, 2002, Selinka *et al.*, 2002).

Le cycle viral des HPV est étroitement lié au cycle de la cellule hôte. En effet, le cycle viral dépend de l'état de différenciation des kératinocytes infectés. On distingue 4 phases :

- **phase d'établissement** : c'est une étape non productive qui a lieu dans les cellules basales de l'épithélium. Le génome viral est amplifié de façon limitée (50 à 200 épisomes par cellule) et la transcription des protéines virales est faible (De Geest *et al.*, 1993). Durant cette phase, le génome viral est peu répliqué en raison d'une faible expression de E1 et E2 (Wilson *et al.*, 2005).
- **phase de prolifération** : dans les épithéliums sains, les cellules basales migrent vers les couches suprabasales de l'épithélium où elles se différencient en kératinocytes. Elles arrêtent alors, normalement, de proliférer, leur cycle cellulaire étant bloqué avant l'entrée en phase S. Dans les cellules para-basales infectées par HPV, cet arrêt de prolifération est aboli par l'expression des oncoprotéines virales E7 et E6 qui vont stimuler la progression du cycle cellulaire par les phénomènes décrits dans le chapitre 2.4.1.
- **phase d'amplification du génome** : lors de cette phase, le génome viral est amplifié, notamment grâce à une production accrue des protéines virales E2 et E1 mais aussi E4 et E5 (Fehrmann *et al.*, 2003, Genther *et al.*, 2003, Peh *et al.*, 2004). La réplication du génome viral se met en place à partir d'une fourche de réplication, initiée au niveau de l'origine de réplication qui se situe sur le LCR. Toutes les protéines nécessaires à la réplication (ADN polymérase et

topoisomérases) sont présents dans la cellule hôte. Sous l'influence de E1 et E2, on assiste alors à une réplication intense de l'ADN d'HPV. Flores *et al.* ont démontré, par des techniques d'électrophorèse-2D, que la réplication de l'ADN viral se fait vraisemblablement selon le modèle du cercle roulant dans les cellules épithéliales différenciées (Flores & Lambert, 1997). Il a récemment été montré que la réplication du génome viral d'HPV18 avait lieu pendant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Wang *et al.*, 2009).

- **production de nouvelles particules virales** : parallèlement à l'amplification du génome viral, le promoteur tardif est activé dans les couches supérieures des épithéliums infectés, vraisemblablement sous l'influence de signaux cellulaires de différenciation ou encore de facteurs cellulaires de transcription (Spink & Laimins, 2005). Les deux protéines de capsid L1 et L2, dont les gènes sont placés sous le contrôle de ce promoteur, sont produites et s'accumulent. De nouvelles particules virales sont alors formées suite à l'encapsidation du génome viral. Les HPV ne sont pas des virus lytiques et sont donc libérés passivement lors de la desquamation des cellules épithéliales (Flores & Lambert, 1997). Après libération ils peuvent infecter de nouvelles cellules.

1.3.3. Les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus :

1.3.3.1. Col normal :

Le col de l'utérus est situé à extrémité inférieure de l'utérus qui s'ouvre sur le vagin. En son centre se trouve un orifice de quelques millimètres de diamètre, le canal cervical.

Sur le plan histologique, la paroi du col de l'utérus est constituée de 3 tuniques : une tunique périphérique, appelée adventice, une tunique moyenne fibromusculaire et une tunique superficielle, la muqueuse. Cette muqueuse est constituée de 2 épithéliums :

- un épithélium exocervical : c'est un épithélium pavimenteux malpighien non kératinisé pluristratifié qui recouvre l'exocol (partie intra-vaginale du col).
- un épithélium endocervical : c'est un épithélium cylindrique glandulaire unistratifié qui recouvre l'endocol (muqueuse du canal endocervical). Il est principalement constitué de cellules muco-sécrétantes, séparées du chorion par une lame basale.
- la zone de jonction pavimento-cylindrique (Figure 2) : c'est la zone de rencontre entre les 2 épithéliums. Théoriquement, il s'agit d'une jonction brutale avec un passage instantané du revêtement malpighien au revêtement cylindrique. En réalité, cette zone est constamment soumise à des modifications mécaniques et hormonales qui vont aboutir à la formation d'une région de transition, la zone de transformation. Cette zone de transformation correspond au remplacement de l'épithélium cylindrique par un épithélium squameux. Ce phénomène est appelé métaplasie malpighienne. La jonction pavimento-cylindrique est aussi une zone de fragilité mécanique et immunologique. Ainsi, c'est au niveau de cette jonction que naissent la majorité des lésions cervicales.

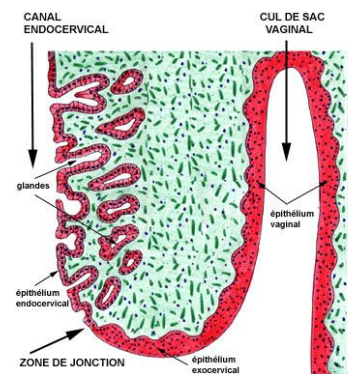


Figure 2 : Représentation schématique de la jonction pavimento-cylindrique

1.3.3.2. Condylomes cervicaux :

Les condylomes cervicaux sont des lésions prolifératives bénignes localisées sur le col de l'utérus. En général, les HPV à bas risque sont responsables de condylomes acuminés et les HPV à haut risque de condylomes plans (aussi dits maculaires ou diffus). Les condylomes acuminés présentent un aspect polypoïde et restent cantonnés aux couches superficielles de l'épithélium. Les condylomes plans sont, eux, considérés comme des lésions intra-épithéliales de bas grade (voir ci-dessous).

1.3.3.3. Dysplasies :

Le terme de dysplasie fut introduit par Reagan en 1956 (Reagan & Hamonic, 1956). Il désigne des anomalies dont l'aspect histocytologique est intermédiaire entre l'épithélium normal et le carcinome *in situ*. Elles sont dorénavant désignées sous le terme de CIN pour Cervical Intraepithelial Lesion. Ces lésions sont caractérisées par :

- une prolifération de cellules épithéliales indifférenciées, d'aspect basaloïde, basophile, de petite taille, avec des mitoses parfois anormales
- des atypies cytonucléaires
- une désorganisation de l'architecture de l'épithélium

Depuis 1968, la classification de Richart permet de diviser ces dysplasies en 3 « grades » selon la hauteur de l'épithélium présentant des anomalies (Richart, 1973) (Figure 3):

- CIN1 (dysplasies légères et condylomes plans) : 1/3 inférieur de l'épithélium
- CIN2 : 1/3 à 2/3 de l'épithélium
- CIN3/CIS : plus de 2/3 de l'épithélium

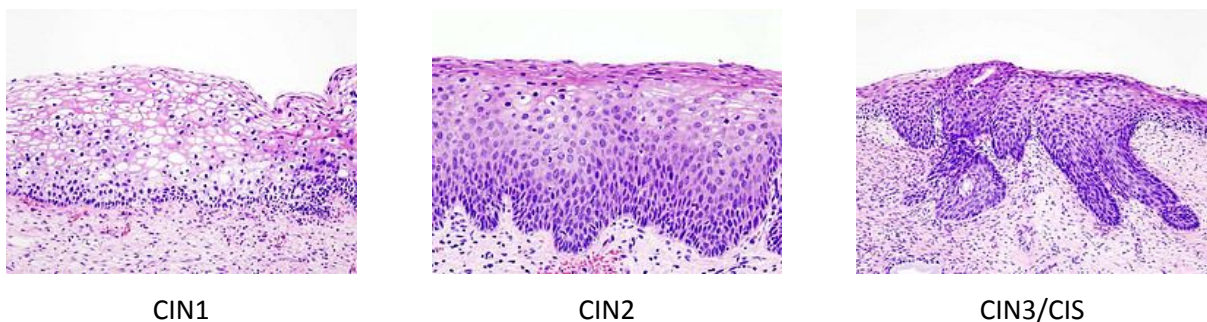


Figure 3 : Aspects histologiques des lésions du col de l'utérus (bioimage.free.fr)

1.3.3.4. Cancers invasifs :

Les cancers invasifs sont caractérisés par une effraction de la lame basale, et un envahissement du chorion sous-jacent, par les cellules tumorales. Il existe deux principaux types de cancers invasifs : le cancer invasif épidermoïde (ou malpighien) qui représente la majorité des cas (environ 85% en France) et l'adénocarcinome qui représente environ 15% (en France) des cancers infiltrants du col de l'utérus et qui se développe à partir de la muqueuse de l'endocol.

Les cancers du col de l'utérus, et en particulier les cancers épidermoïdes invasifs, sont généralement précédés d'une longue période de la maladie à l'état pré-invasif.

1.3.4. Evolution des lésions précancéreuses du col de l'utérus :

La plupart des infections à HPV sont éliminées par le système immunitaire, mais 4 à 10 % des femmes infectées vont développer des lésions précancéreuses ou cancéreuses (Koutsky, 1997, Schiffman & Brinton, 1995). L'apparition des lésions et leur évolution sont étroitement liées à la persistance de l'infection qui a été arbitrairement définie par deux prélèvements positifs en HPV à 12/18 mois d'intervalle (Franco *et al.*, 1999, Ho *et al.*, 1998, Moscicki *et al.*, 2006). Dans la plupart des cas, en particulier chez la femme de moins de 30 ans, les infections à HPV sont transitoires (Monsonogo, 2006, Moscicki *et al.*, 2006, Ostor, 1993, Schlecht *et al.*, 2003). En effet, la clairance virale est assez rapide, en moyenne 70% des infections disparaissent en 12 mois et 90% en 36 mois (Baseman & Koutsky, 2005, Ho *et al.*, 1998, Riethmuller *et al.*, 2002). La clairance virale est attestée par la non-détection de l'ADN viral par les tests disponibles. Les méthodes actuelles ne permettent cependant pas d'affirmer si le virus a été complètement éliminé ou s'il est sous forme latente et donc indétectable par manque de sensibilité.

Des lésions apparaissent, seulement en cas d'infection persistante. Il est admis depuis les années 70 (Richart & Barron, 1969) que le développement d'un cancer suit une progression CIN1 -> CIN2 -> CIN3 -> cancer (Figure 4). Ce processus est habituellement long et il se déroule sur une à deux décennies en moyenne.

Toutefois, des études longitudinales ont montré que des lésions de type CIN2/3 peuvent se développer en moins de 12 mois après le premier frottis anormal (Woodman *et al.*, 2001). De plus, Koutsky *et al.* ont montré que des CIN2/3 peuvent apparaître moins de 24 mois après le premier test HPV positif (Koutsky *et al.*, 1992). Ainsi, les stratégies de dépistage du cancer du col de l'utérus doivent aussi permettre le dépistage des lésions précancéreuses.

En 1993, Ostör (Ostor, 1993) a démontré que l'évolution de ces lésions dépendait étroitement de leur stade. En effet, 1% des CIN1, 5% des CIN2 et 12% des CIN3 vont progresser vers un cancer invasif. Lorsqu'elles ne progressent pas, les lésions peuvent soit persister, soit régresser (Figure 4 ; Tableau 2). Ces travaux ont été confirmés par deux études basées sur des résultats de cytologie (Liaw *et al.*, 1999) (Melnikow *et al.*, 1998).

Tableau 2 : Potentiel évolutif des lésions CIN1, CIN2 et CIN3 (d'après Ostor *et al.* 1993)

	CIN1	CIN2	CIN3
Taux de régression	60%	40%	33%
Persistance	30%	40%	55%
Progression vers CIN3	10%	20%	-
Progression vers envahissement	1%	5%	12%

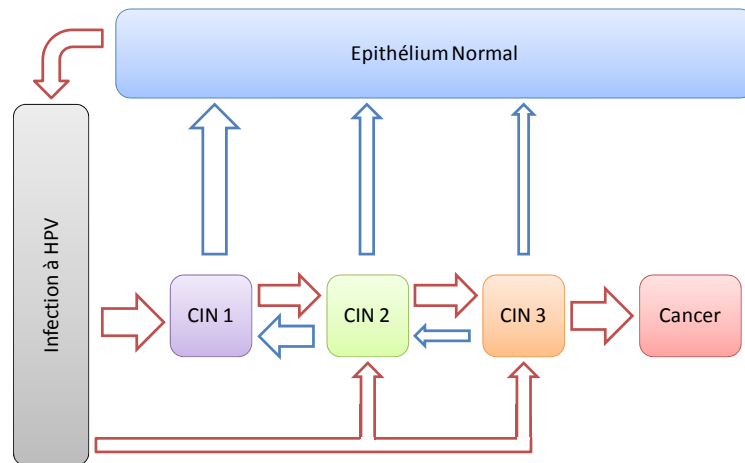


Figure 4 : Schématisation de l'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

En conclusion, la carcinogenèse du col de l'utérus est un processus long et multi-étapes. De ce fait, ce cancer est un bon candidat au dépistage car il est possible de détecter les lésions précancéreuses et de les traiter bien avant l'apparition d'un cancer.


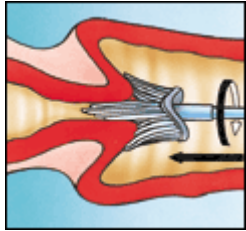
1.4. Stratégies de dépistage des lésions du col de l'utérus :

1.4.1. Techniques de dépistage :

Le diagnostic des lésions du col de l'utérus repose sur la confrontation de plusieurs examens : la cytologie pour dépister, la colposcopie pour repérer et l'histologie pour confirmer la présence d'une lésion.

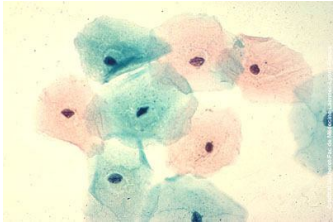
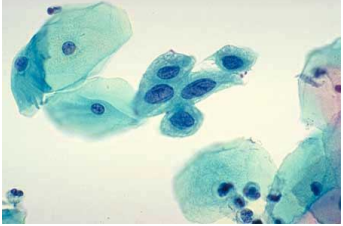
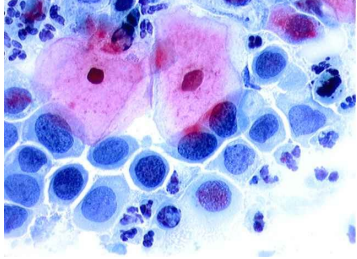
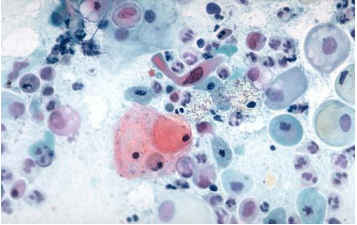
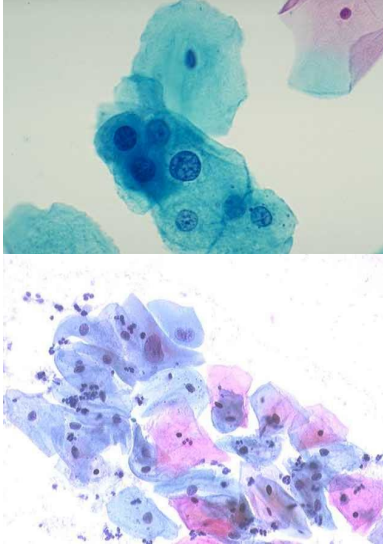
1.4.1.1. Cytologie :

Deux types de frottis sont utilisés pour observer les cellules du col de l'utérus :

- Le frottis conventionnel : les cellules endocervicales sont prélevées à l'aide d'une cytobrosse et les cellules exocervicales à l'aide d'une spatule d'Ayre. Les cellules recueillies par desquamation sont étalées sur une lame de verre, une par prélèvement (endo- ou exocervical). Les 2 lames sont ensuite séchées, fixées, puis colorées par la technique de Papanicolaou et observées au microscope. 
- Le frottis en phase liquide : un seul prélèvement est réalisé à l'aide d'une brosse permettant de recueillir à la fois les cellules de l'endocol et celles de l'exocol. Après rotation de cette brosse au niveau du col de l'utérus, elle est plongée dans un flacon contenant du liquide fixateur pour y déposer les cellules. Au laboratoire, la préparation des lames est semi-automatisée. Les lames sont ensuite colorées et observées au microscope. 

Différents systèmes de classification des frottis cervico-utérins se sont succédés. Aujourd'hui, c'est le système de Bethesda qui est recommandé pour formuler les résultats du frottis. Ce système prévoit de juger du caractère interprétable du frottis. Ainsi un frottis est jugé non interprétable si les lames ne sont recouvertes que d'un nombre limité de cellules, si la fiche de renseignement n'est pas remplie, ou si plus de 70% des cellules sont masquées par des cellules inflammatoires, des globules rouges, des superpositions cellulaires, un artefact de fixation. Les frottis interprétables sont divisés en 5 classes (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification de Bethesda

<p><u>Frottis négatifs pour une lésion intraépithéliale ou de signe de malignité</u></p> <p>Les frottis sont classés sous cette appellation lorsqu'ils sont normaux ou qu'ils présentent des anomalies mineures. Ces anomalies qui peuvent être d'origine inflammatoire, dystrophique ou atrophique, ne sont en aucun cas évocatrices de lésions précancéreuses.</p>	
<p><u>Frottis évocateurs de Lésions Intra-Epithéliales de Bas Grade</u> (= LIEBG ou LSIL pour Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion)</p> <p>Ces frottis, dits de bas grade, correspondent à des lésions condylomateuses ou des CIN1.</p>	
<p><u>Frottis évocateurs de Lésions Intra-Epithéliales de Haut Grade</u> (= LIEHG ou HSIL pour High Grade Squamous Intraepithelial Lesion)</p> <p>Ces frottis, dits de haut grade, correspondent à des lésions de type CIN2 et CIN3/CIS.</p>	
<p><u>Frottis évocateurs de carcinomes</u></p> <p>Ces frottis correspondent à des cancers invasifs.</p>	
<p><u>Atypies des cellules malpighiennes</u></p> <p>Ces frottis présentent des altérations cellulaires qui sont trop peu marquées ou trop peu nombreuses pour être classées dans une autre catégorie. On distingue les ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) dits de signification indéterminée et les ASC-H (Atypical Squamous Cells that cannot exclude HSIL) pour lesquels il n'est pas possible d'exclure la présence d'une lésion de haut grade. Il est estimé que 60% des frottis ASC-US correspondent à un col normal mais que 20 à 54% représentent une CIN1, 5 à 18% une CIN2/3 et 1% un cancer (Boulanger & Sevestre, 2006, Sherman <i>et al.</i>, 1999).</p>	

Cette technique a l'avantage de détecter les lésions précurseurs du col de l'utérus avec une spécificité clinique très élevée, de l'ordre de 90% (Clavel *et al.*, 2001, Schiffman *et al.*, 2000). En revanche, la sensibilité de cette technique est limitée puisqu'elle est, en moyenne, égale à 50% (Fahey *et al.*, 1995, Nanda *et al.*, 2000). La variabilité inter-observateurs a été améliorée par l'utilisation du système de Bethesda, mais elle reste tout de même importante (Stoler & Schiffman, 2001). La cytologie en milieu liquide a permis d'améliorer cette technique : suppression des artéfacts d'étalement, fixation immédiate et optimale, cellularité riche, et élimination des polynucléaires, des hématies. Des études ont montré que l'utilisation de la cytologie en milieu liquide améliore la moyenne des taux de détection cytologique de 50 à 122% pour les LIEBG et de 73 à 233% pour les LIEHG (Bernstein *et al.*, 2001, Limaye *et al.*, 2003). De plus la méta-analyse de Abulafia *et al.*, portant sur plus de 56 000 patientes, a montré que la sensibilité et la spécificité cliniques de la cytologie en milieu liquide étaient supérieures (de 68% à 76% et de 79% à 86% respectivement) à celle de la cytologie conventionnelle (Abulafia *et al.*, 2003). Toutefois, dans une récente méta-analyse portant sur 9 études et incluant plus de 30 000 patientes, Arbyn *et al.* ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les spécificités et les sensibilités obtenues en cytologie liquide ou classique (Arbyn *et al.*, 2008).

1.4.1.2. Colposcopie :

Les anomalies repérées lors de l'examen colposcopique (qui ne seront pas détaillées dans ce rapport) permettent de classer la zone de transformation en 2 classes : TAG1 (zone de transformation atypique de grade 1) et TAG2. En priorité, la colposcopie, permet l'observation de la zone de développement des lésions intra-épithéliales. Cet examen permet alors de diriger la biopsie dont l'étude anatomopathologique permet de préciser le diagnostic. La sensibilité de la colposcopie est meilleure que celle de la cytologie mais la spécificité est mauvaise (50%) pour les lésions de bas grade. De plus, l'examen colposcopique est subjectif et la qualité de l'observation dépend de l'expérience du praticien. Même pour les colposcopistes expérimentés, les variations inter-observateurs restent très importantes (Hopman *et al.*, 1995, Sellors *et al.*, 1990).

1.4.1.3. Histologie :

L'histologie peut être réalisée sur 2 types de prélèvement : une biopsie effectuée lors d'une colposcopie ou une pièce opératoire. Des modifications de l'architecture tissulaire, des modifications nucléaires ou encore des mitoses anormales sont recherchées au microscope. Les lésions associées aux HPV sont classées en 5

catégories : condylomatose, CIN1, CIN2, CIN3 et cancer invasif. Ces lésions ont été décrites dans le chapitre 1.3.3.

Cette technique à l'avantage d'être à la fois sensible et très spécifique. Cependant, la variabilité inter-opérateur peut parfois être importante (Stoler & Schiffman, 2001). De plus, le prélèvement tissulaire est un geste invasif qui est susceptible de modifier l'évolution de la lésion : excision partielle ou totale du tissu pathologique, saignements, phénomène de cicatrisation avec inflammation et afflux de cellules immunitaires (Bibbo *et al.*, 1989, Richart & Barron, 1969). Toutefois, le résultat histologique est à l'heure actuelle considéré comme un gold standard, c'est-à-dire qu'il est considéré comme le diagnostic définitif.

1.4.2. Organisation du dépistage en France :

Selon les recommandations de l'ANAES de 1990 (actualisées en 2002), le dépistage concerne les femmes de 25 à 65 ans, ayant ou ayant eu une activité sexuelle. Dans le cadre du dépistage systématique, un frottis tous les 3 ans correspond au rythme optimal de dépistage (en l'absence de détection d'anomalie). En début de dépistage, les deux premiers frottis doivent être réalisés à un an d'intervalle quel que soit l'âge où le dépistage commence.

En France, le dépistage n'est pas organisé, il est individuel, c'est-à-dire qu'il est laissé à la seule initiative de la patiente et de son médecin. Selon les chiffres publiés par l'Institut de veille sanitaire, entre 2003 et 2005, le taux de couverture moyen sur 3 ans n'a pas dépassé les 59%. Depuis une quinzaine d'années, cinq départements pilotes ont tenté de mettre en place un dépistage organisé : Isère, Haut-Rhin, Bas-Rhin, Martinique et Doubs (jusqu'en 2005). Les résultats sont très encourageants, cependant ces initiatives restent locales et sont isolées.

1.4.2.1. Prise en charge des frottis ASC :

Pour ce type de frottis, la prise en charge est différente selon le type : ASC-H ou ASC-US.

Concernant les ASC-H (ne permettant pas d'éliminer une lésion de haut grade), la probabilité de découvrir une lésion de haut grade sur la biopsie est élevée (environ 40%). Par conséquent, la patiente est référée en colposcopie pour qu'une biopsie soit effectuée.

Concernant les ASC-US, la probabilité de découvrir une lésion de haut grade sur la biopsie est plus faible (5 à 10%). Trois possibilités sont proposées : (i) pratiquer un frottis de contrôle à 6 mois puis, s'il est négatif,

un autre 6 mois plus tard. Si ces 2 contrôles sont négatifs, la patiente retourne à un dépistage de routine. Si non, elle est référée en colposcopie. (ii) adresser d'emblée la patiente en colposcopie. (iii) pratiquer un test HPV (description au chapitre 2.1.1). S'il est positif, soit dans 50% des cas, la patiente est référée en colposcopie. Si le test est négatif, toute lésion de haut grade peut être exclue mais un frottis de contrôle est réalisé un an plus tard avant de reprendre un dépistage classique.

1.4.2.2. Prise en charge des frottis LSIL :

Dans le cas de LSIL, le test HPV n'est pas recommandé car il serait positif dans 75 à 80% des cas. Les patientes ayant eu un frottis LSIL doivent être suivies car, même si dans 40% des cas la biopsie confirme une lésion de bas grade, dans 20% des cas une lésion de haut grade est découverte sur la biopsie. Le suivi de telles patientes peut être réalisé de 2 manières : (i) pratiquer un frottis de contrôle à 6 mois puis un autre 6 mois plus tard. Si ces 2 tests sont négatifs, un troisième est réalisé à un an. Si tout est négatif, la patiente retourne à un dépistage de routine. Si un des contrôles est positif, la patiente est référée en colposcopie. (ii) réaliser une colposcopie d'emblée. Si la colposcopie est satisfaisante et qu'aucune lésion grave n'est observée, un frottis est réalisé après un an et la patiente retourne à un dépistage classique. Si la colposcopie n'est pas satisfaisante, une nouvelle colposcopie est réalisée après traitement (traitement œstrogénique local ou curetage du col ou conisation à visée diagnostique).

1.4.2.3. Prise en charge des frottis HSIL :

Dans 80% des cas, la biopsie confirme une CIN2/3. La colposcopie d'emblée est donc recommandée.

1.4.2.4. Prise en charge des frottis évocateurs de cancer :

Après confirmation du diagnostic par l'étude histologique d'une biopsie puis d'une pièce de conisation, le traitement des cancers cervico-utérins se fait essentiellement par chirurgie associée ou non à une radiothérapie.

1.5. Infection à HPV et persistance :

L'infection par HPV est l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente. On estime qu'aux Etats-Unis, 70% des femmes sexuellement actives ont ou vont rencontrer un HPV (Baseman & Koutsky, 2005, Cates, 1999, Ho *et al.*, 1998). En Afrique, cette proportion atteint 95% (Bosch & de Sanjose, 2002, Koutsky *et al.*, 1992).

La prévalence médiane des infections à HPV chez la femme est de 15% mais elle varie de 2 à 44 % selon l'âge et la population étudiée (Bosch & de Sanjose, 2003, de Sanjose *et al.*, 2007, Franceschi *et al.*, 2006, Gjooen *et al.*, 1996). Un pic de prévalence est observé entre 20 et 25 ans avec 15 à 25% de femmes porteuses d'HPV. Après 35 ans, la prévalence chute puis un second pic peut être observé chez les femmes de plus de 50 ans (Bosch & de Sanjose, 2003, de Sanjose *et al.*, 2007). Au niveau géographique, les plus fortes prévalences sont observées en Afrique (22,1%) et en Amérique centrale (20,4%). En Europe et en Asie, les prévalences sont de 8,1% et 8,0% respectivement (de Sanjose *et al.*, 2007, Hoory *et al.*, 2008).

Ainsi, l'infection par HPV est très courante et elle peut être considérée comme le reflet d'une activité sexuelle. Elle est le plus souvent asymptomatique, mais cette infection peut persister et être la cause de lésions précancéreuses et cancéreuses chez 4% de la population (Koutsky, 1997).

La persistance d'une infection, qui concerne 10 à 20% des infections, par un HPV à haut risque constitue le principal facteur de risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (Bory *et al.*, 2002, Dalstein *et al.*, 2003, Kjaer *et al.*, 2002, Koshiol *et al.*, 2008, Wallin *et al.*, 1999, Ylitalo *et al.*, 2000). Plusieurs facteurs peuvent influencer la persistance : des facteurs liés à l'environnement, des facteurs liés à l'hôte et des facteurs liés au virus.

1.5.1. Facteurs liés à l'environnement :

Il est aujourd'hui démontré que le comportement sexuel de l'individu et/ou de son partenaire influence grandement le risque de l'acquisition d'un HPV et donc du développement de lésions précancéreuses et cancéreuses (Franco, 1995, Schiffman *et al.*, 1993). En effet, plus le nombre de partenaires sexuels est important, et plus le premier rapport sexuel est précoce, plus le risque de développer des lésions de haut grade est élevé (Collins *et al.*, 2005, Flores *et al.*, 2008, Herrero *et al.*, 2005, Ho *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré qu'une parité élevée (7 grossesses menées à terme ou plus) était associée à une augmentation du risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses (Munoz *et al.*, 2002, Vaccarella *et*

al., 2006). En effet, la grossesse va induire chez la future mère un état d'immunotolérance et des changements hormonaux qui peuvent favoriser la persistance de l'infection. Les changements hormonaux dus à la prise de contraceptifs oraux, peuvent eux aussi augmenter le risque (Moodley *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2003).

Enfin, d'autres facteurs environnementaux tels que le tabagisme ou l'alimentation sont considérés comme des cofacteurs pouvant influencer le risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses (Castellsague & Munoz, 2003, Castle *et al.*, 2002, Plummer *et al.*, 2003).

1.5.2. Facteurs liés à l'hôte :

La perturbation des défenses immunitaires locales et systémiques est considérée comme un facteur endogène majeur impliqué dans la carcinogenèse du col de l'utérus. Ceci est illustré par le fait que les patientes immunodéprimées (transplantées, VIH) ont un risque plus important de développer des lésions précancéreuses et cancéreuses que la population générale (Brown *et al.*, 2000, Critchlow *et al.*, 1998, Palefsky *et al.*, 1999, Socie *et al.*, 1998). Le cancer du col de l'utérus est par ailleurs considéré depuis 1993 comme l'une des maladies du stade SIDA (Berrebi *et al.*, 2008). De plus, des susceptibilités génétiques sont décrites, notamment concernant certains types HLA (Hildesheim & Wang, 2002, Mahmud *et al.*, 2007).

1.5.3. Facteurs viraux :

De nombreux facteurs viraux influencent la persistance de l'infection. Ces facteurs sont abordés dans un chapitre spécifique.

2. Facteurs viraux influençant la persistance de l'infection :

2.1. Infection par un HPV-HR :

Les HPV-HR sont les agents étiologiques des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. La recherche d'ADN d'HPV-HR dans les prélèvements cervico-utérins suscite donc un fort intérêt dans la mise en place de nouvelles stratégies de dépistage et de suivi de ces lésions.

2.1.1. Méthodes d'étude :

La mise en évidence des HPV est essentiellement réalisée par des techniques de biologie moléculaire. Elles ont pour objectif de mettre en évidence de l'ADN d'HPV et reposent sur l'hybridation d'une séquence nucléotidique connue par une sonde d'ADN ou d'ARN complémentaire.

2.1.1.1. Southern blot :

Cette technique a longtemps été la technique de référence pour l'identification de nouveaux génotypes. Elle consiste en la fragmentation de l'ADN extrait par des enzymes de restriction puis à la séparation des fragments obtenus, en fonction de leur taille, par électrophorèse. Les fragments sont ensuite dénaturés puis transférés et fixés sur une membrane de nitrocellulose. Le fragment d'intérêt, spécifique de l'HPV recherché, est révélé grâce à une sonde marquée. Les hybrides sont alors révélés par autoradiographie ou réaction colorimétrique. Cette technique est sensible car capable de détecter jusqu'à 1 copie pour 10 cellules, mais elle reste lourde et nécessite des quantités importantes d'ADN ; elle n'est donc pas utilisable en routine.

2.1.1.2. Hybridation *in situ* (HIS) :

Cette technique est réalisée sur des prélèvements cellulaires ou des tissus congelés ou fixés et inclus en paraffine. Cette technique permet à la fois de détecter les génomes d'HPV mais aussi de renseigner sur l'état physique du génome selon la morphologie du marquage. De plus, elle permet d'étudier la localisation des HPV par rapport à la lésion. Toutefois, l'HIS a une sensibilité relativement faible (20 à 50 copies par cellule) et c'est une technique longue et délicate. C'est pourquoi elle a été progressivement remplacée, dans les années 90, par des techniques plus sensibles, plus rapides et automatisables, telles que l'hybridation en phase liquide ou la PCR (Polymerase Chain Reaction).

2.1.1.3. Hybridation en phase liquide :

La méthode d'hybridation en phase liquide repose sur l'utilisation de sondes d'ARN permettant la détection simultanée de plusieurs types d'HPV. Après dénaturation de l'échantillon cellulaire, l'ADN est hybridé avec un cocktail de sondes ARN. Les hybrides sont ensuite capturés par des anticorps anti-hybrides adsorbés sur une microplaque. Après ajout d'un second anticorps anti-hybride couplé à une enzyme, la révélation est réalisée par addition d'un substrat chimioluminescent et l'intensité du signal émis est mesurée par un luminomètre. C'est sur ce principe que repose la trousse commerciale Hybrid Capture 2 ou HC2 (Digene, Gaithersburg, Etats-Unis). Cette trousse permet la détection simultanée de 13 types d'HPV à haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68) ou de 5 types d'HPV à bas risque (6, 11, 42, 43, 44). Cette trousse ne permet pas d'identifier spécifiquement le ou les types d'HPV présents dans l'échantillon. Ce test, qui a un marquage CE, a obtenu l'agrément de la FDA (« Food and Drug Administration ») en 1997 et de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé) en 1998.

2.1.1.4. PCR :

La détection des HPV par Polymerase Chain Reaction (PCR) présente l'avantage de nécessiter une faible quantité d'ADN de départ, d'être sensible, spécifique, rapide et en partie automatisable. Elle requiert néanmoins des locaux adaptés ainsi que des techniciens formés à la biologie moléculaire. Plusieurs types d'amorces permettant la détection des HPV ont été développés : des amorces spécifiques de types d'HPV et des amorces consensus.

Des amorces spécifiques de types d'HPV, permettant la détection d'un seul type, ont été tout d'abord utilisées (Shibata *et al.*, 1988). Par la suite, des PCR multiplexes, c'est-à-dire utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques de différents types d'HPV, ont été développées (Soler *et al.*, 1991, Vandenvelde *et al.*, 1990). Ces PCR, qu'elles soient multiplexées ou non, permettent seulement la détection des HPV ciblés.

C'est pour cette raison que des PCR utilisant des amorces consensus ont été développées. Ces PCR ciblent des régions très conservées du génome des HPV (notamment la région L1). Ainsi, ces PCR permettent l'amplification d'un large spectre de génotypes, de séquences connues ou inconnues (Snijders *et al.*, 1990). Les couples d'amorces consensus les plus utilisés depuis une dizaine d'années sont les amorces MY09/MY11, GP5/GP6 et SPF.

- **Amorces MY09/MY11 :** ce sont des amorces dégénérées (un nucléotide est incorporé de façon aléatoire à certaines positions lors de la synthèse) qui génèrent un amplicon de 450 paires de bases (Resnick *et al.*, 1990). Elles ont été améliorées par Gravitt et collaborateurs en 2001 (Gravitt *et al.*,

2001) afin d'améliorer la reproductibilité et la sensibilité de la réaction. Les amorces ainsi améliorées sont appelées PGMY09/11.

- **Amorces GP5/GP6** : ces amorces génèrent un amplicon de 150 paires de bases (Snijders *et al.*, 1991) (van den Brule *et al.*, 1990a, van den Brule *et al.*, 1990b). De part la petite taille des amplicons générés, ces amorces permettent d'amplifier l'ADN d'HPV même lorsque celui-ci est endommagé. Elles ont été améliorées par ajout de séquences très conservées en 3' des deux amorces afin d'augmenter la sensibilité analytique de 10 à 100 fois (de Roda Husman *et al.*, 1995). Les amorces ainsi améliorées sont appelées GP5+/6+.
- **Amorces SPF** : ces amorces, développées par Kleter en 1999 (Kleter *et al.*, 1999) génèrent un amplicon de 65 pdb. Elle permet la détection d'un large spectre d'HPV avec une forte sensibilité.

2.1.2. Apport de la détection des HPV-HR dans le dépistage du cancer du col de l'utérus :

Les études visant à étudier les apports de la détection des HPV dans le dépistage ont majoritairement utilisé des techniques d'hybridation en phase liquide ou des PCR utilisant des amorces consensus. Il a été démontré que la valeur prédictive négative du test HPV (HC2) pour une CIN3 est très élevée. En effet elle est supérieure à 99%, ce qui signifie qu'un test HPV négatif équivaut à la quasi-certitude que la patiente testée n'a pas de lésion de type CIN3 (Petry *et al.*, 2003). Lorsque le test est positif, il n'est en revanche pas possible d'affirmer qu'une lésion est présente puisque l'infection par HPV est très fréquente et le plus souvent asymptomatique. Chez les jeunes femmes, la prévalence est élevée et l'infection est souvent transitoire. Ainsi, un test HPV positif ne donnera pas toujours suite à des examens plus poussés. En revanche, chez les femmes plus âgées, à 35-40 ans, il est probable qu'un test HPV positif reflète une infection persistante. Dans ce cas, la patiente est considérée à risque de lésions prévalentes ou incidentes.

La recherche d'HPV peut se révéler très utile dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses dans le cadre de trois applications : le dépistage primaire, le dépistage secondaire et le suivi post-traitement.

Dépistage primaire :

De nombreuses études visant à comparer l'utilité de la cytologie et du test HPV (test HC2 pour la plupart) sont disponibles (Clavel *et al.*, 1999, Clavel *et al.*, 2001, Cox, 2006, Cuzick *et al.*, 2003, Cuzick *et al.*, 1995, Dalstein *et al.*, 2004, Dehn *et al.*, 2007, Koliopoulos *et al.*, 2007, Kulasingam *et al.*, 2002, Mayrand *et al.*, 2007, Naucler *et al.*, 2007a, Petry *et al.*, 2003, Schneider *et al.*, 2000, Wright *et al.*, 2007). Toutes ces études s'accordent sur le fait que le test HPV est 10 à 30% plus sensible que la cytologie. En revanche, la spécificité

du test HPV est légèrement plus faible que celle de la cytologie, notamment chez la femme jeune. C'est chez les femmes à partir de 30 à 35 ans que le test HPV serait le plus efficace ; en effet, dans ce groupe, la sensibilité est égale à 97% et la spécificité à 90%.

Selon les auteurs, le test HPV pourrait trouver sa place dans le dépistage primaire de deux façons : utilisé seul ou utilisé en complément à la cytologie :

- L'utilisation combinée de la cytologie et du test HPV permet d'atteindre une VPN de 100% (Dalstein *et al.*, 2004, Ratnam *et al.*, 2000, Schiffman *et al.*, 2000). Ainsi, il est possible d'augmenter sans risque l'intervalle de dépistage chez les patients ayant un frottis et un test HPV négatif (Dalstein *et al.*, 2004). De plus, la sensibilité de ce double test est égale à 100% (Mayrand *et al.*, 2007), ce qui signifie que toutes les lésions incidentes ont été identifiées. Cependant, comme l'a souligné Ronco *et al.* (Ronco *et al.*, 2006), cette augmentation de la sensibilité est négligeable par rapport au test HPV utilisé seul. L'intérêt majeur de la combinaison des 2 tests est qu'elle permet de réduire le risque de développer une lésion précancéreuse ou cancéreuse de 40% chez les femmes de 30 à 40 ans (Naucler *et al.*, 2007a).
- Le principal atout du test HPV utilisé seul est son faible indice coût/efficacité (Goldie *et al.*, 2001, Goldie *et al.*, 2004). En effet, l'utilisation du test HPV seul permettrait de réaliser des examens complémentaires seulement chez les femmes à risques, soit 10% des patientes.

Dépistage secondaire :

Lorsqu'une patiente présente une cytologie ASC-US, ASC-H ou encore LGSIL, des tests complémentaires (colposcopie et biopsie) sont nécessaires pour déterminer si une lésion est réellement présente. Or ces tests nécessitent une consultation supplémentaire avec des cliniciens formés à la colposcopie et la biopsie représente un acte invasif. De plus, 50% des ASC-US étant HPV négatifs, l'implémentation du test HPV permet d'éviter 50% des colposcopies (Riethmuller *et al.*, 1999, Schiffman & Solomon, 2003, Stoler, 2000, Stoler, 2003). Depuis 2004, le test HPV est recommandé et remboursé en France dans le cadre de la prise en charge des ASC-US.

Suivi post traitement :

Dans le cadre du suivi des femmes traitées pour une CIN, après conisation par exemple, le test HPV permet de détecter la persistance du virus et donc d'estimer la probabilité de récurrence de la lésion (Alonso *et al.*, 2006, Carter *et al.*, 2006, Lu *et al.*, 2006, Riethmuller *et al.*, 2008). Il a même été suggéré que les femmes avec une cytologie négative et un test HPV négatif, 6 mois après traitement d'une CIN, pouvaient être exemptées de nouveaux examens pendant 3 ans (Kitchener *et al.*, 2008).

2.2. Génotypes et variants :

Les papillomavirus sont classés selon les variations de séquence de la phase ouverte de lecture (POL) du gène L1 qui est le gène le plus conservé de ce virus. Chaque genre regroupe des papillomavirus présentant entre 45 et 60% d'identité génétique. Au sein d'un genre, on définit une espèce lorsque les différents PV ont une identité génétique atteignant 60 à 70%. Dans une même espèce on distingue alors : (i) les types, qui sont considérés comme tels si la POL de L1 est différente de plus de 10% du PV connu le plus proche ; (ii) les sous-types, qui ont une différence de séquence comprise entre 2 et 10% et (iii) les variants, qui ont une différence de séquence inférieure à 2%.

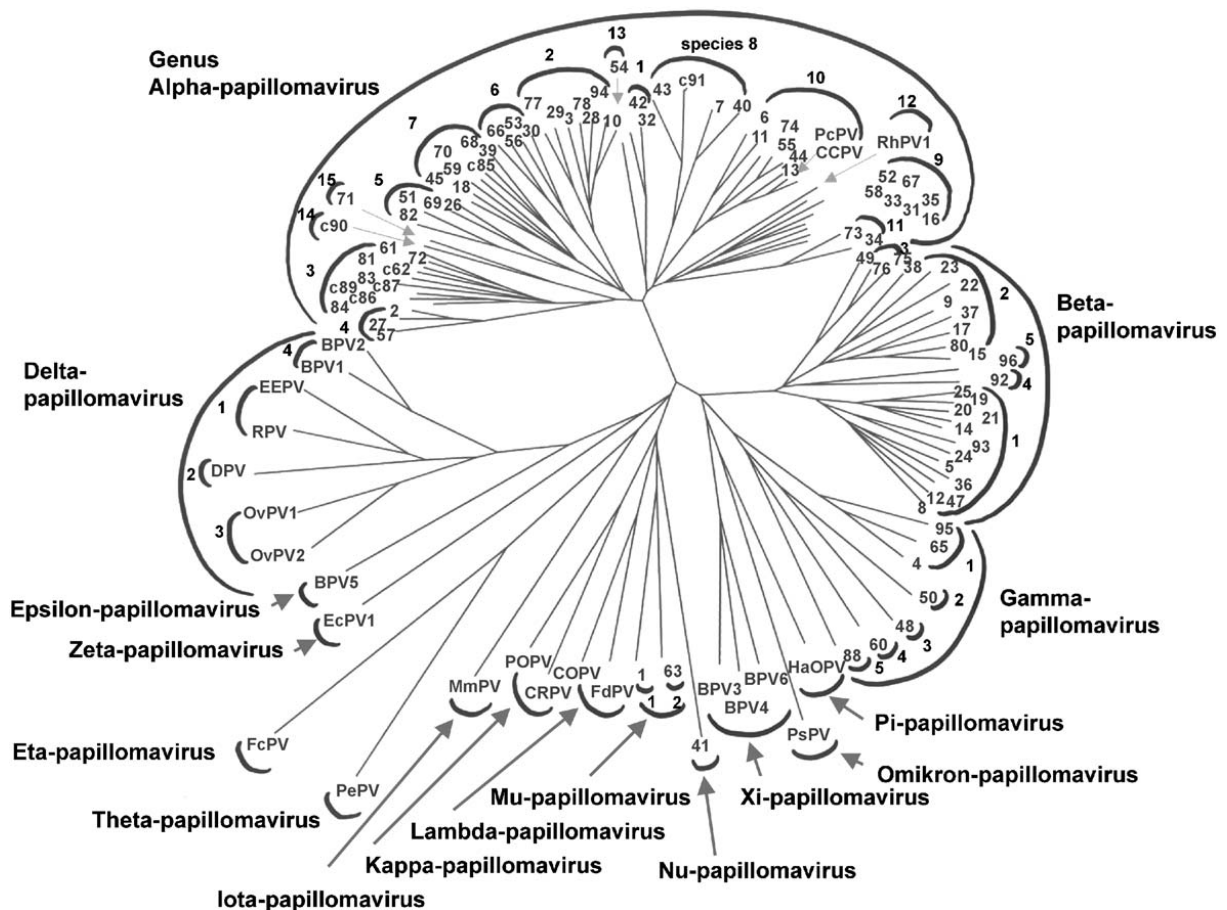


Figure 5 : Arbre phylogénétique des Papillomavirus (de Villiers et al., 2004)

2.2.1. Méthodes d'étude :

Pour identifier les HPV présents dans un échantillon, un génotypage doit être réalisé. Plusieurs techniques sont disponibles :

- des techniques d'hybridation *in situ*
- des PCR spécifiques de type (multiplexées ou non)
- des PCR consensus suivies du clonage et du séquençage des produits des PCR
- des PCR consensus suivies, après dénaturation, d'une hybridation avec des sondes spécifiques : l'hybridation peut être réalisée sur membrane (blots, systèmes radioactifs ou froids), en solution (ELISA), sur micro-puits, sur bandelettes ou sur puce à ADN.
- des PCR consensus (GP5+/6+) suivies d'une hybridation avec des sondes à ADN et d'une révélation utilisant la technologie Luminex (Schmitt *et al.*, 2006)
- des PCR multiplexes suivies d'une hybridation sur puce à ADN et d'une révélation basée sur la technologie APEX (Gheit *et al.*, 2007, Gheit *et al.*, 2006)

Dans la suite de ce chapitre, 2 types de technologies seront décrites, les seules pour lesquelles des trousseaux commerciaux sont disponibles : l'hybridation inverse sur bandelette et les puces à ADN.

2.2.1.1. Hybridation inverse sur bandelette :

Les techniques d'hybridation inverse sur bandelettes (ou RLB pour « Reverse Line Blotting ») se basent sur l'utilisation d'amorces marquées à la biotine lors de la réaction de PCR. Les amplicons sont ensuite mis en contact avec une bandelette sur laquelle des sondes spécifiques de type d'HPV sont fixées. Les hybrides sont alors révélés par une réaction colorimétrique. Deux trousseaux commerciaux utilisent cette technique :

- Le test INNO-LiPA HPV genotyping test (Innogenetics, Gand, Belgique) qui, dans la version V2, permet de détecter 24 génotypes. Dans sa version améliorée, INNO-LiPA HPV genotyping test EXTRA, il permet de détecter 28 génotypes : 15 HPV haut risque (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 3 HPV potentiellement à risque (26, 53, 66), 7 HPV bas risque (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) et 3 types additionnels (69, 71, 74). Cette trousse commerciale, qui utilise des amorces consensus SPF, permet de réaliser un génotypage sur tout type de prélèvements. Le test est sensible et très spécifique (Kleter *et al.*, 1999, Melchers *et al.*, 1999).

- Le test Roche LINEAR-ARRAY HPV genotyping (Roche Diagnostic, Meylan, France) utilise des amorces consensus PGMY et permet de détecter 37 génotypes.

Ces deux trousse commerciales ont globalement des capacités similaires en termes de sensibilité et de spécificité de détection des différents génotypes (van Hamont *et al.*, 2006). Néanmoins, dans le cas de mono-infection et lorsque la charge virale est faible, c'est la trousse INNO-LIPA qui est la plus sensible (van Hamont *et al.*, 2006). De plus la trousse INNO-LIPA est plus adaptée pour le génotypage d'HPV présents dans des échantillons fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine.

2.2.1.2. Puces à ADN :

Récemment, des trousse 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 préalablement amplifiées par PCR. La détection des produits amplifiés est réalisée à l'aide de biopuces à ADN. A l'heure actuelle, 2 trousse commerciales utilisant cette technologie sont disponibles : la trousse Papillocheck HPV-Screening (Greiner Bio-One, Monroe, Etats-Unis) qui permet de détecter 24 génotypes et la trousse Clinical Arrays HPV Genotyping (Genomica, Madrid, Espagne) qui permet de détecter 35 génotypes.

Ces techniques ont permis d'étudier la prévalence des différents génotypes d'HPV dans le col sain et dans des lésions précancéreuses et cancéreuses. Les résultats obtenus dans diverses études ont été rassemblés et présentés sous forme de méta-analyses qui ont permis de classifier les types d'HPV selon leur risque oncogène, d'observer la prévalence des génotypes pour chaque type de lésion au niveau mondial ou à l'échelle de pays, mais aussi d'étudier l'influence du génotype, des variants et des co-infections sur la persistance de l'infection ou le développement de lésions (pré)-cancéreuses.

2.2.2. Classification des génotypes selon leur risque oncogène :

Des études épidémiologiques ont permis de classer les HPV selon leur risque (Odd Ratios) d'induction de cancer au niveau du col de l'utérus. Munoz *et al.* ont réalisé en 2003 une méta-analyse regroupant 11 études réalisées dans 9 pays et portant sur 1918 femmes avec un cancer invasif du col de l'utérus et 1928 femmes témoins (Munoz *et al.*, 2003). Cette analyse a permis de classer les HPV en 3 catégories :

- Les HPV à haut risque qui ont un fort potentiel oncogénique : HPV 16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82. Ce groupe est constitué des types d'HPV ayant un OR pour un cancer du col de l'utérus supérieur à 45.
- Les HPV probablement oncogènes : HPV 26, 53 et 66. Ce groupe est constitué de types ayant été identifiés chez 1 à 3 patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus mais chez aucune femme témoin.
- Les HPV à bas risque (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 et 81) qui n'ont pas de pouvoir oncogène. Certains types n'ont jamais été retrouvés dans des cancers (40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72) ou détectés 1 seule fois parmi les patientes atteintes de cancer (6, 11 et 81).

2.2.3. Distribution des génotypes :

Distribution des génotypes d'HPV dans les cancers invasifs :

La distribution des génotypes d'HPV dans les cancers invasifs a été récemment décrite dans 2 méta-analyses : une analyse de l'IARC (International Agency for Research on Cancer) regroupant 12 études effectuées dans 25 pays et portant sur 3 085 cas de cancers du col de l'utérus (Munoz *et al.*, 2004) et une analyse de Smith *et al.* regroupant 130 études effectuées dans 62 pays et portant sur 14 595 cas (Smith *et al.*, 2007).

Au niveau mondial, les HPV les plus fréquents dans les cancers invasifs sont les types : 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 et 58. Le génotype le plus courant est l'HPV16 (de 52% en Asie à 58% en Europe) suivi de l'HPV18 (de 13% en Amérique du Sud à 22% en Amérique du Nord). Les 6 génotypes suivants, en terme de fréquence mondiale, sont les types 31, 33, 35, 45, 52 et 58. Toutefois, l'importance relative de chacun de ces types diffère selon le continent ou le pays considéré. En France, la distribution des types est proche, avec par fréquence décroissante les HPV16 (73%), 18 (19%) , 31, 33, 68, 45, 52 et 58 (Pretet *et al.*, 2008a).

De plus, la distribution des génotypes d'HPV varie selon le type de cancer étudié : cancer invasif épidermoïde ou adénocarcinome. En effet, le type 18 est plus fréquemment retrouvé dans les

adénocarcinomes (37%) que dans les cancers invasifs épidermoïdes (11%) (Clifford *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2007).

Distribution des génotypes d'HPV dans les lésions de haut grade :

La distribution des génotypes d'HPV dans les lésions de haut grade a été décrite dans 2 principales méta-analyses : une analyse de Clifford *et al.* regroupant plus de 52 études portant sur 7 000 cas de lésions de haut grade (Clifford *et al.*, 2006) et une étude de Smith *et al.* regroupant 86 études et portant sur 7 094 cas (Smith *et al.*, 2007).

Au niveau mondial, les HPV les plus fréquemment retrouvés dans les lésions de haut grade sont, par fréquence décroissante : HPV16, 31, 33, 58, 18, 52, 35, 51, 56, 45, 6, 39 et 66. Les huit types les plus fréquents sont similaires à ceux observés dans les cancers à l'exception de HPV18 et HPV45 qui sont beaucoup moins fréquents que dans les cancers. En fonction des zones géographiques, la prévalence d'HPV16 varie de 34 à 52% et celle d'HPV18 de 6 à 10%. L'importance des autres types varie elle aussi en fonction de l'origine géographique des patientes étudiées. En France par exemple, la distribution des types dans les lésions de haut grade est par fréquence décroissante : HPV 16, 31, 33, 52, 51, 58, 35 et 18 (Pretet *et al.*, 2008b).

Distribution des génotypes d'HPV dans les lésions de bas grade:

La distribution des génotypes d'HPV dans les lésions de bas grade a été décrite dans la méta-analyse de Clifford *et al.* qui regroupe plus de 55 études et porte sur 8 308 cas (Clifford *et al.*, 2005b).

Au niveau mondial, les HPV les plus fréquemment identifiés dans les lésions de bas grade sont, par fréquence décroissante : HPV16, 31, 51, 53, 56, 52, 18, 66 et 58. Dans moins de 5% des LSIL, d'autres génotypes sont détectables, ce qui souligne la grande hétérogénéité de la distribution des génotypes dans les lésions de bas grade.

Distribution des génotypes d'HPV dans le col normal :

La distribution des génotypes d'HPV dans le col normal a été décrite dans la méta-analyse de de Sanjose *et al.* qui regroupe 78 études effectuées dans 38 pays (de Sanjose *et al.*, 2007). Sur les 157 879 femmes ayant une cytologie normale incluses dans l'étude, 10% sont HPV positives. Les HPV les plus fréquemment retrouvés chez ces femmes sont, par fréquence décroissante : HPV16, 42, 58, 31, 18, 56, 81, 35, 33, 45 et 52. De plus, parmi les HPV à haut risque, les génotypes 16, 18, 31, 58 and 52 représentent 50% des infections dans le monde.

2.2.4. Génotype et persistance :

Il a été démontré que les infections par des HPV à haut risque persistent 2 à 5 mois de plus que les infections par des HPV à bas risque (Franco *et al.*, 1999, Richardson *et al.*, 2003).

Parmi les HPV à haut risque, HPV16 va persister davantage que les autres génotypes (Ho *et al.*, 1998, Liaw *et al.*, 2001, Molano *et al.*, 2003, Woodman *et al.*, 2001). En effet, la clairance à 5 ans est de 92% tout génotype confondu contre 67% pour HPV16 (Elfgren *et al.*, 2000). De plus, au sein des HPV à haut risque, pour lesquels la clairance à 18 mois est de 65% en moyenne, l'HPV 16 persiste plus longtemps avec une clairance à 18 mois de 49% (Bulkmans *et al.*, 2007).

De part sa persistance, l'infection par HPV16 est associée à un risque important de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses. En effet, le risque cumulatif (à 2 ans) de développer une lésion de type CIN3 chez les femmes infectées par HPV16 et présentant un frottis ASC-US ou LSIL est égal respectivement à 32,5 et 39,1%, alors qu'il est de 8,4 et 9,9% chez celles infectées par un autre génotype (Castle *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que le risque cumulatif à 10 ans de développer une lésion de type CIN3 était de 17,2% chez les femmes infectées par HPV16, de 13,6% chez les femmes infectées par HPV18 et de 3% seulement chez les femmes infectées par l'un des 11 autres HPV haut risque détectés par la trousse HC2 (Khan *et al.*, 2005).

2.2.5. Variants :

Des études cas-témoin (Berumen *et al.*, 2001, Hildesheim *et al.*, 2001) et des études longitudinales (Villa *et al.*, 2000, Xi *et al.*, 2002, Xi *et al.*, 1997, Xi *et al.*, 2007) ont montré que les femmes infectées par les variants Africain 2 (Af2) et Asiatiques-Américains (AA) d'HPV16 ont un risque plus important de développer une lésion de haut grade que celles infectées par un variant Européen. De même, les femmes infectées par un variant Européen ou Asiatique-Américain d'HPV18 ont un risque plus important de développer une lésion de haut grade que celles infectées par un variant Africain.

Les femmes blanches ont plus de risque de développer une lésion de haut grade que les Afro-Américaines lors d'une infection par un variant Européen d'HPV16. Inversement, les femmes blanches ont moins de risque de développer une lésion de haut grade que les Afro-Américaines lors d'une infection par un variant Africain d'HPV16 (Xi *et al.*, 2007). Ceci peut s'expliquer par le fait que les variants Européens d'HPV 16 et 18 persistent plus longtemps chez les femmes blanches que chez les femmes Afro-Américaines et que les variants Africains d'HPV 16 et 18 persistent plus longtemps chez les femmes Afro-Américaines que chez les femmes blanches (Xi *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que ces variants ont co-évolué avec leur hôte, et

que cette évolution a permis la sélection de variants qui persistent le plus longtemps lors d'une infection dans une population donnée. En revanche, certaines études ont montré une augmentation du risque de développer un cancer associé aux variants non-Européens chez les femmes d'origine 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). Ces études suggèrent alors que les variants n'ayant pas co-évolué avec une population seraient plus pathogènes (Chen *et al.*, 2005).

Les raisons de ces différences sont peu claires mais elles seraient vraisemblablement liées au système immunitaire. Toutefois, les variants diffèrent aussi dans leur capacité à induire la dégradation de p53 et dans l'efficacité de transcription des oncogènes E6 et E7 (De la Cruz-Hernandez *et al.*, 2005, Ordonez *et al.*, 2004, Sichero *et al.*, 2005, Stoppler *et al.*, 1996). En effet il a été démontré que des clones cellulaires abritant le variant africain d'HPV18 produisaient plus de transcrits E6*I et moins de transcrits E6 complets que le clone de référence (abritant le variant Asiatique-Américain d'HPV18). Par ailleurs, une plus grande quantité de la protéine p53 a été détectée dans les cellules abritant le variant africain d'HPV18 (De la Cruz-Hernandez *et al.*, 2005).

2.2.6. Co-infections :

Au niveau du col de l'utérus, les co-infections par plusieurs types d'HPV sont très fréquentes puisqu'elles représenteraient 20 à 30% des infections (Bauer *et al.*, 1991, Franco *et al.*, 1999, Herrero *et al.*, 2000, Rousseau *et al.*, 2001). L'impact des co-infections sur la persistance n'est pas clairement établi.

En effet, certaines études ont montré que les multi-infections étaient le plus souvent associées à une persistance importante (Hoffmann *et al.*, 1998, Perrons *et al.*, 2005), et qu'une co-infection à HPV16 avec un autre type d'HPV entraînait une persistance d'HPV16 plus longue que lors d'une mono-infection à HPV16 (Woodman *et al.*, 2001). Il a été récemment démontré par Trottier *et al.* que les co-infections à HPV16 associées à un autre génotype persistaient en moyenne 3,5 mois de plus que les mono-infections à HPV16. De plus, il a été démontré que les multi-infections à HPV16 persistaient en moyenne 2,6 mois de plus que les multi-infections sans HPV16 (Trottier *et al.*, 2008).

En revanche, d'autres études indiquent que la persistance des infections est indépendante des co-infections (Rousseau *et al.*, 2001) (Liaw *et al.*, 2001). Il a aussi été démontré qu'une infection par HPV16 était associée à un risque accru de co-infection avec d'autres types d'HPV. Cependant il a été proposé que cela soit seulement représentatif d'une nouvelle exposition à un HPV différent (Liaw *et al.*, 2001).

2.2.7. Apport du génotypage dans le dépistage et le suivi des lésions précancéreuses et cancéreuses :

Le génotype semble être un facteur viral très important dans la persistance et donc pour définir le risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus.

A l'heure actuelle, seule la recherche d'HPV, et non le génotypage, est recommandée dans le cadre du dépistage et du suivi des lésions précancéreuses et cancéreuses. Toutefois, le test HPV a une spécificité limitée et une valeur prédictive positive faible. Pour augmenter la spécificité il serait donc envisageable de réaliser un génotypage systématique afin d'identifier les femmes les plus à risque telles que celles infectées par HPV16 et HPV18 (Guo *et al.*, 2008). Cependant, le génotypage est une technique onéreuse et ne peut donc pas être utilisé en dépistage primaire. Il serait donc plus judicieux d'introduire la recherche d'HPV16, 18 et 45 qui sont les génotypes les plus prévalents dans le cancer du col de l'utérus. Dans ce cadre, la société Digene/Qiagen a récemment mis sur le marché une nouvelle trousse permettant la détection simultanée des HPV16, 18 et 45 (Lepej *et al.*, 2007). Il est aussi envisageable de mettre en place d'autres techniques permettant de détecter ces 3 génotypes comme par exemple des techniques de PCR, qu'elles soient multiplexées ou non.

De plus, le génotype n'est pas le seul facteur viral impliqué dans la persistance de l'infection. En particulier, la charge virale est capable d'influencer la persistance de l'infection. C'est pourquoi, de nombreux auteurs se sont intéressés à la charge virale d'HPV16 et 18.

2.3. Charge virale :

2.3.1. Méthodes d'études :

2.3.1.1. Techniques semi-quantitatives :

Parmi les approches semi-quantitatives, c'est-à-dire ne permettant pas une quantification absolue mais capable de comparer une valeur par rapport à un calibrateur, on peut distinguer 3 techniques couramment utilisées dans la littérature :

- PCR spécifique de type avec migration sur gel d'agarose et observation de l'intensité des bandes révélées au bromure d'éthidium.
- PCR consensus suivie d'une hybridation avec des sondes spécifiques et de la mesure de l'intensité du signal après ajout d'un substrat (Southern blot, ELISA, Luminex).
- Hybridation en phase liquide (HC2) et mesure de la chimioluminescence. En effet, il existe une bonne corrélation entre les valeurs obtenues avec ce test (exprimées en unités relatives de fluorescence) et la charge virale en HPV16 obtenue par des méthodes de quantification absolue (Gravitt *et al.*, 2003a, Ho *et al.*, 2006, Pretet *et al.*, 2004). Toutefois, la quantification par cette approche est limitée à des échantillons dédiés et avec de faibles taux de co-infections.

Les techniques basées sur la PCR ont été beaucoup utilisées pour estimer la charge virale en HPV. En effet, la PCR permet de produire une grande quantité de fragments d'intérêt à partir d'une faible quantité d'ADN. Elle peut être réalisée avec succès sur un grand nombre d'échantillons : frottis ou lavages cervicaux-utérins, biopsies congelées, tissus inclus en paraffine etc. L'extrême sensibilité de cette technique (de l'ordre de 1 copie dans plusieurs centaines de cellules) permet l'amplification d'une très faible quantité d'ADN de départ (1 pg). De plus, elle est très spécifique, rapide et en partie automatisable. Toutefois, si elle n'est pas réalisée dans des conditions optimales, cette technique n'est pas adaptée à la mesure de la charge virale. En effet, lorsqu'on observe la cinétique d'une réaction de PCR, on peut distinguer 3 phases :

- la phase d'initiation (étapes 1 et 2 – Figure 6) : l'amplification se fait de façon linéaire et le nombre d'amplicons obtenu à la fin de chaque cycle de PCR n'est pas suffisant pour être quantifié.
- la phase exponentielle (étape 3 – Figure 6) : l'ADN est amplifié de façon exponentielle. Plus le nombre initial de copies du gène cible est élevé, plus la phase exponentielle sera atteinte rapidement. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, les échantillons doivent être analysés dans cette phase qui est la plus reproductible de la réaction de PCR.

- la phase d'amortissement (étape 4) suivie de la phase plateau (étape 5 – Figure 6). La phase plateau reflète une baisse de l'efficacité de d'amplification qui résulte en partie de l'inactivation thermique partielle de la polymérase et du fait que les produits nécessaires à l'amplification deviennent limitants. D'autres phénomènes sont aussi impliqués : réhybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces, et activation de l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase. Le nombre d'amplicons détectés durant cette phase n'est donc pas représentatif du nombre initial de copies.

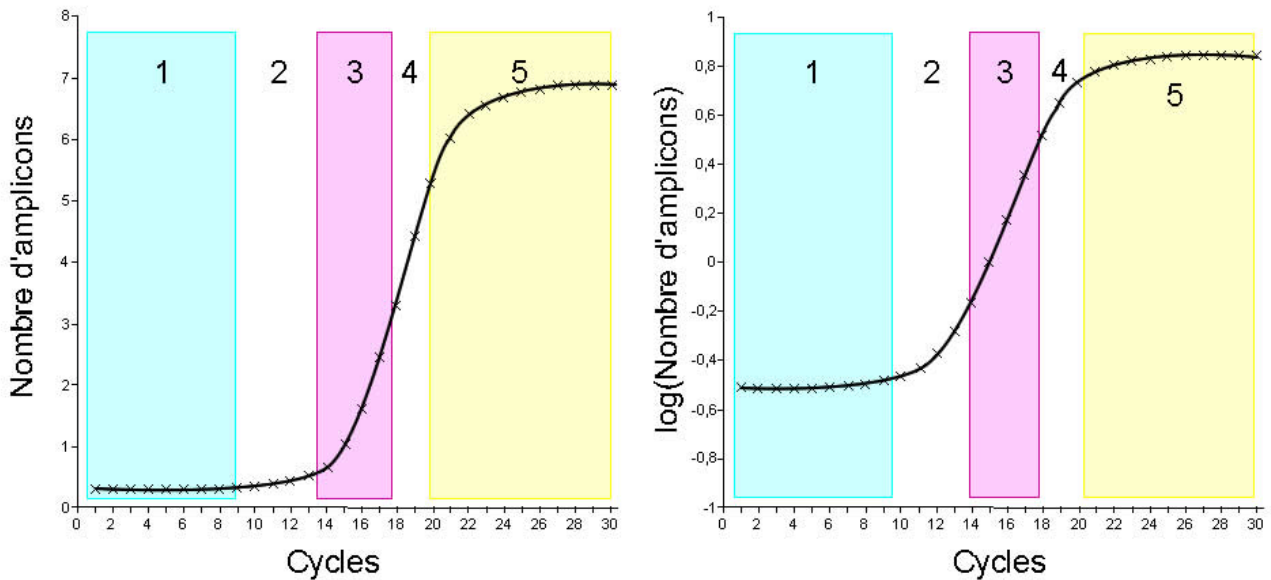


Figure 6 : Cinétique d'une réaction de PCR

Pour obtenir une mesure quantitative en PCR il est donc nécessaire de quantifier le nombre d'amplicons durant la phase exponentielle de la réaction. Or il est très difficile de savoir à partir de quel cycle la réaction entre en phase exponentielle puisque la cinétique de PCR est dépendante du nombre de copies initiales du gène cible. De nombreux auteurs ont étudié la charge virale en analysant le nombre d'amplicons obtenus à la fin de la phase plateau, et par conséquent, ces résultats peuvent être biaisés.

Il était donc nécessaire de mettre en place des outils permettant de suivre la cinétique de chaque réaction de PCR et c'est dans ce but que la PCR temps-réel a été développée dans les années 1990.

2.3.1.2. PCR temps-réel et mesure absolue de la charge virale :

Principe :

Le principe de la PCR quantitative en temps-réel repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification. Cette technique utilise une sonde fluorescente dont le signal est directement proportionnel à la quantité d'amplicons. En quantifiant la fluorescence émise à chaque cycle, il devient donc possible de suivre la cinétique de la réaction de PCR et notamment de mettre en évidence la phase exponentielle. C'est uniquement au cours de cette phase qu'il sera possible d'extrapoler la quantité de d'ADN cible initialement présente avant l'amplification. Le point de départ de la phase exponentielle est appelé cycle seuil optique. Le cycle seuil optique est le nombre de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise est supérieure à une valeur seuil significativement différente du bruit de fond. Le cycle seuil optique, appelé Ct pour Crossing Threshold ou Cp pour Crossing Point, est un point remarquable de la cinétique d'amplification car il est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible de départ. Il est aussi possible de déterminer ce point en déterminant le nombre de cycles à partir duquel l'accélération de la réaction de PCR est maximale (maximum de la dérivée seconde).

Stratégies de quantification :

La quantification d'un ADN cible peut se faire, soit de façon absolue grâce à une gamme étalon, soit de façon relative par rapport à un calibrateur (gène de référence). Seule la quantification absolue sera abordée dans ce chapitre, cette stratégie ayant été utilisée au cours de ce travail.

La quantification absolue d'un ADN cible repose sur l'établissement d'une gamme d'étalonnage réalisée à partir de dilutions en série d'un standard externe titré en nombre de copies. Les cinétiques de PCR propres à chaque point de gamme sont déterminées et les Ct obtenus permettent l'établissement d'une courbe d'étalonnage exprimant les Ct en fonction de la concentration (Figure 7). Par conséquent, il est possible de traduire la valeur du Ct obtenu pour un échantillon en résultat quantitatif en le comparant avec la gamme d'étalonnage (Figure 7). Pour travailler en quantification absolue, il est impératif que l'efficacité de la réaction de PCR (soit le nombre de nouveaux amplicons obtenus à chaque cycle à partir d'un amplicon, théoriquement égal à 2) soit identique dans les échantillons testés et dans la gamme d'étalonnage. De plus, la principale difficulté de cette stratégie de quantification réside dans la capacité à titrer avec précision et de façon reproductible les solutions d'étalonnage. Bien souvent, les standards employés sont constitués d'une solution titrée de plasmide contenant la séquence d'intérêt. Dans le cas des HPV, la quantification du virus peut être associée à la quantification d'un gène cellulaire afin de normaliser les résultats. Ainsi les résultats pourront être exprimés en nombre d'équivalents génomes viraux par cellule.

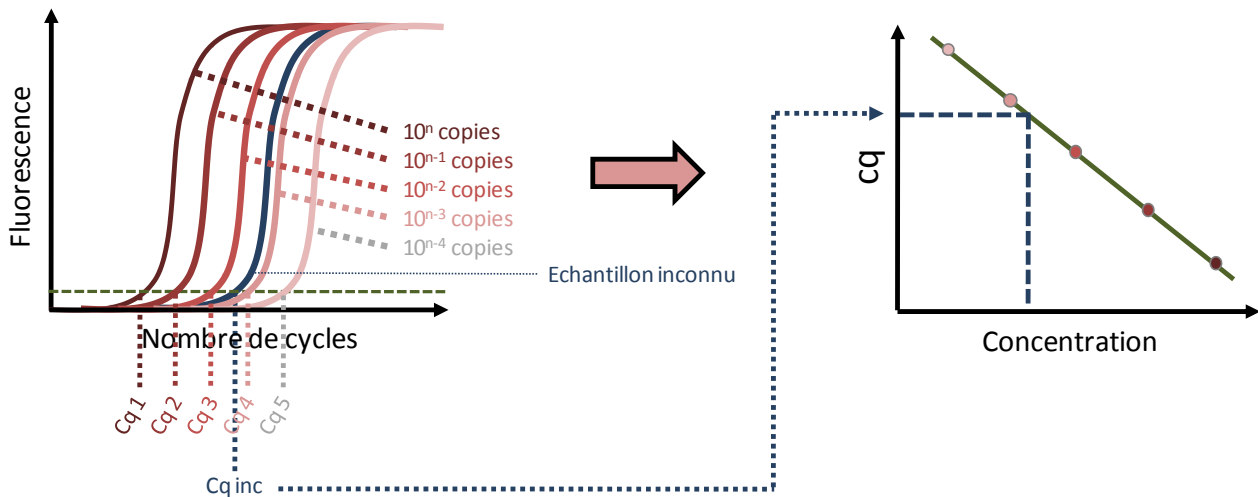


Figure 7 : Principe de la quantification absolue par PCR en temps-réel (Schéma original).

Molécules fluorescentes utilisées en PCR temps-réel :

Il existe 2 classes de molécules fluorescentes permettant la quantification par PCR temps-réel : des molécules se liant à l'ADN double brin et des sondes nucléotidiques fluorescentes spécifiques de la cible.

Les agents se liant à l'ADN double brin peuvent être des agents intercalants comme le bromure d'éthidium ou le SYBR Green, ou des agents se liant au sillon mineur de l'ADN comme le Hoeschst 33258. Dans les deux cas, l'émission de fluorescence augmente lorsque ces molécules sont liées à l'ADN double brin. La sensibilité des PCR utilisant ces agents est importante, surtout avec le SYBR Green qui est le plus souvent utilisé. En revanche, la spécificité de la réaction de PCR est conditionnée par le choix des amorces. En effet, ces molécules se fixant à tous les d'ADN double brin, les dimères d'amorces et les produits de PCR non spécifiques qui peuvent être formés induisent une émission de fluorescence. Afin de contrôler la spécificité de la réaction, il est alors nécessaire d'établir une courbe de fusion post-PCR afin de vérifier que les produits amplifiés présentent la température de fusion attendue.

Les sondes nucléotidiques fluorescentes sont des fragments d'ADN monobrin, non extensibles par l'ADN polymérase, spécifiques du fragment cible à amplifier et portant deux groupements : un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur. Le donneur est une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse, de passer à un état excité, puis de restituer cette énergie sous forme d'une émission de fluorescence en retournant à son état initial. L'accepteur, lorsqu'il est suffisamment proche du donneur est capable d'absorber l'énergie émise par celui-ci et de la réémettre dans une longueur d'onde différente ou sous forme de chaleur (Dark Quencher). Ce processus de transfert d'énergie est appelé extinction

(quenching) et utilise le phénomène de FRET (Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer). Pour que cette réaction soit possible, le donneur et l'accepteur doivent être proches (entre 40 et 100 Angström) et leurs spectres respectivement d'émission et d'excitation doivent se chevaucher.

Il existe plusieurs types de sondes utilisant ce processus, parmi lesquelles :

- les sondes à hydrolyse ou sondes TaqMan
- les sondes en épingle à cheveux ou molecular Beacon
- les sondes en tandem ou sondes LightCycler
- les amorces sunrise et scorpions

Les sondes à hydrolyse, qui sont les plus communément utilisées, portent un donneur en 3' et un accepteur en 5'. Du fait de la proximité entre les 2 fluorophores, l'énergie du fluorophore donneur est absorbée par l'accepteur par FRET, il n'y a pas de fluorescence (à la longueur d'onde du donneur) émise dans le milieu (Figure 8a).

- Lors de la phase d'hybridation, la sonde se lie de façon spécifique à la séquence cible, entre les 2 amorces.
- Lors de l'élongation, la *Taq* polymérase réalise la synthèse du brin complémentaire à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre la sonde. Grâce à son activité 5'-3' exonucléasique, la *Taq* polymérase hydrolyse la sonde. Ainsi, les 2 fluorophores sont libérés dans le milieu. La distance qui les sépare devient plus importante et le phénomène de FRET ne peut plus se produire. Une émission de fluorescence est donc observée (Figure 8b) et peut être mesurée dans le milieu réactionnel à la fin de chaque cycle.

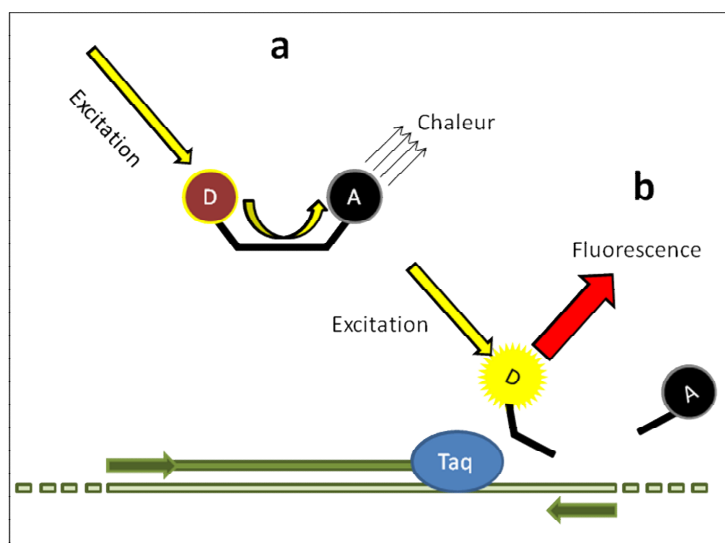


Figure 8 : Principe des sondes à hydrolyse Taqman (schéma original)

PCR temps-réel et mesure de la charge virale :

La PCR temps-réel a de multiples applications : recherche de mutations, étude de l'expression de transcrits, quantification d'agents pathogènes viraux, bactériens et parasitaires... Concernant les HPV, elle a permis de mesurer la charge virale de façon absolue avec une sensibilité et une répétabilité élevées (Fontaine *et al.*, 2005, Gravitt *et al.*, 2003b). De plus la mesure de la charge virale par PCR temps-réel peut être réalisée sur divers échantillons : lignées cellulaires, biopsies, lavages cervico-utérins, résidus liquides provenant de prélèvements par cytobrosse, résidus de liquides provenant du milieu de transport Digene (Hart *et al.*, 2001, Lefevre *et al.*, 2003). En effet, les amplicons générés en PCR temps-réel sont souvent de petite taille (de 70 à 200 pb) et il est possible d'amplifier de l'ADN même s'il est endommagé.

Elle est par conséquent une technique de choix pour la mesure de la charge virale. Enfin, pour normaliser les résultats en fonction du nombre de cellules, un gène cellulaire tel que celui codant la β -globine, la GAPDH ou l'albumine, peut être quantifié en parallèle.

2.3.2. Charge virale et stade lésionnel :

De nombreux auteurs ont tenté d'estimer la charge virale dans des échantillons de différents grades lésionnels. Il a été proposé que la charge virale globale, c'est-à-dire non spécifique de type, soit corrélée à la sévérité des lésions. Cette association a été pour la première fois proposée par Ho *et al.* (PCR consensus) et Melbye *et al.* (test Hybrid Capture 1), en 1995 et 1996 respectivement, puis confirmé par Ikenberg *et al.* en 1997 (PCR différentielles) (Ho *et al.*, 1995, Ikenberg *et al.*, 1997, Melbye *et al.*, 1996). D'autres auteurs ont par la suite proposé que la charge virale, estimée par HC2 ou par PCR consensus, permettrait de détecter les lésions précancéreuses (Gravitt *et al.*, 2007, Hernandez-Hernandez *et al.*, 2003, Tsai *et al.*, 2005). Toutefois, des études utilisant le test Hybrid Capture 1 puis HC2 (Clavel *et al.*, 1998a, Clavel *et al.*, 1999, Clavel *et al.*, 1998b) ont montré que la charge virale estimée par ces tests ne permettaient pas de distinguer les femmes ayant une lésion prévalente ou non.

Ainsi il n'y a pas à l'heure actuelle de consensus sur le lien entre le grade des lésions et la valeur de la charge virale en HPV-HR. Ceci peut s'expliquer par le fait que les résultats obtenus dans les études ci-dessus ont été exploités de façon quantitative, alors que les techniques utilisées ne sont pas quantitatives. De plus, on sait que la persistance de l'infection et le risque de développement de lésions sont différents selon le génotype. Il est donc très probable que l'évolution de la charge virale soit elle aussi dépendante du génotype.

Par conséquent, de nombreux auteurs se sont intéressés aux variations de charge virale spécifique de type au cours de l'histoire naturelle des lésions. En 1999, Swan *et al.* ont démontré, par PCR temps-réel quantitative, que la charge virale en HPV16 augmentait avec le grade de la lésion (Swan *et al.*, 1999). Ces résultats ont par la suite été confirmés par plusieurs études utilisant soit des techniques de PCR quantitatives spécifiques d'HPV16 (Carcopino *et al.*, 2006, Cricca *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2007, Lindh *et al.*, 2007, Tabora *et al.*, 2008, Zerbini *et al.*, 2001), soit des PCR consensus MY09 semi-quantitatives suivies d'hybridation avec des sondes spécifiques de types (dot blot hybridization) (Gravitt *et al.*, 2007, Kovacic *et al.*, 2006). Concernant les autres génotypes, le lien charge virale / grade de la lésion est toujours discuté. Plusieurs auteurs ont en effet démontré que la charge virale des génotypes 18, 31, 33, 35, 45 et 58 augmentait avec le grade de la lésion (Cheung *et al.*, 2008, Gravitt *et al.*, 2007) alors que d'autres n'ont pas observé cette relation (Guo *et al.*, 2007, Swan *et al.*, 1999, Zerbini *et al.*, 2001).

2.3.3. Charge virale et risque de développement de lésions :

Les premières études visant à étudier le lien entre charge virale et risque d'apparition de lésions précancéreuses et cancéreuses ont été réalisées par Ho *et al.* en 1995 puis 1998. En utilisant des techniques de PCR consensus couplées à la quantification de produits de PCR, les auteurs ont montré que de fortes charges virales globales en HPV-HR (non spécifiques de type) étaient associées à un risque élevé de développement de lésions de haut grade à 2 ans (OR=21,4)(Ho *et al.*, 1998, Ho *et al.*, 1995). Ces résultats, tout d'abord controversés par des études utilisant le test HC2 (Bory *et al.*, 2002, Clavel *et al.*, 2000, Lorincz *et al.*, 2002) ont par la suite été confirmés par d'autres études (Dalstein *et al.*, 2003, Sun *et al.*, 2001, Tsai *et al.*, 2005). En particulier, notre équipe a démontré que les femmes ayant une charge virale supérieure à 100 pg/mL par le test HC2 avaient un risque élevé de développer une lésion de type CIN2/3 à 2 ans (Dalstein *et al.*, 2003).

Les différences obtenues dans ces études peuvent s'expliquer de plusieurs façons :

- la mesure de la charge virale est réalisée le plus souvent sur des échantillons de cytologie liquide. De ce fait, les cellules normales peuvent être récoltées en même temps que les cellules pathologiques, ce qui peut biaiser le résultat (Sherman *et al.*, 2003).
- certains auteurs ont utilisé des échantillons dédiés et d'autres des résidus de cytologie liquide.
- les techniques employées peuvent différer dans leur sensibilité et leur spécificité analytiques.
- de plus, les résultats des travaux se basant sur l'utilisation des valeurs HC2 pour la détermination d'une charge virale ont été longtemps controversés, puisque aucune normalisation de la valeur de charge

virale n'était apportée et qu'il est impossible, de différencier les mono-infections des pluri-infections avec cette technique (Moberg *et al.*, 2004).

- les populations étudiées sont différentes (âge ; origine géographique)

En particulier, de nombreuses études ont montré que les femmes présentant de fortes charges virales en HPV16 (ou HPV18/45 dans une moindre mesure) avaient un risque accru de développer des lésions de haut grade. Grâce à une PCR temps-réel spécifique d'HPV16, une équipe finlandaise a notamment démontré que les femmes avec de fortes charges virales (exprimé en Ct) avaient 30 à 60 fois plus de risque de développer un cancer du col de l'utérus que les femmes ayant une charge virale plus faible (Josefsson *et al.*, 2000, Ylitalo *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré par Moberg *et al.*, que les femmes avec les charges virales les plus fortes, avaient le risque le plus élevé de développer un cancer du col de l'utérus (OR = 36,9)(Moberg *et al.*, 2004, Moberg *et al.*, 2005).

De plus, il a été démontré que parmi des femmes HPV16 positives, celles présentant les plus hautes charges virales avaient plus de risque de développer une lésion de type CIN2/3 (OR=3,2)(van Duin *et al.*, 2002). Ces données ont été confirmés par Gravitt *et al.*, qui ont montré, par PCR consensus couplée à l'hybridation avec des sondes spécifiques de type, que les femmes avec une forte charge virale en HPV16 avaient un risque important de développer une lésion de type CIN2/3 à 7 ans (OR=27,2)(Gravitt *et al.*, 2007). Notre équipe a aussi montré, par PCR temps-réel quantitative, que les femmes avec une charge virale HPV16 supérieure à 200 copies/10³ cellules, avait un risque multiplié par 3,5 de développer une lésion CIN2/3 à 18 mois (Monnier-Benoit *et al.*, 2006). Nous avons aussi montré que la progression vers une CIN2/3 était surtout liée à l'évolution de la charge virale. En déterminant la charge virale en HPV16 sur au moins 2 échantillons de suivi, nous avons constaté que les femmes ayant une charge virale stable ou qui diminue présentent une incidence cumulative d'apparition d'une lésion de 15%, alors que chez les femmes ayant une charge virale qui augmente, l'incidence cumulative atteint 50% (Monnier-Benoit *et al.*, 2006).

Le lien entre charge virale et apparition et/ou progression des lésions précancéreuses et cancéreuses n'a pas été établi à ce jour pour les génotypes 31, 33, 35, 39, 52, 58 et 87 (Gravitt *et al.*, 2007, Moberg *et al.*, 2004, Moberg *et al.*, 2005) .

De plus, il est très difficile de comparer les études spécifiques de type (HPV16 en particulier) entre elles car différents types d'échantillon ont été utilisés, différentes techniques ont été employées et les résultats ne sont pas exprimés de la même façon. Ainsi, pour mettre en place la mesure de la charge virale en HPV16 en routine, il est indispensable d'harmoniser les méthodes, de tester leur répétabilité et de standardiser les résultats au préalable. Il sera alors nécessaire de définir les seuils cliniques de charge virale au-delà desquels une femme sera considérée à risque d'abriter une lésion prévalente ou à risque de développer une lésion de haut grade ou plus.

2.4. Intégration :

L'intégration du génome viral au sein de la cellule hôte est un événement fréquent dans la carcinogenèse du col de l'utérus, même si ce phénomène ne semble pas obligatoire dans le développement du cancer cervico-utérin. L'intégration n'a pas été observée pour les HPV-BR. Ceci expliquerait que les HPV-BR ne soient pas en mesure de provoquer des lésions précancéreuses et cancéreuses. Les mécanismes par lesquels le génome viral s'intègre à celui de la cellule hôte sont mal compris. Il n'y a pas de production d'intégrase comme chez les rétrovirus et l'intégration constitue une impasse dans le cycle viral. En effet, l'intégration induit la perte de gènes viraux indispensables à la production de nouveaux virions : l'intégration va conférer un avantage prolifératif à la cellule hôte sans avantage apparent pour le virus. L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte peut favoriser le processus d'immortalisation et de transformation par deux types de mécanismes : la surexpression des oncoprotéines virales E6 et E7, faisant suite à la perte de fonctionnalité de E2, et la mutagenèse insertionnelle.

2.4.1. Protéines virales et carcinogenèse :

La carcinogenèse associée aux HPV-HR implique 4 protéines virales : 3 oncoprotéines (E7, E6 et E5) et la protéine E2.

2.4.1.1. Rôles de la protéine E2 :

a. Réplication de l'ADN viral :

La protéine E2 se lie à l'ADN viral sur un motif palindromique AACCG(N₄)CGGTT présent dans le LCR (Dell *et al.*, 2003). Le génome d'HPV16 présente 4 sites portant ce motif dans le LCR (#1, #2, #3 et #4), dont un adjacent à l'origine de réplication (#1) (Figure 9). La liaison de E2 sur le site #4 est nécessaire au recrutement de l'hélicase E1 sur la séquence *ori*. En effet, E2 se fixe à l'ADN viral au niveau de la séquence *ori* par son extrémité C-terminale puis se lie à la protéine virale E1 par son extrémité N-terminale (Moscufo *et al.*, 1999, Sarafi & McBride, 1995). La formation du complexe E1/E2 au niveau de la séquence *ori* induit une distorsion localisée de l'ADN qui permet le recrutement d'une deuxième molécule de E1 et le détachement de E2. E1 se lie ensuite aux protéines cellulaires nécessaires à la réplication de l'ADN : RPA (replication protein A) et l'ADN polymérase *alpha* primase (Conger *et al.*, 1999, Loo & Melendy, 2004, Masterson *et al.*, 1998) ; le complexe ainsi formé va assurer la réplication du génome viral.

b. Régulation de la transcription des gènes viraux :

La protéine E2 est aussi capable de réguler les promoteurs précoces p97 chez HPV16, p99 chez HPV31 et p105 chez HPV18 et donc de contrôler l'expression des oncogènes viraux E6 et E7 (Soeda *et al.*, 2006). En effet, lorsque E2 est faiblement exprimée, elle se lie aux sites #3 et #4 du LCR avec lesquels elle a une forte affinité. En se liant à ces sites, elle va réguler positivement la transcription des gènes viraux en activant le promoteur précoce en coopération avec p300 (Kruppel *et al.*, 2008) (Figure 9a). Lorsque la quantité de E2 augmente, la protéine va s'accumuler sur les autres sites, #1 et #2. Or ces 2 sites sont aussi les sites de fixation des facteurs de transcription Sp1 et TBP (TATA box Binding Protein) qui sont nécessaires à l'activation du promoteur précoce (Steger & Corbach, 1997). De fait, l'accumulation de E2 sur les sites #1 et #2 va provoquer le déplacement de Sp1 et TBP et ainsi stopper la transcription des gènes précoces E6 et E7 (Figure 9b).

L'activation et l'inactivation de la transcription des gènes viraux est donc dépendante de la quantité de protéine E2. Ainsi, une expression importante de E2, va inhiber la transcription des oncoprotéines virales E6 et E7.

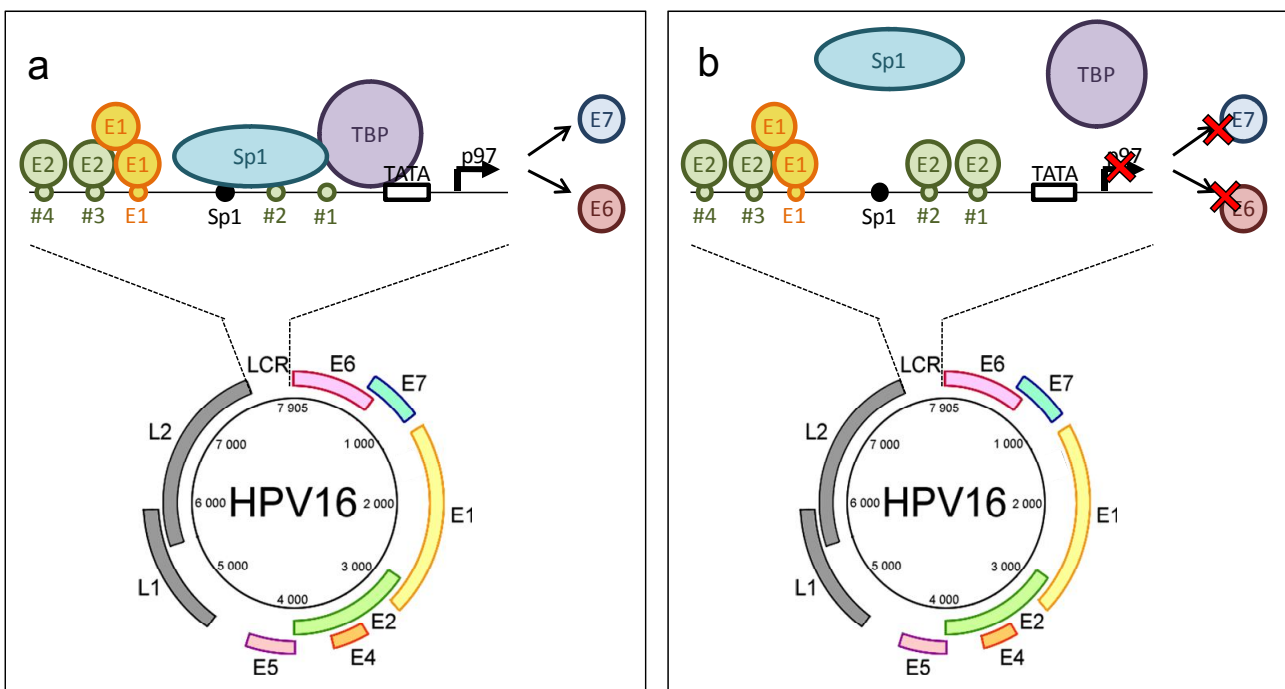


Figure 9 : Régulation de la transcription par la protéine virale E2. a) faible expression de E2 et b) forte expression de E2 (d'après Steger et Corbach, 1997)

2.4.1.1. L'intégration du génome viral et ses conséquences :

L'intégration est un phénomène dont le mécanisme n'est pas encore compris chez les HPV. Toutefois, il semblerait que les instabilités génomiques induites par les oncoprotéines E6 et E7 puissent être impliquées dans ce phénomène (Voir chapitre 2.4.1.4). La linéarisation du génome viral, qui est indispensable à son intégration dans le génome de la cellule hôte, se fait la plupart du temps par une coupure dans la POL du gène E2 (Baker *et al.*, 1987, Kalantari *et al.*, 1998, Matsukura *et al.*, 1986). Par conséquent, il n'y a plus de production de protéine E2 fonctionnelle, et on observera une levée de l'inhibition de la transcription de E7 et E6.

L'intégration a 2 conséquences principales sur les protéines virales: (i) une surexpression des oncoprotéines E7 et E6 dont la transcription n'est plus régulée par E2 et (ii) une augmentation de la stabilité des ARN messagers codant ces 2 protéines. En effet, l'intégration induit une perte des séquences ARE (AU Rich Element) en 3' des messagers. Ces séquences, qui induisent en temps normal une instabilité des ARNm, sont délétées et les ARNm codant E7 et E6 sont plus stables (Jeon *et al.*, 1995, Jeon & Lambert, 1995, Vinther *et al.*, 2005).

2.4.1.2. Rôles de la protéine E7 des HPV-HR :

E7 est une protéine d'environ 100 acides aminés qui est localisée dans le noyau. Elle est formée de 3 régions : CR1 en N-Ter ; CR2 et CR3. Les régions CR1 et CR2 sont très similaires aux CR1 et CR2 de la protéine E1A adénovirale et sont aussi très conservés par rapport à l'antigène T du SV40. En son extrémité C-terminale, E7 contient deux copies d'un motif CXXC séparées de 29 acides aminés. Ce domaine est impliqué dans les liaisons au zinc (Barbosa *et al.*, 1989) et pourraient fonctionner comme un domaine de dimérisation (Clemens *et al.*, 1995, McIntyre *et al.*, 1993). E7 peut favoriser l'immortalisation et la transformation de la cellule en interagissant avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, dans l'adhérence et la polarité, dans l'immunité et dans la mitose.

E7 et dérégulation du cycle cellulaire :

Les protéines à poche régulent l'activité des facteurs de transcription E2F (Cam & Dynlacht, 2003). Tout comme les protéines E1A (adénovirus) et l'antigène T (SV40), la protéine E7 interagit avec la protéine suppresseur de tumeur pRb, et les protéines à poche p107 et p130 apparentées, via le motif LXCXE contenu dans la région CR2 (Dyson *et al.*, 1992, Dyson *et al.*, 1989). E7 a une forte affinité pour la forme hypophosphorylée de pRb et induit sa dégradation via le protéasome (Berezutskaya *et al.*, 1997, Boyer *et al.*, 1996, Gonzalez *et al.*, 2001, Helt & Galloway, 2001, Jones *et al.*, 1997, Jones & Munger, 1997). Il a été

récemment proposé que l'association entre E7 et un complexe ubiquitine ligase / culline 2, contribuerait à cette dégradation (Huh *et al.*, 2007). E7 est capable de lier p107 et p130 mais n'induit pas leur dégradation. Par conséquent, en présence de E7 dans une cellule, les facteurs de transcription E2F ne sont plus séquestrés par les protéines à poche et la transcription des gènes cibles de E2F, codant entre autres des protéines nécessaires à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN (cycline A, CDC25A, ADN polymérase- α , thymidine kinase, ribonucléotide réductase, PCNA...), n'est plus réprimée. Ceci permet à la cellule d'entrer en phase S et d'accomplir un nouveau cycle, favorisant la prolifération cellulaire et l'induction d'anomalies lors de la mitose (Duensing & Munger, 2004, Munger *et al.*, 2004, Munger *et al.*, 1989).

De plus, E7 amplifie ce phénomène par plusieurs voies : (i) en transactivant directement les promoteurs des cyclines E et A, (ii) en activant les complexes cycline A/CDK2, (iii) en se liant et neutralisant certains inhibiteurs de CDK (Cycline Dependant Kinase) p21 et p27 et (iv) en agissant sur les HDAC (Funk *et al.*, 1997, Jones *et al.*, 1997, McIntyre *et al.*, 1996, Nguyen & Munger, 2008, Ruesch & Laimins, 1998, Zerfass-Thome *et al.*, 1996). Enfin, E7 contribue au maintien de l'activité télomérase induite par E6 (Liu *et al.*, 2008).

E7, adhérence et polarité :

Grace à son motif CXXC, E7 peut réprimer la transactivation de la fibronectine. Cette glycoprotéine, localisée dans la matrice extracellulaire, a un rôle essentiel dans l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Norton & Hynes, 1990, Rey *et al.*, 2000a, Rey *et al.*, 2000b). De plus E7 a la capacité de perturber l'organisation cellulaire en modifiant le cytosquelette. En effet, E7 peut se lier à l'actine et entraîner une inhibition de la polymérisation de cette dernière (Rey *et al.*, 1999b). L'association de E7 avec l'actine peut ainsi affecter la morphologie, la mobilité cellulaire, mais aussi la transduction des signaux (phosphorylation de pRb, expression de cycline A, modulation de l'activité de la cycline E et de la CDK2) (Schliwa & Potter, 1986) (Assoian, 1997, Assoian & Zhu, 1997) (Ben-Ze'ev, 1997) (Rey *et al.*, 1999a).

E7 et réponse immunitaire

La protéine E7, lorsqu'elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire exerce une activité immunosuppressive en inhibant l'activation des PBCM (Peripheral Blood Mononuclear Cells) par les lymphocytes via une surexpression de l'interféron- α dans les macrophages et les cellules dendritiques (Le Buanec *et al.*, 1999a, Le Buanec *et al.*, 1999b). E7 a aussi la capacité d'entraîner la production de nombreuses cytokines angiogéniques (TNF α , IL-1 β ou IL-6 par exemple) par les macrophages et les cellules dendritiques. Par cette activité immunosuppressive et angiogénique, E7 contribue à la mise en place d'un environnement propice au développement et à l'envahissement tumoral (Le Buanec *et al.*, 1999a, Le Buanec *et al.*, 1999b). Il a aussi été démontré que l'induction de l'expression de E7 résultait en une expression réduite des molécules de

classe I du CMH à la surface de la cellule infectée (Bottley *et al.*, 2008), ce qui constitue un mécanisme d'échappement au système immunitaire.

E7 et instabilités chromosomiques :

Les centrosomes sont des organites cytoplasmiques impliqués dans la division cellulaire. Chaque cellule ne comporte qu'un seul centrosome qui se duplique durant la mitose pour former les 2 pôles du fuseau mitotique. Ce processus, nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes, est régulé par les CDK qui synchronisent la duplication des centrosomes avec le début de la phase de réplication de l'ADN.

La protéine E7 des HPV-HR perturbe cette synchronisation (Duensing *et al.*, 2000), d'une part en régulant négativement les CKI (Cyclin Kinase Inhibitor) p21 et p27 (Duensing & Munger, 2004), et d'autre part via la dégradation de pRb, elle-même impliquée dans la synthèse des centrosomes {Balsitis, 2003 #12}. Il en résulte des mitoses anormales, dites multipolaires, qui sont caractéristiques des lésions associées aux HPV haut risque (Duensing & Munger, 2004). L'instabilité génomique ainsi engendrée par E7 contribue à l'acquisition ultérieure de mutations requises pour la transformation tumorale.

2.4.1.3. Rôles de la protéine E6 des HPV-HR :

E6 est une protéine de 150 acides aminés présentant 2 domaines en doigt de zinc Cys-X-X-Cys. La protéine E7 contenant un motif similaire, des auteurs ont émis l'hypothèse que le gène E6 proviendrait d'une duplication du gène E7 (Cole & Danos, 1987). La protéine E6 est localisée dans le noyau (à la périphérie de la chromatine condensée) et dans le cytoplasme (co-localisée avec des ultrastructures ribonucléoprotéiques et les ribosomes) de la cellule hôte (Masson *et al.*, 2003).

Le rôle d'E6 qui a été le plus décrit est son interaction avec la protéine p53. En effet, E6 est capable de former un complexe avec la protéine E6AP (E6-associated protein) et la protéine p53. La formation de ce complexe va induire l'ubiquitinylation de p53 et sa dégradation par le protéasome 26S (Huibregtse *et al.*, 1993, Werness *et al.*, 1990). En plus d'induire la dégradation de p53, E6 est capable d'inhiber la liaison de p53 avec ses sites de fixation à l'ADN (Lechner & Laimins, 1994, Zimmermann *et al.*, 1999), de séquestrer p53 dans le cytoplasme (Mantovani & Banks, 1999) et d'inhiber l'activité des ses co-activateurs p300 et hADA3 (Kumar *et al.*, 2002, Patel *et al.*, 1999).

La protéine p53 étant une protéine essentielle dans les mécanismes de réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, les interactions de E6 avec cette protéine favorisent la transformation et l'immortalisation de la cellule. Mais la protéine E6 va aussi amplifier ces processus grâce à des interactions avec plus de 30 protéines différentes (Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008, zur Hausen, 2002)

E6 et apoptose :

En plus d'induire la dégradation de p53, favorisant ainsi la survie des cellules transformées (Crook *et al.*, 1991, Lechner & Laimins, 1994), E6 est capable d'inhiber l'apoptose par d'autres mécanismes. E6 inhibe notamment la voie extrinsèque de l'apoptose en interagissant avec le récepteur de mort TNRF-1 (Filippova *et al.*, 2002), et la protéine adaptatrice de FADD (Filippova *et al.*, 2007, Garnett & Duerksen-Hughes, 2006, Garnett *et al.*, 2006) et la voie intrinsèque de l'apoptose, en favorisant la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bak (Thomas *et al.*, 2002, Underbrink *et al.*, 2008). De plus, E6 augmente la transcription de la survivine, une protéine anti-apoptotique (Borbely *et al.*, 2006) et favorise la dégradation de la pro-caspase 8 (Filippova *et al.*, 2007).

E6, adhérence, polarité et différenciation de l'épithélium :

Dans l'épithélium sain, l'adhérence matrice extracellulaire/cellule, les contacts cellule/cellule, l'organisation du cytosquelette et la polarité des cellules sont activement régulés afin de contrôler la prolifération et la différenciation des cellules. E6 va interagir avec la paxilline, qui est une protéine impliquée dans l'organisation de l'actine (Tong & Howley, 1997). La liaison de E6 avec la paxilline va inhiber la formation des fibres d'actine. De plus, E6 va interagir avec la zyxine, une protéine d'adhérence qui permet de la connexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, qui régule la prolifération cellulaire et la différenciation, qui transmet les signaux depuis le site d'adhérence de la cellule et qui organise les filaments d'actine en collaboration avec la paxilline (Degenhardt & Silverstein, 2001). La protéine E6 va aussi interagir avec la fibuline-1, ce qui va déstabiliser encore plus la matrice extracellulaire (Du *et al.*, 2002).

Au niveau de son extrémité C-terminale, E6 possède un domaine PDZ qui lui permet de se lier et de stimuler la dégradation de cibles cellulaires contenant de tels motifs (Spanos *et al.*, 2008). En effet, E6 est capable de lier la protéine hScrib (human homologue of the drosophila scribble protein), une protéine qui agit comme un suppresseur de tumeur en régulant négativement la prolifération cellulaire. La liaison de E6 avec cette protéine va induire la dégradation de hScrib et donc lever le contrôle qu'elle exerçait sur la progression du cycle cellulaire (Takizawa *et al.*, 2006, Zeitler *et al.*, 2004). De plus, cette protéine est associée aux jonctions serrées et sa perte entraîne l'impossibilité de la cellule à adhérer à la matrice extracellulaire. La protéine E6 est capable d'induire la dégradation de la protéine hDlg (human homolog of Dlg) qui est nécessaire aux jonctions cellule-cellule, à la polarité cellulaire et qui est impliquée dans le contrôle de la prolifération. Par conséquent, la liaison de E6 avec cette protéine va inhiber la formation des jonctions serrées entre cellules mais va aussi induire une perte de polarité cellulaire et une perte de contrôle de la prolifération (Kiyono *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1997). Enfin, E6 favorise la dégradation des protéines PATJ (Protein Associated with Tigh Junctions, impliquées dans la formation des jonctions serrées)

et PTPN3 (tyrosine phosphatase impliquée dans la phosphorylation de récepteurs de facteurs de croissance) (Jing *et al.*, 2007, Latorre *et al.*, 2005, Storrs & Silverstein, 2007).

Ainsi, ces interactions vont réduire la capacité des cellules infectées d'adhérer à la matrice extracellulaire, de garder une morphologie cellulaire normale et vont promouvoir leur potentiel de réplication. Ces interactions sont donc fortement impliquées dans la transformation de la cellule.

E6 et système immunitaire

Pour favoriser la survie du virus, E6 interfère avec le système immunitaire. En effet, E6 diminue la capacité des cellules du système immunitaire à reconnaître les cellules infectées et à les éliminer. Tout d'abord, E6 interagit avec le facteur 3 de régulation de l'interféron (IFR-3) qui normalement permet l'apoptose des cellules infectées par un virus. En liant IFR-3, E6 inhibe sa transactivation et ainsi l'empêcher de réguler correctement le cycle cellulaire (Chakrabarti & Krishna, 2003, Ronco *et al.*, 1998). De plus, E6 inhibe la reconnaissance des cellules infectées en inhibant la transcription du TLR9 (Toll Like Receptor 9)(Hasan *et al.*, 2007).

E6 et stabilité chromosomique

Dans les cellules somatiques, on observe un raccourcissement des télomères à mesure des divisions cellulaires. Ce mécanisme est responsable de la sénescence réplivative. Or, la protéine E6 va être capable d'inhiber la sénescence réplivative en activant la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT pour human telomerase reverse transcriptase) qui permet la réplication des télomères. En effet, E6 est capable de se lier à c-myc (et son cofacteur max) afin d'induire la transcription de hTERT. Ainsi, E6 va favoriser l'immortalisation de la cellule infectée (Greenberg *et al.*, 1999, Oh *et al.*, 2001, Takakura *et al.*, 2001, Veldman *et al.*, 2003).

La protéine E6 est capable de lier la protéine 7 humaine de maintenance minichromosomique (hMCM7)(Kukimoto *et al.*, 1998) et d'induire sa dégradation, favorisant ainsi l'apparition d'anomalies chromosomiques dans la cellule infectée (Mantovani & Banks, 2001). De plus, il a été montré que E6 pouvait interagir avec 2 protéines impliquées dans la réparation de l'ADN : XRCC1 et MGMT (Iftner *et al.*, 2002, Srivenugopal & Ali-Osman, 2002).

2.4.1.4. Instabilités génomiques et intégration :

Il a été démontré que les instabilités génomiques étaient déjà présents dans les lésions précancéreuses et précédaient l'intégration (Bulten *et al.*, 1998, Jones *et al.*, 1967, Melsheimer *et al.*, 2004, Reid *et al.*, 1984, Rihet *et al.*, 1996, Steinbeck, 1997, Vinokurova *et al.*, 2008). Comme décrit dans les chapitres précédents,

les oncoprotéines E6 et E7 favorisent l'apparition d'anomalies chromosomiques dans la cellule infectée. En particulier, E7 induirait des cassures de l'ADN double brin et interférerait avec les réparations de l'ADN (Kassis *et al.*, 1996). Il a été proposé que ces phénomènes de cassures et réparations de chromosomes favoriseraient l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (Figure 10) (Munger *et al.*, 2004, Wentzensen *et al.*, 2004).

De plus, il a été récemment proposé que les instabilités génomiques et l'intégration soient la conséquence d'une réplication de l'ADN viral « en peau d'oignon ». Dans ce modèle, il y aurait simultanément plusieurs événements de réplication depuis un seul génome d'HPV (Figure 10 - étape 1) (Kadaja *et al.*, 2007, Mannik *et al.*, 2002)). Ces réplifications multiples pourraient conduire à des cassures double brin de l'ADN viral épisomal qui serait alors intégré à l'ADN de la cellule hôte *via* la machinerie de réparation de l'ADN double brin de la cellule (Figure 10 - étape 2). Si l'origine de réplication est comprise dans le fragment d'ADN viral ainsi intégré, une réplication en « peau d'oignon » pourra alors être amorcée depuis ce site, sous réserve que des protéines E1 et E2 soit exprimées depuis des formes épisomales (Figure 10 - étape 3)(Kadaja *et al.*, 2007). Cette production anormale de multiples fragments d'ADN double brin peut alors, elle aussi, engendrer des phénomènes de réparation de l'ADN double brin qui peuvent conduire à des événements de recombinaisons génomiques pouvant induire : l'excision de l'ADN viral, une intégration répétée de l'ADN viral, des délétions d'ADN cellulaire ou encore une répétition de fragments d'ADN cellulaire (Figure 10 - étape 4). Ces recombinaisons pourraient alors contribuer à la transformation de la cellule infectée en augmentant l'expression des oncogènes viraux mais aussi de gènes cellulaires (voir chapitre 2.4.2). Ce modèle expliquerait notamment les phénomènes d'intégration en concatémères.

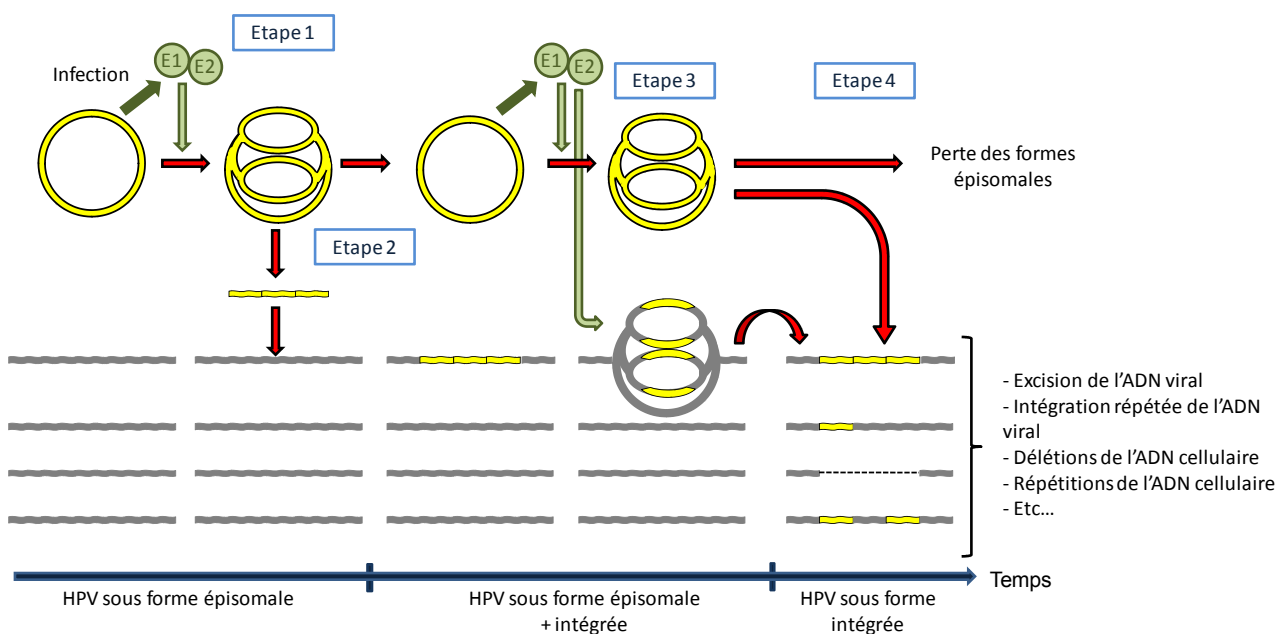


Figure 10 : Modèle de l'intégration médiée par une réplication « en peau d'oignon » par Kadaja *et al.* (Kadaja *et al.*, 2007)

Après l'intégration de génomes viraux, E6 et E7 vont pouvoir exercer leur fonction de façon intense sur les différents partenaires protéiques décrits dans les chapitres 2.4.1.2 et 2.4.1.3, induire une dérégulation du cycle cellulaire et favoriser l'accumulation d'anomalies génétiques. De plus, les phénomènes d'instabilités génomique induits par E6 et E7 vont être amplifiés (Duensing *et al.*, 2001, Duensing & Munger, 2001, Duensing & Munger, 2002, Hopman *et al.*, 2004, Schaeffer *et al.*, 2004). Ainsi, l'intégration va favoriser l'immortalisation et la transformation de la cellule hôte.

2.4.1.5. Récapitulatif de la carcinogénèse médiée par E6 et E7 :

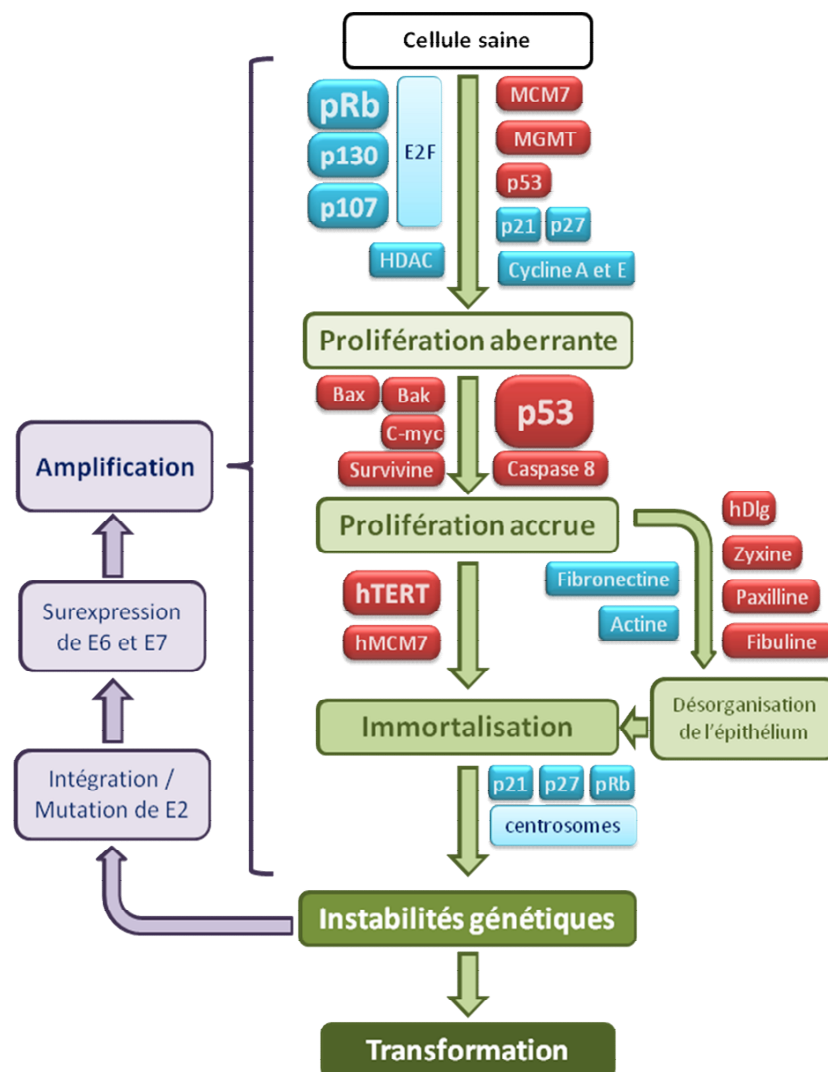


Figure 11 : Carcinogénèse médiée par E7 et E6

L'action de E7 et E6 sur leurs protéines cibles (cibles de E7 en bleu et cibles de E6 en rouge) vont conduire à une prolifération aberrante, suivie d'une prolifération accrue et de l'immortalisation de la cellule infectée. Les instabilités génétiques médiées par E7 (et E6 dans une moindre mesure) vont favoriser l'intégration du génome viral (et/ou des mutations dans le gène E2) conduisant à une surexpression de E6 et E7. L'expression accrue de ces 2 oncoprotéines permet l'amplification des phénomènes de prolifération, d'immortalisation et d'instabilités génétiques qui favoriseront la transformation de la cellule infectée. (Schéma original)

2.4.2. Mutagenèse insertionnelle :

Les sites d'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte semblent être aléatoires et sont distribués tout au long du génome. Toutefois, l'intégration a souvent lieu dans les sites fragiles (common fragile sites) (Thorland *et al.*, 2003, Thorland *et al.*, 2000). En effet, une méta-analyse de Wentzensen *et al.* a révélé que 38% des sites d'intégration sont situés dans les sites fragiles (Wentzensen *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que l'intégration avait souvent lieu dans des régions avec de hauts niveaux de transcription où l'ADN est décondensé (Klimov *et al.*, 2002). Par conséquent, les sites d'intégration semblent être liés à l'accessibilité du génome plutôt qu'à la présence de séquences ou de gènes spécifiques.

Des phénomènes de mutagenèse insertionnelle ont été décrits et il a été rapporté que l'intégration pouvait avoir lieu dans, ou à proximité, d'oncogènes/anti-oncogènes cellulaires. De plus, il a été observé que ces gènes étaient souvent co-transcrits avec les gènes viraux (Wentzensen *et al.*, 2004).

Le site d'intégration le plus fréquemment rapporté (en particulier pour HPV18) est la région du gène *myc* (Durst *et al.*, 1987, Ferber *et al.*, 2003b, Peter *et al.*, 2006, Wentzensen *et al.*, 2002). Des intégrations ont aussi été observées dans les gènes *tert* (TElomerase Reverse Transcriptase)(Ferber *et al.*, 2003a), *fancc* (Fanconi Anemia Group C Protein)(Ferber *et al.*, 2003a, Wentzensen *et al.*, 2002) et *apm-1* (transcription Affected by Papillomavirus DNA intégration in ME180 cells)(Reuter *et al.*, 1998).

2.4.3. Méthodes d'étude du statut physique du génome viral :

La détermination du statut physique du génome viral, c'est-à-dire s'il est sous forme intégrée ou épisomale, peut être réalisée de plusieurs façons. Les premières études visant à déterminer le statut physique ont utilisé des techniques d'hybridation *in situ* qui permettent de visualiser de façon précise des génomes viraux dans les tissus cervico-utérins. L'aspect du marquage peut évoquer le statut physique du génome : un marquage dense et homogène reflète vraisemblablement un génome viral sous forme épisomale, alors qu'un marquage ponctué dans le noyau traduit plutôt un génome viral sous forme intégrée (Cooper *et al.*, 1991a, Cooper *et al.*, 1991b, Fujii *et al.*, 2005, Sano *et al.*, 1998). D'autres techniques, basées sur une digestion enzymatique de l'ADN par des enzymes de restriction suivie d'un Southern-blot ou d'une migration sur gel d'agarose ont été développées (Cullen *et al.*, 1991, Hudelist *et al.*, 2004). Selon le statut physique du génome, le profil de migration observé sera différent : une bande à environ 8000 b suggère que le génome viral est sous forme épisomale, alors que plusieurs bandes de tailles différentes suggèrent

que le génome viral est sous forme intégré. Toutefois, la sensibilité de ces techniques est faible et elles ne permettent pas la quantification de chaque forme.

Le développement de la PCR a permis d'améliorer la description du statut physique dans les échantillons cervico-utérins. Les techniques basées sur la PCR reposent sur la détection du gène viral E2 (Das *et al.*, 1992, Kalantari *et al.*, 2001, Lukaszuk *et al.*, 2003, Tonon *et al.*, 2001, Yoshinouchi *et al.*, 1999). En effet, la POL de ce gène étant toute ou partiellement supprimée lors de l'intégration, la détection de E2 indique la présence de formes épisomales. Le développement de la PCR temps-réel a permis la quantification des formes intégrées et épisomales. Plusieurs équipes ont en effet développé des PCR quantitatives ciblant le gène E2 et le gène E6 (Figure 12) (Fujii *et al.*, 2005, Peitsaro *et al.*, 2002, Ruutu *et al.*, 2008). Ceci présente un double avantage : (i) la possibilité de déterminer le ratio E2/E6 et donc de connaître le statut physique précis de l'échantillon et (ii) de déterminer la charge virale *via* la PCR ciblant E6.

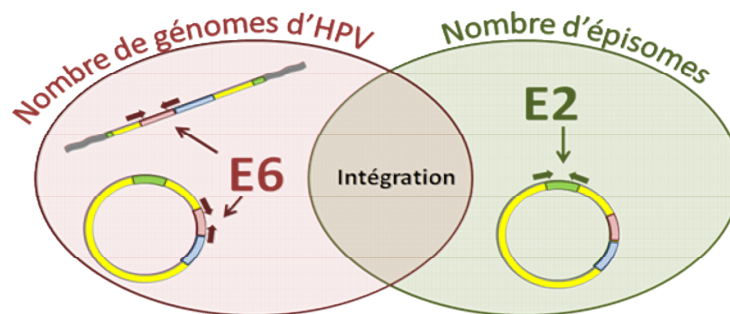


Figure 12 : PCR Temps-réel E6 et E2 : La PCR-TR E6, en rouge, amplifie le gène E6 des formes intégrées et épisomales. La PCR-TR E2, en vert, amplifie le gène E2 des formes épisomales seulement puisque ce gène est délété dans les formes intégrées

Ces techniques ont permis d'une part d'étudier le lien entre statut physique du génome viral des HPV-HR et grade de la lésion, et d'autre part d'étudier le lien entre le statut physique du génome viral et le risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses.

2.4.4. Statut physique et lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus :

Il est possible de définir 3 classes d'échantillons selon leur statut physique :

- épisomal : échantillons abritant essentiellement des génomes viraux sous forme épisomale.
- mixte : échantillons abritant des génomes viraux sous forme épisomale et intégrée.
- intégré : échantillons abritant essentiellement des génomes viraux sous forme intégrée.

Dans les échantillons cervico-utérins, la coexistence de formes épisomales et de formes intégrées est très fréquente. Mais la proportion d'échantillons abritant des formes épisomales, mixtes ou intégrées, varie selon le stade lésionnel.

2.4.4.1. Intégration, un phénomène précoce ?

Dans un premier temps, il a été montré que, dans les échantillons de cytologie normale et dans les lésions de bas grade, le génome viral était principalement observé sous forme épisomale. En effet, Cullen *et al.* ont montré, par Southern blotting, que sur 100 biopsies de CIN 1 à 3 seules trois abritaient des formes intégrées (Cullen *et al.*, 1991). Puis, Das *et al.* ont montré par PCR que le gène E2 était amplifiable dans 100% (n=10) des échantillons de cytologie normale testés mais aussi dans 100% des CIN1 et 2 testées (n=39) (Das *et al.*, 1992). Ces résultats ont par la suite été confirmés, par la technique APOT (Amplification of Papillomavirus Oncogene Transcripts), dans une étude de Klaes *et al.* dans laquelle la totalité des biopsies de cols normaux et de CIN1 présentaient exclusivement des formes épisomales d'HPV16 et d'HPV18 (Klaes *et al.*, 1999).

Toutefois, ces résultats sont controversés. En effet, d'autres études ont démontré, grâce à des techniques de PCR, que l'intégration était un phénomène précoce, avec la présence de génomes viraux intégrés (seuls ou avec des formes épisomales) dans les lésions de bas grade : 8% pour Tonon *et al.* (Tonon *et al.*, 2001), au moins 25% des CIN1 pour Andersson *et al.* (Andersson *et al.*, 2005), 27% des CIN1 pour De Marco *et al.* (De Marco *et al.*, 2007), 28% des LSIL pour Cricca *et al.* (Cricca *et al.*, 2007), 50% des LSIL pour Gallo *et al.* (Gallo *et al.*, 2003), 85% des LSIL pour Kulmala *et al.* et 100% pour Peitsaro *et al.* (Peitsaro *et al.*, 2002). De plus, des génomes viraux intégrés ont été détectés dans des échantillons de col de l'utérus ne présentant pas de lésions (De Marco *et al.*, 2007, Peitsaro *et al.*, 2002). Kulmala *et al.* ont même montré que 80% des échantillons de cytologie normale testés présentaient des formes intégrées (Kulmala *et al.*, 2006).

Ces données suggèrent que l'intégration serait un phénomène précoce pouvant intervenir avant l'apparition d'anomalies cellulaires et histologiques.

2.4.4.2. Intégration et grade des lésions :

Echantillons abritant des formes intégrées (mixtes et/ou intégrées seules) :

Même si des disparités existent entre les différentes études, il a globalement été observé que la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées augmentait avec la sévérité de la lésion. Ainsi, plus le grade de la lésion augmente, plus la proportion d'échantillons abritant des formes épisodales diminue au profit d'échantillons abritant des formes mixtes ou intégrées (Figure 13 ;Tableau 4) (Cheung *et al.*, 2008, Cricca *et al.*, 2007, Daniel *et al.*, 1995, Das *et al.*, 1992, De Marco *et al.*, 2007, Fujii *et al.*, 2005, Guo *et al.*, 2008, Hudelist *et al.*, 2004, Klaes *et al.*, 1999, Kulmala *et al.*, 2006, Tonon *et al.*, 2001):

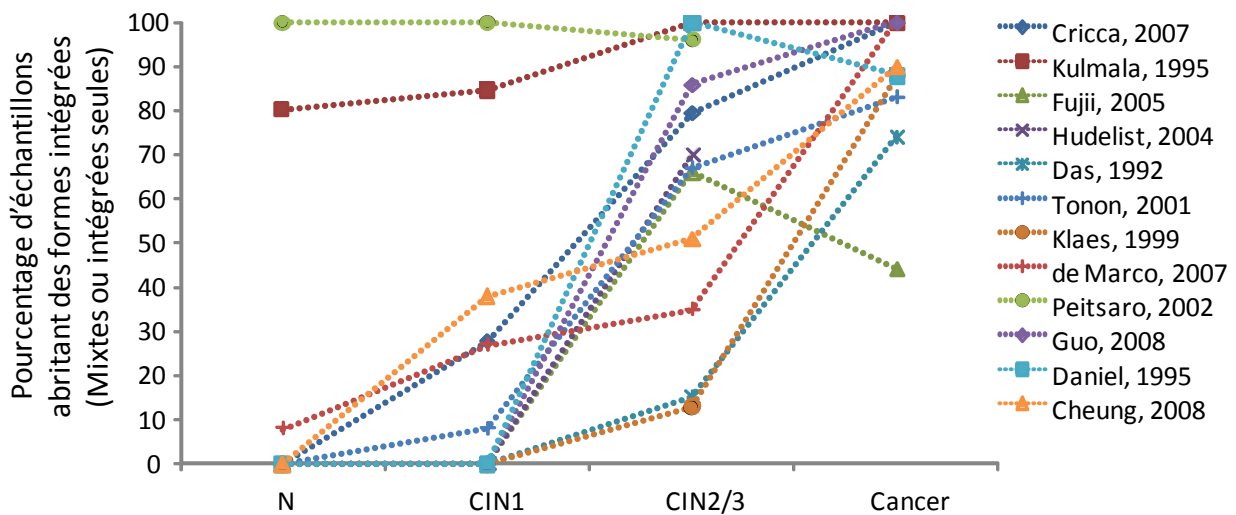


Figure 13 : Pourcentage d'échantillons abritant des formes intégrées en fonction du grade de la lésion dans différentes études de la littérature.

Tableau 4 : Pourcentage d'échantillons abritant des formes intégrées en fonction du grade de la lésion dans différentes études de la littérature.

		Cricca et al.	Kulmala et al.	Fujii et al.	Hudelist et al.	Das et al.	Tonon et al.	Klaes et al.	de Marco et al.	Peitsaro et al.	Guo et al.	Daniel et al.	Cheung et al.	moyenne
normaux	Episomal		19,7		100	100		100	92	0		100		73
	Mixte + I		80,3		0	0		0	8	100		0		27
CIN1	Episomal	72,2	15,4	100	100	100	92	100	73	0		100	62	74
	Mixte + I	27,8	84,6	0	0	0	8	0	27	100		0	38	26
CIN2/3	Episomal	20,5	0	34	30	85	33	87	65	4	14	0	49	35
	Mixte + I	79,5	100	66	70	15	67	13	35	96	86	100	51	65
Cancers	Episomal	0	0	56		26	17	12	0		0	12	10	13
	Mixte + I	100	100	44		74	83	88	100		100	88	90	87

Echantillons abritant des formes intégrées seules :

Une intégration complète sans présence d'épisome a été observée dans des échantillons issus de :

- lésions de bas grade : 9% des CIN1 pour de Marco *et al.* (De Marco *et al.*, 2007) et 25% des LSIL pour Andersson *et al.* (Andersson *et al.*, 2005). Toutefois, ces formes essentiellement intégrées n'ont pas été observées, dans les échantillons issus de lésions de bas grade, dans d'autres études (Cricca *et al.*, 2007, Das *et al.*, 1992, Fujii *et al.*, 2005, Hudelist *et al.*, 2004, Peitsaro *et al.*, 2002).
- lésions de haut grade : 6% des CIN2/3 pour Cricca *et al.* (Cricca *et al.*, 2007), 6% des CIN3 pour Kalantari *et al.* (Kalantari *et al.*, 2001), 8% des CIN3 pour Kulmala *et al.* (Kulmala *et al.*, 2006) et Peitsaro *et al.* (Peitsaro *et al.*, 2002), 15% des CIN3 pour de Marco *et al.* (De Marco *et al.*, 2007), 18% des CIN2 pour Peitsaro *et al.* (Peitsaro *et al.*, 2002), 36% des CIN3 pour Anderson *et al.* (Andersson *et al.*, 2005) et 50% des CIN3 pour Hudelist *et al.* (Hudelist *et al.*, 2004).
- cancers : 5% des cancers pour Das *et al.* (Das *et al.*, 1992), 16% des cancers pour Arias-Pulido *et al.* (Arias-Pulido *et al.*, 2006), 43% des cancers pour Kulmala *et al.* (Kulmala *et al.*, 2006), 43% des cancers pour Kalantari *et al.* (Kalantari *et al.*, 2001), 52% des cancers pour Cullen *et al.* (Cullen *et al.*, 1991) et 83% des cancers pour Cricca *et al.* (Cricca *et al.*, 2007). Les profils d'intégration dans les cancers sont différents selon le génotype. En effet, dans les échantillons infectés par HPV16, 70% des cancers présentent seulement des formes intégrées (et 20% des formes mixtes) alors que dans les échantillons infectés par HPV18, 100% présentent des formes intégrées seules (Park *et al.*, 1997).

Il a aussi été observé que la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées seules augmentait avec le grade de la lésion (Tableau 5 ; Figure 14) (Cheung *et al.*, 2008, Cricca *et al.*, 2007, Das *et al.*, 1992, De Marco *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2008, Hudelist *et al.*, 2004, Kulmala *et al.*, 2006, Peitsaro *et al.*, 2002).

Tableau 5 : Pourcentage d'échantillons abritant des formes épisomales seules, mixtes et intégrées seules, selon le grade de la lésion dans différentes études de la littérature.

		Cricca <i>et al.</i>	Kulmala <i>et al.</i>	Hudelist <i>et al.</i>	Das <i>et al.</i>	de Marco <i>et al.</i>	Peitsaro <i>et al.</i>	Guo <i>et al.</i>	Cheung <i>et al.</i>	Moyenne
normaux	Episomal		19,7	100	100	92	0			62
	Mixte		69,3	0	0	8	100			35
	Intégré		11	0	0	0	0			2
CIN1	Episomal	72,2	15,4	100	100	73	0		62	60
	Mixte	27,8	76,9	0	0	18	100		17	34
	Intégré	0	7,7	0	0	9	0		21	5
CIN2/3	Episomal	20,5	0	30	85	65	4	14	49	33
	Mixte	73,5	100	20	13	27	83	68	43	53
	Intégré	6	0	50	2	8	13	18	8	13
Cancers	Episomal	0	0		26	0		0	10	6
	Mixte	18,2	57,1		69	100		65	75	64
	Intégré	81,8	42,9		5	0		35	25	32

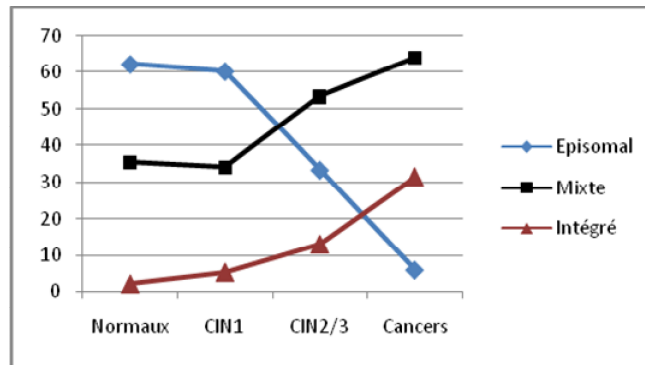


Figure 14 : Moyenne des pourcentages d'échantillons abritant des formes épisomales seules, mixtes et intégrées seules, selon le grade de la lésion dans différentes études de la littérature.

2.4.4.3. Intégration et risque d'apparition et de progression de lésions précancéreuses et cancéreuses :

La proportion d'échantillons présentant des formes intégrées (mixtes ou exclusivement) augmentant avec le grade de la lésion, de nombreux auteurs ont proposé que l'intégration est associée à un risque de progression tumorale (Gallo *et al.*, 2003, Graham & Herrington, 2000, Hopman *et al.*, 2004, Hudelist *et al.*, 2004, Klaes *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2008, Peitsaro *et al.*, 2002, Tonon *et al.*, 2001, Ueda *et al.*, 2003). En particulier, Li *et al.* ont étudié le devenir de 8 lésions de types CIN1 : parmi les 4 CIN1 abritant des génomes d'HPV16 sous forme épisomale, l'une d'entre elle a régressé et dans 3 cas, l'infection à HPV16 a été éliminée. En revanche, l'infection a persisté chez les 4 cas de CIN1 abritant des génomes d'HPV sous forme intégrée et un cas a progressé vers une lésion de type CIN2/3 (Li *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que la présence de formes intégrées dans les cancers était associée à un mauvais pronostic et un échec des traitements (Kalantari *et al.*, 2001, Kalantari *et al.*, 1998, Unger *et al.*, 1995, Vernon *et al.*, 1997). En effet, dès 1997 Vernon *et al.* ont démontré que sur 46 patientes atteintes de carcinomes cervico-utérins, celles dont les tumeurs abritaient des génomes viraux sous forme intégrée (non détection de la région E1/E2 par PCR) avaient une survie à 36 mois diminuée de 35% (Figure 15)(Vernon *et al.*, 1997).

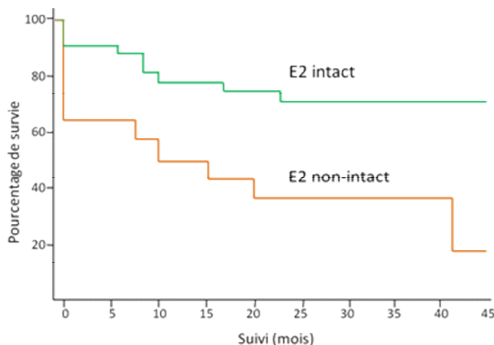


Figure 15 : Estimation de Kaplan-Meier de la survie des patientes atteintes de cancer cervico-utérins (d'après Vernon *et al.*, 1997).

Analyse incluant 46 femmes dont les tumeurs primaires abritaient des POL E2 amplifiables comparé avec celle dont il manquait une ou plusieurs partie de la POL E2 (p=0,006)

2.4.4.4. Éléments de conclusion :

Ainsi, l'intégration du génome viral au sein du génome de la cellule hôte pourrait représenter un marqueur de progression tumorale. Toutefois, concernant le statut physique (intégré, épisomal ou mixte) du génome viral dans les différents stades lésionnels, il existe de grandes disparités entre les études. Ces différences peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité de la nature (et du nombre) des échantillons testés, des techniques utilisées mais aussi du type d'HPV testé. En effet, il a été démontré que les génomes d'HPV de type 16, 18 et 45 étaient significativement plus souvent intégrés que les génomes d'HPV de type 31 et 33 (Varnai *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que lorsque des formes épisomales et intégrées du génome viral coexistaient au sein de la même cellule, les protéines E2 exprimées à partir des formes épisomales avaient la capacité de trans-inhiber la transcription des gènes E6 et E7 de génomes intégrés (Bechtold *et al.*, 2003) (Pett & Coleman, 2007). Par conséquent, la quantification des transcrits ou des protéines E6/E7 pourrait aussi constituer un outil performant pour déterminer le risque de progression vers des lésions précancéreuses et cancéreuses. Enfin, dans la majeure partie des études citées ci-dessus, la proportion de génomes intégrés, au sein de chaque échantillon, n'a été que rarement décrite (Cricca *et al.*, 2007, Lukaszuk *et al.*, 2003, Peitsaro *et al.*, 2002, Yoshinouchi *et al.*, 1999) et il n'y a pas de données concernant l'utilité de l'intégration comme marqueur clinique dans la littérature.

2.5. Expression des protéines virales :

2.5.1. Transcription :

2.5.1.1. Mode de transcription :

Le génome des HPV contient 2 promoteurs principaux : un promoteur précoce et un promoteur tardif.

- Le promoteur précoce, p97 chez HPV16 et p105 chez HPV18 (Schneider-Gadicke & Schwarz, 1986), se situe en amont de la POL E6 et il est responsable de la transcription des gènes précoces (Smotkin & Wettstein, 1986). Il est très fortement régulé par des cis-éléments situés dans le LCR. Ces cis-éléments incluent les 4 sites de liaison à E2 décrits précédemment (2.4.1.1.a).
- Le promoteur tardif, p670 chez HPV16, se situe dans la POL E7 et il est responsable de la transcription des gènes tardifs.

Les transcrits primaires précoces (ou ARN pré-messagers) dont la transcription est initiée par le promoteur précoce possèdent tous 3 exons et 2 introns. Ils sont polyadénylés sur le nucléotide 4 215 (HPV16) et vont subir un épissage alternatif. Pour HPV16 (Figure 16), chacun de ces ARN pré-messagers peut être épissé par l'utilisation de :

- 3 sites d'épissage alternatif situés aux nucléotides 409, 526 ou 742 dans l'intron 1 (Ordonez *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 2004).
- 3 autres sites d'épissage alternatif situés aux nucléotides 2582, 2709 ou 3358 dans l'intron 2 (Doorbar *et al.*, 1990, Sherman & Alloul, 1992, Sherman *et al.*, 1992).

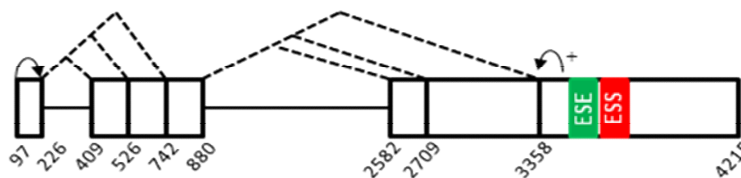


Figure 16 : Epissage alternatif depuis le promoteur précoce chez HPV16 (d'après Zheng et Baker, 2006)

L'épissage de l'ARN pré-messager est assuré par un ensemble de complexes ribonucléoprotéiques appelé spliceosome. Chaque complexe, appelé snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein) contient un ARN et plusieurs protéines. Le « choix » des sites d'épissage alternatif (donneurs et accepteurs) est modulé par de

nombreux facteurs d'épissage et notamment par les protéines SR (Serin/Arginin Rich proteins). De plus, des séquences nucléotidiques, appelées ESE pour Exonic Splicing Enhancers et ESS pour Exonic Splicing Silencer, peuvent favoriser ou réprimer l'épissage (Schwartz, 2008).

L'utilisation de ces différents sites induit la production d'au moins 14 ARN messagers (pour HPV16) possédant divers potentiel de traduction (Zheng & Baker, 2006).

Les ARN pré-messagers dont la transcription est initiée par le promoteur tardif possèdent eux aussi 3 exons et 2 introns. Ils sont polyadénylés sur le nucléotide 7321 (HPV16) et vont subir un épissage alternatif. Le second intron (3358 à 3632 pour HPV16) peut aussi servir d'exon (Zheng & Baker, 2006). La conservation de cet intron est indispensable à la production de la protéine L2 et elle est favorisée par la liaison de la protéine hnRNP-A1 à l'ESS situé dans la région 3' des transcrits tardifs (Zhao *et al.*, 2004).

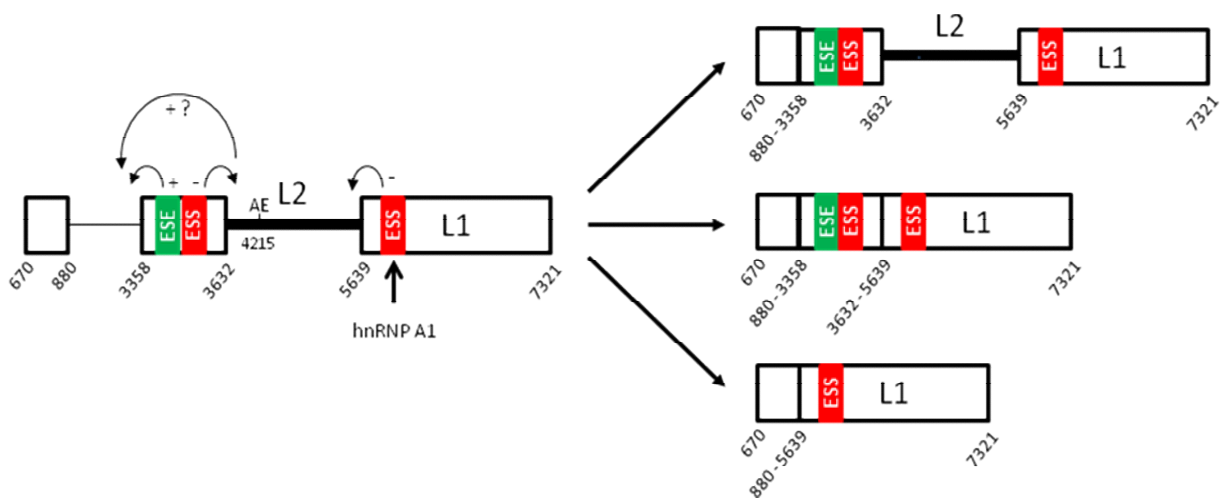


Figure 17 : Epissage alternatif depuis le promoteur tardif chez HPV16 (d'après Zheng et Baker, 2006).

Les ARN messagers produits à partir de ces 2 promoteurs sont polycistroniques, c'est-à-dire qu'ils contiennent plusieurs introns et peuvent coder plusieurs protéines (Zheng & Baker, 2006). Par exemple, 3 transcrits codent les oncoprotéines E6 et E7 (transcrits 1, 6 et 11 sur la Figure 18) et ces 2 oncoprotéines sont traduites à partir d'un transcrit bicistronique E6/E7 (Schwarz *et al.*, 1985, Smotkin & Wettstein, 1986).

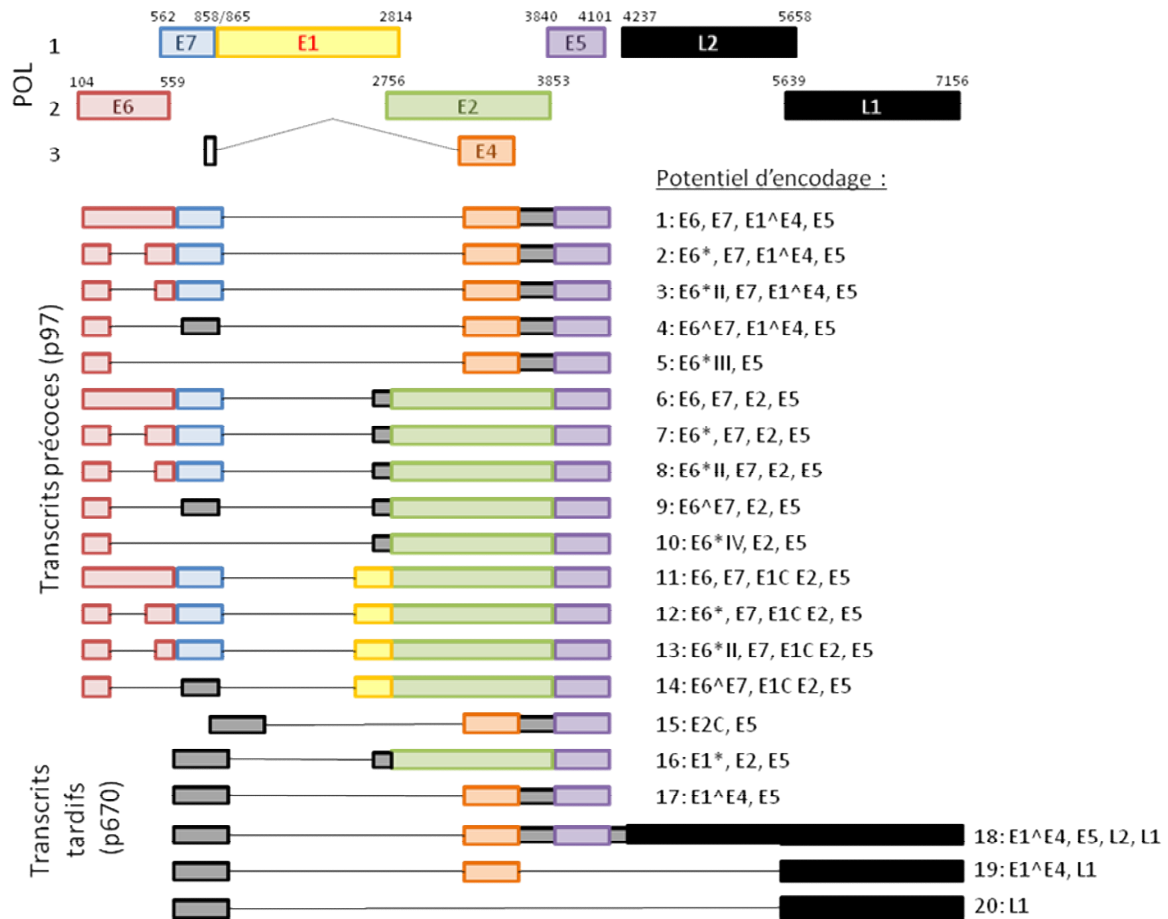


Figure 18 : Les transcrits d'HPV16 (d'après Zheng et Baker, 2006)

Concernant E6, l'épissage alternatif engendre plusieurs transcrits, 3 pour HPV16 et 2 pour HPV18 (Figure 19) (Schneider-Gadicke & Schwarz, 1986, Zheng & Baker, 2006):

- **un transcrit « complet » de E6** : n83 à n559 pour HPV16 et n105 à n581 pour HPV18.
- **un transcrit tronqué E6*I** : avec une délétion de n226 à n409 pour HPV16 et de n229 à n581 pour HPV18.
- **un transcrit tronqué E6*II** : avec une délétion de n226 à n526 pour HPV16. E6*II n'a pas été décrit pour HPV18.

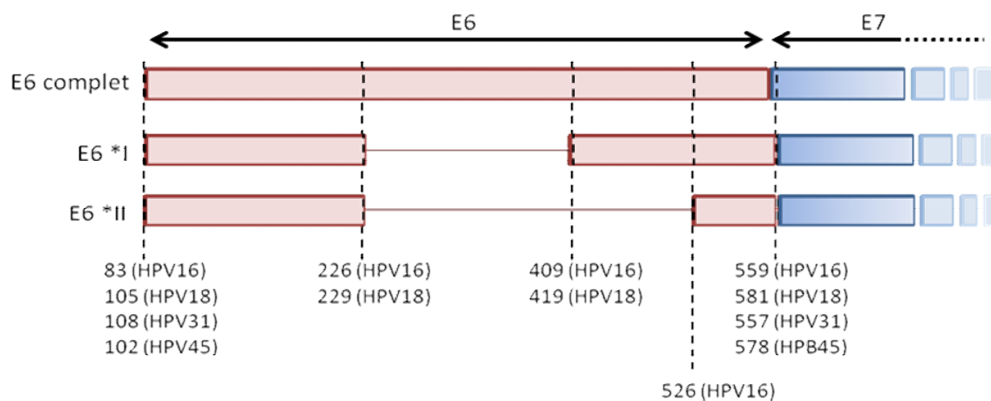


Figure 19 : Transcrits de E6FL, E6*I et E6*II (Schéma original)

2.5.2. Traduction :

Classiquement, la traduction suit un processus en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Lors de l'initiation, il y a formation d'un complexe de pré-initiation composé de la petite sous-unité du ribosome (40S), de l'ARNt méthionine (ARNt Met Initiateur) et du facteur d'initiation eIF-2 (lié à un GTP). Ce complexe va reconnaître et lier l'extrémité 5' de l'ARNm (coiffe 6-méthyl-guanosine-triphosphate ou séquence CAP) puis se déplacer le long de l'ARNm jusqu'à reconnaissance de la séquence consensus Kozak (GCCRCCaugG). Après l'initiation et l'élongation, la terminaison de la traduction a lieu lorsque le ribosome rencontre l'un des 3 codons stop (UAA, UAG, UGA). Ces codons sont reconnus par un facteur protéique eRF qui se lie au ribosome, induit la libération du polypeptide synthétisé. Le ribosome inactif se dissocie et libère l'ARNm.

Les transcrits d'HPV sont polycistroniques. De ce fait, seule la traduction du premier cistron (en 5') est possible par ce processus de traduction. Ainsi, des mécanismes capables d'initier leur traduction autrement que par la « voie classique » vont être mis en place. Deux mécanismes ont été décrits chez les HPV : il s'agit de la ré-initiation de la traduction et du mécanisme de « leaky scanning ».

2.5.2.1. Ré-initiation de la traduction :

Dans certains cas, la terminaison de la traduction n'entraîne pas la dissociation du ribosome avec l'ARNm. En effet, seule la sous-unité 60S est dissociée du complexe de traduction et la sous-unité 40S reste associée à l'ARNm. La sous-unité 40S scanne alors l'ARNm jusqu'à ce qu'elle rencontre une nouvelle séquence Kozak où le ribosome sera alors capable de ré-initier la traduction (Kozak, 2002, Kozak, 2003). Ce phénomène n'est possible que sous 2 conditions : (i) un espace intercistronique suffisant (environ 100 pb) pour permettre à la sous-unité 40S de lier un nouvel ARNt initiateur (Kozak, 1987) et (ii) une concentration élevée du facteur d'initiation eIF2 (Hinnebusch, 1997).

Il a été démontré que les oncoprotéines E7 d'HPV16 et 18 étaient produites par ce mécanisme depuis les transcrits E6*I mais pas depuis les transcrits non-épissés E6/E7 (Smotkin *et al.*, 1989, Tang *et al.*, 2006). En effet, le transcrit non épissé E6/E7 porte les 2 POL séparées de seulement 2 nucléotides et le complexe ribosomal n'a pas le temps ou l'espace pour se reformer après la traduction de E6. En revanche, l'épissage de E6*I induit un décalage du cadre de lecture qui va créer un codon stop prématuré et accroître la distance de 130 nucléotides entre le codon stop de E6 et le codon d'initiation de E7 ; cela permet au ribosome de réinitialiser la traduction (Tang *et al.*, 2006).

2.5.2.2. Mécanisme de « leaky scanning » :

Ce mécanisme utilise le fait que certains codons initiateurs sont situés dans une séquence ayant une identité faible avec la séquence Kozak. De ce fait, une certaine proportion des complexes d'initiation de la traduction ne va pas reconnaître ce codon. Ainsi, le complexe d'initiation va continuer de scanner l'ARNm jusqu'au codon d'initiation suivant (Kozak, 2002, Kozak, 2003). Ce mécanisme, appelé « leaky scanning », est utilisé lors de la traduction de certaines protéines d'HPV et il a notamment été démontré que la protéine E7 pouvait être traduite grâce à ce mécanisme (Stacey *et al.*, 1995, Stacey *et al.*, 2000).

2.5.3. Expression des transcrits E6/E7 :

A ce jour, peu d'anticorps assez spécifiques et performants pour permettre l'étude des oncoprotéines E6 et E7 par western-blotting sont disponibles. Ainsi, pour des raisons pratiques, l'étude de l'expression de ses protéines se fait indirectement via l'étude des transcrits. Les 2 principales méthodes utilisées pour l'étude des transcrits sont : la RT-PCR (Reverse Transcription PCR), et la technologie NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) qui est une méthode d'amplification isotherme reposant sur l'action conjointe de trois

enzymes : transcriptase inverse de l'AMV, Rnase-H et polymérase-ARN T7 (technologie utilisée par la trousse commerciale HPVproof). Ces techniques ont permis d'étudier l'expression des transcrits comme marqueur de progression.

Expression des transcrits E6/E7 et grade des lésions cervico-utérines :

Dans les échantillons normaux, il a été démontré que les transcrits E6/E7 étaient présents en très faible quantité, voir absents. Falcinelli *et al.* ont montré par RT-PCR, en 1993, que sur 23 échantillons HPV16 positifs et de cytologie normale, aucun n'exprimait d'ARNm E6 (Falcinelli *et al.*, 1993). Ces résultats ont été confirmés par des études utilisant des PCR temps-réel (Lamarcq *et al.*, 2002) ou le test HPV Proofer (Molden *et al.*, 2006, Molden *et al.*, 2005a). En particulier, Molden *et al.* ont démontré que les transcrits E6/E7 étaient détectables dans moins de 1,5% des échantillons cervico-utérins de cytologie normale.

En revanche, il a été observé que les transcrits E6/E7 étaient exprimés dans la majorité des cancers du col de l'utérus : dans 90% des cas pour Kraus *et al.* (Kraus *et al.*, 2006) et 100% des cas pour Van der Brule *et al.* et Nagakawa *et al.* (Nakagawa *et al.*, 2000, van den Brule *et al.*, 1991).

Par conséquent de nombreux auteurs ont tenté d'établir un lien entre le grade des lésions et l'expression des transcrits E6/E7. En 1990 tout d'abord, Johnson *et al.* ont montré, par RT-PCR, qu'il n'y avait pas de lien entre le grade lésionnel et l'expressions de E6/E7 (Johnson *et al.*, 1990). Ces résultats, qui ont été par la suite confirmés par de nombreux auteurs, utilisant des techniques de RT-PCR ou la technique APOT (Hafner *et al.*, 2008, Lanham *et al.*, 2001, Nishikawa *et al.*, 1991, Sherman *et al.*, 1992), sont controversés. En effet, dès 1997, Forslund *et al.* ont constaté sur une série de 89 échantillons, que le nombre de CIN2 exprimant des transcrits E6/E7 était significativement plus élevé que le nombre de CIN1 exprimant ces transcrits (Forslund *et al.*, 1997). Ces résultats ont par la suite été confirmés par d'autres auteurs montrant que plus le stade lésionnel était élevé, plus la proportion d'échantillons exprimant les transcrits E6/E7 était grande (Andersson *et al.*, 2006, Castle *et al.*, 2007a, Cuschieri *et al.*, 2004, Lie & Kristensen, 2008, Manavi *et al.*, 2008, Rosini *et al.*, 2007, Sathish *et al.*, 2004, Scheurer *et al.*, 2005, Sotlar *et al.*, 1998, Sotlar *et al.*, 2004, Varnai *et al.*, 2008, Wang-Johanning *et al.*, 2002). En particulier, Sotlar *et al.* ont décrit sur une série de 227 échantillons, que des transcrits E6/E7 étaient détectables dans 18% des échantillons normaux, 58% des CIN1, 77% des CIN2 et 84% des CIN3.

Il a été proposé que la détection d'ARNm de E6/E7 puisse être utilisée comme un marqueur de lésions de haut grade (Castle *et al.*, 2007a, Molden *et al.*, 2006, Molden *et al.*, 2005a, Molden *et al.*, 2005b, Rosini *et al.*, 2007, Sathish *et al.*, 2004, Varnai *et al.*, 2008). Castle *et al.* ont notamment démontré que la présence

d'ARN E6/E7, détectée par la trousse HPV Proofer, était un très bon marqueur de lésions de type CIN3+ (Castle *et al.*, 2007a). De plus, il a été démontré que le test PreTect HPV Proofer était capable d'identifier :

- les femmes abritant une CIN2 avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 85% (Molden *et al.*, 2005b).
- les femmes abritant une CIN3 avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 55% (Varnai *et al.*, 2008)

Expression des transcrits E6/E7 et risque d'apparition et de progression de lésions précancéreuses et cancéreuses :

L'expression des transcrits E6/E7 étant corrélée au grade de la lésion, il a été proposé que la détection de ces transcrits puisse être utilisée comme marqueur du risque d'apparition et de progression de lésions précancéreuses et cancéreuses (Cuschieri *et al.*, 2004, Lie & Kristensen, 2008, Rosini *et al.*, 2007, Sotlar *et al.*, 1998, Sotlar *et al.*, 2004). De plus, Cuschieri et collaborateurs ont démontré que sur 54 femmes HPV positives (HPV-HR) et ayant une cytologie normale, celles dont les transcrits E6/E7 sont détectables étaient significativement plus à risque d'abriter une infection persistante à 2 ans ($p=0,013$) que les femmes chez lesquelles il n'est pas possible de détecter les transcrits (Cuschieri *et al.*, 2004).

De plus, 3 études ont montré que la recherche de transcrits E6/E7 dans les ganglions sentinelles de patientes atteintes de cancer du col de l'utérus apporte des informations essentielles au diagnostic. En effet, les auteurs ont été capables de détecter des transcrits E6/E7 dans 14% des ganglions histologiquement négatifs (Rose *et al.*, 1994) et ont proposé que la recherche des transcrits est plus spécifique que la recherche d'ADN d'HPV puisque les ARNm ne sont produits que dans les cellules vivantes alors que l'ADN d'HPV peut être présent dans les cellules mortes séquestrées dans les ganglions (Czegledy *et al.*, 1994, Czegledy *et al.*, 1995). Enfin, Tseng *et al.* ont démontré que la présence de transcrits E6 dans le sang de femmes atteintes de cancer du col de l'utérus était associée à un volume tumoral important (plus de 4 cm) ($p=0,03$) et à la présence de métastases dans les ganglions pelviens ($p=0,03$). De plus, les auteurs ont démontré que parmi les femmes traitées par radiothérapie, après 22 mois de suivi, celles présentant des transcrits E6 dans le sang au début du suivi avaient un plus grand risque de rechute que celles ne présentant pas de transcrits ($p=0,02$). Il a aussi été démontré que la présence de transcrits E6 dans le sang en début de suivi était associée à la présence de métastases distantes après 22 mois ($p=0,01$) (Tseng *et al.*, 1999). Les auteurs ont donc proposé que la présence de transcrits de E6 dans le sang pourrait être un marqueur précoce des patientes à risque de développer des métastases. Enfin, la présence de fortes concentrations d'ARNm E6/E7 dans les cancers serait de mauvais pronostic (de Boer *et al.*, 2007).

Expression de E6, E6*I et E6*II :

Il existe 3 formes de protéines E6 : une forme complète (E6FL), et 2 formes tronquées : E6*I et E6*II. Parmi ces 3 formes, seule la protéine E6 complète possède les capacités d'immortalisation et de transformation décrites au chapitre 2.4.1.3. La protéine E6*I, qui est la forme la plus abondante (Doorbar *et al.*, 1990, Hafner *et al.*, 2007), est capable de former des dimères avec la protéine E6FL. Par conséquent, E6FL ne peut plus lier la protéine p53 par son extrémité C-terminale (Guccione *et al.*, 2004, Pim *et al.*, 1997, Scheffner *et al.*, 1994). De plus, la protéine E6*I est aussi capable de lier la protéine E6AP. La protéine E6*I agit donc comme un transdominant négatif de E6FL. La protéine E6*I a donc des propriétés antiprolifératives (De la Cruz-Hernandez *et al.*, 2005, Guccione *et al.*, 2004, Pim *et al.*, 1997, Scheffner *et al.*, 1994, Vaeteewootacharn *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, le rôle de la protéine tronquée E6*II n'est pas connu.

C'est pourquoi, certains auteurs se sont intéressés aux proportions des différents transcrits de E6, E6 complet (E6FL), E6*I et E6*II, dans les échantillons cervico-utérins. Dans la majeure partie des études, il a été observé que la forme E6*I était la forme majoritaire dans les échantillons, quelque soit le grade de la lésion étudiée (Forslund *et al.*, 1997, Shirasawa *et al.*, 1991, Shirasawa *et al.*, 1988).

Concernant un éventuel lien entre le grade de la lésion et l'expression des différents transcrits de E6, les données de la littérature sont contradictoires. En effet, plusieurs auteurs ont démontré qu'il n'y avait pas de différence dans les proportions d'expression de ces transcrits selon le grade des lésions (Hafner *et al.*, 2008, Nishikawa *et al.*, 1991, Sherman *et al.*, 1992). En particulier, Hafner *et al.* ont récemment montré que ni le rapport (E6/E6FL) ni le rapport (E6/E6*I) n'étaient significativement différents entre les lésions de types CIN et les cancers (Hafner *et al.*, 2008). Toutefois, Mc Nicol *et al.* ont montré que, bien que le niveau d'expression de E6*I ne variait pas selon le grade des CIN étudiées sur des frottis, l'expression de E6*II était significativement diminuée dans des biopsies issues de CIN2/3 ($p=0,014$) (McNicol *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que lorsque les transcrits E6*I et E6*II étaient tout deux détectés, une proportion E6*I/E6*II supérieure à un rapport 95%/5% était corrélée à la présence de lésions de haut grade (Hsu *et al.*, 1993). Enfin, chez des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus, de Boer *et al.* ont démontré que la survie à 3 ans était plus faible chez les femmes avec de faibles taux de E6*I (survie de 53%) par rapport aux femmes avec de forts taux d'expression (93% de survie) (de Boer *et al.*, 2007). Ces résultats, qui sont similaires chez les femmes infectées par HPV18 (76% contre 53%), suggèrent que la présence de taux élevés de transcrit E6*I serait un facteur de bon pronostic.

En conclusion, la quantification des ARNm E6/E7 pourrait être un outil intéressant pour améliorer le dépistage des lésions de haut grade et des cancers. Toutefois, il reste difficile de comparer les études entre elles et d'obtenir un consensus sur ces données. Les différences entre les études peuvent s'expliquer par la variabilité des techniques utilisées mais aussi par l'échantillonnage. En effet, certains travaux ont été réalisés sur des biopsies, d'autres sur des résidus de frottis liquides et d'autres sur des prélèvements cellulaires dédiés. L'ARN étant sensible aux dégradations, l'échantillonnage et la conservation des échantillons peuvent influencer sur les résultats obtenus. Des études supplémentaires, visant à déterminer le lien entre charge virale, intégration, expression des transcrits de E6, expression de E2 et grade de la lésion sur de grandes séries d'échantillons, sont cependant nécessaires.

3. La vaccination :

L'infection par un HPV à haut risque étant nécessaire au développement des cancers du col de l'utérus, la vaccination anti-HPV représente une stratégie évidente dans la lutte contre ces cancers. Il existe deux approches vaccinales : la vaccination thérapeutique qui a pour but d'éliminer les cellules infectées par un HPV et la vaccination prophylactique qui a pour but de prévenir l'infection virale.

La vaccination thérapeutique vise à stimuler la production de cellules CD8 cytotoxiques ou lymphocytes T cytotoxiques (CTL) capables d'éliminer spécifiquement les cellules infectées et/ou tumorales. Trois types de vaccins thérapeutiques sont en cours de développement : des vaccins peptidiques et protéiques, des vaccins vivants recombinants et des vaccins à ADN. Certains de ces vaccins sont performants dans des modèles murins, cependant leur efficacité chez l'homme reste à démontrer.

La vaccination prophylactique vise à stimuler l'immunité humorale et ainsi neutraliser les HPV et les empêcher d'infecter leur cellule cible, *via* la production d'anticorps au niveau génital. Ces vaccins sont composés de protéines L1 (produites *in vitro* dans des levures ou dans des cellules d'insecte transfectées par un Baculovirus recombinant) capables de s'assembler en capsides vides appelées VLP pour « Virus Like Particles »

A l'heure actuelle, 2 vaccins prophylactiques sont commercialisés :

- un vaccin bivalent, le Cervarix™ (GlaxoSmithKline) qui cible les génotypes 16 et 18
- un vaccin quadrivalent, le Gardasil® (Merck & Co et Aventis Pasteur MSD) qui cible les génotypes 16, 18, 6 et 11. La vaccination contre ces 2 types additionnels a pour but de prévenir les lésions génitales externes telles que les condylomes, qui sont dues à HPV6 et 11 dans 75 à 90% des cas (83% en France (Aubin *et al.*, 2008)).

La vaccination par ces préparations nécessite 3 injections à 0, 1 et 6 mois pour Cervarix™ et à 0, 2 et 6 mois pour Gardasil®.

Il a été démontré que ces vaccins étaient très immunogènes. En effet, la séroconversion est obtenue dans pratiquement 100% des cas et les taux d'anticorps obtenus après vaccination sont 10 à 100 fois supérieurs aux taux obtenus après une infection naturelle (Harper *et al.*, 2004, Villa *et al.*, 2006a). Des études ont montré que les titres d'anticorps atteignaient leur maximum 1 mois après la troisième dose de vaccin (6 mois), diminuaient au long de l'année suivante et restaient stables pendant la fin du suivi (5 ans pour le Cervarix™ et 4,5 ans pour le Gardasil®) (Harper, 2008, Harper *et al.*, 2006, Villa *et al.*, 2006b). Durant cette

phase plateau, les taux d'anticorps sont toujours supérieurs à ceux induits par une infection naturelle pour le Cervarix™. Une dose additionnelle de Gardasil® à 5 ans induit une réponse anamnétique avec des taux d'anticorps équivalents à ceux observés à la fin de la série de 3 injections (Olsson *et al.*, 2007). Ces données indiquent que le vaccin induit une réponse des lymphocytes B mémoires et procurerait donc une réponse immunitaire durable. Il a d'ailleurs été estimé par Fraser et collaborateurs, que des anticorps pourraient rester présents au moins 12 ans, voire à vie (Fraser *et al.*, 2007).

L'efficacité prophylactique de ces vaccins a été estimée dans 5 grandes études, analysées par Schiller *et al.* en 2008 (Schiller *et al.*, 2008) : GSK 001/007, Merck 007, PATRICIA (**PA**pilloma **TR**ial against **C**ancer In young **A**dults), FUTURE I et FUTURE II (**F**emales **U**nited **T**o **U**nilaterally **R**educe **E**ndo/**E**ctocervical disease). Le détail de ces études est présenté dans le Tableau 6, ci-dessous :

Tableau 6 : Caractéristiques des études d'efficacité des vaccins (Schiller *et al.*, 2008)

Etude	GSK 001/007	Merck 007	PATRICIA	FUTURE I	FUTURE II
Vaccin	Cervarix™	Gardasil®	Cervarix™	Gardasil®	Gardasil®
Nombre de femmes	1 113	552	18 644	5 455	12 167
Age moyen	20 (15-25)	20 (16-23)	20 (15-25)	20 (16-24)	20 (15-26)
Nombre de partenaires	≤6	≤4	≤6	≤4	≤4
Fréquence des visites	6 mois	6 mois	12 mois	6 mois	12 mois
Durée du suivi	48 mois	60 mois	15 mois ^a	36 mois ^a	36 mois ^a
Critères d'évaluation :	Infection incidente à HPV16 ou 18	- Infection à HPV6/11/16 ou 18 persistante - lésion cervicale	CIN2+ liée à HPV16 ou HPV18	- CINI+ liée à HPV16 ou HPV18 - condylomes externes	CIN2+ lié à HPV16 ou HPV18
- secondaires	Infection persistante ou CIN1+		- Infection persistante - CIN1+		

^a Analyse intermédiaire des résultats, études prévues sur 4 ans de suivi

Ces études ont montré que les vaccins étaient efficaces contre la persistance de l'infection par les HPV ciblés par le vaccin, l'incidence des CIN1+ ou encore l'incidence des lésions génitales externes pour le vaccin quadrivalent (Tableau 7).

Tableau 7 : Effet prophylactique des vaccins contre les infections et les lésions liées aux HPV ciblés (Schiller *et al.*, 2008)

Vaccin	Etude	End-point	Efficacité du vaccin (intention de traiter modifiée) (95%CI)
Gardasil®	Merck 007	Persistance à 4 mois	94 (83-98)
		Lésions génitales externes	100 (<0-100)
		CIN1+ / AIS	100 (31-100)
	FUTURE I	CIN1+ / AIS	98 (92-100)
		Lésions génitales externes	95 (87-99)
FUTURE II	CIN2+ / AIS	95 (85-99)	
Cervarix™	GSK 001/007	Persistance à 6 mois	94 (78-99)
		Persistance à 12 mois	94 (61-100)
		CIN1 +	100 (42-100)
		CIN2 +	100 (-8-100)
	PATRICIA	Persistance à 6 mois	80 (70-87)
		Persistance à 12 mois	76 (48-90)
		CIN1 +	89 (59-99)
		CIN2 +	90 (53-99)

De plus, il a été récemment démontré que la protection apportée par le vaccin Gardasil® contre les lésions de type CIN3 associées à HPV16/18 était égale à 98% (95%CI : 89-100)(Ault, 2007). Pour les adénocarcinomes, l'efficacité du Gardasil® s'élève à 100% (95%CI : 31-100). Concernant le Cervarix™, il a été démontré que l'efficacité atteignait 100% pour la prévention des CIN2+ et des adénocarcinomes liés à HPV16/18 (Belak, 2007, Castle *et al.*, 2007b, Naucler *et al.*, 2007a, Rosini *et al.*, 2007, Smith *et al.*, 2007).

Enfin, il a été montré que Cervarix™ protégeait non seulement contre les infections à HPV16 et 18 mais aussi contre 94% des infections à HPV45 et 55% des infections à HPV31 (Harper *et al.*, 2006). En revanche, aucune réaction croisée n'a été observée avec les types 33, 52 et 58. Gardasil® protégerait quant à lui contre 60% des infections à HPV45, 36% des infections persistantes à HPV31 et 32% des infections à HPV52 à 6 mois (Paavonen *et al.*, 2007).

Il est admis que la vaccination des jeunes adolescentes doit être la priorité des programmes de vaccination (Wright *et al.*, 2006). En effet, les infections à HPV sont transmises sexuellement, sont très fréquentes chez les jeunes adultes et sont souvent contractées très vite après les premiers rapports sexuels. Les vaccins n'ayant pas d'action thérapeutique, ils seront le plus efficaces s'ils sont administrés avant le début de l'activité sexuelle. Par conséquent les programmes de vaccination doivent cibler les jeunes filles avant l'âge

moyen des premiers rapports sexuels mais aussi les jeunes femmes n'ayant pas encore eu de rapports sexuels (Schiller *et al.*, 2008). Toutefois, un certain nombre de jeunes femmes sexuellement actives pourraient bénéficier de ces vaccins puisque elles n'ont pas forcément été en contact avec les HPV ciblés.

L'impact de la vaccination sera visible dans plusieurs années compte tenu de la période s'écoulant entre l'infection et le développement du cancer du col de l'utérus. Les résultats préliminaires suggèrent qu'une réduction importante des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus, mais aussi des autres cancers liés aux HPV (cancer du canal anal, cancers de la tête et du cou par exemple), devrait être observée.

Néanmoins, ces vaccins ne ciblent que les génotypes 16 et 18, et 32% des cancers du col de l'utérus sont causés par d'autres génotypes au niveau mondial. De plus, le coût élevé de ces vaccins sera un frein à la vaccination dans les pays en voie de développement dans lesquels la prévalence du cancer du col de l'utérus est très élevée. Ainsi le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin doit être poursuivi et des marqueurs des lésions prévalentes et incidentes, qui devront être adaptées à la population vaccinale, devront être développés.

4. Objectifs :

A l'heure actuelle, le dépistage du cancer du col de l'utérus se fait essentiellement par l'analyse cytologique de frottis cervico-utérin. Le frottis cervico-utérin, bien que très spécifique, manque toutefois de sensibilité. Il est admis que parmi les femmes chez lesquelles un cancer invasif est découvert, 30% avaient été régulièrement dépistées (Sawaya & Grimes, 1999) sans que les anomalies cytologiques n'aient été détectées. Environ 2/3 de ces faux négatifs seraient liés à un problème d'échantillonnage (les cellules anormales n'ayant pas été transférées sur la lame) et 1/3 à des erreurs de lecture ou d'interprétation.

Par conséquent, il est nécessaire de développer des outils afin d'améliorer le dépistage, que ce soit pour identifier les lésions de haut grade mais aussi pour distinguer les infections à risque de CIN2+ (celles qui vont induire des lésions précancéreuses et cancéreuses) des infections non à risque de CIN2+. Pour cela, il est impératif de mieux connaître l'histoire naturelle de l'infection en particulier au niveau moléculaire. Il est en effet reconnu que la persistance de l'infection est le facteur de risque le plus important et qu'elle est modulée par de nombreux facteurs liés à l'hôte, à l'environnement et au virus.

Pendant notre thèse, notre objectif a été (i) de mettre en place des techniques permettant l'analyse de facteurs viraux tels que la charge virale, l'intégration et l'expression des ARN messagers, (ii) de décrire l'évolution de ces facteurs viraux tout au long de l'histoire naturelle des lésions associées aux HPV-HR et (iii) d'évaluer l'intérêt de certains de ces marqueurs sur le plan clinique.

PARTIE 2 : Travaux personnels

1. Publication n°1 :

Human papillomavirus genotype distribution in low -grade Squamous intraepithelial lesions in France and comparison with CIN2/3and invasive cervical cancer The EDiTH III study

J-L. Prétet, A-C. Jacquard, **M. Saunier**, C. Clavel, R. Dachez, J. Gondry, P. Pradat, B. Soubeyrand,
Y. Leochmach, C. Mougin and D. Riethmuller

2008 ; Gynecologic Oncology 110, 179-184

Ce travail a été présenté sous forme orale :

Au 7th International Multidisciplinary Congress EUROGIN, Monaco, France, October 2007

Human papillomavirus genotypes in low-grade cervical lesions. Comparison with cervical cancer: the EDITH study.

Prétet JL, Jacquard AC, Saunier M, Clavel C, Dachez R, Gondry J, Soubeyrand B, Leocmach Y, Riethmuller D for the EDITH study group

Au 7th International Multidisciplinary Congress EUROGIN, Monaco, France, October 2007

Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in low-grade cervical lesions in France: the EDITH III study.

Clavel C, Jacquard AC, Saunier M, Dachez R, Gondry J, Soubeyrand B, Leocmach Y, Prétet JL, Mougin C, Riethmuller D for the EDITH study group.

A la 24th International Papillomavirus Conference, Pékin, Chine, Novembre 2007

Human papillomavirus genotypes in low-grade cervical lesions (LSIL). Comparison with invasive cervical cancer (ICC): The EDiTH Study.

Prétet JL, Jacquard AC, Saunier M, Clavel C, Dachez R, Gondry J, Soubeyrand B, Leocmach Y, Riethmuller D for the EDITH study group.

Introduction à la publication n°1 :

Objectifs :

Si la distribution des génotypes d'HPV dans les lésions de bas grade est connue dans de nombreux pays, elle a été peu étudiée en France. L'objectif de cette étude était de décrire la prévalence des différents génotypes d'HPV dans des lésions intra-épithéliales de bas grade (LSIL) en France. Ces prévalences ont ensuite été comparées à celles rapportées en France dans les cancers (SCC, étude EDITH I) pour identifier les génotypes associés préférentiellement à une progression maligne. Cette description a d'autre part contribué à évaluer les bénéfices potentiels de la vaccination HPV en France.

Méthode :

Trois cent quatre-vingt dix-sept frottis (Preservcyt®) avec un diagnostic de LSIL ont été collectés rétrospectivement dans plusieurs centres en France : le CHU d'Amiens, le CHU de Reims et le laboratoire LCL (Paris). La détection des HPV et leur génotypage ont été réalisés à l'aide de la trousse INNO-LiPA V2 qui permet l'identification de 24 types d'HPV.

Résultats :

De l'ADN d'HPV a été détecté dans 98% des échantillons et de l'ADN d'HPV-HR dans 64% des échantillons. Dans notre cohorte, l'âge moyen au diagnostic était de 31 ans pour les patientes avec des LSIL contre 50 ans pour les patientes avec des cancers. Les génotypes les plus fréquents dans les LSIL en France sont : HPV66 (25%), HPV16 (21%), HPV53 (18%), HPV51 (14%). Les HPV16 et 18, génotypes ciblés par les vaccins sont, quant à eux, identifiés dans 28% des cas et les HPV6, 11, 16 et/ou 18 dans 33% des LSIL. En comparant la prévalence des HPV dans les lésions de bas grade à celle des HPV dans les cancers, il a été observé que la prévalence des génotypes 16, 18 et 33 était 2 à 3 fois supérieures dans les cancers que dans les LSIL (ratio SCC/LSIL > 2) alors que la prévalence des autres génotypes dans les cancers était soit équivalente, soit inférieure à celle des LSIL.

Conclusion :

Dans cette étude, les 10 génotypes les plus fréquents dans les lésions de bas grade sont similaires à ceux décrits au niveau mondial. Toutefois, la prévalence de chacun de ces génotypes est différente. En particulier, dans notre étude, le génotype le plus fréquemment détecté est l'HPV66 (25% des échantillons), alors qu'il est détecté dans seulement 9% des LSIL et est à la huitième place dans la méta-analyse de

Clifford *et al.* (Clifford *et al.*, 2005b). Cette différence peut s'expliquer par des variations géographiques mais aussi par les techniques utilisées puisque les amorces utilisées pour le géotypage diffèrent par leur capacité à amplifier certains géotypes. En revanche, HPV16 qui est retrouvé dans 25% des lésions dans notre étude a une prévalence similaire à l'échelle mondiale (26,6% pour Clifford *et al.*).

La comparaison de la prévalence des types d'HPV dans les LSIL et dans les cancers suggère que les LSIL abritant les types 16, 18 ou 33 sont associées à un plus grand risque d'évolution vers des cancers que les LSIL associées à d'autres géotypes. Ces données suggèrent que les femmes avec des lésions de bas-grade associée à HPV16/18/33 devraient faire l'objet d'une attention particulière (colposcopie, biopsie) alors que les femmes avec des lésions de bas grade non-associées à ces géotypes pourraient bénéficier d'une prise en charge moins agressive.

Enfin, avec une efficacité du vaccin de 95% sur les CIN1 et une couverture vaccinale théorique de 100%, la vaccination HPV pourrait prévenir 27% (en utilisant un vaccin bivalent 16/18) à 32% (en utilisant un vaccin quadrivalent 6/11/16/18) des LSIL en France.

Human papillomavirus genotype distribution in low-grade squamous intraepithelial lesions in France and comparison with CIN2/3 and invasive cervical cancer[☆]

The EDiTH III study

Jean-Luc Prétet^{a,*}, Anne-Carole Jacquard^b, Maëlle Saunier^a, Christine Clavel^c, Roger Dachez^d, Jean Gondry^e, Pierre Pradat^{f,g,h}, Benoît Soubeyrand^b, Yann Leocmach^b, Christiane Mougin^a, Didier Riethmuller^{a,i}
for the EDiTH study group¹

^a EA3181, IFR133, Université de Franche-Comté, Besançon, France

^b Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France

^c CHU REIMS, IFR 53, Laboratoire Pol Bouin, Hôpital Maison Blanche, Reims, France

^d Laboratoire LCL, Paris, France

^e Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU d'Amiens, France

^f Service d'Hépatogastroentérologie, Hotel-Dieu, Hospices Civils de Lyon, France

^g IFR62 Lyon-Est, Université Claude Bernard Lyon 1, France

^h INSERM U871, Lyon, France

ⁱ Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Saint Jacques, Besançon, France

Received 20 February 2008

Available online 2 June 2008

Abstract

Objectives. In the present study (EDiTH III study), the genotype-specific prevalence of HPV in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) was estimated to predict the potential benefit of HPV vaccination in France. This prevalence was compared to that previously reported in France in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3, EDiTH II study) and squamous cell carcinoma (SCC, EDiTH I study) to identify the genotypes preferentially associated with a progression to malignancy.

Methods. 397 smears with LSIL diagnosis (Preservcyt[®]) were retrospectively collected in different centres in France and genotyped using the INNO-LiPA assay allowing the detection of 24 HPV genotypes.

Results. HPV was found in 98% of cases. The most prevalent genotypes in LSIL in France were HPV 66 (25%), HPV 16 (21%), HPV 53 (18%), 51 (17%) and 52 (14%). HPV 16 and/or 18 were present in 28% and HPV 6, 11, 16 and/or 18 in 33% of LSIL. The highest SCC/LSIL prevalence ratios were shown for HPV 16, 33 and 18.

Conclusions. With a 95% vaccine efficacy on CIN1 and theoretical vaccine coverage of 100%, HPV vaccination might prevent 27% (with a 16, 18 bivalent vaccine) and up to 32% (with a 6, 11, 16, 18 quadrivalent vaccine) of LSIL cases in France. In this study, LSIL related to HPV 16, 18 or 33 are at highest risk of progression to malignancy and thus could require a stringent surveillance. Conversely, anxiety and over-treatment could be avoided in women with low risk of progression.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Human papillomavirus; HPV; Low-grade squamous intraepithelial lesions; LSIL; Prevalence; Genotyping; Risk ratio

Abbreviations: CIN, cervical intraepithelial neoplasia; HPV, human papillomavirus; HR, high risk; LR, low risk; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion, SCC, squamous cell carcinoma; VLP, virus-like particles.

[☆] This study was funded by Sanofi Pasteur MSD.

* Corresponding author. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CHU J. Minjoz, Boulevard Fleming, 25030 Besançon, France. Fax: +33 3 81 66 83 42.

E-mail address: jean_luc.pretet@univ-fcomte.fr (J.-L. Prétet).

¹ Etude de la Distribution des Types d'HPV en France.

Introduction

Genital infection with human papillomavirus (HPV) is highly prevalent in young sexually active women with 60% to 80% of sexually active U.S. adolescent girls testing positive for HPV [1,2]. Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) appear in young women early during the natural history of HPV infection. The host immune system may clear these infections which spontaneously regress to normal cytology in 47% of cases but 20% may progress to high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) within 24 months [3], some of which progressing sometimes to cervical cancer [4].

About 70,000 LSIL (1.12% of the 6 million of pap smears) are diagnosed each year in France. LSIL are most often managed by colposcopy to eventually reveal a CIN. About 70% of LSIL are histologically diagnosed as CIN1 and 50% of these CIN1 are hospitalized in France [5].

Two HPV VLP L1 vaccines are now available: an HPV 16/18 bivalent vaccine, Cervarix[®] for the prevention of HPV 16/18-related genital diseases and an HPV 6/11/16/18 quadrivalent vaccine, Gardasil[®] which not only protects against HPV 16/18-related genital diseases but also against HPV 6 and HPV 11 associated genital diseases [6]. The objective of this study was to assess the genotype-specific prevalence of HPV in smears evocative of LSIL cases to predict the potential benefit of HPV vaccination in France. Instead of analyzing CIN1, we decided to work on cytological specimens since in routine screening those lead to patient management and associated morbidity. Preventing LSIL would significantly reduce the morbidity associated with the management of these lesions, reducing patient anxiety and over-treatment [5,7,8].

HPV type-specific prevalence in LSIL was then compared to that we previously reported in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) [9] and squamous cell carcinoma (SCC) [10] to identify genotypes associated with a lesion at risk of progression to malignancy.

Materials and methods

Sample collection and patient data

397 smears with LSIL diagnosis were obtained from three French Centres collecting smears on liquid medium: two university hospitals (Amiens and Reims, $n=197$) and one private laboratory (Paris, $n=200$). All cervical smears had been collected on liquid-based cytological medium (Preservcyt[®]). These specimens were retrospectively collected by descending chronological order starting on October 2006.

Patient data such as age at diagnosis, area of residence, and year of sample collection were extracted from medical records.

DNA isolation and HPV genotyping

Cervical samples from Amiens and Reims were managed locally for DNA extraction with Qiamp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) (Amiens) and with the BioRobot EZ1 Workstation (Qiagen) (Reims). Quality of extracted DNA was further assessed by spectrophotometer analysis. Samples from Paris (4 mL of Preservcyt[®]) were sent to the laboratory of Cellular and Molecular Biology in Besançon, where DNA was extracted with the Qiamp DNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

HPV genotyping was centralised in Besançon and performed using the INNO-LiPA HPV Genotyping v2 test (Innogenetics Inc, Gent, Belgium). This kit allows

the detection of 24 HPV types, both high-risk (HR) and low-risk (LR). A detailed procedure for genotyping was described elsewhere [9]. Positive control (DNA from CaSki cells harbouring HPV 16) and negative control (molecular biology grade water) were systematically used in parallel with DNA from cervical specimen for each run. A band pattern consistent with the presence of HPV 16 DNA only was revealed on the strips when CaSki cell DNA was used. The negative controls never gave any band on the strips. HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 were considered as high-risk genotypes whereas HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 66, 70 and 74 were classified as low-risk. As suggested by the INNO-LiPA manufacturer, HPV genotypes 53 and 66, sometimes considered as "probable high-risk" genotypes [11], were included in the low-risk group.

Comparison of HPV prevalence in LSIL, CIN2/3 and SCC

HPV type-specific prevalence in smears evocative of LSIL was compared to that determined in CIN2/3 and SCC histological specimens and previously reported in two large French multicentre studies (EDiTH I [10] and II [9]). For relevant comparison between squamous samples, 70 cases with adenocarcinoma were excluded from the EDiTH I study. 493 CIN2/3 and 446 SCC specimens had been collected between 2000 and 2005 and genotyped with the same INNO-LiPA HPV genotyping kit we used in the present study.

Statistical analysis

Sample size calculation was performed to detect genotypes with a prevalence as low as 5% with a 2.5% precision. Considering $\alpha=0.05$, the estimated sample size was 293. This number was increased by 20% to compensate for possible recruitment anomalies giving a total of 367 cases. The ratio of HPV prevalence in squamous cell carcinomas (SCC) versus LSIL together with its 95% confidence interval was calculated for each genotype to appreciate their importance in the risk of progression to cervical cancer.

Ethical consideration

According to the French legislation (Public Health Code modified by the law n^o 2004-806, August 9, 2004 and the Huriet-S  rusclat act 88-1138, December

Table 1
Distribution of high-risk (HR) and low-risk (LR) HPV genotypes in 397 specimens with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL)

HPV type	HR/LR ^a	All infections (single or multiple) <i>n</i> (%)	Single infections <i>n</i> (%)
66	LR	99 (24.9)	38 (9.6)
16	HR	85 (21.4)	31 (7.8)
53	LR	72 (18.1)	28 (7.1)
51	HR	69 (17.4)	16 (4.0)
52	HR	55 (13.9)	8 (2.0)
18	HR	30 (7.6)	8 (2.0)
31	HR	29 (7.3)	8 (2.0)
6	LR	26 (6.5)	11 (2.8)
45	HR	24 (6.0)	6 (1.5)
58	HR	23 (5.8)	11 (2.8)
68	HR	23 (5.8)	3 (0.8)
39	HR	21 (5.3)	3 (0.8)
42	LR	19 (4.8)	3 (0.8)
35	HR	17 (4.3)	5 (1.3)
74	LR	14 (3.5)	3 (0.8)
54	LR	11 (2.8)	2 (0.5)
11	LR	9 (2.3)	0 (0.0)
70	LR	9 (2.3)	1 (0.3)
40	LR	7 (1.8)	4 (1.0)
33	HR	6 (1.5)	1 (0.3)
59	HR	6 (1.5)	1 (0.3)
Other		36 (9.1)	1 (0.3)
HPV negative		7 (1.8)	

^aAccording to the INNO-LiPA manufacturer's classification.

Table 2

Prevalence of vaccine targeted HPV types (HPV 6, 11, 16 and/or 18) as single or multiple infections among 397 specimens with low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL)

Vaccine targeted HPV type	Alone (without any other HPV type) n (%)	In combination (with other HPV type) n (%)	Total n (%)
HPV 6	11 (2.8%)	15 (3.8%)	26 (6.5%)
HPV 11	0	9 (2.3%)	9 (2.3%)
HPV 6 and/or 11	11 (2.8%)	22 (5.5%)	33 (8.3%)
HPV 16	31 (7.8%)	54 (13.6%)	85 (21.4%)
HPV 18	8 (2.0%)	22 (5.5%)	30 (7.6%)
HPV 16 and/or 18	40 (10.1%)	71 (17.9%)	111 (28.0%)
HPV 6 and/or 11 and/or 16 and/or 18	57 (14.4%)	76 (19.1%)	133 (33.5%)

20, 1988) and since this study only involved anonymous data extracted from medical records and stored cytological specimens, no ethics committee approval and no informed consent from the patients were necessary.

Results

A total of 397 LSIL cases recruited from three different (public and private) centres in France were included in this study. Fifty percent of cases were recruited in the Paris Centre and 25% in each of the two other centres (Amiens and Reims). Median age at diagnosis was 31 years (range 16–72). HPV was present in 390/397 cases (98.2%). One hundred and ninety-two cases (48.4%) had a single infection whereas 198 (49.9%) had at least 2 HPV genotypes. Presence of at least one high-risk HPV genotype was observed in 64% whereas infection with low-risk genotypes only was found in 27% of all samples. Seven percent of the remaining samples had undetermined HPV types (HPV-positive but HPV genotype other than the 24 detected by the assay).

Table 3

Prevalence of HPV genotypes in low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2/3) [9] and squamous cell carcinomas (SCC) [10]

	HPV prevalence (%)									
	All infections (single or multiple)					Single infections				
	LSIL (n=397)	CIN2/3 (n=493)	SCC (n=446)	SCC/LSIL ratio	95% CI	LSIL (n=397)	CIN2/3 (n=493)	SCC (n=446)	SCC/LSIL ratio	95% CI
HPV 16	21.4	62.3	74.2	3.47	2.85–4.22	7.8	40.4	55.4	7.10	5.01–10.0
HPV 33	1.5	12.2	4.7	3.13	1.27–7.64	0.3	5.5	2.5	8.33	1.27–75.5
HPV 18	7.6	4.3	15.9	2.09	1.41–3.16	2.0	0.6	5.6	2.80	1.27–6.10
HPV 31	7.3	15.4	7.0	0.96	0.58–1.55	2.0	8.3	3.6	1.80	0.77–4.11
HPV 59	1.5	0.2	1.4	0.93	0.29–2.74	0.3	0	0.2	0.67	0.06–14.2
HPV 68	5.8	2.8	3.8	0.66	0.36–1.21	0.8	0.6	1.4	1.75	0.45–7.07
HPV 45	6.0	1.2	3.4	0.57	0.30–1.05	1.5	0	1.8	1.20	0.42–3.39
HPV 58	5.8	6.5	2.2	0.38	0.19–0.80	2.8	3.0	0.5	0.18	0.04–0.73
HPV 39	5.3	2.4	2.0	0.38	0.18–0.82	0.8	0.4	0.7	0.87	0.18–4.39
HPV 35	4.3	4.3	1.3	0.30	0.13–0.79	1.3	1.4	0.7	0.54	0.13–2.22
HPV 52	13.9	8.7	3.1	0.22	0.13–0.40	2.0	2.6	1.4	0.70	0.23–1.91
HPV 6 (low-risk)	6.5	2.8	1.4	0.22	0.09–0.49	2.8	0	0.2	0.07	0.01–0.62
HPV 11 (low-risk)	2.3	1.4	0.2	0.09	0.01–0.78	0	0.2	0.2	–	–
HPV 51	17.4	7.7	1.4	0.08	0.03–0.18	4.0	2.4	0.2	0.05	0.007–0.42
HPV 53 (low-risk)	18.1	2.0	1.4	0.08	0.03–0.17	7.1	0.8	0.7	0.11	0.03–0.31
HPV 66 (low-risk)	24.9	2.2	0.5	0.02	0.004–0.07	9.6	0.6	0	0	–

Genotype-specific HPV prevalence

Table 1 indicates that the most prevalent genotypes were HPV 66 (25%) and HPV 16 (21%) followed by HPV 53 (18%), 51 (17%), 52 (14%), 18, 31, 6, and 45 (6 to 8%). The distribution of HPV 6, 11, 16 and/or 18 as single or multiple infections is presented in Table 2. HPV 6 and HPV 11 single infections were observed in 2.8% and 0% of LSIL cases respectively whereas HPV 16 and HPV 18 single infections were found in 7.8% and 2% of cases respectively. HPV 6 and/or 11, alone or in combination with other HPV types were present in 8.3% of LSIL cases and HPV 16 and/or 18 in 28% of cases. Presence of at least one vaccine targeted type (HPV 6, 11, 16 or 18) without any other HPV type was identified in 14.4% of cases whereas the overall proportion of LSIL with HPV 6 and/or 11 and/or 16 and/or 18 reached 33.5% of cases.

HPV type-specific prevalence: comparison between smears evocative of LSIL and histological specimens with CIN2/3 and SCC diagnosis

Infection with multiple HPV types is observed in about 50% of LSIL cases. This proportion decreases to 32% in CIN2/3 and 22% in SCC cases (Chi-2 for trend gives $p < 0.001$).

Table 3 gives a comparison of HPV type-specific prevalence between LSIL, CIN2/3 and SCC cases. Three different groups of genotypes could be distinguished: the first group comprised HPV 16, 33 and 18 present at a low frequency in LSIL and 2–3 fold more prevalent in SCC than in LSIL. SCC/LSIL prevalence ratios for these genotypes were 3.47, 3.13 and 2.09, respectively, with 95% confidence intervals significantly above 1. The second group of genotypes presented a low prevalence in LSIL (1.5–7%). This prevalence decreased with lesion severity except for HPV 31 that peaked in CIN2/3. Among these genotypes, HPV 31 (0.96), HPV 59 (0.93), HPV 68 (0.66), and HPV 45 (0.57)

had a quite similar prevalence in SCC and LSIL (ratios not statistically different from 1). The last group of genotypes (HPV 66, 53, 58, 39, 35, 52, 6, 11 and 51) had a much lower prevalence in SCC compared to LSIL (ratios significantly below 1). Interestingly, HPV genotypes 66 and 53 – among the most prevalent types in LSIL cases (24.9% and 18.1%, respectively) – had a very low prevalence among SCC cases (0.5% and 1.4%) and thus a very low SCC/LSIL ratio (0.02 and 0.07, respectively).

Discussion

This study is the first large survey describing the HPV genotype-specific prevalence among LSIL cases in France. Compared with two other EDiTH studies using the same methodology, on CIN2/3 and invasive cervical cancer specimens collected between 2000 and 2005 [9,10], our results clearly identify genotypes most likely to progress to invasive cervical lesions of increasing severity.

In these two previous studies conducted on CIN2/3 and cervical cancer [9,10], we reported that HPV was present in 98% and 97% of cases, respectively. Similarly, the present study indicates that HPV DNA is detected in almost all LSIL cases (98%), suggesting that such abnormal smears, like CIN2/3 and SCC rarely occur in the absence of HPV infection. This observed overall HPV prevalence in LSIL is, however, much higher than that previously reported in a meta-analysis on about 8000 LSIL cases where only 71% tested positive for HPV DNA [12]. This discrepancy could be explained, at least partly, by the use of a more sensitive HPV detection method but could also reflect study-specific differences in the quality of cytological specimens [12].

Almost 50% of our LSIL cases were infected with multiple HPV types. This high proportion of coinfecting cases reflects the high sensitivity of the Lipa method but makes it difficult to identify the specific genotype responsible of the lesion. The proportion of cases with multiple HPV types differs between LSIL, CIN2/3 and SCC being highest among LSIL and significantly decreasing with increasing lesion severity. As the median age at diagnosis increases with the lesion grade, this is in accordance with the observation that the proportion of multiple infections markedly declines with age [13]. This could be explained by viral clearance of some less-aggressive HPV types with time, together with viral persistence of other types then associated with a risk of progression to malignancy [14,15].

LSIL may appear within 4 months after HPV infection [16] and if associated with certain HPV genotypes, could progress to high-grade lesions (HSIL) and cervical cancer [17]. Assessing HPV genotype among LSIL is therefore suitable to identify women at risk of progression. Our results indicate that the six most frequent HPV genotypes in LSIL in order of decreasing prevalence were HPV 66, HPV 16, HPV 53, HPV 51, HPV 52, and HPV 18. This differs somehow from what was previously observed by Clifford et al. who reported in their meta-analysis HPV 16, HPV 31, HPV 51, HPV 53, HPV 56 and HPV 52 as the most prevalent types worldwide [12]. Prevalence of HPV 16 is of the same magnitude in both studies (26.6% and 21.4% in the Clifford's meta-analysis and in the present study, respectively) as well as the prevalence of HPV 18 (8.6% versus 7.6%).

However, the largest difference is observed for HPV 66 (8.5% and 24.9%, respectively). Such a high prevalence of HPV 66 was previously reported by Brown et al. [18] who reported a prevalence of 28% in a cohort of closely followed adolescent women. However, apparent geographical differences in HPV types could be partly explained by the use of different sets of primers which do not amplify all genotypes with exactly the same sensitivity [19]. It has been suggested for example that GP5+/6+ primers had limited sensitivity for HPV 31 and HPV 66 whereas the SPF primers detect a very broad range of HPV genotypes with apparently equal sensitivity [20]. Other factors related to PCR were also found to be associated with higher detection of HPV [21].

Several randomized clinical trials have now explored the efficacy and safety of prophylactic HPV 16 and 18 L1 VLP vaccines [22,23] showing a high efficacy of both vaccines for the prevention of CIN2+ [24–26] as well as a high efficacy of the quadrivalent HPV 6, 11, 16, 18 vaccine for the prevention of low-grade lesions [6,8]. About 70,000 French women are diagnosed each year with a LSIL, most often managed by colposcopy and/or biopsy to eventually reveal a CIN1 diagnosis or worse. Then, prevention of LSIL would result in a decrease of psychological distress, a reduced number of treated cases as well as a reduction of the number of regular smears recommended for the follow-up. Geographical data on HPV type-specific prevalence in LSIL are helpful to accurately predict the future impact of vaccination on the occurrence of these specific cervical lesions. Allowing the distinction between HPV single and multiple infections, the present study was able to assess the lowest expected potential of an HPV L1 VLP vaccination on LSIL. The HPV types targeted by a bivalent 16, 18 vaccine and by a quadrivalent 6, 11, 16, 18 vaccine are found in 10% and 14% of mono-infected LSIL and in 28% and 33% of all LSIL, respectively (Table 2). Considering a theoretical vaccine coverage of 100% and a vaccine efficacy close to 95%, a bivalent 16, 18 vaccine would thus prevent at least 10% and a quadrivalent 6, 11, 16, 18 vaccine 14% of LSIL cases in France. If one further assumes that HPV6, 11, 16 and 18 are causally related to the lesion in which they are found even in the presence of another HPV type, the potential benefit of vaccination could increase to 32% (0.95×0.335), representing about 22,000 cases a year.

Some HPV genotypes have been described as being more persistent and associated with progression from low-grade lesions to cervical cancer [14,15,27]. Comparison of HPV type-specific prevalence in LSIL, CIN2/3 and SCC depicts that the genotype distribution differs between these 3 groups of lesions. Even if comparing cytological and histological samples could be criticized, we thought like others [12] that such a comparison would provide relevant information. The observed differences in HPV prevalence between the three groups of lesions reflect the role of HPV genotype in the risk of progression from low-grade squamous lesions to invasive squamous cervical cancer. As previously described by Clifford et al. [12], we calculated for each genotype the ratio of HPV prevalence in SCC versus LSIL to appreciate their importance in the risk of progression to cervical cancer. HPV genotypes were then classified according to their SCC/LSIL prevalence ratio (above 1, close to 1, or below 1). HPV

16 and 18 had high SCC/LSIL prevalence ratios hereby confirming that these genotypes are associated with lesions presenting a high probability of progression to malignancy. HPV 33, although less common among SCC cases, was also characterized by a high risk of progression. However, the 95% confidence interval of its prevalence ratio was rather large compared to HPV 16 and 18. All other genotypes were under-represented in SCC compared to LSIL (prevalence ratio below 1). HPV 31, 59, 68 and 45 had an SCC/LSIL prevalence ratio close to 1 and were thus associated with an intermediate risk of progression to malignancy. It is noteworthy that HPV 31 and 33 are more prevalent in CIN2/3 than in LSIL or SCC. Interestingly, HPV 66 and 53, among the most frequently encountered genotypes in LSIL and sometimes considered as “probable high-risk” genotypes [11] had, however, very low SCC/LSIL prevalence ratios suggesting a low probability of being associated with lesions that progress from LSIL to invasive cervical cancer. This was particularly underlined recently by Mansour et al. who found different biological properties of the E7 oncoproteins of HPV types 53 and 66 [28]. Genotyping may thus have a diagnostic utility and could be of help to recommend stringent surveillance of LSIL cases with high risk of progression (e.g. containing HPV 16 or 18). Conversely, anxiety and over-treatment could be avoided in women with low risk of progression.

Since the proportion of multiple-type infections decreases from 50% in LSIL to 22% in cervical cancers, we also calculated SCC/LSIL prevalence ratios in cases with HPV single infections only (Table 3). However, no clear-cut discrepancies were observed except an expected increase of the ratio for most HPV types resulting from the different proportion of cases with multiple infections in SCC and LSIL, respectively.

One possible study limitation is the rather low number of participating centres which makes it difficult to consider our study population as representative of all LSIL cases in France. Following recommendations of the French National Authority for Health [29], LSIL specimens are not routinely collected on liquid medium, suitable for HPV genotyping. Therefore, only few Centres could be involved in the present study.

However, based on a rather large number of cases, this study may provide new evidence of the possible benefit of a quadrivalent HPV vaccination in France and highlights the relevance of HPV genotyping for optimizing the management of LSIL cases.

Conflict of interest statement

- Jean-Luc Prétet is a consultant for Sanofi Pasteur MSD.
- Anne-Carole Jacquard is an employee of Sanofi Pasteur MSD which has developed and now distributes Gardasil HPV 6-11-16-18 vaccine.
- Maëlle Saunier: No conflict of interest.
- Christine Clavel was a speaker at a Sanofi Pasteur MSD session at the Eurogin 2007 meeting.
- Roger Dachez: No conflict of interest.
- Jean Gondry: No conflict of interest.
- Pierre Pradat: No conflict of interest.
- Benoît Soubeyrand is an employee of Sanofi Pasteur MSD which has developed and now distributes Gardasil HPV 6-11-16-18 vaccine.
- Yann Leocmach is an employee of Sanofi Pasteur MSD which has developed and now distributes Gardasil HPV 6-11-16-18 vaccine.
- Christiane Mougin: No conflict of interest.
- Didier Riethmuller is a consultant for Sanofi Pasteur MSD.

Acknowledgments

We gratefully thank Emilie Maillard, Therapharm, Boulogne Billancourt, France, for data management and analysis, and Nubia Muñoz for critically commenting the manuscript.

References

- [1] Wiley D, Masongsong E. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv* 2006;61:S3–S14.
- [2] Moscicki AB. Impact of HPV infection in adolescent populations. *J Adolesc Health* 2005;37:S3–9.
- [3] Melnikow J, Nuovo J, Willan AR, Chan BK, Howell LP. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1998;92:727–35.
- [4] Ault KA. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2006; (Suppl): 40470.
- [5] Bergeron C, Cohet C, Bouée S, Lorans C, Rémy V. Management of abnormal smears intraepithelial neoplasia and associated treatment costs in France. *Bull Epidemiol Hebd* 2007;1:4–6.
- [6] Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, 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.
- [7] Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskevaides E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2006;367:489–98.
- [8] Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine* 2007;25:4931–9.
- [9] Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G, Soubeyrand B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer* 2008;122:424–7.
- [10] Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* 2008;122: 428–32.
- [11] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518–27.
- [12] Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005;14:1157–64.
- [13] Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE, Franco E. Occurrence of cervical infection with multiple human papillomavirus types is associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis* 2003;30:581–7.
- [14] Bulkmans NW, Berkhof J, Bulk S, Bleeker MC, van Kemenade FJ, Rozendaal L, et al. High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer* 2007;96:1419–24.
- [15] Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Hansson BG, et al. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: a population-based prospective study. *Br J Cancer* 2007;97:129–132.
- [16] Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, et al. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis* 2005;191:731–8.
- [17] Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:252–258.
- [18] Brown DR, Shew ML, Qadadri B, Neptune N, Vargas M, Tu W, et al. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis* 2005;191:182–92.

- [19] Iftner T, Villa LL. Chapter 12: human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;80–8.
- [20] Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. 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* 1999;37:2508–17.
- [21] Castle PE, Schiffman M, Gravitt PE, Kendall H, Fishman S, Dong H, et al. Comparisons of HPV DNA detection by MY09/11 PCR methods. *J Med Virol* 2002;68:417–23.
- [22] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. 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* 2004;364:1757–65.
- [23] Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, 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;6:127278.
- [24] Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007;356:1915–27.
- [25] Ault KA. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet* 2007;369:1861–8.
- [26] Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:2161–70.
- [27] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1072–9.
- [28] Mansour M, Touka M, Hasan U, Bellopede A, Smet A, Accardi R, et al. E7 properties of mucosal human papillomavirus types 26, 53 and 66 correlate with their intermediate risk for cervical cancer development. *Virology* 2007;367:1–9.
- [29] ANAES. French National Authority for Health. Practice guidelines. Management of a patient with an abnormal cervical smear; 2002. http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c_272243.

2. Publications n°2 :

Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma.

M. Saunier, S. Monnier-Benoit, F. Mauny, V. Dalstein, J. Briolat, D. Riethmuller, B. Kantelip, E. Schwarz, C. Mougín and J-L. Prétet

2008 ; Journal of Clinical Microbiology 46, 3678-3685

Ce travail a été présenté sous forme orale :

Au forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France, Juin 2006.

Lésions génitales associées à papillomavirus humains : facteurs prédictifs de progression et de régression.

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

Au 6th International Multidisciplinary Congress EUROGIN, Paris, France, Avril 2006.

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

Saunier M, Monnier-Benoit S, Prétet JL.

Ce travail a été présenté sous forme affichée :

Au 22th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Vancouver, Avril 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, Capilna M, Mo Lz, Mougín C, Prétet JL.

Au Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France, Juin 2008.

Rôle de la charge virale et de l'intégration des HPV dans l'apparition et l'évolution des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus

Saunier M, Monnier-Benoit S, Prétet JL, Mougín C.

Au 4th International Meeting of the Cutaneous HPV Consortium, Juin 2007.

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

Saunier M, Monnier-Benoit S, Mo L, Prétet JL.

Introduction à la publication n°2 :

Objectifs :

HPV16 est le génotype le plus fréquemment retrouvé dans les lésions de haut grade et les cancers, et nous avons proposé que les lésions de bas grade infectées par ce génotype soient associées à un risque de progression vers des lésions plus sévères. Toutefois, toutes les femmes infectées par un HPV16 ne développeront pas nécessairement des lésions précancéreuses ou cancéreuses. De fait, le génotype n'étant pas suffisant pour prédire l'apparition d'une lésion, il est nécessaire d'étudier d'autres paramètres viraux qui pourraient permettre d'identifier les femmes les plus à risque. A ce titre, certains auteurs ont montré que la charge virale augmentait avec le grade des lésions et nous avons montré dans des travaux antérieurs que les femmes ayant une charge virale en HPV supérieure à 100 pg/mL (test HC2) avaient une incidence cumulative de CIN2/3 supérieure aux femmes ayant une charge virale inférieure à cette valeur (Dalstein *et al.*, 2003). Nous avons de plus montré que les valeurs de charge virale obtenues par le test HC2 étaient corrélées avec la charge virale en HPV16 dans la mesure où les taux de co-infection des échantillons testés étaient faibles (Pretet *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'intégration du génome d'HPV dans celui de la cellule hôte est un événement important dans la carcinogenèse médiée par les HPV puisqu'elle favorise l'expression des oncoprotéines virales E7 et E6.

Pour avoir une idée plus précise de l'histoire naturelle de l'infection et pour définir de nouveaux facteurs prédictifs, nous avons choisi d'étudier la charge virale et l'intégration d'HPV16 dans des échantillons cervico-utérins de différents grades.

Méthode :

Nous avons utilisé une combinaison de 3 PCR temps-réel, ciblant les gènes E6, E2 et albumine, pour calculer la charge virale (E6 et albumine) et le ratio E2/E6 comme marqueur de l'intégration. Cette étude a été réalisée sur 311 échantillons dont 176 étaient HPV16 positifs (37 normaux, 45 LSIL, 41 HSIL, 37 ASC-US et 22 cancers).

Résultats :

Nous avons observé que la charge virale en HPV16 augmentait avec le grade de la lésion de 102 copies/10³ cellules dans les échantillons normaux, à 270 copies/10³ cellules dans les LSIL, à 20 974 copies/10³ cellules dans les HSIL et à 59 963 copies/10³ cellules dans les cancers.

Au niveau de l'intégration, nous avons montré que 29% des échantillons normaux présentaient des formes intégrées. Puis la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées augmente avec le grade de la lésion, pour atteindre son maximum dans les cancers (82%). Nous avons aussi déterminé les ratios E2/E6 afin d'évaluer le degré d'intégration de nos échantillons et nous avons montré que ce ratio diminuait avec le grade de la lésion, de 1 dans les échantillons de cytologie normale à 0,36 dans les cancers.

Enfin, nous avons démontré, qu'avec notre technique de PCR temps-réel, une charge virale d'HPV16 supérieure à 22 000 copies pour 1000 cellules ou un ratio E2/E6 inférieur à 0,50 permettait d'identifier les femmes avec des lésions de haut grade ou plus, avec une bonne spécificité.

Conclusion :

Dans cette étude nous avons montré que la charge virale et l'intégration augmentaient avec le grade de la lésion, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Par ailleurs, par l'analyse de courbes ROC, nous avons pu déterminer que le seuil de charge virale avec le plus important rapport de vraisemblance positif (LR = 5,1) était égal à 22 000 copies/10³ cellules et permettait d'identifier, parmi les femmes HPV16 positives, celles présentant des lésions de haut grade avec une spécificité de 90% et une sensibilité de 50%.

Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma^{∇†}

Maëlle Saunier,¹ Sylvain Monnier-Benoit,¹ Frédéric Mauny,^{2,3} Véronique Dalstein,⁴
Jenny Briolat,⁴ Didier Riethmuller,¹ Bernadette Kantelip,^{1,5} Elisabeth Schwarz,⁶
Christiane Mouglin,¹ and Jean-Luc Prétet^{1*}

EA 3181, IFR 133, Université de Franche-Comté, Rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France¹; Département d'Informations Médicales (DIM), Centre Hospitalier Universitaire, 25000 Besançon, France²; UMR 6249 CNRS/Université de Franche-Comté Chrono-environnement, 25030 Besançon, France³; CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin, INSERM UMR-S 903, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Médecine, 51092 Reims, France⁴; Service d'Anatomopathologie, Hôpital Jean Minjoz, 25000 Besançon, France⁵; and DKFZ F030, D-69120 Heidelberg, Germany⁶

Received 26 June 2008/Returned for modification 6 August 2008/Accepted 8 September 2008

Integration of human papillomavirus (HPV) DNA into the host cell genome is a frequent event in cervical carcinogenesis, even though this phenomenon does not seem to be mandatory for cervical cancer development. Our objective was to describe the load and physical state of HPV type 16 (HPV16) DNA in a series of cervical samples representative of the natural history of cervical cancer. We used a combination of three real-time PCR assays targeting E6, E2, and albumin genes to calculate HPV16 load (E6 and albumin) and the E2/E6 ratio as a surrogate of integration. This method was applied to 173 HPV16-positive cervical samples. Results show that viral load increases with the lesion grade (from 102 HPV16 DNA copies per 10³ cells in normal samples up to 56,354 copies per 10³ cells in cancers), while E2/E6 ratio decreases (from 1 in normal samples down to 0.36 in cancers). We propose that, according to this technique, an HPV16 viral load of higher than 22,000 copies/10³ cells or an E2/E6 ratio of lower than 0.50 allows the identification of women with prevalent high-grade lesions or worse with a high specificity. In conclusion, both viral load and E2/E6 ratio, used in combination with an appropriate cutoff value, are suitable to screen women with prevalent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 or cancer. Therefore, these assays would be useful in addition to routine HPV testing to more accurately identify women with (pre)cancerous lesions.

Cervical cancer is a worldwide health concern, with approximately 493,000 new cases and 274,000 deaths in 2002 (7, 38). The causality link between human papillomavirus (HPV) infection and this cancer has been well established by molecular and epidemiological studies (5, 52). HPVs belong to a family of circular double-stranded DNA viruses that are classified in terms of genus, species, and type (13). Papillomaviruses associated with cervical diseases are found mainly among the alpha genus. These viruses can be divided into low-risk HPV and high-risk HPV (HR-HPV), according to their oncogenic potentials (35).

In most cases, infection by HR-HPV is transient and cleared within 8 to 13 months (12, 15, 19, 54) and remains asymptomatic. Induction of an efficient and specific immune response that eliminates the virus and/or the infected cells likely plays a pivotal role in the control of HPV infection. Thus, while HPV genital infection is the most common sexually transmitted infection, cervical cancer is a rare consequence of an HR-HPV infection (32). Cervical cancer takes decades on average to

arise and follows a progressive histopathological disease pattern. After an infection with an HR-HPV, cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1) can arise. A high proportion of CIN1 regresses spontaneously if left untreated, but if HR-HPV infection persists, especially with HPV16 or HPV18 (23), CIN1 may progress to CIN2/3. Because these lesions are recognized as precancerous lesions, it is recommended to treat them generally through surgical ablation. If not, CIN2/3 may persist or progress toward invasive carcinoma (30, 37). Pap smears, introduced in the 1950s, proved to be an efficient screening tool for cervical cancer prevention (45). It allows the identification of cytological abnormalities evocative of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), and cancer according to the Bethesda system. Some Pap smears are however difficult to categorize and are referred to as atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) or atypical squamous cells that cannot exclude HSIL (ASC-H).

Several studies have shown that the persistence of the HR-HPV infection is necessary for the development and progression of lesions to CIN2/3 and/or invasive carcinoma (12, 53). Moreover, studies showed that a high viral load was associated with an increased persistence of HPV infection and with an increased risk of developing CIN2/3 or cancer (12, 21, 27). Finally, an increasing viral load in persistently infected women was also shown to be associated with an increased cumulative prevalence of precancerous/cancerous lesions of the cervix (31, 51).

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, IFR 133, Université de Franche-Comté, Centre Hospitalier Universitaire, Boulevard A. Fleming, 25030 Besançon cedex, France. Phone: 33.3.81.66.91.12. Fax: 33.3.81.66.83.42. E-mail: jean_luc.pretet@univ-fcomte.fr.

† This work is dedicated to the memory of Jean-Gérard Guillet.

∇ Published ahead of print on 17 September 2008.

TABLE 1. Cross-tabulation of cytology and histology diagnoses

Cytology diagnosis	NA ^a	No. (%) of available samples with histology diagnosis of:		
		N ^b	CIN1	CIN2/3
WNL (<i>n</i> = 28)	26	0.0	2 (100)	0.0
LSIL (<i>n</i> = 45)	33	2 (17)	6 (50)	4 (33)
HSIL (<i>n</i> = 41)	11	0.0	1 (3)	29 (97)
ASC-US (<i>n</i> = 37)	27	2 (20)	5 (50)	3 (30)

^a NA, no. of samples with indicated cytology diagnosis that were not available for histology diagnosis.
^b N, normal.

Integration of the HPV genome in the host cell DNA represents a key step in the progression of lesions, as it allows the continuous overexpression of E6 and E7. Recently, real-time PCR targeting E6 and E2 was shown to be reliable to study HPV16 DNA physical state (episomal or integrated) (1, 2, 8, 16, 25, 36, 40). As a whole, these studies showed that the proportion of lesions with integrated HPV16 increased with the grade of cervical lesion. However, in most studies, authors have limited their investigation to the description of (i) pure episomes, (ii) mixes of integrated and episomal forms, or (iii) pure integrated forms of HPV16 DNA in clinical specimens. Probably, the difficulties in retrieving a low frequency of integration events due to the high load of episomal forms may have precluded a more detailed description of integration (2).

In this study, after a validation step, we applied E2 and E6 targeting real-time PCR to 173 HPV16-positive cervical samples in order to describe the viral DNA physical state according to the lesion grade. Moreover, we wished to define cutoff values for viral load and integration that would allow the discrimination of prevalent high-grade lesions and/or cancer versus low-grade lesions or normal epithelium.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. The study was retrospectively performed on 289 smears and 22 cervical cancer biopsy samples. One hundred ninety-four smears had been collected at the endo-exocervix junction with a cytobrush and conserved in STM (specimen transport medium; Digene, Gaithersburg, MD). These specimens had been denatured with sodium hydroxide for routine HR-HPV testing with the HCII assay (Digene) and then stored at -20°C until further processing. Ninety-five samples had been similarly collected but stored in PreservCyt (Cytoc, Marlborough, MA) or Cytoscreen (Seroa, Monaco, France) (liquid-based cytology transport medium) at 4°C until further processing for routine HR-HPV screening with HCII.

Among the 289 smears, 151 samples harboring HPV16 were selected for viral load and integration analysis. Twenty-eight were samples within normal limits

(WNL), and 45 were diagnosed as LSIL, 41 as HSIL, and 37 as ASC-US (no ASC-H selected). For 54 cases, a histology result obtained from a subsequent biopsy sample or cervical resection was retrieved from medical record: 4 were normal, and 14 were diagnosed as CIN1 and 36 as CIN2/3. However, viral load and E2/E6 ratio for the tissue specimens were not studied. The cross-tabulation of cytology and histology results is shown in Table 1.

As smears evocative of invasive carcinoma were rare, we collected 22 cervical invasive cancers fixed with formaldehyde and paraffin embedded to study viral load and E2/E6 ratio.

DNA extraction. DNA extraction procedures were adapted according to the nature of the specimens as follows. (i) For STM samples, 350 µl of denatured solution was neutralized with 50 µl of 5 M acetic acid and 3 M potassium acetate. Then, 400 µl of AL buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France) and 40 µl proteinase K (Qiagen) were added and the mix was digested overnight at 56°C. (ii) Four-milliliter portions of samples stored in PreservCyt or Cytoscreen medium were centrifuged for 10 min at 2,500 × *g*. The pellet was suspended in 400 µl Tris-EDTA buffer (pH 8). Then, 400 µl of AL buffer (Qiagen) and 40 µl proteinase K (Qiagen) were added and the mix was digested overnight at 56°C. All lysates were filtered through the column provided in the kit. After washes, DNA was eluted with 80 µl of molecular biology-grade water.

DNA from the 22 paraffin-embedded cancer tissues was extracted from 1 to 16 10-µm serial sections (according to the size of the specimen) by use of the EXTRAcell kit (Bioline, Turin, Italy) according to the manufacturer's instructions. DNA from cultured cell lines was extracted by proteinase K digestion and subsequent phenol-chloroform extraction and served as the control.

Real-time PCR. Quantification of the human albumin gene and the HPV16 E6 and E2 genes was performed with a LightCycler 1.2 (Roche Diagnostics, Meylan, France) using TaqMan technology. Primers and probes used have been described elsewhere and their sequences are provided in Table 2 (26, 40, 41).

Albumin real-time PCR. The standard curve used for the albumin gene quantification was made with five serial dilutions (1:5) of calibrated human genomic DNA (Roche, Meylan, France) containing 82,500, 16,500, 3,300, 660, and 132 albumin gene copies. The PCR was performed in a final volume of 20 µl containing 5 mM MgCl₂, 1× fast start hybridization probe buffer containing *Taq* polymerase (Roche Diagnostics), 100 nM TaqMan probe (Eurogentec, Seraing, Belgium), 200 mM each primer (MWG, Ebersberg, Germany), and 0.5 U uracil-DNA glycosylase (Roche Diagnostics).

E6 and E2 real-time PCR. Standard curves used to quantify E6 and E2 HPV16 copy number and to study the reproducibility of the E2 real-time PCR were made with six serial dilutions (1:10) of the pBR322-HPV16 plasmid containing 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, and 10² HPV16 DNA copies diluted in 50 ng/µl salmon sperm DNA. The PCR targeting E6 has been previously described (41). Briefly, the reaction was performed in a final volume of 20 µl containing 5 mM MgCl₂, 1× fast start hybridization probe buffer (Roche Diagnostics), 50 nM TaqMan probe (Eurogentec, Seraing, Belgium), 500 mM each primer (MWG, Ebersberg, Germany), and 0.5 U uracil-DNA glycosylase (Roche Diagnostics). The PCR targeting E2 has also been described in detail before (40). Briefly, the reaction was performed in a final volume of 20 µl containing 4 mM MgCl₂, 1× fast start hybridization probe buffer, 170 nM TaqMan probe (Eurogentec, Seraing, Belgium), 500 mM each primer (MWG, Ebersberg, Germany), and 0.5 U uracil-DNA glycosylase (Roche Diagnostics).

Viral load and physical state determination. The viral load was determined using the HPV16 copy number (real-time PCR targeting HPV16 E6 open reading frame) normalized according to the number of cells (real-time PCR targeting the albumin gene). This normalization is important, as it limits bias linked to the number of cells harvested in smears and to the nature of the cervical samples

TABLE 2. Sequences of primers and probes used for viral load and E2/E6 ratio determination

Target	Primer or probe	Sequence ^a
E6 HPV16	Forward primer	5'-GAG-AAC-TGC-AAT-GTT-TCA-GGA-CC-3'
	Reverse primer	5'-TGT-ATA-GTT-GTT-TGC-AGC-TCT-GTG-C-3'
	Probe	3'BHQ-1-CAG-GAG-CGA-CCC-AGA-AAG-TTA-CCA-CAG-TT-FAM-5'
E2 HPV16	Forward primer	5'- AAC-GAA-GTA-TCC-TCT-CCT-GAA-ATT-ATT-AG-3'
	Reverse primer	5'-CCA-AGG-CGA-CGG-CTT-TG-3'
	Probe	3'BHQ-1-CAC-CCC-GCC-GCG-ACC-CAT-A-FAM-5'
Albumin	Forward primer	5'-GCT-GTC-ATC-TCT-TGT-GGG-CTG-T-3'
	Reverse primer	5'-ACT-CAT-GGG-AGC-TGC-TGG-TTC-3'
	Probe	3'BHQ-1-GGA-GAG-ATT-TGT-GTG-GGC-ATG-ACA-GG-FAM-5'

^a FAM, 6-carboxyfluorescein; BHQ-1, black hole quencher 1.

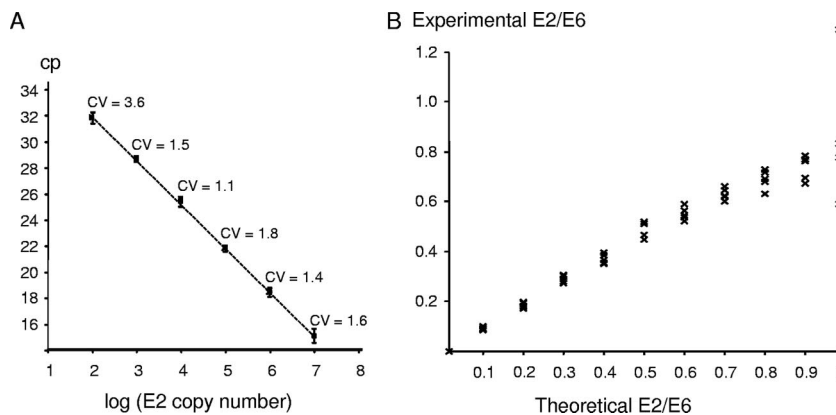


FIG. 1. (A) Reproducibility of the E2 real-time PCR. Mean Cp and standard deviations from 17 standard curves are shown. Coefficients of variation (CV) for each Cp were lower than 4%. (B) Experimental versus theoretical E2/E6 ratios in a validation assay (six experiments). Coefficient of correlation value: $r = 0.959$.

used in this study. Results are expressed as HPV16 copy number per 10^3 cells. The physical state of HPV16 was determined using real-time PCR targeting the E6 and E2 open reading frames of HPV16. Then, the E2/E6 ratio was calculated for each sample. To assess the validity of the method, E2/E6 ratios were determined for mixes containing known E2 and E6 copy numbers. For this purpose, we set up a series made with mixes of pBR322-HPV16 plasmids (representing episomal forms) and SiHa cells DNA (representing integrated forms; two copies/cell) with ratios varying from 0 to 1, with 0.1 increments.

Statistical analysis. Data are expressed as medians, ranges, and first and third quartiles. According to data set characteristics (continuous data but small samples; non-Gaussian), differences between groups were assessed using the Kruskal-Wallis test. When differences were significant, post hoc pairwise comparisons between groups were performed using the method described by Siegel and Castelan (47), which includes corrections for significance values to account for multiple comparisons. The level of significance was set to 0.05. Analyses were performed with the SYSTAT package (v 10.0), and StatXact (V5.0) was used to compute Monte Carlo estimates of the exact P values.

RESULTS

HPV16 E2 real-time PCR is sensitive, specific, and reproducible. First, we validated the E2 real-time PCR. Dilutions of the pBR322-HPV16 plasmid were realized with cellular DNA from HaCat cells to obtain from 1 to 10^6 E2 gene copies per 10^5 cells. The technique was performed six times independently on all diluted samples. The detection limit reached 10 copies per 10^5 cells.

The E2 real-time PCR was specific for HPV16, as no cross-reaction was observed for samples previously genotyped and harboring the phylogenetically related HPV31, HPV33, HPV52, HPV18, or HPV56 (data not shown).

The reproducibility of the E2 real-time PCR was assessed using standard curves obtained from 17 independent experiments. The coefficient of variation of crossing point (Cp) obtained at each concentration was less than 4%, showing that the technique was very reproducible (Fig. 1A).

The efficiency of real-time PCRs was also calculated from plasmid dilutions and from dilutions of clinical samples. Efficiency was equal to 1.9 ± 0.1 and very close to that obtained with the real-time PCR targeting E6 (2 ± 0.1).

E6 and E2 real-time PCR permit the physical state of HPV16 DNA to be defined. Mixes of pBR322-HPV16 plasmid and SiHa cell DNA representing E2/E6 ratios from 0 to 1 were subjected to real-time PCR targeting E2 and E6. In Fig. 1B, we

plotted experimental E2/E6 ratios (obtained from six independent experiments) against theoretical ratios. Overall, an excellent correlation ($r = 0.959$; $P < 10^{-3}$) was observed. However, we noted that the variability in experimental E2/E6 ratios was more important when ratios were higher than 0.8. One can propose that real-time PCR lacks the accuracy to retrieve high E2/E6 ratios. For this reason, we defined three classes of samples regarding the physical state of HPV16 DNA: (i) E2/E6 values equaling 0 (representing fully integrated genomes), (ii) E2/E6 values between 0 and 0.8 (representing mixed genomes), and (iii) E2/E6 values of more than 0.8 (mostly representing episomes).

After this validation step, we submitted the DNA from the 151 HPV16-positive smears and the 22 HPV16-positive cervical carcinomas to the three real-time PCR assays (E6, E2, and albumin) to investigate the load and physical state of HPV16 DNA.

HPV16 viral load increases with the grade of the lesion. Figure 2 represents the medians, ranges, and first and third quartiles of HPV16 viral loads per 10^3 cells in the 151 smears and in the 22 cervical cancer samples.

We observed that the median viral load increases with the lesion grade from 102 HPV16 DNA copies per 10^3 cells in WNL to 270 in LSIL and to 20,974 in HSIL. Statistical analysis revealed differences in viral loads between WNL and HSIL ($P < 0.01$) and between LSIL and HSIL ($P < 0.01$). ASC-US samples showed a median viral load of 802 HPV16 DNA copies/ 10^3 cells. HPV16 loads were significantly higher in ASC-US than in WNL and LSIL samples ($P < 0.01$). However, they were lower than those noted for HSIL, but no significant difference was observed.

For the smears from women subsequently diagnosed with a CIN2/3 (median load of 7,270 copies/ 10^3 cells), we observed HPV16 loads higher than those observed for the smears from women with CIN1 (median load of 94 copies/ 10^3 cells; $n = 14$) or with normal cervixes (median load of 397 copies/ 10^3 cells; $n = 4$). However, no statistical difference was noted.

The highest HPV16 loads (median load of 59,963 copies/ 10^3 cells; $n = 22$) were observed for biopsy samples from cervical

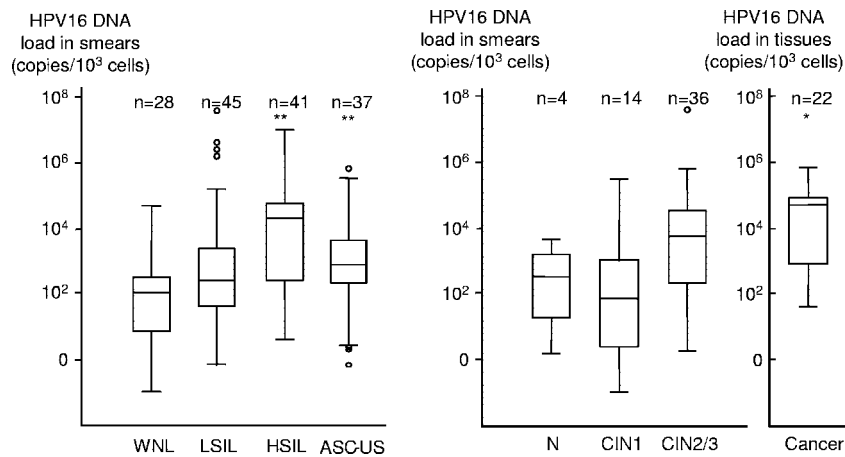


FIG. 2. Box-and-whisker plots showing HPV16 load per 10^3 cells (medians, first and third quartiles, and ranges) for cervical smears. Starting material for cancers was fixed and paraffin-embedded tissues. N, normal. Symbols: **, P value of <0.01 compared to WNL and LSIL; *, P value of <0.05 compared to CIN1.

cancers. These loads were statistically different than those observed for the smears from women with CIN1 only.

Physical state of HPV16 DNA is related to lesion grade. As for cytology results, a majority of WNL (71%) presented E2/E6 values of more than 0.8, indicating that they harbored mostly episomal HPV16 genomes (Fig. 3). The remaining 29% of samples harbored both episomal and integrated HPV16 genomes. None of the samples belonging to this category presented only integrated forms of HPV16 DNA (E2/E6 values equal to 0). In LSIL, the proportion of samples presenting E2/E6 values of >0.8 decreased to 44%, while the proportion of samples with mixed forms increased to 53%. In one smear, E2/E6 reached the value of 0.001, suggesting that most if not all HPV16 genomes were integrated. Unfortunately, the medical record was not available to confirm the final diagnosis. In HSIL, the proportion of specimens with E2/E6 values of more than 0.8 dropped to 15%, while 85% of these samples presented integrated HPV16 DNA associated with episomes. Finally, 76% of ASC-US samples harbored integrated HPV16 DNA (E2/E6 values between 0 and 0.8). Five percent of ASC-US ($n = 2$) presented E2/E6 values of 0, indicating that HPV16 DNA was totally integrated. The remaining ASC-US specimens (19%) presented an E2/E6 value of >0.8 . As a whole, we observed that the proportion of samples with integrated HPV16 genomes increased with the lesion grade ($P < 0.01$; chi-square test).

Two smears from women with normal biopsy results presented E2/E6 values of more than 0.8, whereas the two others presented both episomal and integrated HPV16 genomes. The proportion of smears with E2/E6 values of more than 0.8 decreased to 36% and to 16% for women with CIN1 and CIN2/3, respectively. The remaining samples presented both episomal and integrated HPV16 genomes.

For cancer biopsy samples, the proportion of specimens with E2/E6 values of more than 0.8 (18%) was close to the one observed for smears from women with a subsequent diagnosis of CIN2/3. In contrast, the proportion of samples with mixed forms decreased to 45% to the benefit of pure integrated HPV16 genomes, which were observed in 37% of cases.

We also noted that the proportion of smears with integrated HPV16 DNA increased with the lesion grade. However, this trend was not statistically significant ($P > 0.05$; chi-square test).

E2/E6 ratio decreases with lesion grade. The medians, ranges, and first and third quartiles of E2/E6 ratios for each category of samples are presented in Fig. 4. As a whole, the median of E2/E6 ratios decreased with the lesion severity (1 for WNL, 0.64 for LSIL, and 0.46 for HSIL). Whereas no significant difference was found between WNL and LSIL, the E2/E6 ratios were significantly lower for HSIL than for WNL and LSIL ($P < 0.01$). The E2/E6 ratios for ASC-US (median of 0.55) were also significantly lower than for WNL ($P < 0.01$). A

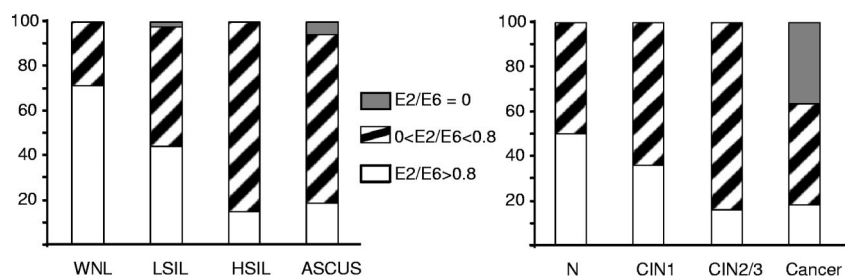


FIG. 3. Distribution of samples with E2/E6 ratio values equal to 0, between 0 and 0.8, and more than 0.8 for cervical smears. Further information and abbreviations are given in the legend for Fig. 2.

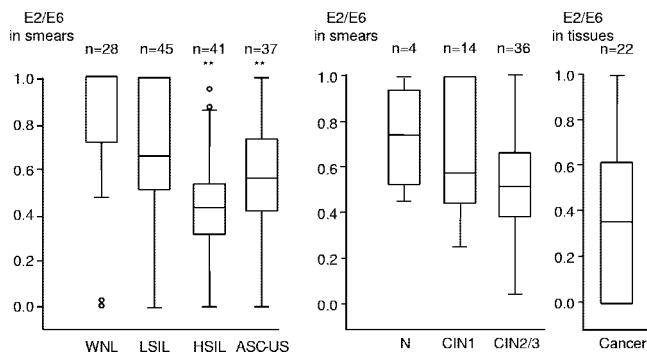


FIG. 4. Box-and-whisker plots showing E2/E6 ratios (medians, first and third quartiles, and ranges) for cervical smears. Further information and abbreviations are given in the legend for Fig. 2.

similar trend was observed when the 54 smears were classified according the subsequent histological data. Indeed, the median of E2/E6 decreased from 0.75 for smears from women with normal histologies to 0.58 for smears from women with CIN1 and 0.51 for smears from women with CIN2/3. No difference between E2/E6 ratios was observed.

The lowest E2/E6 ratio median (0.36) was noted for cancer samples. However, no statistical difference was observed in comparison to ratios calculated from smears.

Appropriate cutoffs permit identification of women with high-grade lesions. Figure 5 shows the receiver operating characteristic (ROC) analysis results of viral load and E2/E6 ratios in discriminating WNL and LSIL samples from HSIL samples.

For viral load, the cutoff with the highest positive likelihood ratio (LR^+) (LR^+ of 5.1), was 21,907 copies/ 10^3 cells. At this threshold, HPV16 load allowed the identification of women with HSIL with a specificity of 90% and a sensitivity of 50%. We then used this cutoff to discriminate smears from women with normal cervixes or with CIN1 from smears from women with CIN2/3. The specificity and the sensitivity decrease to 83% and 40%, respectively, with the LR^+ dropping to 2.3 (area under the curve, 0.68; 95% confidence interval [95% CI], 0.52 to 0.85).

For the E2/E6 ratio, the cutoff with the highest LR^+ (LR^+ of 3) was 0.52, with a specificity of 78% and a sensitivity of 66%. This cutoff was not used to discriminate smears of women with normal cervixes or with CIN1 from smears of women with CIN2/3, as the ROC analysis was not satisfactory (area under the curve, 0.66; 95% CI, 0.50 to 0.81).

DISCUSSION

In this study, we quantified HPV16 E6 and E2 DNA copy numbers by real-time PCR to analyze the load and physical state of the HPV16 genome in a series of 173 cervical samples. Several studies have reported the use of this methodology to characterize integration (1, 2, 8, 16, 25, 36, 40), even though some authors have highlighted limitations concerning the use of real-time PCR targeting E2 (2, 3, 29, 44). In order to preclude the erroneous interpretation of real-time PCR results, we validated our method with mixes of pBR322-HPV16 plasmids (mimicking episomal forms) and SiHa cell DNA (two integrated HPV16 genomes per cell) representing E2/E6 ratios

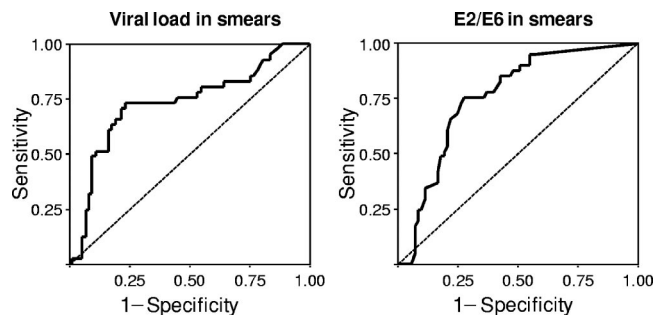


FIG. 5. ROC analysis of viral load and E2/E6 ratio in discriminating WNL and LSIL from HSIL. ROC curve characteristics were as follows: for viral load, the area under the curve was 0.728, the standard error was ± 0.05 , and the 95% CI was 0.625 to 0.831; and for the E2/E6 ratio, the area under the curve was 0.760, the standard error was ± 0.04 , and the 95% CI was 0.671 to 0.850.

from 0 to 1 with increments of 0.1. Moreover, we confirmed that E6 and E2 real-time PCR assays have almost equal efficiencies and that the calculation of E2/E6 ratios was accurate.

HPV16 DNA load analysis. First, we observed that HPV16 load increased with the lesion grade. An appropriate statistical analysis permitted us to retrieve significant differences between WNL and HSIL samples as well as between LSIL and HSIL samples. This trend was further confirmed when histology results were taken into account. Thus, our data confirm previous observations suggesting that the higher the grade of the lesion, the higher is the viral load, even though statistical analyses were not always available (1, 9, 11, 18, 24, 25, 39, 50, 51, 55, 56). We would like to point out that a direct comparison between our results and those obtained in previous reports may be difficult because no standardized procedures were reported. (i) Original material differed widely. (ii) Different methods for HPV detection, more or less quantitative, were used: MY09/MY11 PCR followed by type-specific dot blot hybridization (24), PCR followed by an enzyme-linked immunosorbent assay (56), conventional nested PCR (50), real-time PCR using SYBR green (11, 39), real-time PCR using the TaqMan technology (9, 18, 25, 55), and consensus real-time PCR (1). (iii) Results were expressed by different means: copies per cell (1, 56), copies per ng of DNA (11, 25), copies per sample (39, 50), and qualitatively (18, 24). Thus, the value of viral load calculated is likely to be dependent on the procedures used to quantify HPV DNA. This may explain the large range of values obtained for a given lesion grade in the different studies.

We would like to stress the fact that the viral load values observed for invasive cancers were very high. This observation is in contrast with the results described by Cricca and coworkers, who noticed the lowest viral load for samples of invasive cancers (11). This can be attributed to the starting material and the number of samples analyzed ($n = 11$). Moreover, smears evocative of invasive cancer may include not only cancer cells but also normal cells or cells from associated low-grade lesions, leading to an overall underestimation of the viral load (46). Here, we noticed that among cancer samples, those with the highest viral loads also presented the highest E2/E6 ratios. In contrast, cancer samples with most if not all HPV genomes integrated (E2/E6 values equal to 0) presented the lowest viral load values (data not shown). These observations are likely to

be consistent with the fact that integration prevents HPV replication (14).

Physical state of HPV16 DNA according to lesion grade. The 3'-terminal part of E2, including the hinge region (nucleotides 3352 to 3535) and the DNA binding domain, is the most often deleted or disrupted part of E2 following HPV16 DNA integration in the cellular genome (2, 22). For that reason, authors used real-time PCR targeting E2 and E6 to study the physical state of HPV16. Here, we defined three classes of samples according to the value of the E2/E6 ratios: class I, with E2/E6 values equal to 0, representing fully integrated genomes; class II, with E2/E6 values between 0 and 0.8, representing mixes of episomal and integrated genomes; and class III, with E2/E6 values of more than 0.8, mostly representing episomes.

In our series, we noticed that the most frequently observed E2/E6 ratios were between 0 and 0.8. This means that the majority of samples harbored mixes of episomes and integrated forms of HPV16 genomes independently of the lesion grade. Our results also confirm that integration can be an early event, because 29% of the normal smears harbored a fraction of integrated HPV16 genomes. This is in accordance with previously published data (8, 11, 17, 25, 28, 40). Some authors do not agree with this observation (20, 49). But their methods (two-dimensional gel electrophoresis [20] and classic PCR [49]) were probably not sensitive enough to detect low-frequency integration events. We also observed that the proportion of samples with integrated forms increased with the lesion grade. This is consistent with the literature, with some variations within each category of smears, however (1, 8, 11, 16, 25, 40, 49). For example, we found that 44% of LSIL (corresponding to 36% of smears from women with CIN1) harbored only episomal HPV16 genomes. This is close to the value (33.3%) we previously published on a series of CIN1 samples (8) but higher than the values from Kulmala et al. (15.4%) (25) and lower than the values from Cricca et al. (72.2%) (11), Tonon et al. (92%) (49), and Hudelist et al. (100%) (20). As for viral load, these discrepancies could be explained by the lack of standardized protocols to investigate integration and by definitions of mixed forms of HPV16 genomes. As reported in a previous study, pure integrated forms (E2 values equal to 0) were rarely found for precancerous lesions (8). In the present study, 100% integration was observed for several cancer samples, as already described (3, 10, 24, 40). This is consistent with the HPV-associated mechanism of carcinogenesis. Indeed, tumors grow from cellular clones selected for their proliferative advantages, which are driven by integration and continuous overexpression of E6 and E7 (33).

Quantitative analysis of E2/E6 ratios. We observed that the median of E2/E6 ratios decreased with the increasing grade of the lesions. This indicates that the proportion of episomes decreases to the benefit of integrated forms of HPV16 genomes in the higher-grade lesions. The methods used in this and other studies do not allow a determination of whether some cells harbor episomal forms and others integrated forms or if the same cells harbor both episomes and integrated forms. One possibility to address this question is to analyze the physical state of the HPV16 genome at the single-cell level, for example after the isolation of single abnormal cells by laser microdissection followed by whole-genome amplification and HPV16 DNA analysis. Such experiments would give interest-

ing clues regarding the impact of HPV DNA integration and E2 gene alterations for the progression of HPV16-infected cells.

Optimal cutoffs to identify women with prevalent high-grade lesions. From a practical point of view, we propose that a high viral load or a low E2/E6 ratio is clinically associated with a prevalent precancerous lesion. Thus, we propose that relevant cutoffs of viral load and of E2/E6 ratio might permit the identification of women with high-grade lesions. We chose to discriminate normal plus LSIL versus HSIL or normal and CIN1 versus CIN2/3, since low-grade lesions spontaneously regress in most women within 3 years (32). Even though these lesions need to be monitored, they do not necessarily need aggressive management as high-grade lesions do.

Using the ROC analysis, we have set optimal cutoffs at 21,907 copies/10³ cells and at an E2/E6 ratio of 0.52 to discriminate WNL plus LSIL from HSIL. These cutoffs allow the identification of women with prevalent high-grade lesion with a good specificity (90% for viral load and 78% for E2/E6). Moreover, we attempted to apply the viral load cutoff using a histology result as the end point. Interestingly, we were able to identify women with prevalent CIN2/3 with a specificity of 83%. E2/E6 ratios were not informative enough to discriminate smears from women with normal cervixes or CIN1 from smears of women with CIN2/3. As expected, the sensitivities remained modest with these cutoffs, which were not designed for primary screening purposes.

We deliberately decided to exclude ASC-US samples from ROC analyses. Indeed, ASC-US can be suggestive of a wide range of histological diagnoses from a totally normal cervix to infiltrating carcinoma, as recently reported by Boulanger and Sevestre (CIN1 or condyloma in 20 to 54% of cases, CIN2 or CIN3 in 5 to 18% of cases, and invasive cancer in 0 to 4% of cases) (6). Thus, we noticed that HPV16 parameters (load, E2/E6 ratio) presented intermediate values, reflecting the diversity of this category of samples.

In summary, we observed that the viral load and E2/E6 ratios were related to the lesion grade. Moreover, we confirmed that integration is an early event in the course of natural HPV infection. Based on our results, we propose that among HR-HPV infected women, those with an HPV16 load of above 22,000 copies/10³ cells or with an E2/E6 ratio below 0.5 are likely to present a high-grade lesion. These cutoff values, however, are relevant for HPV16 only, which is detected for 34 to 52% of patients with CIN2/3 and for 52 to 58% of cancers (4, 10, 34, 48) (62% of CIN2/3 and in 73% of cancers in France [42, 43]). Because other HR-HPVs (e.g., HPV18, HPV31, and HPV45) are also responsible for cervical lesions, relevant cutoffs should be determined for these genotypes. Now, prospective cohort studies are necessary to evaluate the clinical relevance of these viral parameters. Moreover, there is an obvious need for standardized procedures, as our results may be dependent on the protocol we have used. Standardization would allow the comparison of viral load and integration results from different studies and laboratories. In this respect, we recently worked on the homogenization of techniques between different labs. Preliminary results indicate that it is possible to achieve very good inter-/intra-laboratory and inter-/intra-observer reproducibility.

ACKNOWLEDGMENTS

M. Saunier and S. Monnier-Benoit were recipients of a predoctoral scholarship from the Conseil Régional de Franche-Comté and J. Briolat was a recipient of a postdoctoral fellowship from the Cancéropôle Grand-Est. Part of this work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (Comité du Doubs) and from Institut National du Cancer.

We thank E. de Villiers (DKFZ, Germany) for kindly providing us with HPV16 plasmid and M. Căpîlna and A. Petitjean for providing us with cervical samples. L. Gissmann is gratefully acknowledged for his advice regarding result interpretation.

REFERENCES

- Andersson, S., H. Safari, M. Mints, I. Lewensohn-Fuchs, U. Gyllensten, and B. Johansson. 2005. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br. J. Cancer* **92**:2195–2200.
- Arias-Pulido, H., C. L. Peyton, N. E. Joste, H. Vargas, and C. M. Wheeler. 2006. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* **44**:1755–1762.
- Baker, C. C., W. C. Phelps, V. Lindgren, M. J. Braun, M. A. Gonda, and P. M. Howley. 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* **61**:962–971.
- Barbosa, M. S., D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1989. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* **63**:1404–1407.
- Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, K. V. Shah, et al. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**:796–802.
- Boulangier, J. C., and H. Sevestre. 2006. ASCUS: an update. *Gynecol. Obstet. Fertil.* **34**:44–48. (In French.)
- Bray, F., R. Sankila, J. Ferlay, and D. M. Parkin. 2002. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur. J. Cancer* **38**:99–166.
- Briolat, J., V. Dalstein, M. Saunier, K. Joseph, S. Caudroy, J. L. Pretet, P. Birembaut, and C. Clavel. 2007. HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int. J. Cancer* **121**:2198–2204.
- Carcopino, X., M. Henry, D. Benmoura, A. S. Fallabregues, H. Richet, L. Boubli, and C. Tamalet. 2006. Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J. Med. Virol.* **78**:1131–1140.
- Clifford, G., S. Franceschi, M. Diaz, N. Munoz, and L. L. Villa. 2006. HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* **24**(Suppl. 3):S26–S34.
- Cricca, M., A. M. Morselli-Labate, S. Venturoli, S. Ambretti, G. A. Gentilomi, G. Gallinella, S. Costa, M. Musiani, and M. Zerbinì. 2007. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol. Oncol.* **106**:549–557.
- Dalstein, V., D. Riethmuller, J. L. Pretet, K. Le Bail Carval, J. L. Sautiere, J. P. Carbillet, B. Kantelip, J. P. Schaal, and C. Mougin. 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.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**:17–27.
- Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* **32**(Suppl. 1):S7–S15.
- Franco, E. L., L. L. Villa, J. P. Sobrinho, J. M. Prado, M. C. Rousseau, M. Desy, and T. E. Rohan. 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**:1415–1423.
- Fujii, T., N. Masumoto, M. Saito, N. Hirao, S. Niimi, M. Mukai, A. Ono, S. Hayashi, K. Kubushiro, E. Sakai, K. Tsukazaki, and S. Nozawa. 2005. Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn. Mol. Pathol.* **14**:103–108.
- Gallo, G., M. Bibbo, L. Bagella, A. Zamparelli, F. Sanseverino, M. R. Giavagnoli, A. Vecchione, and A. Giordano. 2003. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J. Clin. Pathol.* **56**:532–536.
- Gravitt, P. E., M. B. Kovacic, R. Herrero, M. Schiffman, C. Bratti, A. C. Hildesheim, J. Morales, M. Alfaro, M. E. Sherman, S. Wacholder, A. C. Rodriguez, and R. D. Burk. 2007. High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int. J. Cancer* **121**:2787–2793.
- Ho, G. Y., R. D. Burk, S. Klein, A. S. Kadish, C. J. Chang, P. Palan, J. Basu, R. Tachezy, R. Lewis, and S. Romney. 1995. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**:1365–1371.
- Hudelist, G., M. Manavi, K. I. Pischinger, T. Watkins-Riedel, C. F. Singer, E. Kubista, and K. F. Czerwenka. 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**:873–880.
- Josefsson, A. M., P. K. Magnusson, N. Ylitalo, P. Sorensen, P. Qvarforth-Tubbin, P. K. Andersen, M. Melbye, H. O. Adami, and U. B. Gyllensten. 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**:2189–2193.
- Kalantari, M., F. Karlsen, G. Kristensen, R. Holm, B. Hagmar, and B. Johansson. 1998. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **17**:146–153.
- Khan, M. J., P. E. Castle, A. T. Lorincz, S. Wacholder, M. Sherman, D. R. Scott, B. B. Rush, A. G. Glass, and M. Schiffman. 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**:1072–1079.
- Kovacic, M. B., P. E. Castle, R. Herrero, M. Schiffman, M. E. Sherman, S. Wacholder, A. C. Rodriguez, M. L. Hutchinson, M. C. Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, M. Alfaro, and R. D. Burk. 2006. Relationships of human papillomavirus type, qualitative viral load, and age with cytologic abnormality. *Cancer Res.* **66**:10112–10119.
- Kulmala, S. M., S. M. Syrjanen, U. B. Gyllensten, I. P. Shabalova, N. Petrovichev, P. Tosi, K. J. Syrjanen, and B. C. Johansson. 2006. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J. Clin. Pathol.* **59**:513–517.
- Laurendeau, I., M. Bahuau, N. Vodovar, C. Larramendy, M. Olivi, I. Bieche, M. Vidaud, and D. Vidaud. 1999. TaqMan PCR-based gene dosage assay for predictive testing in individuals from a cancer family with INK4 locus haploinsufficiency. *Clin. Chem.* **45**:982–986.
- Lillo, F. B., S. Lodini, D. Ferrari, C. Stayton, G. Taccagni, L. Galli, A. Lazzarin, and C. Uberti-Foppa. 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**:451–457.
- Lukaszuk, K., J. Liss, I. Wozniak, J. Emerich, and C. Wojcikowski. 2003. Human papillomavirus type 16 status in cervical carcinoma cell DNA assayed by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**:608–612.
- Meissner, J. D. 1999. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* **80**:1725–1733.
- Melnikow, J., J. Nuovo, A. R. Willan, B. K. Chan, and L. P. Howell. 1998. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* **92**:727–735.
- Monnier-Benoit, S., V. Dalstein, D. Riethmuller, N. Lalaoui, C. Mougin, and J. L. Pretet. 2006. Dynamics of HPV16 DNA load reflect the natural history of cervical HPV-associated lesions. *J. Clin. Virol.* **35**:270–277.
- Moscicki, A. B., S. Shiboski, N. K. Hills, K. J. Powell, N. Jay, E. N. Hanson, S. Miller, K. L. Canjura-Clayton, S. Farhat, J. M. Broering, and T. M. Darragh. 2004. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* **364**:1678–1683.
- Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* **78**:11451–11460.
- Munoz, N., F. X. Bosch, X. Castellsague, M. Diaz, S. de Sanjose, D. Hammouda, K. V. Shah, and C. J. Meijer. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer* **111**:278–285.
- Munoz, N., F. X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K. V. Shah, P. J. Snijders, and C. J. Meijer. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**:518–527.
- Nagao, S., M. Yoshinouchi, Y. Miyagi, A. Hongo, J. Kodama, S. Itoh, and T. Kudo. 2002. Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**:863–867.
- Ostor, A. G. 1993. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **12**:186–192.
- Parkin, D. M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* **2**:533–543.
- Payan, C., A. Ducancelle, M. H. Aboubaker, J. Caer, M. Tapia, A. Chauvin, D. Peyronnet, E. Le Hen, Z. Arab, M. C. Legrand, A. Tran, E. Postec, F. Tourmen, M. Avenel, C. Malbois, M. A. De Brux, P. Descamps, and F. Lunel. 2007. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J. Clin. Microbiol.* **45**:897–901.
- Peitsaro, P., B. Johansson, and S. Syrjanen. 2002. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as dem-

- onstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* **40**:886–891.
41. Pretet, J. L., V. Dalstein, S. Monnier-Benoit, S. Delpeut, and C. Mouglin. 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**:140–147.
 42. Pretet, J. L., A. C. Jacquard, X. Carcopino, J. F. Charlot, D. Bouhour, B. Kantelip, B. Soubeyrand, Y. Leocmach, C. Mouglin, and D. Riethmuller. 2008. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int. J. Cancer* **122**:428–432.
 43. Pretet, J. L., A. C. Jacquard, X. Carcopino, S. Monnier-Benoit, G. Averous, B. Soubeyrand, Y. Leocmach, C. Mouglin, and D. Riethmuller. 2008. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int. J. Cancer* **122**:424–427.
 44. Romanczuk, H., and P. M. Howley. 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3159–3163.
 45. Shepherd, J. C., and R. A. Fried. 1995. Preventing cervical cancer: the role of the Bethesda system. *Am. Fam. Physician* **51**:434–440, 443–444.
 46. Sherman, M. E., S. S. Wang, C. M. Wheeler, L. Rich, P. E. Gravitt, R. Tarone, and M. Schiffman. 2003. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **12**:1038–1044.
 47. Siegel, S., and N. J. Castelane. 1988. *Nonparametric statistics for behavioral sciences.* McGraw-Hill, New York, NY.
 48. Smith, J. S., L. Lindsay, B. Hoots, J. Keys, S. Franceschi, R. Winer, and G. M. Clifford. 2007. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer* **121**:621–632.
 49. Tonon, S. A., M. A. Picconi, P. D. Bos, J. B. Zinovich, J. Galuppo, L. V. Alonio, and A. R. Teyssie. 2001. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J. Clin. Virol.* **21**:129–134.
 50. Tsai, H. T., C. H. Wu, H. L. Lai, R. N. Li, Y. C. Tung, H. Y. Chuang, T. N. Wu, L. J. Lin, C. K. Ho, H. W. Liu, and M. T. Wu. 2005. Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**:2544–2549.
 51. van Duin, M., P. J. Snijders, H. F. Schrijnemakers, F. J. Voorhorst, L. Rozendaal, M. A. Nobbenhuis, A. J. van den Brule, R. H. Verheijen, T. J. Helmerhorst, and C. J. Meijer. 2002. Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. *Int. J. Cancer* **98**:590–595.
 52. Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer, and N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**:12–19.
 53. Wallin, K. L., F. Wiklund, T. Angstrom, F. Bergman, U. Stendahl, G. Wadell, G. Hallmans, and J. Dillner. 1999. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **341**:1633–1638.
 54. Woodman, C. B., S. Collins, H. Winter, A. Bailey, J. Ellis, P. Prior, M. Yates, T. P. Rollason, and L. S. Young. 2001. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* **357**:1831–1836.
 55. Ylitalo, N., A. Josefsson, M. Melbye, P. Sorensen, M. Frisch, P. K. Andersen, P. Sparen, M. Gustafsson, P. Magnusson, J. Ponten, U. Gyllensten, and H. O. Adami. 2000. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res.* **60**:6027–6032.
 56. Zerbini, M., S. Venturoli, M. Cricca, G. Gallinella, P. De Simone, S. Costa, D. Santini, and M. Musiani. 2001. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. *J. Clin. Pathol.* **54**:377–380.

3. Publication n°3 :

Intersite validation of in house real-time PCR for HPV16 load determination.

(Manuscript en preparation)

M. Saunier, V. Dalstein, J. Briolat, F. Mauny, E. Schwarz, C. Clavel, C. Mougín and J-L. Prétet

Manuscrit en préparation

Ce travail a été présenté sous forme orale :

Aux 1^{ières} journées scientifiques francophones sur les Papillomavirus, Tours, France, Octobre 2008.

Quantification en temps réel des HPV 16 et 18.

Saunier M.

Au 8th International Multidisciplinary Congress EUROGIN, Nice, France, Novembre 2008

Interlaboratory comparison for performance characteristics of in-house real-time PCR assays for HPV16 quantification.

Dalstein V, Saunier M, Briolat J, Prétet JL, Mauny F, Clavel C, Mougín C.

Objectifs :

La comparaison directe des résultats de charge virale obtenus dans la littérature est difficile sans l'utilisation de protocoles standardisés, puisque le type d'échantillons utilisés, les techniques utilisées et le mode d'expression des résultats sont différents.

Suite à ce constat, nous avons souhaité comparer les valeurs de charge virale obtenues sur 2 sites sur une série de 20 échantillons cervico-utérins. Les résultats, bien qu'encourageants, ont montré une variabilité importante entre les charges virales mesurées dans les 2 laboratoires. En effet, en représentant les différences de charge virale obtenues sur les 2 sites en fonction de la moyenne de charge virale obtenue sur les 2 sites (Figure 20), nous avons observé que la moyenne des différences de charge virale obtenues sur les 2 sites était égale à 0,7 log, ceci signifiant que l'une et/ou l'autre des mesures surestime ou sous/estime la charge virale de 0,7 log en moyenne. De plus, nous avons observé que seulement 80% des différences entre les 2 mesures étaient comprises dans l'intervalle de confiance à 95%.

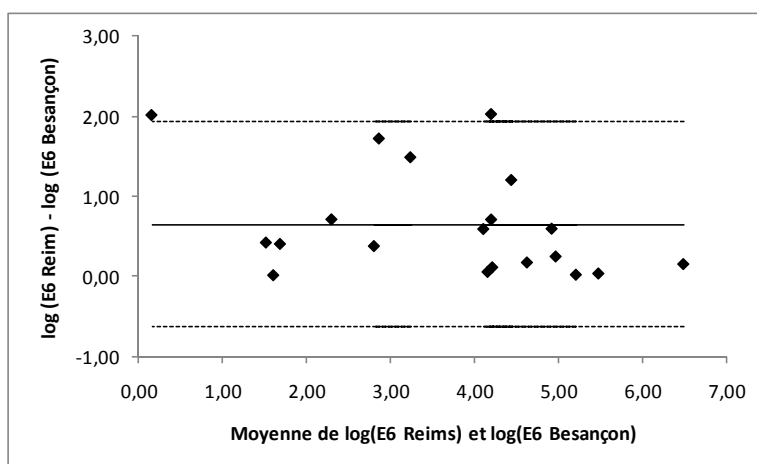


Figure 20 : Concordance inter-laboratoire pour la quantification de E6 HPV16 (étude préliminaire)

Pour diminuer la variabilité de la mesure de charge virale entre les 2 sites, nous avons choisi d'harmoniser les séquences et les concentrations d'amorces et de sondes et les gammes de standards utilisées pour l'étalonnage. Par la suite, les variabilités intra-laboratoires (intra-manipulateur et inter-manipulateur) et les variabilités inter-laboratoires ont été évaluées.

Méthode :

L'étude a été réalisée dans 2 laboratoires indépendants : le laboratoire de l'EA3181 à Besançon (centre) et le laboratoire Pol Bouin à Reims (centre 2). La collecte des échantillons, l'extraction d'ADN et le génotypage ont été réalisés par le centre 2 puis les échantillons d'ADN ont été distribués au centre 1. L'extraction d'ADN a été effectuée grâce à la trousse EZ1 DNA tissue et le Biorobot EZ1 (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur. Les échantillons ont ensuite été génotypés par la trousse Linear Array. Sur les échantillons HPV16 positifs, nous avons utilisé une combinaison de 2 PCR temps-réel, ciblant les gènes E6 et albumine, pour calculer la charge virale.

Une première série de 60 échantillons a été utilisée pour évaluer la répétabilité intra- et inter-manipulateur. Faute de quantité suffisante d'échantillons, la répétabilité inter-laboratoire a été évaluée sur une deuxième série de 108 échantillons cervico-utérins (HPV16 positifs). Dans chaque centre les mêmes concentrations et séquences de sondes et d'amorces, et les mêmes gammes d'étalonnage ont été utilisées. Dans le centre 1, les PCR ont été réalisées sur le thermocycleur l'ABI7500 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en utilisant la trousse Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Dans le centre 2, les PCR ont été réalisées sur le thermocycleur LC480 (Roche Diagnostics, Meylan, France,) en utilisant la trousse Light Cycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics).

La répétabilité, intra/inter manipulateur et inter-laboratoire a ensuite été évaluée grâce à des courbes de Bland-Altman. Le graphique de Bland-Altman consiste en la représentation de la différence entre 2 valeurs en fonction de la moyenne de ces 2 valeurs. Sur une telle représentation, la moyenne des différences correspond au biais moyen entre les deux méthodes. Si on fait l'hypothèse que les différences suivent une loi normale, 95% des différences sont comprises entre cette valeur moyenne $-1,96x$ (écart type des différences) et la valeur moyenne $+ 1,96x$ (écart type des différences). En fonction de l'étendue de cet intervalle, il est possible de déterminer si les valeurs obtenues sur les 2 sites sont concordantes.

Résultats :

Concordances intra et inter-manipulateur :

Les courbes de Bland-Altman montrent que 91,1 à 100% des différences entre les 2 mesures sont comprises dans l'intervalle de confiance à 95% (Figure 21, Figure 22). Les moyennes des différences entre les 2 mesures sont comprises entre 0,01 log (E6, inter-manipulateur à Besançon) et 0,3 log (E6, intra-manipulateur à Reims)(Figure 25). Ces résultats suggèrent une bonne concordance entre les manipulations intra- et inter-manipulateurs, que ce soit pour la PCR ciblant l'albumine ou celle ciblant E6.

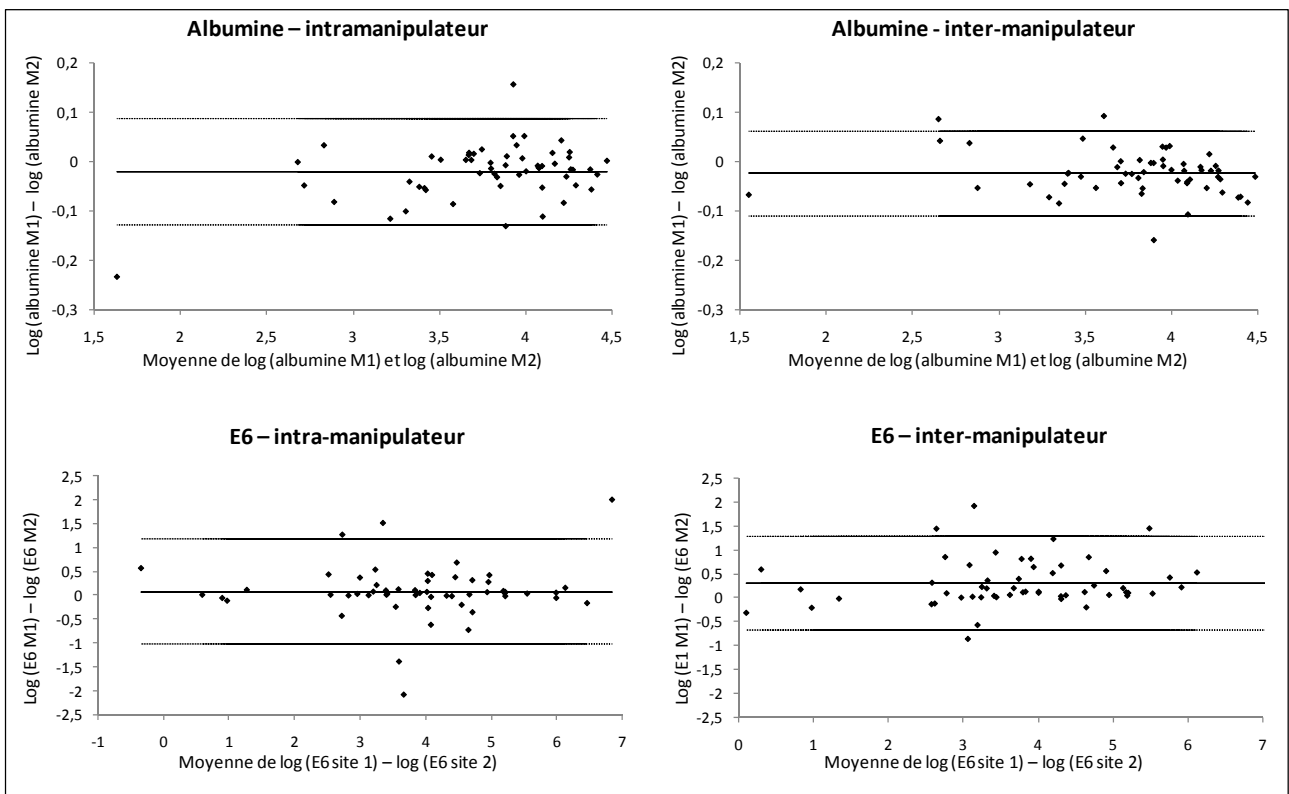


Figure 21 : Concordance intra- et inter-manipulateur à Besançon

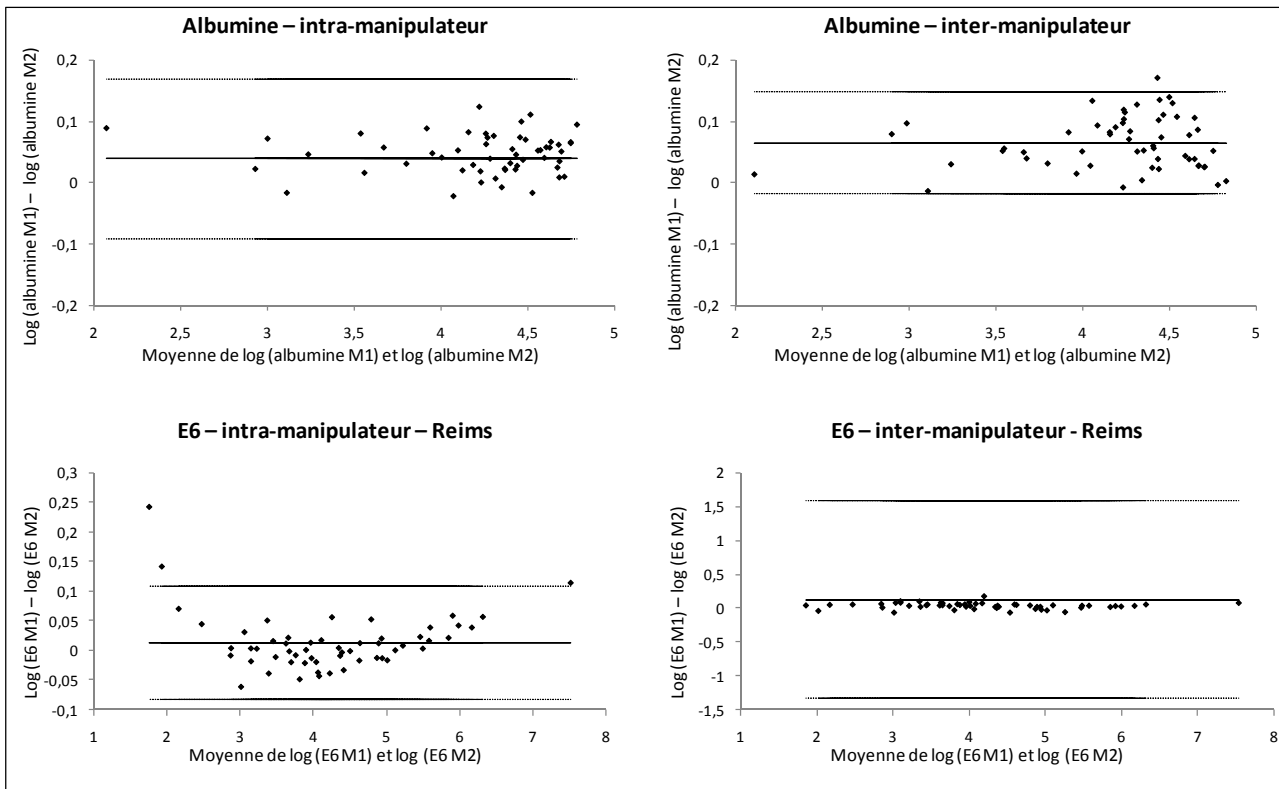


Figure 22 : Concordance intra- et inter-manipulateur à Reims

Concordance inter-laboratoire :

Pour la quantification de E6 et de l'albumine, les courbes de Bland-Altman montrent que 97% des différences entre les deux mesures sont comprises dans l'intervalle de confiance à 95% (Figure 23). La moyenne des différences entre les 2 mesures est égale à 0,22 log pour E6 et - 0,11 log pour l'albumine (Figure 25). Ceci suggère une bonne concordance entre les mesures effectuées dans les 2 centres.

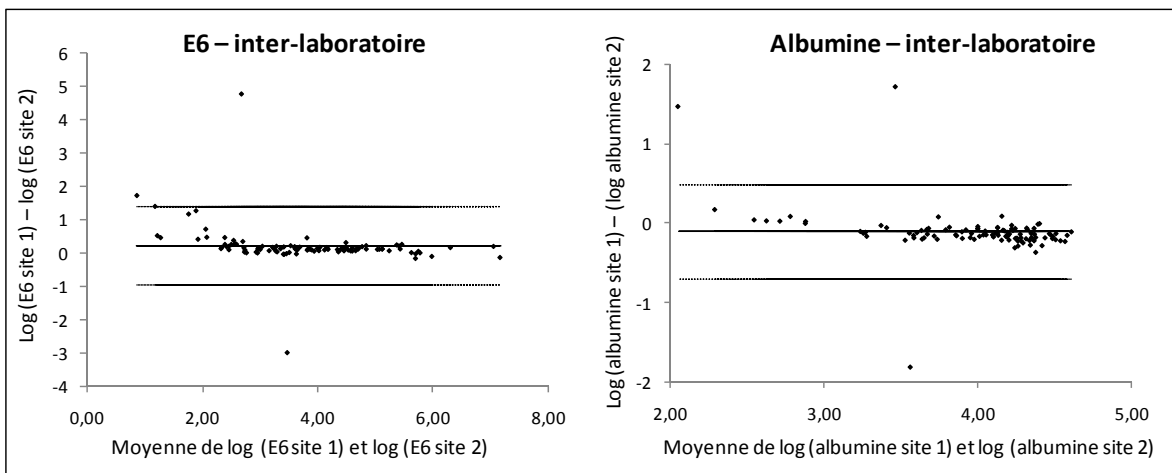


Figure 23 : Concordance inter-laboratoire pour la quantification des gènes E6 et Albumine.

Lorsqu'on observe la concordance inter-laboratoire sur la charge virale finale, la courbe de Bland-Altman montre que 99% des différences entre les 2 mesures sont comprises dans l'intervalle de confiance à 95%. La moyenne des différences entre les 2 mesures est égale à 12,5, ce qui n'est pas statistiquement différent de 0 (95%CI : -2,57 – 54,4). Ces résultats indiquent une excellente concordance entre les charges virales obtenues sur les 2 sites.

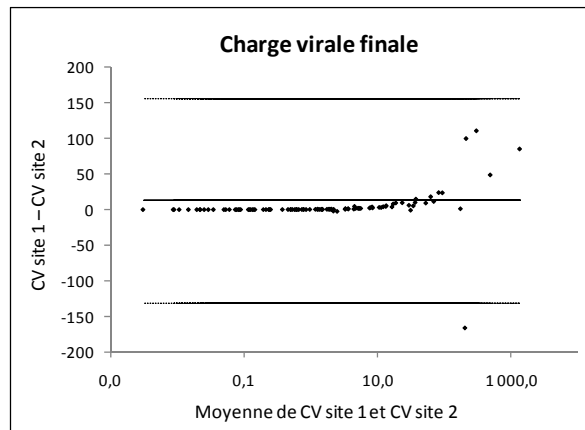


Figure 24 : Concordance inter-laboratoire pour la mesure de la charge virale normalisée.

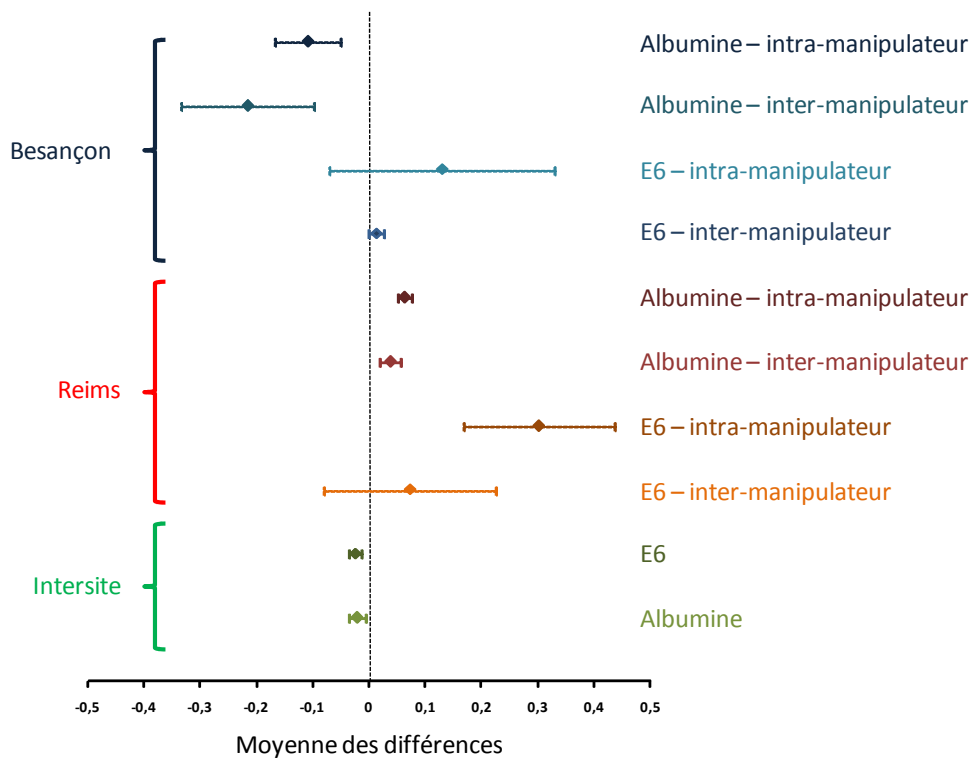


Figure 25 : Répartition des moyennes des différences et intervalles de confiance à 95%

Conclusion :

Sur chaque site, la concordance intra- et inter- manipulateur est bonne. Bien que les moyennes des différences de mesure soient dans un certain nombre de cas différentes de 0, elles sont très proches de cette valeur avec des moyennes de -0,025 à 0,303.

La concordance inter-laboratoires est elle aussi importante. Si les moyennes des différences sont différentes de 0 pour les PCR E6 et albumine, elles sont très proches de zéro. De façon intéressante, la concordance finale obtenue pour la charge virale est excellente, avec une moyenne des différences non statistiquement différente de 0, ce qui souligne l'importance de la normalisation. Ceci signifie que notre méthode est robuste et que des résultats obtenus sur deux sites différents sont comparables.

Pour atteindre une telle concordance, les protocoles ont dû être standardisés entre les 2 sites. En particulier, les standards utilisés pour construire les droites de calibration doivent être homogènes, puisqu'une différence mineure sur la pente de la droite de calibration peut induire des variations importantes des Cp obtenus sur des échantillons inconnus.

4. Publication n°4 :

Real-time duplex PCR for HPV16 and 18 simultaneous viral load quantification

(Manuscript en preparation)

M. Saunier, C. Mougin and J-L. Prétet

Manuscrit en préparation

Ce travail a été présenté sous forme orale :

Au 8th International Multidisciplinary Congress EUROGIN, Nice, France, Novembre 2008

Diplex real-time PCR for simultaneous quantification of HPV16 and HPV18 DNA.

Saunier M, Batal M, Schwarz E, Mougin C and Prétet JL.

Ce travail a été présenté sous forme affichée :

A la 5th Quantitative PCR Conference, San Diego, Etats-Unis, Mars 2009

Usefulness of real-time quantitative PCR in the screening of HPV associated lesions of the cervix.

Saunier M, Batal M, Mougin C and Prétet JL.

Objectifs :

Les génotypes 16 et 18, sont les 2 plus fréquents dans les cancers mais aussi les plus à risque d'induire des lésions (pré)-cancéreuses. Par ailleurs, comme la charge virale pourrait être un paramètre intéressant pour identifier les femmes avec des lésions prévalentes ou incidentes, l'obtention d'outils permettant le génotypage et la quantification de la charge virale de ces 2 génotypes simultanément présente un intérêt majeur. Ainsi, nous avons souhaité développer une technique de PCR temps-réel permettant la quantification absolue de la charge virale de ces 2 génotypes dans une même réaction. La mise en place d'une telle PCR représente un défi technique car il n'est pas rare d'assister à l'amplification préférentielle de l'une des cibles. Ainsi la validation est une étape très importante lors de la mise en place d'une telle technique de PCR.

Méthode :

Pour détecter les 2 génotypes simultanément, nous avons combiné une PCR ciblant le gène E6 d'HPV16 (Pretet *et al.*, 2004) et une PCR ciblant le gène E6 d'HPV18.

La PCR-TR duplex E6 HPV16 et 18 a été réalisée à l'aide de la trousse commerciale TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le mélange réactionnel de 25 μ L contenait du tampon de réaction avec le MgCl₂, les dNTP et la Taq polymérase, 500nM d'amorces sens E6 HPV16 (Eurogentec) et E6 HPV18 500nM d'amorces antisens E6 HPV16 et E6 HPV18 (Eurogentec), 250nM de sonde Taqman E6 HPV16 et E6 HPV18 (Eurogentec et Applied Biosystems).

Au préalable, la PCR HPV18 a été optimisée et validée pour sa spécificité et sa sensibilité. Pour valider la PCR duplex nous avons ensuite réalisé plusieurs séries de mélanges de plasmides contenant les génomes d'HPV16 et d'HPV18. Ces mélanges ont été réalisés dans un équivalent d'ADN de 20 000 cellules par μ L afin de mimer l'encombrement stérique dû à l'ADN génomique des cellules humaines. Sept séries de mélanges ont été constituées afin de tester un maximum de concentrations et de rapport entre le nombre d'équivalents génomes d'HPV16 (egHPV16) et d'HPV18 (egHPV18) possibles :

- 3 séries de 8 mélanges avec une concentration d'egHPV16 fixe (10^2 , 10^5 et 10^7 eg/ μ L) et une concentration d'egHPV18 variant de 0 à 10^7 eg/ μ L.
- 3 séries de 8 mélanges avec une concentration d'egHPV18 fixe (10^2 , 10^5 et 10^7 eg/ μ L) et une concentration d'egHPV16 variant de 0 à 10^7 eg/ μ L.
- une série de 8 mélanges avec une concentration d'egHPV16 et d'egHPV18 variant de 0 à 10^7 eg/ μ L (mélanges équimolaires).

Sur chacun de ces mélanges ont été réalisées : une PCR HPV16 simplex, une PCR HPV18 simplex et une PCR duplex HPV16-HPV18 ; puis nous avons comparé les valeurs de charges virales obtenues à partir des PCR simplex et duplex, la PCR simplex étant notre gold standard. Chaque PCR a été réalisée 2 fois et en duplicate.

Enfin, nous avons appliqué cette technique à 37 échantillons cervico-utérins, puis comparé les valeurs obtenues en PCR duplex et en PCR simplex.

Résultats :

Validation de la PCR temps-réel ciblant E6 d'HPV18 :

La sensibilité a été testée sur une gamme de plasmides pBluescript HPV18 (gracieusement fournis par le Pr E.M. de Villiers) variant de dix millions à 1 eg/ μ L ainsi que sur de l'ADN de cellules HeLa (abritant chacune environ 50 eg HPV18). Les résultats obtenus (Figure 26) montrent que la PCR-TR E6 HPV18 a une limite de détection de 1 eg/100 000 cellules et une sensibilité de 10 eg/100 000 cellules.

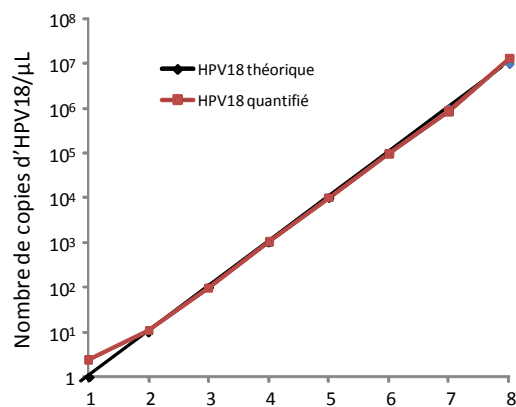


Figure 26 : Sensibilité de la PCR ciblant E6 d'HPV16.

La spécificité de la PCR-TR E6 HPV18 a, dans un premier temps, été testée sur 15 échantillons cervico-utérins contenant de l'ADN d'HPV39, 45, 59, 68 et 70, ces derniers étant les types les plus proches phylogénétiquement d'HPV18. Sur les échantillons abritant les types 39, 59, 68 et 70 il n'y a pas eu d'amplification. En revanche, sur un des échantillons abritant un HPV45, une réaction d'amplification a été observée (Cp = 37).

De façon à déterminer s'il pouvait y avoir une réaction croisée de cette PCR avec HPV45, nous avons réalisé la PCR ciblant E6 d'HPV18 sur 37 échantillons préalablement génotypés et abritant HPV45. La réaction de PCR s'est révélée positive pour 5 des échantillons testés (13%). Toutefois, les Cp obtenus (de 33 à 42) avec 4 de ces échantillons correspondaient à des concentrations inférieures à 5 eg/ μ L. La PCR ciblant HPV18 a

ensuite été appliquée à une gamme de plasmides pBluescript-HPV45 variant de dix millions à 1 eg/μL. Sur cette gamme, une amplification a été observée pour des concentrations de 10⁵, 10⁶ et 10⁷ eg/μL d'HPV45. Les Cp obtenus (39>Cp>35) lors de ces réactions correspondaient à moins de 1 egHPV18 les concentrations 10⁵ et 10⁶ eg/μL d'HPV45 et à 30 egHPV18/μL pour la concentration 10⁷ egHPV45/μL d'HPV45 (Cp = 31).

La PCR ciblant E6 d'HPV18 est donc très sensible et relativement spécifique.

Validation de la PCR duplex sur les mélanges de plasmides :

A titre d'exemple (Figure 27), à partir de mélanges ayant une concentration d'HPV16 fixée à 10⁵ eg/μL et une concentration d'HPV18 variant de 0 à 10⁷ eg/μL, nous n'avons pas obtenu de déviation entre les résultats théoriques et expérimentaux pour la PCR simplex. Pour la PCR duplex, une légère déviation a été observée lorsque HPV18 est en excès de 100 fois (par rapport à HPV16) (tube 1) ou lorsque HPV16 est en excès de 1000 à 100 000 fois par rapport à HPV18 (tubes 6 à 8).

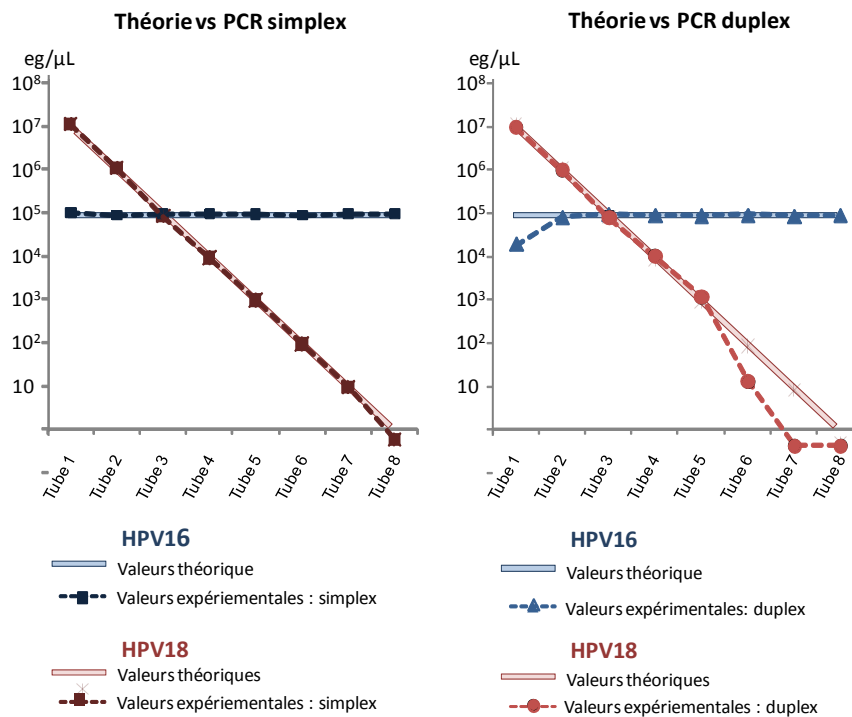


Figure 27 : Exemple de déviations obtenues pour les PCR 16 et 18 en simplex et en duplex.

Les tableaux ci-dessous représentent pour chaque mélange, la variabilité (exprimée en pourcentage) de la mesure du nombre d'egHPV16 (Tableau 8) ou d'egHPV18 (Tableau 9) par rapport aux valeurs théoriques. Sont représentées en clair les valeurs sous-estimées de plus de 20% et en foncé les valeurs surestimées de plus de 20%.

Tableau 8 : Variabilité, exprimée en pourcentage, de la mesure du nombre de copies d'HPV16 par rapport aux valeurs théoriques ([log valeur expérimentale / log valeur théorique] x100).

En clair, les valeurs sous-estimées et en foncé, les valeurs surestimées. Les notations « * » signifient que de l'ADN a été amplifié alors que l'eg théorique est égale à 0. Les notations « ** » signifient que le nombre d'eg expérimental était égal à 0.

HPV16 eg/μL (simplex)		HPV16 (eg/μL)							
théorie		0	10	100	1 000	10 000	100 000	1 000 000	10 000 000
HPV18 (eg/μL)	0		91		96		100		99
	10	100	89	95	95	98	99	101	99
	100		78	109	93		99		99
	1 000	100	78	94	95	98	99	100	99
	10 000		98		96	104	99		99
	100 000	*	96	95	96	98	99	100	99
	1 000 000		114		95		99	103	99
	10 000 000	*	182	107	95	96	99	100	99

HPV16 eg/μL (duplex)		HPV16 (eg/μL)							
théorie		0	10	100	1 000	10 000	100 000	1 000 000	10 000 000
HPV18 (egs/μL)	0		59		86		99		99
	10	100	96	95	91	98	99	100	99
	100		101	108	88		100		98
	1 000	100	81	98	98	98	99	100	99
	10 000		35		123	101	99		98
	100 000	100	**	18	144	100	100	100	99
	1 000 000		383		191		99	99	99
	10 000 000	100	395	**	214	87	89	99	99

Tableau 9 : Variabilité, exprimée en pourcentage, de la mesure du nombre de copies d'HPV18 par rapport aux valeurs théoriques ([log valeur expérimentale / log valeur théorique] x100).

En clair, les valeurs sous-estimées et en foncé, les valeurs surestimées. Les notations « * » signifient que de l'ADN a été amplifié alors que l'eg théorique est égale à 0. Les notations « ** » signifient que le nombre d'eg expérimental était égal à 0.

HPV18 eg/μL (simplex)		HPV16 (eg/μL)							
théorie		0	10	100	1 000	10 000	100 000	1 000 000	10 000 000
HPV18 (eg/μL)	0		100		100		100		*
	10	99	103	96	98	98	98	96	105
	100		95	98	95		98		99
	1 000	98	98	97	98	99	99	98	100
	10 000		98		98	100	99		99
	100 000	98	98	98	98	98	98	98	99
	1 000 000		101		100		100	101	101
	10 000 000	101	101	101	101	101	101	100	101

HPV18 eg/μL (duplex)		HPV16 (eg/μL)							
théorie		0	10	100	1 000	10 000	100 000	1 000 000	10 000 000
HPV18 (eg/μL)	0		100		*		100		100
	10	95	100	112	218	33	**	**	**
	100		96	97	125		57		**
	1 000	98	99	97	98	102	104	80	**
	10 000		98		92	98	101		78
	100 000	98	98	98	96	98	99	100	100
	1 000 000		100		95		100	101	102
	10 000 000	100	100	100	98	101	100	100	101

Que ce soit en PCR simple ou en PCR duplex, on observe une variabilité de plus de 20% lorsque la concentration d'un des génotypes est faible (moins de 1000 eg/ μ L) et que la concentration du second génotype est 100 à 1000 fois supérieure à celle du génotype le moins concentré. Cette variabilité est légèrement plus marquée en PCR duplex.

Validation de la PCR duplex sur des échantillons cervico-utérins :

Nous avons ensuite réalisé une PCR HPV16 simple, une PCR HPV18 simple et une PCR duplex HPV16/18 sur l'ADN de 37 échantillons cervico-utérins abritant HPV16 seulement (15 échantillons), HPV18 seulement (7 échantillons) ou co-infectés par HPV16 et 18 (15 échantillons).

Pour les échantillons mono-infectés, nous observons une très bonne corrélation entre le nombre de copies obtenu en PCR simple et le nombre de copies obtenu en PCR duplex (Figure 28), avec des coefficients de corrélation très proches de 1. Nous n'avons pas pu détecter la présence d'ADN d'HPV16 dans l'échantillon 15, pour lequel le nombre de copies déterminé par PCR simple est inférieur à 10 copies par μ L. Le nombre de copies d'HPV18 a, quant à lui, été surestimé dans les échantillons 6 et 7, dans lesquels le nombre de copies est inférieur à 10 copies par μ L. Or, en dessous de 10 copies/ μ L la précision de la mesure n'est pas optimale puisque notre seuil de sensibilité est égal à 10 copies/ μ L.

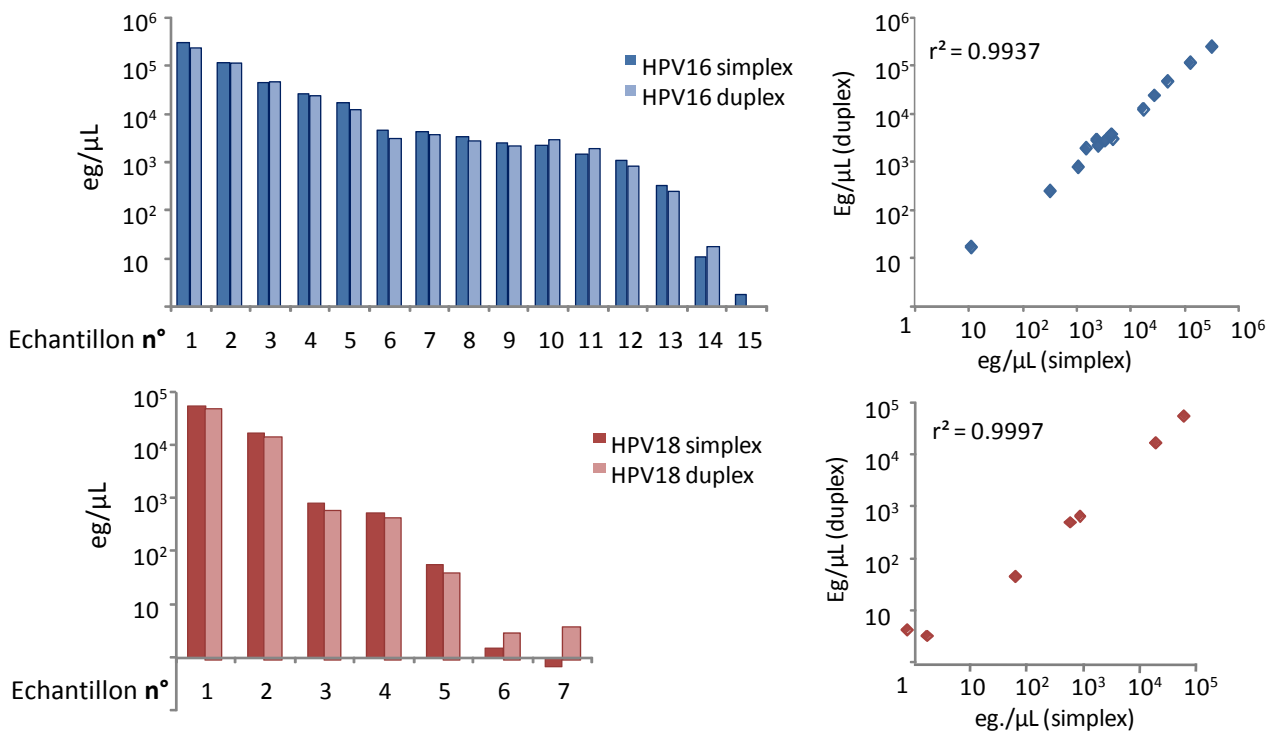


Figure 28 : Validation de la PCR duplex HPV16/18 sur des échantillons mono-infectés. A gauche : nombre de copies/ μ L obtenues en simple et en duplex. A droite, corrélation entre le nombre de copies obtenues en simple et le nombre de copies obtenues en duplex.

Pour les échantillons co-infectés par HPV16 et 18, la corrélation entre les valeurs obtenues par la PCR simplex et les valeurs obtenues par la PCR duplex est très bonne, avec un coefficient de corrélation égal à 0,99 pour les PCR HPV16 et à 0,95 pour les PCR HPV18. Ici encore, nous n'avons pas pu détecter, ou nous avons sous-estimé, le nombre d'équivalent génome d'un des génotypes en PCR duplex pour les concentrations inférieures à 10 eg/ μ L (échantillons 1, 13, 14 et 15) qui constituent notre seuil de sensibilité.

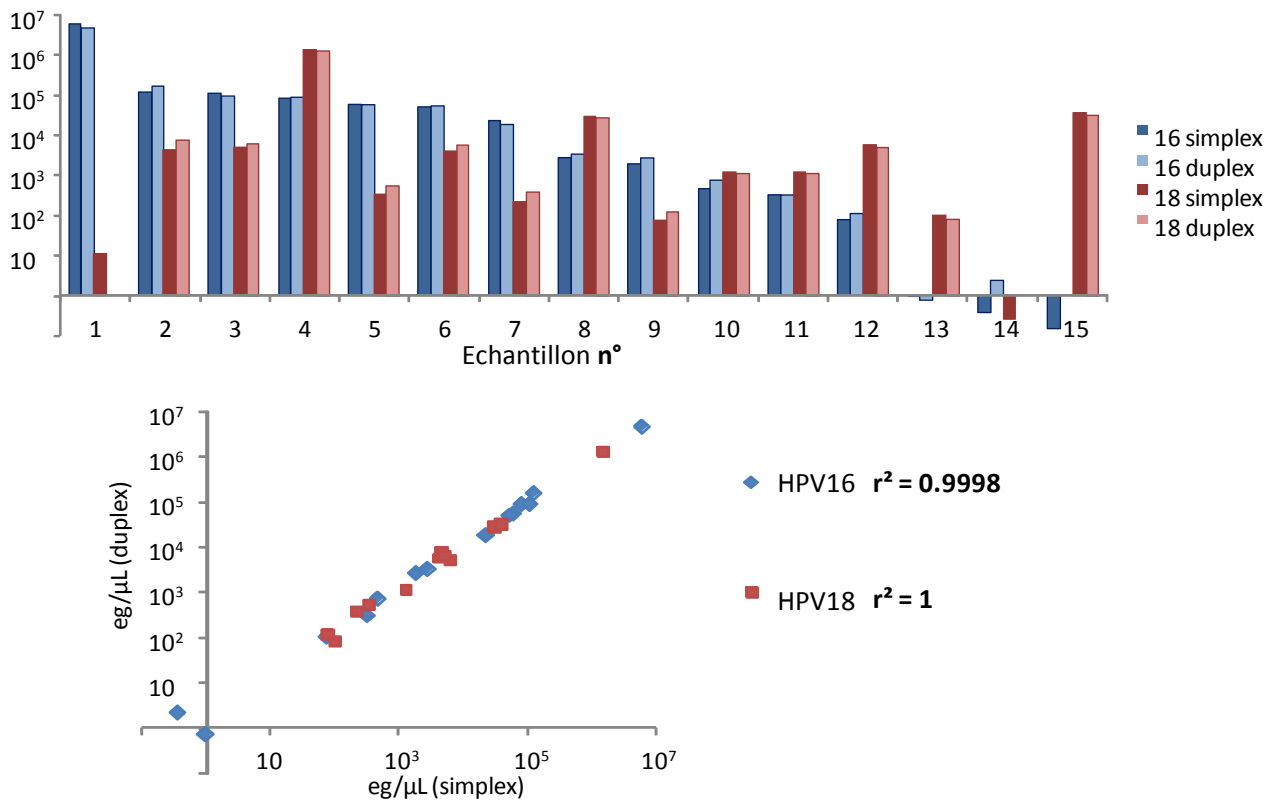


Figure 29 : Validation de la PCR duplex HPV16/18 sur des échantillons co-infectés par HPV16 et HPV18. En haut : nombre de copies/ μ L obtenues en simplex et en duplex. En bas, corrélation entre le nombre de copies obtenues en simplex et le nombre de copies obtenues en duplex.

Conclusion :

Nous avons montré, à partir de mélanges de plasmides, qu'il était possible de détecter et de quantifier les 2 génotypes (HPV16 et HPV18) en duplexant les 2 réactions de PCR. Nous avons aussi montré que la variabilité de la technique pouvait être importante lorsque 2 conditions étaient réunies : une faible concentration d'un des génotypes (moins de 1000 eg/ μ L) et une concentration du second génotype 100 à 1000 fois supérieure à celle du génotype le moins concentré. Cette variabilité est plus importante en PCR duplex qu'en PCR simplex. Ceci pourrait s'expliquer par des phénomènes de compétition qui subsistent entre les 2 PCR.

Nous avons ensuite étudié la capacité de cette technique à détecter et à quantifier HPV16 et HPV18 dans des échantillons cliniques. Nous avons observé une excellente corrélation entre les valeurs obtenues par PCR duplex et les valeurs obtenues par PCR simplex (gold standard). Les seuls échantillons pour lesquels nous n'avons pas pu détecter ou sous-estimé la quantité d'un des 2 génotypes sont ceux ayant une charge virale très faible (moins de 10 copies par μ L). Pour les valeurs inférieures à 10 eg par μ L, nous sommes en dessous de nos limites de sensibilité (aussi bien pour la PCR 16 que la PCR 18), limites en dessous desquelles la détection est aléatoire en PCR simplex. De plus, la pertinence de si faibles charges virales est discutable. Par exemple, un test HC2 est considéré comme positif pour un équivalent de charge virale supérieur à 100 000 eg/mL alors qu'avec cette PCR duplex, nous sommes en mesure de détecter des charges virales jusqu'à 100 eg/mL.

Pour conclure, nous avons mis au point une technique permettant la détection, mais aussi la quantification des HPV16 et 18 dans une même réaction. Réaliser ces 2 PCR en duplex permettra de réaliser des économies de temps, d'échantillons mais aussi de réactifs. Cette technique pourrait être un outil prometteur dans la prise en charge des femmes HPV-HR positives mais devra être validée sur de grandes séries d'échantillons cervico-utérins.

PARTIE 3 : Discussion et perspectives

Il est aujourd'hui admis que l'infection par un HPV-HR est nécessaire au développement des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Or, cette infection sexuellement transmissible est très fréquente, puisque environ 70% des femmes sexuellement actives ont, ou vont, être en contact avec un HPV au cours de leur vie. Cependant, seulement une petite fraction de ces femmes va développer des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Ce cancer est donc une conséquence rare de l'infection et les facteurs régissant le développement de lésions sont nombreux.

Il existe un lien étroit entre l'histoire naturelle des lésions et l'histoire naturelle de l'infection, illustrée par la nécessité d'une infection persistante dans le développement des lésions. Si l'histoire naturelle est bien décrite sur le plan histologique et cytologique, l'histoire naturelle de l'infection est encore mal connue (rôle des co-infections, de la charge virale, de l'intégration sur la persistance par exemple). Or une meilleure compréhension de l'histoire de l'infection virale permettrait de définir de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostiques des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus.

A l'heure actuelle, le test recommandé en France pour le dépistage de ces lésions est la cytologie. Ce test a une spécificité très élevée mais a en revanche une sensibilité limitée. Par conséquent, l'utilisation d'un tel test ne permet pas la détection de toutes les lésions. Le test HPV, quant à lui, a une spécificité modeste mais possède une sensibilité très élevée. Ce test permet donc de dépister la quasi totalité des lésions mais sera aussi positif chez des femmes n'abritant pas de lésions. Ainsi, dans l'optique de réaliser un dépistage virologique, il est nécessaire d'identifier et de valider de nouveaux marqueurs des lésions prévalentes et incidentes.

L'histoire naturelle de l'infection est liée à l'environnement, à l'hôte, et en particulier le système immunitaire, et aux HPV. Parmi les facteurs liés aux HPV, on sait que le génotype joue une place prépondérante dans l'évolution de l'infection. En revanche, l'implication des autres facteurs viraux tels que la charge virale, l'intégration, l'expression des oncoprotéines E6/E7 et la mutagenèse insertionnelle, est peu connue. Pendant notre thèse, nous avons tenté de décrire l'évolution de certains de ces facteurs viraux au cours de l'histoire naturelle des lésions, de définir leur implication dans ces lésions et de les hiérarchiser dans l'évolution de l'infection vers le cancer du col de l'utérus. Par ailleurs, dans une démarche de validation type assurance qualité, nous avons mené un travail de comparaison intersites de la technique de PCR temps-réel permettant la détermination de la charge virale d'HPV16. Enfin, nous avons développé une technique de PCR temps-réel duplex permettant la quantification simultanée de l'ADN d'HPV16 et 18 qui sont les génotypes les plus fréquemment retrouvés dans les cancers du col de l'utérus.

Les HPV16 et 18 sont les génotypes les plus fréquemment détectés dans les lésions du col de l'utérus.

Parmi les facteurs viraux influençant le développement et la persistance de lésions du col de l'utérus, le génotype semble jouer une place prépondérante puisque certains génotypes ont été décrits comme étant plus à risque que d'autres (Khan *et al.*, 2005). Ainsi, nous avons étudié la distribution des génotypes d'HPV dans des échantillons issus de lésions de bas grade en France, lors de l'étude EDITH III et comparé cette distribution à celle décrite dans les cancers (EDITH I).

Il a tout d'abord été démontré que les HPV les plus fréquemment identifiés dans les lésions de bas grade étaient (par fréquence décroissante) les HPV : 66, 16, 53, 51, 52, 18, 31, 6 et 45.

Ces données obtenues sur le territoire français, ont permis d'évaluer l'impact de la vaccination en France. Ainsi, dans l'hypothèse d'une couverture de vaccination de 100% et d'une efficacité de 95%, la vaccination éviterait en France : au moins 10% des LSIL pour le vaccin bivalent 16/18 et jusqu'à 14% des LSIL dans le cas du vaccin quadrivalent 16/18/6/11. De plus, lors de multi-infections, si on considère que la lésion est due aux types 6/11/16 et/ou 18, la vaccination par le vaccin quadrivalent permettrait de réduire de 32% les cas de LSIL, soit 22 000 cas par an. Par ailleurs, grâce aux études EDITH I et II menées au laboratoire, il a été montré que la vaccination éviterait au moins 45% des CIN2/3 et jusqu'à 64% des CIN2/3 si on considère que la lésion est due aux types 16 et/ou 18 dans le cas de multi-infections ; et au moins 71% des cancers épidermoïdes et 85% des adénocarcinomes si on prend en compte les mono-infections (et au moins 82% des cancers épidermoïdes si l'on prend en compte les co-infections).

Les génotypes les plus fréquemment détectés dans les LSIL dans notre étude sont approximativement les mêmes que ceux décrits par Clifford *et al.* en 2005 au niveau mondial (16, 31, 51, 53, 56, 52, 18, 66), mais leurs prévalences diffèrent. En particulier, l'HPV66 est détecté dans 9 % des lésions (8^{ième} place) pour Clifford *et al.*, et dans 25% des lésions (1^{ière} place) dans notre étude. Cette différence peut s'expliquer tout d'abord par les variations géographiques puisque les femmes constituant les cohortes utilisées dans ces études sont issues de régions différentes et on sait que la distribution des génotypes est dépendante du continent/pays étudié. La différence de prévalence de l'HPV66 dans ces 2 études peut aussi s'expliquer par les techniques de génotypage utilisées. En effet, les amorces utilisées pour réaliser les PCR consensus diffèrent dans leur capacité à amplifier certains génotypes. Ainsi, les amorces Gp5+/6+ (utilisées dans certaines des études incluses dans la méta-analyse de Clifford) auraient une sensibilité limitée pour détecter les HPV de types 31 et 66, alors que les amorces Spf (utilisées dans notre étude) auraient une sensibilité identique pour tous les génotypes (Iftner & Villa, 2003). L'HPV66, dont la prévalence est souvent sous-estimée (Menzo *et al.*, 2008), a été classé dans les HPV « potentiellement à risque » par Muñoz *et al.* (Muñoz *et al.*, 2003). En effet, dans ce travail, l'association entre la présence d'HPV66 et le cancer du col est relativement faible par rapport aux autres génotypes (OR = 5 pour HPV66 contre 435 pour HPV16). En

revanche, ce génotype a été retrouvé chez 3 patientes atteintes d'un cancer cervico-utérin mais chez aucune femme témoin.

Nous avons montré que les HPV66 et 53 qui sont classés comme « potentiellement à risque » étaient fréquemment détectés dans les lésions de bas grade mais rarement décrits dans les lésions de haut grade (Pretet *et al.*, 2008b) et les cancers (Pretet *et al.*, 2008a). Ceci suggère que ces génotypes ont une faible probabilité d'être associés avec des lésions de bas grade qui progressent. En revanche, nous avons montré que la prévalence des HPV 33, 16 et 18 était plus importante dans les lésions de haut grade et les cancers que dans les lésions de bas grade, ce qui suggère que ces génotypes sont associés à des lésions ayant un risque de progresser. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Khan *et al.*, qui ont montré, en 2005, que l'incidence cumulative de CIN2/3 à 10 ans était beaucoup plus élevée chez les femmes infectées par HPV16 ou 18 (17 et 14% respectivement) que chez les femmes infectées par d'autres types d'HPV-HR (3%) (Khan *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que l'HPV16 persistait d'avantage que les autres génotypes (Ho *et al.*, 1998, Liaw *et al.*, 2001, Molano *et al.*, 2003, Woodman *et al.*, 2001) avec une clairance à 5 ans de 67% contre 92% pour les autres génotypes (Elfgren *et al.*, 2000).

Dans notre étude, 50% des LSIL étaient infectées avec plusieurs types d'HPV, alors que cette proportion diminue à 30% dans les CIN2/3 (Pretet *et al.*, 2008b) et à 25% dans les cancers (Pretet *et al.*, 2008a). Ceci pourrait s'expliquer par une clairance virale plus rapide des HPV les moins agressifs (HPV66 par exemple) et par la persistance des autres types qui sont associés à un risque de progression élevé (HPV16, 18 et 33 par exemple) (Bulkmans *et al.*, 2007, Naucler *et al.*, 2007b).

Par conséquent, le génotypage pourrait être un outil intéressant dans le cadre de la prise en charge des patientes avec des lésions de bas grade, puisqu'il permettrait d'adapter le suivi selon le génotype associé à la lésion. Ainsi, les patientes avec des lésions de bas grade liées à HPV16, 18 et/ou 33 devraient être plus attentivement suivies. Toutefois, la prévalence de ces génotypes dans les LSIL est importante : 21,4% pour HPV16 et 7,6% pour HPV18 et la majorité de ces lésions vont régresser spontanément suite à la mise en place d'une réponse immunitaire. Il est donc nécessaire d'identifier des marqueurs viraux plus « sélectifs » que le génotype, tels que la charge virale ou l'intégration pour prédire le risque de progression.

La charge virale augmente avec le grade de la lésion :

Pour établir un lien de causalité entre un facteur de risque et la survenue d'un cancer (critères de Hill), il doit exister une relation entre le niveau d'exposition au facteur considéré (ou dose) et le risque de développer la maladie étudiée (ou effet). Dans le cas du cancer du col de l'utérus, ce critère est vérifié puisque l'on sait que plus le nombre de partenaires sexuels est élevé (dose), plus le risque de développer une infection et donc une lésion du col de l'utérus est élevé (effet). Il est aussi possible qu'il existe un effet/dose entre la charge virale et le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses approches ont été développées afin d'estimer la charge virale en HPV dans des échantillons cervico-utérins. Ces approches, qui sont plus ou moins quantitatives, sont principalement basées sur des techniques de PCR (consensus ou spécifiques de type) ou sur des techniques d'amplification de signal comme le test HC2. Un certain nombre d'auteurs ont tenté de corrélérer les valeurs de charge virale, obtenues grâce à ces techniques, avec le grade des lésions. Il a été démontré que la charge virale augmentait avec le grade de la lésion (Gravitt *et al.*, 2007, Hernandez-Hernandez *et al.*, 2003, Ho *et al.*, 1998, Ikenberg *et al.*, 1997, Melbye *et al.*, 1996) et certains auteurs ont même proposé qu'une charge virale élevée était associée à un risque important de développer des lésions (Ho *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 2001, Tsai *et al.*, 2005). Nous avons notamment démontré, en considérant que les valeurs du test HC2 sont semi-quantitatives, que les femmes ayant une charge virale supérieure à 100 pg/mL avaient un risque plus élevé de développer une lésion de type CIN2/3+ à 2 ans que les femmes avec une charge virale inférieure à 100 pg/mL (Dalstein *et al.*, 2003). Pour décrire l'évolution de la charge virale au cours de l'histoire naturelle, ces approches « globales » (PCR consensus ou test HPV) présentent une limitation liée au fait qu'elles prennent en compte tous les génotypes présents dans l'échantillon. Or, on sait que la persistance de l'infection et le risque de développement de lésions sont dépendantes du génotype, et il paraît donc inapproprié d'étudier l'évolution de la charge virale de plusieurs génotypes simultanément. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la charge virale spécifique de type et en particulier d'HPV16 puisque ce génotype est celui associé au plus haut risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses.

Pour étudier la charge virale spécifique d'HPV16, des techniques semi-quantitatives (PCR/MY11 suivie d'une hybridation avec des sondes spécifiques de type (Kovacic *et al.*, 2006), PCR suivie d'un test ELISA (Zerbini *et al.*, 2001), PCR nichée (Tsai *et al.*, 2005)) et des techniques quantitatives (PCR en temps-réel utilisant la technologie SYBR Green (Cricca *et al.*, 2007, Payan *et al.*, 2007), PCR temps-réel utilisant la technologie Taqman (Andersson *et al.*, 2005, Carcopino *et al.*, 2006, Gravitt *et al.*, 2007, Josefsson *et al.*, 2000, Kulmala *et al.*, 2006, Lindh *et al.*, 2007, Rousseau *et al.*, 2007, Swan *et al.*, 1999, Tabora *et al.*, 2008, Ylitalo *et al.*, 2000) ont été utilisées. Une comparaison directe des résultats entre les différentes études est

difficile car il n'existe pas de procédures standardisées ni dans l'échantillonnage, ni dans les méthodes de quantification, ni dans l'expression des résultats. Au niveau de l'expression des résultats, certains auteurs ont normalisé la charge virale en fonction du nombre de cellules (Andersson *et al.*, 2005, Lindh *et al.*, 2007, Zerbini *et al.*, 2001) ou de la quantité d'ADN (Cricca *et al.*, 2007, Kulmala *et al.*, 2006, Rousseau *et al.*, 2007, Swan *et al.*, 1999) contenues dans l'échantillon testé, alors que d'autres n'ont pas normalisé les résultats (Gravitt *et al.*, 2007, Kovacic *et al.*, 2006, Payan *et al.*, 2007, Tsai *et al.*, 2005).

Pour mesurer quantitativement la charge virale dans nos études, nous avons utilisé la PCR temps-réel, qui permet de monitorer la cinétique de PCR grâce à des molécules fluorescentes et ainsi de mesurer la quantité d'amplicons pendant la phase exponentielle de la réaction. Dans cette phase, la quantité d'amplicons est proportionnelle à la quantité d'ADN cible de départ. Nous avons montré que la charge virale en HPV16 augmentait avec le grade de la lésion (Saunier *et al.*, 2008) et l'analyse statistique a révélé que les différences étaient significatives entre les échantillons de cytologie normale et les LSIL et entre les LSIL et les HSIL. Ces données sont en accord avec les données disponibles dans la littérature et suggèrent que plus le grade de la lésion est élevé plus la charge virale est importante (Carcopino *et al.*, 2006, Cricca *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2008, Lindh *et al.*, 2007, Tabora *et al.*, 2008).

Les plus hautes charges virales ont été obtenues sur les échantillons issus de cancers invasifs. Cette observation est en contradiction avec les résultats obtenus par Cricca *et al.* qui montrent que les plus faibles charges virales sont obtenues dans les cancers invasifs (Cricca *et al.*, 2007). Ces différences peuvent s'expliquer par la nature des échantillons (ce point sera abordé plus loin) et par le nombre d'échantillons analysés (11 frottis évocateurs de carcinomes dans l'étude de Cricca contre 22 dans notre étude). De façon intéressante, nous avons observés que les cancers analysés pouvaient être répartis en 2 groupes : des cancers avec une forte charge virale (plus de 50 000 eg/10³ cellules) et une intégration inférieure à 95% (groupe 1) et des cancers de plus faibles charges virales et intégration supérieure à 95% (groupe 2). Ainsi il est possible d'émettre l'hypothèse suivante : dans les cancers du groupe 1, le génome est peu intégré et la réplication virale peut se poursuivre (d'où de fortes charges virales). Sous l'influence de la protéine E2 produite par les formes épisomales, l'expression de E6 et E7 est modérée. Les cancers de ce groupe pourraient être à un stade précoce, et peu agressifs. Dans les cancers du groupe 2, le génome viral est fortement intégré. Par conséquent il n'y a plus de réplication virale (et donc une charge virale faible) et les protéines E6 et E7 sont fortement exprimées. Les cancers de ce groupe pourraient être à un stade plus tardif et plus agressif que les cancers du groupe 1. Il est difficilement envisageable, pour des raisons éthiques, de vérifier expérimentalement cette hypothèse chez des patientes atteintes de cancer. En revanche, nous pouvons proposer d'évaluer la charge virale et l'intégration comme marqueurs potentiels de la réponse au traitement, de la récurrence et de la survie de ces cancers.

La charge virale et l'intégration semblent donc être 2 facteurs interdépendants. De plus, nous pouvons imaginer que plus la charge virale est forte, plus la probabilité d'intégration est grande. Ainsi, l'étude conjointe de ces 2 facteurs dans l'histoire naturelle de l'infection est primordiale.

L'intégration augmente avec le grade de la lésion :

L'intégration est décrite comme l'un des facteurs clefs de la carcinogenèse induite par les HPV. En effet, elle implique la délétion d'une partie du gène E2 et ainsi la perte de contrôle de l'expression des oncoprotéines E6 et E7. Ainsi, pour mieux comprendre l'histoire naturelle de l'infection, il est indispensable de connaître le statut physique du génome viral au cours de l'histoire naturelle des lésions : génome sous forme intégrée seule, sous forme épisomale seule ou sous forme mixte.

Pour étudier le statut physique du génome d'HPV16, nous avons choisi d'utiliser une PCR temps-réel ciblant le gène E2. En effet, la partie 3' de la POL E2, qui contient la région charnière (nt 3352 à 3535) et le domaine de liaison à l'ADN, est la plus souvent délétée lors de l'intégration de l'ADN d'HPV16 dans le génome de la cellule hôte (Arias-Pulido *et al.*, 2006, Cricca *et al.*, 2009, Kalantari *et al.*, 1998). Ainsi, si un échantillon présente un ratio E2/E6 égal à zéro c'est qu'il abrite des formes intégrées seules et s'il présente un ratio égal à 1 c'est qu'il abrite des formes épisomales seules. La PCR temps-réel ciblant E6 a été validée dans de précédents travaux, pour sa sensibilité, sa spécificité et son efficacité (Pretet *et al.*, 2004). La PCR ciblant E2 a, quant à elle, été optimisée et validée durant notre thèse. Nous avons tout d'abord testé la sensibilité de la PCR en réalisant des mélanges de plasmide HPV16 dans de l'ADN de cellules HaCaT pour mimer l'encombrement stérique lié à la présence d'ADN génomique dans les échantillons cervico-utérins. La sensibilité ainsi évaluée est égale à 10 copies/100 000 cellules. De plus, cette PCR est spécifique d'HPV16 et nous n'avons pas observé de réactions croisées ni sur des échantillons abritant les génotypes phylogénétiquement proches d'HPV16 (31, 33, 52, 56), ni sur des échantillons abritant HPV18. La reproductibilité de la PCR a aussi été évaluée en comparant les valeurs de Cp des gammes d'étalonnage obtenues sur 17 expériences indépendantes. Les coefficients de variation des Cp obtenus à chaque point de gamme étaient inférieurs à 4%, ce qui montre que la technique est très reproductible. L'efficacité de la réaction de PCR était similaire sur nos échantillons et sur nos gammes, ce qui constitue un pré-requis pour une quantification absolue.

Une fois la PCR E2 optimisée et validée, nous avons évalué notre méthode en réalisant des mélanges de plasmides HPV16 (mimant des formes épisomales) et de l'ADN de cellules SiHa (mimant des formes intégrées) représentant des ratios E2/E6 de 0 à 1 (avec un incrément de 0,1). Ces mélanges ont ensuite été soumis aux PCR E2 et E6 et nous avons comparé les valeurs de ratios obtenus expérimentalement aux ratios théoriques. Une excellente corrélation a été obtenue ($r=0,959$, $p < 10^{-3}$) mais nous avons observé que

la variabilité des E2/E6 expérimentaux était plus importante pour des valeurs E2/E6 supérieures à 0,8. Ainsi, nous avons choisi de définir 3 classes d'échantillons selon les valeurs obtenues : (i) $E2/E6 = 0$ (représentant des formes intégrées seules), (ii) $0 < E2/E6 < 0,8$ (représentant des formes mixtes) et (iii) $E2/E6 > 0,8$ (représentant des formes épisomales seules).

Nous avons montré que l'intégration pouvait être un évènement précoce puisque 29% de nos échantillons de cytologie normale abritent des formes intégrées d'HPV16 associées à des épisomes. Une intégration « précoce » a aussi été observée par certains auteurs (Cricca *et al.*, 2007, Gallo *et al.*, 2003, Kulmala *et al.*, 2006, Lukaszuk *et al.*, 2003, Peitsaro *et al.*, 2002) mais n'a pas été observée dans 2 études (Hudelist *et al.*, 2004, Tonon *et al.*, 2001). Pour ces 2 cas, nous pouvons supposer que les auteurs n'ont pas utilisé des méthodes suffisamment sensibles pour détecter de faibles taux d'intégration (électrophorèse en gel 2D et PCR E2 classique). Nous avons observé que la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées (seules et/ou mixtes) augmentait avec le grade de la lésion, de 29% des échantillons de cytologie normale à 85% des lésions de haut grade. Ces données sont en accord avec celles disponibles dans la littérature mais il existe de grandes variations, en ce qui concerne la proportion d'échantillons abritant des formes intégrées, au sein de chaque catégorie d'échantillons (Andersson *et al.*, 2005, Briolat *et al.*, 2007, Cricca *et al.*, 2007, Fujii *et al.*, 1995, Kulmala *et al.*, 2006, Peitsaro *et al.*, 2002, Rousseau *et al.*, 2007, Tonon *et al.*, 2001). Par exemple, dans notre série, 44% des LSIL abritent des formes épisomales seules ; ces données sont proches des valeurs obtenues dans une autre étude française (33,3% des CIN1, (Briolat *et al.*, 2007)) mais plus élevées que celles obtenues par Kulmala *et al.* (15,4%) et plus basses que celles obtenues par Cricca *et al.* (72,2%), Tonon *et al.* (92%) et Hudelist *et al.* (100%). Ces variations sont sans doute liées à la diversité des techniques utilisées.

Dans notre étude, tout comme dans la littérature, nous avons observé que, quel que soit le grade de la lésion, la majorité des échantillons (67%) présentent des formes mixtes, ce qui indique que l'intégration est un phénomène fréquent lors d'infections à HPV16. Par conséquent, le statut physique n'est pas suffisamment discriminant pour identifier les lésions précancéreuses et cancéreuses, et nous avons souhaité déterminer pour chaque stade lésionnel, le ratio E2/E6 des échantillons. Nous avons observé que les ratios E2/E6 diminuaient avec le grade de la lésion, ce qui suggère que la proportion d'épisomes diminue au profit de formes intégrées dans les lésions de haut grade. Ces données sont cohérentes avec le modèle d'intégration proposé par Kadaja *et al.* (Kadaja *et al.*, 2007) dans lequel, sous l'influence des protéines E1 et E2 exprimées par les épisomes, une réplication en « peau d'oignon » et des processus de cassure/réparation de l'ADN double brin vont favoriser l'intégration du génome viral jusqu'à disparition des formes épisomales.

Toutefois, les valeurs de ratio doivent être interprétées avec précaution, pour des raisons liées à la technique de PCR utilisée et pour des raisons liées à la biologie des HPV. Au niveau technique, nous avons

observé lors de la validation de notre méthode, un manque de précision et de répétabilité pour la mesure de ratios supérieurs à 0,8. Ainsi, il est difficile de quantifier précisément les formes intégrées lorsqu'elles sont en présence d'une forte concentration de formes épisomales. Au niveau de la biologie des HPV, un certain nombre de paramètres peuvent induire une sous-estimation de l'intégration. En effet, même si l'intégration se fait souvent dans la POL E2 (Baker *et al.*, 1987, Cricca *et al.*, 2009, Kalantari *et al.*, 1998, Matsukura *et al.*, 1986), des délétions dans d'autres POL ont été décrites, notamment dans E1 (Luft *et al.*, 2001). De plus, une intégration en concatémères ou « tête à queue » a été décrite (Wagatsuma *et al.*, 1990), en particulier dans les cellules CaSki (Baker *et al.*, 1987, Meissner, 1999). Ainsi, certaines POL E2 sont intactes, même si le génome viral est sous forme intégrée. Dans les deux cas, l'intégration sera sous-estimée.

Afin d'évaluer la pertinence du ratio E2/E6 et de mieux décrire l'intégration, une étude visant à étudier les sites d'intégration des génomes viraux dans des échantillons cervico-utérins, a récemment été mise en place dans le cadre d'une collaboration entre le Canceropôle Grand-Est et le DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Dans cette étude, menée par le Pr. Elizabeth Schwarz, l'ADN extrait d'échantillons cervico-utérins est dans un premier temps amplifié par « whole genome amplification », l'échantillon est ensuite enrichi en séquences contenant HPV16 par une PCR spécifique, puis les amplicons obtenus sont pyroséquencés. Ainsi il est possible de déterminer le site de linéarisation du génome viral, et le ou les sites d'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Les ratios E2/E6 ayant été déterminés sur les mêmes échantillons, il sera alors possible de d'observer si les ratios concordent avec l'intégration des génomes viraux.

Enfin, si l'intégration est considérée comme un pré-requis pour la surexpression de E6 et E7, d'autres évènements moléculaires peuvent être à l'origine de cette surexpression. En effet, des mutations de la POL E2, entraînant l'incapacité de E2 à inhiber la transcription de E6 et E7, ont été décrites, notamment dans des variants Asiatique-Américain d'HPV16 (Casas *et al.*, 1999, Ordonez *et al.*, 2004). De plus, des auteurs ont observé des mutations dans une ou plusieurs séquences de liaison du facteur de transcription YY1 qui est impliqué dans la différenciation cellulaire, dans la prolifération mais aussi dans l'apoptose (Wang *et al.*, 2006). La LCR d'HPV16 contient au moins 3 sites de fixation pour ce facteur, et il a été démontré que des mutations dans ces sites favorisaient la transcription depuis le promoteur précoce p97 et donc la surexpression des oncoprotéines E6 et E7 (Dong *et al.*, 1994, Kozuka *et al.*, 2000, Tan *et al.*, 2003, Veress *et al.*, 2001). Ce mécanisme constitue une explication pertinente à l'absence de détection de génomes viraux sous forme intégrée dans certains cancers.

Par conséquent, l'intégration est un marqueur présentant des limitations pour le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses et c'est pour cette raison que nous avons mis en place au laboratoire une étude des transcrits E6/E7. En effet, l'expression des transcrits E6/E7 devrait permettre de mieux identifier

les femmes abritant des lésions prévalentes ou incidentes, puisque les oncoprotéines qui en dérivent, sont à la base de la carcinogenèse induite par les HPV. Pendant notre thèse, nous avons mis en place des techniques permettant la quantification en temps réel des transcrits E6 complets et E6*I et II pour HPV16 et HPV18. Ces techniques, qui ont été optimisées et validées, n'ont pas été décrites dans ce manuscrit mais des manipulations sont en cours au laboratoire pour déterminer s'il existe un lien entre : (i) l'expression des transcrits et le grade de la lésion, (ii) l'expression des transcrits et la charge virale et (iii) l'expression des transcrits et l'intégration.

La charge virale et l'intégration permettent d'identifier les femmes avec des lésions de haut grade :

Après avoir déterminé la charge virale et le ratio E2/E6 dans les échantillons de différents grades, nous avons tenté de définir une valeur seuil permettant d'identifier les femmes abritant des lésions prévalentes de type CIN2/3 par l'utilisation de courbe ROC (Receiver Operating Characteristics). Nous avons choisi de discriminer les échantillons de cytologie normale et les lésions de bas grade des lésions de haut grade. Les lésions de bas grade régissent dans 60% des cas. Par conséquent, même si les femmes avec de telles lésions doivent bénéficier d'une surveillance particulière, elles ne feront pas l'objet d'une prise en charge aussi importante que les femmes avec des lésions de haut grade. Par ailleurs, nous avons choisi d'exclure les échantillons ASC-US de notre analyse. En effet, les ASC-US sont des échantillons qui peuvent correspondre, histologiquement, à tous les états du col depuis le col strictement normal jusqu'au cancer invasif en passant par tous les degrés de néoplasie intraépithéliale cervicale (CIN1 ou condylome dans 20-54% des cas, CIN2 ou CIN3 dans 5-18% des cas et cancer invasif dans 0-4% des cas)(Boulanger & Sevestre, 2006).

Pour la charge virale, nous avons défini par l'analyse de la courbe ROC, qu'une valeur seuil de 22 000 copies d'HPV16 pour 1000 cellules permettait d'identifier les femmes abritant des lésions de haut grade avec une bonne spécificité (90% pour les HSIL et 83% pour les CIN2/3). Cette valeur est proche de celle obtenue par Cricca et al. (Cricca et al., 2007), avec 1,36 millions de copies d'HPV16 pour 300 ng d'ADN, soit approximativement 27 000 copies d'HPV16 pour 1000 cellules, avec une spécificité de 96%. En plus de permettre l'identification des lésions prévalentes, nous avons pu démontrer dans de précédents travaux que la mesure de la charge virale en HPV16 permettait d'identifier les lésions incidentes. Chez des femmes HPV16 positives (avec une cytologie normale ou des anomalies mineures), l'incidence cumulative de CIN2/3 à 18 mois était 3,5 fois supérieure chez les femmes ayant une charge virale supérieure à 200 copies pour 1000 cellules que chez les femmes ayant une charge virale plus faible (Monnier-Benoit et al., 2006).

Ainsi, il existe un rapport de 100 entre le seuil de charge virale permettant d'identifier les femmes avec des lésions prévalentes et le seuil au dessus duquel le risque de développement d'une CIN2/3 est

augmenté. Ce rapport paraît logique dans la mesure où nous avons montré que les femmes avec une charge virale augmentant entre 2 frottis de suivi avaient une incidence cumulative de CIN2/3 à 18 mois supérieure à celles ayant une charge virale stable ou qui diminue (Monnier-Benoit *et al.*, 2006). Ainsi, les femmes avec des lésions prévalentes de haut grade, sont nécessairement des femmes pour lesquelles la charge virale a augmenté (depuis une lésion de grade inférieur). Les femmes dont la charge virale est restée stable (ou a diminué) n'auront que peu de chance de présenter une HSIL.

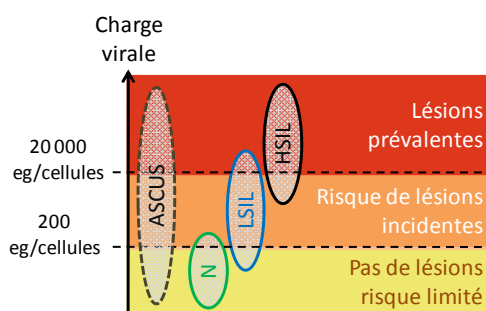


Figure 30 : Seuils de charge virale et risques de lésions prévalentes et incidentes.

En ce qui concerne l'intégration, l'analyse de la courbe ROC a montré qu'une valeur seuil de ratio E2/E6 égale à 0,52 permettait d'identifier les femmes ayant un frottis HSIL avec une spécificité de 78% et une sensibilité de 66%. Ce seuil correspondrait à une intégration d'environ 50%. Nous pouvons faire l'hypothèse qu'à partir de ce seuil, le taux de protéines E2 produite par les formes épisomales n'est plus suffisant pour limiter l'expression de E6/E7 depuis le promoteur p97 des formes intégrées et épisomale. Il y a alors surexpression de E6/E7 et ces 2 protéines vont exercer leur pouvoir oncogène et favoriser le développement de HSIL.

Sur le plan clinique, c'est l'analyse de la charge virale, en utilisant la valeur seuil de 22 copies/cellule, qui est la plus performante, en terme de sensibilité et de spécificité, pour identifier les femmes abritant des lésions de haut grade. De plus, la mesure du ratio E2/E6 étant sujette à des limitations techniques et biologiques, nous avons choisi de nous focaliser sur l'étude de la charge virale dans la suite de ce travail.

Les données de charge virale et d'intégration sont conditionnées par l'échantillonnage :

Les études relatives à la charge virale et l'intégration publiées sont basées sur des techniques et des modèles différents. Au niveau de l'échantillonnage certains auteurs ont utilisé des échantillons caractérisés cytologiquement ou histologiquement. Or, on sait qu'il existe des disparités entre le diagnostic cytologique et le diagnostic histologique, ce dernier étant considéré comme le gold standard (Tableau 10). Par exemple, un frottis LSIL correspond histologiquement à un col normal ou à une atypie dans 14% des cas, à une CIN1 dans 46%, à une CIN2/3 dans 40% et à un cancer invasif dans 1%. De même, un frottis HSIL correspond

histologiquement à un col normal ou une atypie dans 10%, à une CIN1 dans 18%, à une CIN2/3 dans 69% et à un cancer invasif dans 3% des cas (Yeoh & Chan, 1997).

Tableau 10 : Corrélation cytohistologique des lésions du col de l'utérus, adapté de Yeoh *et al.* (Yeoh & Chan, 1997)

Cytologie	Histologie				
	Négatif	Atypie	CIN1	CIN2/3	Cancer
ASC-US	9	45	29	15	2
LSIL	4	10	46	40	1
HSIL	8	2	18	69	3
Cancer	0	0	0	40	60

Compte-tenu des divergences existant entre la cytologie et l'histologie, une comparaison directe de résultats obtenus sur des échantillons caractérisés cytologiquement et sur des échantillons caractérisés histologiquement est difficile. Dans la mesure où le dépistage est réalisé à partir de frottis, il apparaît important de valider tout nouveau marqueur à partir de ce type de prélèvement. Toutefois, les frottis (cytologie liquide ou STM) sont composés d'un mélange complexe de cellules représentatives de l'état du col de l'utérus à un temps t : cellules épithéliales normales, cellules épithéliales pathologiques et cellules inflammatoires. Ainsi un frottis étiqueté HSIL peut contenir non seulement des cellules présentant des anomalies cyto-nucléaires caractéristiques de ce grade de lésion, mais aussi des cellules pathologiques correspondant à des lésions de moins haut grade ainsi que des cellules normales (Sherman *et al.*, 2003). Par conséquent, les résultats, aussi bien de charge virale que d'intégration, devraient prendre en compte ce phénomène et être interprétés avec précaution.

Afin de décrire l'histoire naturelle de l'infection avec moins de biais, nous proposons de décrire les facteurs viraux à l'échelle de cellules isolées, et non pas à partir d'un mélange de cellules. Pour cela, une étude sur cellules isolées a été récemment mise en place par E. Schwarz dans le cadre de notre collaboration entre le Canceropôle Grand Est et le DKFZ. Sur des frottis, une ou plusieurs cellules d'intérêt (HSIL par exemple) sont isolées par microdissection (Palm Microbeam LMPC), leur ADN est amplifié (GenomePlex WGA) et leur génome est analysé (génotypage pour le moment). Ce type d'étude nous permettra par la suite d'observer le génotype, la charge virale et l'intégration au niveau de cellules isolées caractéristiques d'anomalies cytologiques données. Ainsi nous pourrons répondre à un certain nombre de questions primordiales pour la compréhension de l'histoire naturelle de l'infection. Par exemple, lorsque plusieurs génotypes sont détectés dans un échantillon, nous pourrons déterminer s'il s'agit d'une multi-infection (plusieurs génotypes infectent des cellules différentes) ou d'une réelle co-infection (plusieurs génotypes sont présents dans une même cellule). Il sera aussi possible de déterminer si la charge virale et les ratios E2/E6 mesurés correspondent à un ensemble de cellules avec des taux différents ou s'ils

correspondent à un mélange de cellules avec des taux homogènes. Ainsi, ces données pourront donner des indications sur le caractère polyclonal ou monoclonal des anomalies cellulaires médiées par les HPV.

Les charges virales mesurées sur différents sites sont concordantes :

Dans le cadre d'un travail collaboratif avec Christine Clavel et Véronique Dalstein (laboratoire Pol Bouin à Reims), nous avons souhaité évaluer la concordance des valeurs de charge virale obtenues dans notre laboratoire et dans le laboratoire Pol Bouin. En effet, dans l'hypothèse de mettre en place la mesure de la charge virale dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus, il sera primordial que nos mesures soient répétées dans différents sites.

Nous avons tout d'abord comparé les charges virales obtenues à partir de 20 échantillons cervico-utérins et les résultats, bien qu'encourageants, ont montré une variabilité relativement importante. Dans ce travail préliminaire, chaque laboratoire a utilisé ses propres séquences et concentration d'amorces et de sonde, réactifs, thermocycleurs, et gamme d'étalonnage. Ainsi, pour améliorer notre concordance, nous avons choisi de mettre en commun les éléments qu'il était possible d'homogénéiser : les séquences et concentration d'amorces et de sondes et les gammes d'étalonnage. Afin de ne pas avoir de biais apporté par la qualité des prélèvements, nous avons centralisé l'échantillonnage et l'extraction des ADN dans un seul laboratoire.

Avant d'étudier la variabilité de la mesure de charge virale entre les 2 laboratoires, des tests de répétabilité intra-manipulateur et inter-manipulateurs ont été réalisés sur chaque site. L'analyse des graphiques de Bland-Altman ont montré que les PCR E6 et albumine étaient concordantes, quel que soit le site. Toutefois, les moyennes des différences de mesures, bien que proches de 0, n'étaient pas toujours significativement égale à 0.

Nous avons ensuite analysé la variabilité inter-laboratoire. L'analyse des courbes de Bland-Altman a montré une bonne concordance inter-laboratoire, non seulement pour les PCR E6 et albumine mais aussi sur la charge virale obtenue. De façon intéressante, la moyenne des différences de mesure de la charge virale n'était pas significativement différente de 0, alors que les moyennes des différences de mesures pour les PCR E6 et Albumine, l'étaient. Nous pouvons alors proposer que la normalisation de la charge virale soit à l'origine d'une concordance plus importante. Nous avons montré que la technique était robuste et transférable d'un laboratoire à l'autre dans la mesure où un soin particulier est apporté au choix des amorces et à la réalisation des gammes d'étalonnage. En particulier, les dilutions de standard utilisées pour réaliser les gammes d'étalonnage est un facteur clef de la reproductibilité des réactions de PCR. Ainsi, dans la perspective de mener des études multicentriques de charge virale, il sera important de réaliser des protocoles détaillés de la conception des gammes (séquence du plasmide, méthode de quantification et de

calcul de la concentration du plasmide, réalisation des dilutions, diluant et stockage) voire même de centraliser leur fabrication dans un centre avant distribution vers les autres centres. A présent, il est nécessaire de réaliser des études similaires quant à l'échantillonnage et l'extraction de l'ADN.

Mise en place d'une PCR temps-réel duplex :

En prenant en compte le fait que la charge virale serait un marqueur potentiel des lésions prévalentes et incidentes, et que les HPV16 et 18 sont responsables de 80% des cancers du col de l'utérus en France (Pretet *et al.*, 2008a), il nous a semblé important d'avoir des outils permettant d'évaluer la charge virale de ces 2 génotypes en particulier. Nous avons souhaité développer une technique de PCR duplex temps-réel permettant la quantification simultanée des types 16 et 18, afin de ne pas avoir à réaliser une PCR pour chaque génotype, et ainsi gagner en flux d'analyse. Ceci permettra en outre, de réaliser des économies d'échantillons, de temps et de consommables.

La mise en place d'une telle PCR représente un défi technique. En effet, le fait de combiner 2 PCR peut entraîner une diminution de la sensibilité et/ou de la spécificité de l'une des PCR et il n'est pas rare d'assister à l'amplification préférentielle de l'une des cibles (Polz & Cavanaugh, 1998, Walsh *et al.*, 1992). L'amplification préférentielle d'une des cibles serait due aux propriétés de la cible et des séquences adjacentes. Ces propriétés incluent : (i) des différences de GC% induisant la dénaturation plus rapide de l'une des cible; (ii) la présence de structures secondaire empêchant l'accès des amorces à la séquence cible et (iii) le nombre de copies du gène au sein du génome étudié (Elnifro *et al.*, 2000).

De nombreuses PCR multiplexes, classiques ou en temps-réel, ont été décrites pour la détection des HPV (Brestovac *et al.*, 2005, Clavel *et al.*, 1998c, Gheit *et al.*, 2007, Godfroid *et al.*, 1998, Jeney *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2006, Lazarus & Caruana, 1996, Mitrani-Rosenbaum *et al.*, 1994, Nazarenko *et al.*, 2008, Nishiwaki *et al.*, 2008, Pizzighella *et al.*, 1995, Schmitt *et al.*, 2006, Schmitt *et al.*, 2008, Soler *et al.*, 1991, Zheng *et al.*, 1995). En revanche, peu de PCR multiplexes permettant la quantification des HPV ciblés ont été proposées (Carcopino *et al.*, 2006, Moberg *et al.*, 2003, Tucker *et al.*, 2001).

La PCR ciblant E6 d'HPV16 étant déjà disponible au laboratoire, nous avons tout d'abord optimisé et validé la PCR ciblant E6 d'HPV18. Pour la PCR ciblant E6 d'HPV16, le fluorophore donneur, FAM, a une longueur d'onde d'émission de 518 nm. Ainsi pour la PCR ciblant E6 d'HPV18 nous avons dans un premier temps choisi un fluorophore donneur émettant à 548 nm, JOE.

Après optimisation des concentrations d'amorces et de sonde pour chaque PCR, nous avons validé la méthode sur des mélanges de plasmides HPV16 et HPV18. Sur chaque mélange/échantillon ont été réalisées : une PCR simplex ciblant E6 d'HPV16, une PCR simplex ciblant E6 d'HPV18, et la PCR duplex ; puis nous avons comparé, pour chaque gène ciblé, la valeur obtenue en simplex à la valeur obtenue en duplex.

Or, en combinant les PCR E6 HPV16 et E6 HPV18 avec cette combinaison de fluorophore (FAM/JOE), nous avons observé une variabilité importante entre les résultats obtenus en PCR simple et ceux obtenus en PCR duplex. En effet, sur des mélanges de plasmides HPV16 et HPV18, lorsque la quantité d'ADN d'HPV18 (eg) était supérieure à celle d'HPV16, le nombre egHPV16 était largement surestimé en PCR duplex. Plusieurs hypothèses pouvaient expliquer ce phénomène :

- Une réaction croisée. Cette hypothèse ne peut pas être retenue car il n'y a pas d'identité de séquence entre les amorces ciblant E6 d'HPV16 et le génome d'HPV18 ni entre les amorces ciblant E6 d'HPV18 et le génome d'HPV16. De plus, les surestimations obtenues en PCR duplex sont beaucoup moins prononcées par rapport aux PCR simple HPV16 et HPV18.
- Une erreur dans la préparation des mélanges de plasmides ou une contamination. Cette hypothèse est aussi à rejeter car, comme pour l'hypothèse précédente, les surestimations observées en duplex n'ont pas été observées avec les PCR simple HPV16 et HPV18.
- Un chevauchement des spectres d'émissions de fluorescence des sondes utilisées pour les PCR ciblant E6 d'HPV16 et E6 d'HPV18. En effet, bien que les sondes utilisées émettent un maximum de fluorescence à deux longueurs d'onde distinctes (518nm pour la sonde FAM-HPV16 et 548nm pour la sonde JOE-HPV18), on peut imaginer que lorsque la concentration d'HPV18 (eg) est élevée la fluorescence émise par VIC « déborde » dans le canal dédié à la lecture du fluorophore FAM.

C'est cette dernière hypothèse que nous avons retenue et nous avons choisi de remplacer le fluorophore JOE par le fluorophore VIC qui a une longueur d'onde d'émission plus lointaine, de 555 nm. Ce changement de fluorophore nous a permis de limiter ces phénomènes de surestimation. En effet, sur les mélanges de plasmides, nous avons observé une très bonne corrélation entre les valeurs théoriques, les valeurs obtenues en PCR simple et les valeurs obtenues en PCR duplex. Toutefois, lorsqu'un des deux ADN cible est en excès de plus de 1000 fois, la concentration expérimentale de l'ADN présent en plus faible quantité peut être sous-estimée (parfois jusqu'à une extinction complète du signal) ou surestimée (jusqu'à 400% pour HPV16 et 200% pour HPV18). Des résultats similaires ont été observés par la technique multiplex développée par Moberg *et al.* qui n'est plus quantitative lorsque le ratio HPV16/HPV18 est supérieur à 1:100. Ceci peut s'expliquer par des phénomènes de compétitions entre les 2 PCR. Lorsqu'on applique la PCR duplex à des échantillons cervico-utérins, la variabilité entre les résultats obtenus en duplex et en simple est faible, aussi bien dans les échantillons mono-infectés (à HPV16 ou à HPV18) que dans les échantillons co-infectés par HPV16 et HPV18. Quelques limitations ont tout de même été observées : dans les échantillons mono-infectés, la PCR duplex est moins sensible que les PCR simple car elle ne permet pas de détecter des charges virales inférieures à 2 équivalents génomes par μL dans les échantillons mono-infectés et les charges virales inférieures à 10 eg par μL dans les échantillons co-infectés. On peut se

questionner sur l'utilité d'être en mesure de détecter de si faibles charges virales. En effet, dans les 2 cas, les limites de détection obtenues sur les échantillons cervico-utérins se situent en dessous des limites de sensibilité des PCR 16 et 18 simplex. De plus, ces valeurs sont bien inférieures aux valeurs seuil d'identification des lésions de haut grade (prévalente ou incidente) que nous avons fixé. Lors de la validation sur les mélanges de plasmides, nous avons montré que lorsque l'un des génotypes était en large excès, la charge virale du génotype le moins représenté pouvait être surestimée ou sous-estimée. Cette observation n'a pas été retrouvée sur les échantillons cervico-utérins. Toutefois, des rapports de concentrations entre les 2 génotypes supérieurs à 1000 n'ont été observés que dans 2 échantillons. Dans de tels cas, on peut se demander quelle est la signification clinique du génotype le moins représenté et seules des études prospectives pourront apporter des réponses.

Malgré ces limitations, la PCR duplex 16/18 permet une quantification simultanée des charges virales en HPV16 et 18 sur une large gamme de concentration. Cette technique devra être validée sur de grandes séries d'échantillons cervico-utérins mais semble être un outil prometteur dans la prise en charge des femmes HPV-HR positives. A ce titre, cette technique de PCR est en cours de transfert au laboratoire de biologie cellulaire du CHU Jean Minjot (Besançon). Cette technique permettra le génotypage 16/18 de prélèvements de femmes HPV-HR positives issues d'une cohorte hospitalière.

Conclusion :

A cours de ce travail, nous avons confirmé l'importance des génotypes 16 et 18 en France en terme de fréquence de détection (dans les lésions de bas grade) mais aussi en terme d'association avec des lésions de bas grade à risque d'évoluer vers des lésions de haut grade et des cancers. Nous avons aussi observé que la charge virale et l'intégration augmentaient avec le grade de la lésion. Ceci suggère que ces facteurs ont probablement un impact sur l'histoire naturelle de l'infection. Par conséquent, il est envisageable d'utiliser la charge virale et/ou l'intégration pour identifier des femmes avec des lésions du col de l'utérus prévalentes voire de prédire l'évolution des lésions. Néanmoins, ces paramètres devront être validés sur de plus grandes séries et dans des études prospectives afin d'évaluer leur pertinence mais aussi pour définir au mieux leurs indications. A priori, la charge virale ou l'intégration, utilisées avec des seuils cliniques présentant de bonnes spécificités, constitueraient des tests adaptés à un dépistage secondaire faisant suite à un test sensible comme le test HPV, dans le but de sélectionner les femmes les plus à risque.

Le transfert de telles techniques moléculaires vers une pratique de routine qui nécessite un flux d'analyse décent est envisageable. En effet, nous avons montré que le même test de PCR en temps réel (détermination de la charge virale HPV16), réalisé sur deux sites différents, permettait d'obtenir des valeurs de charges virales concordantes. En outre, nous avons pointé le fait que les gammes de standards utilisées devaient être parfaitement homogénéisées entre les deux sites. Par ailleurs, le développement de PCR temps-réel duplex qui assure non seulement le génotypage mais aussi la détermination de charges virales nous permet d'envisager d'augmenter le flux de résultats que l'on peut obtenir à partir d'un prélèvement.

Enfin, il est indispensable de résoudre la problématique de l'échantillonnage. En effet, la nature des échantillons à utiliser pour mesurer la charge virale devra être homogénéisée (cytologie vs histologie, échantillons dédiés ou non). En particulier il sera important de définir si les paramètres viraux obtenus à partir de frottis, qui consistent en un mélange complexe de cellules, sont pertinents et reflètent bien l'histoire naturelle de l'infection telle qu'elle pourrait être décrite à partir de cellules isolées parfaitement caractérisées sur le plan morphologique.

PARTIE 4 : Bibliographie

- Abulafia, O., Pezzullo, J. C. & Sherer, D. M. (2003). Performance of ThinPrep liquid-based cervical cytology in comparison with conventionally prepared Papanicolaou smears: a quantitative survey. *Gynecol Oncol* 90, 137-44.
- 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.
- Andersson-Ellstrom, A., Dillner, J., Hagmar, B., Schiller, J. & Forssman, L. (1994). No serological evidence for non-sexual spread of HPV16. *Lancet* 344, 1435.
- 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., Safari, H., Mints, M., Lewensohn-Fuchs, I., Gyllensten, U. & Johansson, B. (2005). Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer* 92, 2195-200.
- Arbyn, M., Bergeron, C., Klinkhamer, P., Martin-Hirsch, P., Siebers, A. G. & Bulten, J. (2008). Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 111, 167-77.
- 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.
- Assoian, R. K. (1997). Control of the G1 phase cyclin-dependent kinases by mitogenic growth factors and the extracellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 165-70.
- Assoian, R. K. & Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9, 93-8.
- Aubin, F., Humbey, O., Guerrini, J. S., Mougin, C. & Laurent, R. (2003). [Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus]. *Ann Dermatol Venereol* 130, 1131-8.
- Aubin, F., Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Saunier, M., Carcopino, X., Jaroud, F., Pradat, P., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mougin, C. & Riethmuller, D. (2008). Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: a Large French National Study (EDITH IV). *Clin Infect Dis* 47, 610-5.
- Ault, K. A. (2007). Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials. *Lancet* 369, 1861-8.
- 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.
- Barbosa, M. S., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 63, 1404-7.
- Baseman, J. G. & Koutsky, L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S16-24.
- Bauer, H. M., Ting, Y., Greer, C. E., Chambers, J. C., Tashiro, C. J., Chimera, J., Reingold, A. & Manos, M. M. (1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *Jama* 265, 472-7.
- Bechtold, V., Beard, P. & Raj, K. (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* 77, 2021-8.
- Belak, S. (2007). Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine* 25, 5444-52.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A. V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A. M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le Stang, N., Maynadie, M., Monnereau, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schvartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L. & Velten, M. (2008). Cancer incidence

- and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159-175.
- Ben-Ze'ev, A. (1997). Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 9, 99-108.
- Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P. & Bagchi, S. (1997). Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ* 8, 1277-86.
- Bernstein, S. J., Sanchez-Ramos, L. & Ndubisi, B. (2001). Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: a metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol* 185, 308-17.
- Berrebi, A., Badiou, W. & Duclusaud, A. (2008). [Frequency, persistence and recurrence of HPV lesions of the uterine cervix in HIV-positive women.]. *Gynecol Obstet Fertil* 36, 521-4.
- 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.
- Bibbo, M., Dytch, H. E., Alenghat, E., Bartels, P. H. & Wied, G. L. (1989). DNA ploidy profiles as prognostic indicators in CIN lesions. *Am J Clin Pathol* 92, 261-5.
- Borbely, A. A., Murvai, M., Konya, J., Beck, Z., Gergely, L., Li, F. & Veress, G. (2006). Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *J Gen Virol* 87, 287-94.
- 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. & 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. & de Sanjose, S. (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers* 23, 213-27.
- 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.
- Bottley, G., Watherston, O. G., Hiew, Y. L., Norrild, B., Cook, G. P. & Blair, G. E. (2008). High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene* 27, 1794-9.
- Boulanger, J. C. & Sevestre, H. (2006). [ASCUS: an update]. *Gynecol Obstet Fertil* 34, 44-8.
- Bousarghin, L., Combata-Rojas, A. L., Touze, A., El Mehdaoui, S., Sizaret, P. Y., Bravo, M. M. & Coursaget, P. (2002). Detection of neutralizing antibodies against human papillomaviruses (HPV) by inhibition of gene transfer mediated by HPV pseudovirions. *J Clin Microbiol* 40, 926-32.
- 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.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. & Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4.
- Brentjens, M. H., Yeung-Yue, K. A., Lee, P. C. & Tyring, 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.
- Briolat, J., Dalstein, V., Saunier, M., Joseph, K., Caudroy, S., Pretet, J. L., Birembaut, P. & Clavel, C. (2007). HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN. *Int J Cancer* 121, 2198-204.

- Brown, M. R., Noffsinger, A., First, M. R., Penn, I. & Husseinzadeh, N. (2000). HPV subtype analysis in lower genital tract neoplasms of female renal transplant recipients. *Gynecol Oncol* 79, 220-4.
- Bulkmans, N. W., Berkhof, J., Bulk, S., Bleeker, M. C., van Kemenade, F. J., Rozendaal, L., Snijders, P. J. & Meijer, C. J. (2007). High-risk HPV type-specific clearance rates in cervical screening. *Br J Cancer* 96, 1419-24.
- Bulten, J., Poddighe, P. J., Robben, J. C., Gemmink, J. H., de Wilde, P. C. & Hanselaar, A. G. (1998). Interphase cytogenetic analysis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 152, 495-503.
- 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.
- Cam, H. & Dynlacht, B. D. (2003). Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 3, 311-6.
- Campo, M. S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89, 249-61.
- Carcopino, X., Henry, M., Benmoura, D., Fallabregues, A. S., Richet, H., Boubli, L. & Tamalet, C. (2006). Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol* 78, 1131-40.
- 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.
- Casas, L., Galvan, S. C., Ordonez, R. M., Lopez, N., Guido, M. & Berumen, J. (1999). Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 83, 449-55.
- 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. & Munoz, N. (2003). Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 20-8.
- Castle, P. E., Dockter, J., Giachetti, C., Garcia, F. A., McCormick, M. K., Mitchell, A. L., Holladay, E. B. & Kolk, D. P. (2007a). A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res* 13, 2599-605.
- Castle, P. E., Sideri, M., Jeronimo, J., Solomon, D. & Schiffman, M. (2007b). Risk assessment to guide the prevention of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 197, 356 e1-6.
- Castle, P. E., Solomon, D., Schiffman, M. & Wheeler, C. M. (2005). 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.
- Castle, P. E., Wacholder, S., Lorincz, A. T., Scott, D. R., Sherman, M. E., Glass, A. G., Rush, B. B., Schussler, J. E. & Schiffman, M. (2002). A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 94, 1406-14.
- Cates, W., Jr. (1999). Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis* 26, S2-7.
- Chakrabarti, O. & Krishna, S. (2003). Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci* 28, 337-48.
- 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.
- Cheung, J. L., Cheung, T. H., Tang, J. W. & Chan, P. K. (2008). Integration event and infection load of human papillomavirus type 52 from low-grade cervical lesion to invasive cancer. *J Clin Microbiol*.
- 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.
- Clavel, C., Rihet, S., Masure, M., Chypre, C., Boulanger, J. C., Quereux, C. & Birembaut, P. (1998c). DNA-EIA to detect high and low risk HPV genotypes in cervical lesions with E6/E7 primer mediated multiplex PCR. *J Clin Pathol* 51, 38-43.
- Clemens, K. E., Brent, R., Gyuris, J. & Munger, K. (1995). Dimerization of the human papillomavirus E7 oncoprotein in vivo. *Virology* 214, 289-93.
- Clifford, G., Franceschi, S., Diaz, M., Munoz, N. & Villa, L. L. (2006). 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., 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., Aguado, T. & Franceschi, S. (2003). Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 89, 101-5.
- Cole, S. T. & Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol* 193, 599-608.
- Collins, S. I., Mazloomzadeh, S., Winter, H., Rollason, T. P., Blomfield, P., Young, L. S. & Woodman, C. B. (2005). Proximity of first intercourse to menarche and the risk of human papillomavirus infection: a longitudinal study. *Int J Cancer* 114, 498-500.
- 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.
- Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T. & Wang, T. S. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274, 2696-705.
- Cooper, K., Herrington, C. S., Graham, A. K., Evans, M. F. & McGee, J. O. (1991a). In situ evidence for HPV 16, 18, 33 integration in cervical squamous cell cancer in Britain and South Africa. *J Clin Pathol* 44, 406-9.
- Cooper, K., Herrington, C. S., Graham, A. K., Evans, M. F. & McGee, J. O. (1991b). 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.
- Cox, J. T. (2006). Human papillomavirus testing in primary cervical screening and abnormal Papanicolaou management. *Obstet Gynecol Surv* 61, S15-25.
- Cricca, M., Morselli-Labate, A. M., Venturoli, S., Ambretti, S., Gentilomi, G. A., Gallinella, G., Costa, S., Musiani, M. & Zerbini, M. (2007). Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol* 106, 549-57.
- Cricca, M., Venturoli, S., Leo, E., Costa, S., Musiani, M. & Zerbini, M. (2009). Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. *J Virol Methods*.
- Critchlow, C. W., Hawes, S. E., Kuypers, J. M., Goldbaum, G. M., Holmes, K. K., Surawicz, C. M. & Kiviat, N. B. (1998). Effect of HIV infection on the natural history of anal human papillomavirus infection. *Aids* 12, 1177-84.
- Crook, T., Tidy, J. A. & Vousden, K. H. (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67, 547-56.

- 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.
- Cuschieri, K. S., Whitley, M. J. & Cubie, H. A. (2004). Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence--implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol* 73, 65-70.
- Cuzick, J., Szarewski, A., Cubie, H., Hulman, G., Kitchener, H., Luesley, D., McGoogan, E., Menon, U., Terry, G., Edwards, R., Brooks, C., Desai, M., Gie, C., Ho, L., Jacobs, I., Pickles, C. & Sasieni, P. (2003). Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet* 362, 1871-6.
- 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.
- Czegledy, J., Evander, M., Hernadi, Z., Gergely, L. & Wadell, G. (1994). Human papillomavirus type 18 E6* mRNA in primary tumors and pelvic lymph nodes of Hungarian patients with squamous cervical cancer. *Int J Cancer* 56, 182-6.
- Czegledy, J., Iosif, C., Hansson, B. G., Evander, M., Gergely, L. & Wadell, G. (1995). Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer? *Int J Cancer* 64, 211-5.
- 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.
- 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. (1992). 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.
- de Boer, M. A., Jordanova, E. S., Kenter, G. G., Peters, A. A., Corver, W. E., Trimbos, J. B. & Fleuren, G. J. (2007). High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. *Clin Cancer Res* 13, 132-8.
- De Geest, K., Turyk, M. E., Hosken, M. I., Hudson, J. B., Laimins, L. A. & Wilbanks, G. D. (1993). Growth and differentiation of human papillomavirus type 31b positive human cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 49, 303-10.
- De la Cruz-Hernandez, E., Garcia-Carranca, A., Mohar-Betancourt, A., Duenas-Gonzalez, A., Contreras-Paredes, A., Perez-Cardenas, E., Herrera-Goepfert, R. & Lizano-Soberon, M. (2005). Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol* 86, 2459-68.
- 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 Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., Clifford, G., Bruni, L., Munoz, N. & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 7, 453-9.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- Degenhardt, Y. Y. & Silverstein, S. (2001). Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol* 75, 11791-802.
- Dehn, D., Torkko, K. C. & Shroyer, K. R. (2007). Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 111, 1-14.
- Dell, G., Wilkinson, K. W., Tranter, R., Parish, J., Leo Brady, R. & Gaston, K. (2003). Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol* 334, 979-91.

- Dong, X. P., Stubenrauch, F., Beyer-Finkler, E. & Pfister, H. (1994). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* 58, 803-8.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S7-15.
- Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M. & Crawford, L. (1990). Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 178, 254-62.
- Du, M., Fan, X., Hong, E. & Chen, J. J. (2002). Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 962-9.
- Duensing, S., Duensing, A., Flores, E. R., Do, A., Lambert, P. F. & Munger, K. (2001). Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol* 75, 7712-6.
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P. & Munger, K. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10002-7.
- Duensing, S. & Munger, K. (2001). Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta* 1471, M81-8.
- Duensing, S. & Munger, K. (2002). Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 21, 6241-8.
- 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., Nielson, C. M., Stone, K. M., Markowitz, L. E. & Giuliano, A. R. (2006). Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis* 194, 1044-57.
- 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.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-7.
- Elfegren, 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.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 13, 559-70.
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. & McMillan, N. A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71, 2449-56.
- Fahey, M. T., Irwig, L. & Macaskill, P. (1995). Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol* 141, 680-9.
- Falcinelli, C., van Belkum, A., Schrauwen, L., Seldenrijk, K. & Quint, W. G. (1993). Absence of human papillomavirus type 16 E6 transcripts in HPV 16-infected, cytologically normal cervical scrapings. *J Med Virol* 40, 261-5.
- Fehrmann, F., Klumpp, D. J. & Laimins, L. A. (2003). Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J Virol* 77, 2819-31.
- Ferber, M. J., Montoya, D. P., Yu, C., Aderca, I., McGee, A., Thorland, E. C., Nagorney, D. M., Gostout, B. S., Burgart, L. J., Boix, L., Bruix, J., McMahan, B. J., Cheung, T. H., Chung, T. K., Wong, Y. F., Smith, D. I. & Roberts, L. R. (2003a). Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene* 22, 3813-20.
- 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. (2003b). Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 22, 7233-42.
- Filippova, M., Johnson, M. M., Bautista, M., Filippov, V., Fodor, N., Tungteakkhun, S. S., Williams, K. & Duerksen-Hughes, P. J. (2007). The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* 81, 4116-29.
- Filippova, M., Song, H., Connolly, J. L., Dermody, T. S. & Duerksen-Hughes, P. J. (2002). The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis

- factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 21730-9.
- 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, Y. N., Bishai, D. M., Shah, K. V., Lazcano-Ponce, E., Lorincz, A., Hernandez, M., Ferris, D. & Salmeron, J. (2008). Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud Publica Mex* 50, 49-58.
- 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., Lindqvist, P., Haadem, K., Czegledy, J. & Hansson, B. G. (1997). HPV 16 DNA and mRNA in cervical brush samples quantified by PCR and microwell hybridization. *J Virol Methods* 69, 209-22.
- 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.
- 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., 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.
- Fraser, C., Tomassini, J. E., Xi, L., Golm, G., Watson, M., Giuliano, A. R., Barr, E. & Ault, K. A. (2007). Modeling the long-term antibody response of a human papillomavirus (HPV) virus-like particle (VLP) type 16 prophylactic vaccine. *Vaccine* 25, 4324-33.
- Frega, A., Stentella, P., Villani, C., Di Ruzza, D., Marcomin, G. L., Rota, F., Boninfante, M. & Pachi, A. (1999). Correlation between cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus male infections: a longitudinal study. *Eur J Gynaecol Oncol* 20, 228-30.
- Fujii, T., Masumoto, N., Saito, M., Hirao, N., Niimi, S., Mukai, M., Ono, A., Hayashi, S., Kubushiro, K., Sakai, E., Tsukazaki, K. & Nozawa, S. (2005). Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14, 103-8.
- Fujii, T., Tsukazaki, K., Kiguchi, K., Kubushiro, K., Yajima, M. & Nozawa, S. (1995). The major E6/E7 transcript of HPV-16 in exfoliated cells from cervical neoplasia patients. *Gynecol Oncol* 58, 210-5.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B. & Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11, 2090-100.
- Gallo, G., Bibbo, M., Bagella, L., Zamparelli, A., Sanseverino, F., Giovagnoli, M. R., Vecchione, A. & Giordano, A. (2003). Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 56, 532-6.
- Garnett, T. O. & Duerksen-Hughes, P. J. (2006). Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol* 151, 2321-35.
- Garnett, T. O., Filippova, M. & Duerksen-Hughes, P. J. (2006). Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 1915-26.
- Genther, S. M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C. & Lambert, P. F. (2003). Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 77, 2832-42.
- Gheit, T., Billoud, G., de Koning, M. N., Gemignani, F., Forslund, O., Sylla, B. S., Vaccarella, S., Franceschi, S., Landi, S., Quint, W. G., Canzian, F. & Tommasino, M. (2007). Development of a sensitive and specific multiplex PCR method combined with DNA microarray primer extension to detect Betapapillomavirus types. *J Clin Microbiol* 45, 2537-44.
- Gheit, T., Landi, S., Gemignani, F., Snijders, P. J., Vaccarella, S., Franceschi, S., Canzian, F. & Tommasino, M. (2006). Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol* 44, 2025-31.
- 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.

- Gjoen, K., Olsen, A. O., Magnus, P., Grinde, B., Sauer, T. & Orstavik, I. (1996). Prevalence of human papillomavirus in cervical scrapes, as analyzed by PCR, in a population-based sample of women with and without cervical dysplasia. *Apmis* 104, 68-74.
- Godfroid, E., Heinderyckx, M., Mansy, F., Fayt, I., Noel, J. C., Thiry, L. & Bollen, A. (1998). Detection and identification of human papilloma viral DNA, types 16, 18, and 33, by a combination of polymerase chain reaction and a colorimetric solid phase capture hybridisation assay. *J Virol Methods* 75, 69-81.
- 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.
- Gonzalez, S. L., Strelau, M., He, X., Basile, J. R. & Munger, K. (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75, 7583-91.
- Graham, D. A. & Herrington, C. S. (2000). HPV-16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN 3 lesions and invasive squamous cell carcinomas of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol Pathol* 53, 201-6.
- 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., Kovacic, M. B., Herrero, R., Schiffman, M., Bratti, C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Sherman, M. E., Wacholder, S., Rodriguez, A. C. & Burk, R. D. (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer* 121, 2787-93.
- 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. & Manos, M. M. (1992). Polymerase chain reaction-based methods for the detection of human papillomavirus DNA. *IARC Sci Publ*, 121-33.
- 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.
- Greenberg, R. A., O'Hagan, R. C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S. R., Adams, R. R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G. B. & DePinho, R. A. (1999). Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18, 1219-26.
- 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.
- Guccione, E., Pim, D. & Banks, L. (2004). HPV-18 E6*1 modulates HPV-18 full-length E6 functions in a cell cycle dependent manner. *Int J Cancer* 110, 928-33.
- Guo, M., Lin, C. Y., Gong, Y., Cogdell, D. E., Zhang, W., Lin, E. & Sneige, N. (2008). Human papillomavirus genotyping for the eight oncogenic types can improve specificity of HPV testing in women with mildly abnormal Pap results. *Mod Pathol*.
- Guo, M., Sneige, N., Silva, E. G., Jan, Y. J., Cogdell, D. E., Lin, E., Luthra, R. & Zhang, W. (2007). 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* 20, 256-66.
- Hafner, N., Driesch, C., Gajda, M., Jansen, L., Kirchmayr, R., Runnebaum, I. B. & Durst, M. (2007). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene*.
- Hafner, N., Driesch, C., Gajda, M., Jansen, L., Kirchmayr, R., Runnebaum, I. B. & Durst, M. (2008). Integration of the HPV16 genome does not invariably result in high levels of viral oncogene transcripts. *Oncogene* 27, 1610-7.
- Harper, D. M. (2008). Prophylactic human papillomavirus vaccines to prevent cervical cancer: review of the Phase II and II trials. *Therapy* 5, 313-24.
- 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.
- Hasan, U. A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L., Iftner, T., Sideri, M., Stubenrauch, F. & Tommasino, M. (2007). TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 178, 3186-97.
- Helt, A. M. & Galloway, D. A. (2001). Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol* 75, 6737-47.
- 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.
- Herrero, R., Castle, P. E., Schiffman, M., Bratti, M. C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M., Sherman, M. E., Wacholder, S., Chen, S., Rodriguez, A. C. & Burk, R. D. (2005). Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis* 191, 1796-807.
- Herrero, R., Hildesheim, A., Bratti, C., Sherman, M. E., Hutchinson, M., Morales, J., Balmaceda, I., Greenberg, M. D., Alfaro, M., Burk, R. D., Wacholder, S., Plummer, M. & Schiffman, M. (2000). Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst* 92, 464-74.
- Herrington, C. S., Evans, M. F., Gray, W. & McGee, J. O. (1995). 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.
- 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. & Wang, S. S. (2002). Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 89, 229-40.
- Hill, A. B. (1965). The Environment and Disease: Association or Causation? *Proc R Soc Med* 58, 295-300.
- Hinnebusch, A. G. (1997). Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272, 21661-4.
- Ho, C. M., Cheng, W. F., Chu, T. Y., Chen, C. A., Chuang, M. H., Chang, S. F. & Hsieh, C. Y. (2006). Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *Br J Cancer* 95, 1384-9.
- Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J. & Burk, R. D. (1998). 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.
- 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.
- Hoory, T., Monie, A., Gravitt, P. & Wu, T. C. (2008). Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc* 107, 198-217.
- Hopman, A. H., Smedts, F., Dignef, W., Ummelen, M., Sonke, G., Mravunac, M., Vooijs, G. P., Speel, E. J. & Ramaekers, F. C. (2004). Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV

- 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *J Pathol* 202, 23-33.
- Hopman, E. H., Voorhorst, F. J., Kenemans, P., Meyer, C. J. & Helmerhorst, T. J. (1995). Observer agreement on interpreting colposcopic images of CIN. *Gynecol Oncol* 58, 206-9.
- Hsu, E. M., McNicol, P. J., Guijon, F. B. & Paraskevas, M. (1993). Quantification of HPV-16 E6-E7 transcription in cervical intraepithelial neoplasia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 55, 397-401.
- 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.
- Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Jin, J., Harper, J. W. & Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol* 81, 9737-47.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. (1993). 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.
- Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J. I., Caldecott, K. W. & Stubenrauch, F. (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *Embo J* 21, 4741-8.
- Iftner, T. & Villa, L. L. (2003). Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 80-8.
- 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., Walboomers, J. M., Snijders, P. J., Voorhorst, F. J., Verheijen, R. H., Fransen-Daalmeijer, N. & Meijer, C. J. (2000). Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer* 87, 221-7.
- Jeney, C., Takacs, T., Sebe, A. & Schaff, Z. (2007). Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by the L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridization. *J Virol Methods* 140, 32-42.
- 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.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69, 2989-97.
- Jeon, S. & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1654-8.
- Jiang, H. L., Zhu, H. H., Zhou, L. F., Chen, F. & Chen, Z. (2006). Genotyping of human papillomavirus in cervical lesions by L1 consensus PCR and the Luminex xMAP system. *J Med Microbiol* 55, 715-20.
- Jing, M., Bohl, J., Brimer, N., Kinter, M. & Vande Pol, S. B. (2007). Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 81, 2231-9.
- Johnson, M. A., Blomfield, P. I., Bevan, I. S., Woodman, C. B. & Young, L. S. (1990). Analysis of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcription in cervical carcinomas and normal cervical epithelium using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 71 (Pt 7), 1473-9.
- 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.
- Jones, H. W., Jr., Katayama, K. P., Staffl, A. & Davis, H. J. (1967). Chromosomes of cervical atypia, carcinoma in situ, and epidermoid carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 30, 790-805.
- 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.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E. & Ustav, M. (2007). Genomic instability of the host

- cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *Embo J* 26, 2180-91.
- 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.
- Kalantari, M., Karlsen, F., Kristensen, G., Holm, R., Hagmar, B. & Johansson, B. (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17, 146-53.
- Kessis, T. D., Connolly, D. C., Hedrick, L. & Cho, K. R. (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* 13, 427-31.
- Khan, M. J., Castle, P. E., Lorincz, A. T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D. R., Rush, B. B., Glass, A. G. & Schiffman, M. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 97, 1072-9.
- Kitchener, H., Walker, P., Nelson, L., Hadwin, R., Patnick, J., Anthony, G., Sargent, A., Wood, J., Moore, C. & Cruickshank, M. (2008). HPV testing as an adjunct to cytology in the follow up of women treated for cervical intraepithelial neoplasia. *Bjog*.
- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T. & Ishibashi, M. (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11612-6.
- 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., van den Brule, A. J., Paull, G., Svare, E. I., Sherman, M. E., Thomsen, B. L., Sunsum, M., Bock, J. E., Poll, P. A. & Meijer, C. J. (2002). 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* 325, 572.
- Klaes, R., Woerner, S. M., Ridder, R., Wentzensen, N., Duerst, M., Schneider, A., Lotz, B., Melsheimer, P. & von Knebel Doeberitz, M. (1999). Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59, 6132-6.
- 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.
- Klimov, E., Vinokourova, S., Mojsjak, E., Rakhmanaliev, E., Kobseva, V., Laimins, L., Kisseljov, F. & Sulimova, G. (2002). Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. *BMC Cancer* 2, 24.
- Koliopoulos, G., Arbyn, M., Martin-Hirsch, P., Kyrgiou, M., Prendiville, W. & Paraskevidis, 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.
- Koshiol, J., Lindsay, L., Pimenta, J. M., Poole, C., Jenkins, D. & Smith, J. S. (2008). Persistent Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol*.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 102, 3-8.
- 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.
- Kovacic, M. B., Castle, P. E., Herrero, R., Schiffman, M., Sherman, M. E., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Hutchinson, M. L., Bratti, M. C., Hildesheim, A., Morales, J., Alfaro, M. & Burk, R. D. (2006). Relationships of human papillomavirus type, qualitative viral load, and age with cytologic abnormality. *Cancer Res* 66, 10112-9.
- Kozak, M. (1987). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol Cell Biol* 7, 3438-45.
- Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299, 1-34.
- Kozak, M. (2003). Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene* 318, 1-23.
- Kozuka, T., Aoki, Y., Nakagawa, K., Ohtomo, K., Yoshikawa, H., Matsumoto, K., Yoshiike, K. & Kanda,

- T. (2000). Enhancer-promoter activity of human papillomavirus type 16 long control regions isolated from cell lines SiHa and CaSki and cervical cancer biopsies. *Jpn J Cancer Res* 91, 271-9.
- 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.
- Kruppel, U., Muller-Schiffmann, A., Baldus, S. E., Smola-Hess, S. & Steger, G. (2008). E2 and the co-activator p300 can cooperate in activation of the human papillomavirus type 16 early promoter. *Virology*.
- Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K. & Kanda, T. (1998). Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 258-62.
- 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.
- Kumar, A., Zhao, Y., Meng, G., Zeng, M., Srinivasan, S., Delmolino, L. M., Gao, Q., Dimri, G., Weber, G. F., Wazer, D. E., Band, H. & Band, V. (2002). Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22, 5801-12.
- Lamarcq, L., Deeds, J., Ginzinger, D., Perry, J., Padmanabha, S. & Smith-McCune, K. (2002). Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening. *J Mol Diagn* 4, 97-102.
- Lanham, S., Herbert, A. & Watt, P. (2001). HPV detection and measurement of HPV-16, telomerase, and survivin transcripts in colposcopy clinic patients. *J Clin Pathol* 54, 304-8.
- Latorre, I. J., Roh, M. H., Frese, K. K., Weiss, R. S., Margolis, B. & Javier, R. T. (2005). Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci* 118, 4283-93.
- Lazarus, P. & Caruana, S. (1996). Typing of common human papilloma virus strains by multiplex PCR. *Anal Biochem* 243, 198-201.
- Le Buanec, H., D'Anna, R., Lachgar, A., Zagury, J. F., Bernard, J., Ittele, D., d'Alessio, P., Hallez, S., Giannouli, C., Burny, A., Bizzini, B., Gallo, R. C. & Zagury, D. (1999a). HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomed Pharmacother* 53, 424-31.
- Le Buanec, H., Lachgar, A., D'Anna, R., Zagury, J. F., Bizzini, B., Bernard, J., Ittele, D., Hallez, S., Giannouli, C., Burny, A. & Zagury, D. (1999b). Induction of cellular immunosuppression by the human papillomavirus type 16 E7 oncogenic protein. *Biomed Pharmacother* 53, 323-8.
- Lechner, M. S. & Laimins, L. A. (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 68, 4262-73.
- Lee, S. S., Weiss, R. S. & Javier, R. T. (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6670-5.
- 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.
- Lepej, S. Z., Grgic, I., Poljak, M., Iscic-Bes, J., Skerk, V., Vince, D. B., Dusek, D. & Vince, A. (2007). Detection of human papillomavirus genotypes 16/18/45 by hybrid capture hybridisation genotyping probe in clinical specimens: the first report. *J Clin Virol* 40, 171-2.
- Li, W., Wang, W., Si, M., Han, L., Gao, Q., Luo, A., Li, Y., Lu, Y., Wang, S. & Ma, D. (2008). The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Liaw, K. L., Glass, A. G., Manos, M. M., Greer, C. E., Scott, D. R., Sherman, M., Burk, R. D., Kurman, R. J., Wacholder, S., Rush, B. B., Cadell, D. M., Lawler, P., Tabor, D. & Schiffman, M. (1999). Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 91, 954-60.
- 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.
- Lie, A. K. & Kristensen, G. (2008). Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 8, 405-15.
- Limaye, A., Connor, A. J., Huang, X. & Luff, R. (2003). Comparative analysis of conventional Papanicolaou tests and a fluid-based thin-layer method. *Arch Pathol Lab Med* 127, 200-4.
- Lindh, M., Gorander, S., Andersson, E., Horal, P., Mattsby-Balzer, I. & Ryd, W. (2007). Real-time Taqman PCR targeting 14 human papilloma virus types. *J Clin Virol* 40, 321-4.
- Liu, X., Roberts, J., Dakic, A., Zhang, Y. & Schlegel, R. (2008). HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*.
- Loo, Y. M. & Melendy, T. (2004). Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78, 1605-15.
- 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.
- 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.
- Mahmud, S. M., Robinson, K., Richardson, H., Tellier, P. P., Ferenczy, A. S., Roger, M., Coutlee, F. & Franco, E. L. (2007). HLA polymorphisms and cervical human Papillomavirus infection in a cohort of Montreal University students. *J Infect Dis* 196, 82-90.
- Manavi, M., Hudelist, G., Fink-Retter, A., Gschwantler-Kaulich, D., Pischinger, K. & Czerwenka, K. (2008). Human papillomavirus DNA integration and messenger RNA transcription in cervical low- and high-risk squamous intraepithelial lesions in Austrian women. *Int J Gynecol Cancer* 18, 285-94.
- Mannik, A., Runkorg, K., Jaanson, N., Ustav, M. & Ustav, E. (2002). Induction of the bovine papillomavirus origin "onion skin"-type DNA replication at high E1 protein concentrations in vivo. *J Virol* 76, 5835-45.
- Mantovani, F. & Banks, L. (1999). Inhibition of E6 induced degradation of p53 is not sufficient for stabilization of p53 protein in cervical tumour derived cell lines. *Oncogene* 18, 3309-15.
- Mantovani, F. & Banks, L. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874-87.
- Masson, M., Hindelang, C., Sibling, A. P., Schwalbach, G., Trave, G. & Weiss, E. (2003). Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. *J Gen Virol* 84, 2099-104.
- Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. & Romanos, M. A. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 72, 7407-19.
- Matsukura, T., Kanda, T., Furuno, A., Yoshikawa, H., Kawana, T. & Yoshiike, K. (1986). Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J Virol* 58, 979-82.
- Mayrand, M. H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., Walter, S. D., Hanley, J., Ferenczy, A., Ratnam, S., Coutlee, F. & Franco, E. L. (2007). Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med* 357, 1579-88.
- McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R. & Laimins, L. A. (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* 67, 3142-50.
- McIntyre, M. C., Ruesch, M. N. & Laimins, L. A. (1996). Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 215, 73-82.
- 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.
- McNicol, P., Guijon, F., Wayne, S., Hidajat, R. & Paraskevas, M. (1995). Expression of human papillomavirus type 16 E6-E7 open reading frame varies quantitatively in biopsy tissue from different

- grades of cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Microbiol* 33, 1169-73.
- Medeiros, L. R., Ethur, A. B., Hilgert, J. B., Zanini, R. R., Berwanger, O., Bozzetti, M. C. & Mylius, L. C. (2005). Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad Saude Publica* 21, 1006-15.
- Meissner, J. D. (1999). Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 80 (Pt 7), 1725-33.
- 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.
- Melchers, W. J., Bakkers, J. M., Wang, J., de Wilde, P. C., Boonstra, H., Quint, W. G. & Hanselaar, A. G. (1999). Short fragment polymerase chain reaction reverse hybridization line probe assay to detect and genotype a broad spectrum of human papillomavirus types. Clinical evaluation and follow-up. *Am J Pathol* 155, 1473-8.
- 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.
- Melsheimer, P., Vinokurova, S., Wentzensen, N., Bastert, G. & von Knebel Doeberitz, M. (2004). DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin Cancer Res* 10, 3059-63.
- Menzo, S., Ciavattini, A., Bagnarelli, P., Marinelli, K., Sisti, S. & Clementi, M. (2008). Molecular epidemiology and pathogenic potential of underdiagnosed human papillomavirus types. *BMC Microbiol* 8, 112.
- Mitrani-Rosenbaum, S., Tsvieli, R., Lavie, O., Boldes, R., Anteby, E., Shimonovitch, S., Lazarovitch, T. & Friedmann, A. (1994). Simultaneous detection of three common sexually transmitted agents by polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 171, 784-90.
- 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. (2006). [Cervical cancer prevention: the impact of HPV vaccination]. *Gynecol Obstet Fertil* 34, 189-201.
- Monsonogo, J. (2007). [Prevention of cervical cancer: screening, progress and perspectives]. *Presse Med* 36, 92-111.
- Moodley, M., Moodley, J., Chetty, R. & Herrington, C. S. (2003). The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int J Gynecol Cancer* 13, 103-10.
- 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.

- Moscufo, N., Sverdrup, F., Breiding, D. E. & Androphy, E. J. (1999). Two distinct regions of the BPV1 E1 replication protein interact with the activation domain of E2. *Virus Res* 65, 141-54.
- 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., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. & Schlegel, R. (1989). 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.
- 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., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J. S., Shah, K. V., Meijer, C. J. & Bosch, F. X. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359, 1093-101.
- Nakagawa, S., Yoshikawa, H., Yasugi, T., Kimura, M., Kawana, K., Matsumoto, K., Yamada, M., Onda, T. & Taketani, Y. (2000). Ubiquitous presence of E6 and E7 transcripts in human papillomavirus-positive cervical carcinomas regardless of its type. *J Med Virol* 62, 251-8.
- 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.
- Naucler, P., Ryd, W., Tornberg, S., Strand, A., Wadell, G., Elfgrén, K., Radberg, T., Strander, B., Forslund, O., Hansson, B. G., Rylander, E. & Dillner, J. (2007a). Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med* 357, 1589-97.
- Naucler, P., Ryd, W., Tornberg, S., Strand, A., Wadell, G., Hansson, B. G., Rylander, E. & Dillner, J. (2007b). HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: a population-based prospective study. *Br J Cancer* 97, 129-32.
- Nazarenko, I., Kobayashi, L., Giles, J., Fishman, C., Chen, G. & Lorincz, A. (2008). A novel method of HPV genotyping using Hybrid Capture((R)) sample preparation method combined with GP5+/6+ PCR and multiplex detection on Luminex((R)) XMAP((R)). *J Virol Methods*.
- 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. (2002). Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 277, 23958-64.
- Nguyen, C. L. & Munger, K. (2008). Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology*.
- Nishikawa, A., Shimada, M. & Fukushima, M. (1991). [Analysis of human papillomavirus type 16 E6/E7 mRNA in cervical cancers and precancerous lesions by means of the polymerase chain reaction with reverse transcriptase reaction]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 43, 1660-6.
- Nishiwaki, M., Yamamoto, T., Tone, S., Murai, T., Ohkawara, T., Matsunami, T., Koizumi, M., Takagi, Y., Yamaguchi, J., Kondo, N., Nishihira, J., Horikawa, T. & Yoshiki, T. (2008). Genotyping of human papillomaviruses by a novel one-step typing method with multiplex PCR and clinical applications. *J Clin Microbiol* 46, 1161-8.
- Norton, P. A. & Hynes, R. O. (1990). In vitro splicing of fibronectin pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res* 18, 4089-97.
- Oh, S. T., Kyo, S. & Laimins, L. A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol* 75, 5559-66.
- Olsson, S. E., Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Malm, C., Iversen, O. E., Høye, J., Steinwall, M., Riis-Johannessen, G., Andersson-Ellstrom, A., Elfgrén, K., von Krogh, G., Lehtinen, M., Paavonen, J., Tamms, G. M., Giacoletti, K., Lupinacci, L., Esser, M. T., Vuocolo, S. C., Saah, A. J. & Barr, E. (2007). Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine* 25, 4931-9.
- Ordóñez, R. M., Espinosa, A. M., Sanchez-Gonzalez, D. J., Armendariz-Borunda, J. & Berumen, J. (2004).

- Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 85, 1433-44.
- Orth, G. & Favre, M. (1985). Human papillomaviruses. Biochemical and biologic properties. *Clin Dermatol* 3, 27-42.
- Ostor, A. G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 12, 186-92.
- Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmeron, J., Wheeler, C. M., Chow, S. N., Apter, D. L., Kitchener, H. C., Castellsague, X., de Carvalho, N. S., Skinner, S. R., Harper, D. M., Hedrick, J. A., Jaisamrarn, U., Limson, G. A., Dionne, M., Quint, W., Spiessens, B., Peeters, P., Struyf, F., Wieting, S. L., Lehtinen, M. O. & Dubin, G. (2007). Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 369, 2161-70.
- 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. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2, 533-43.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Patel, D., Huang, S. M., Baglia, L. A. & McCance, D. J. (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J* 18, 5061-72.
- Payan, C., Ducancelle, A., Aboubaker, M. H., Caer, J., Tapia, M., Chauvin, A., Peyronnet, D., Le Hen, E., Arab, Z., Legrand, M. C., Tran, A., Postec, E., Tourmen, F., Avenel, M., Malbois, C., De Brux, M. A., Descamps, P. & Lunel, F. (2007). Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. *J Clin Microbiol* 45, 897-901.
- Pecorelli, S., Favalli, G., Zigliani, L. & Odicino, F. (2003). Cancer in women. *Int J Gynaecol Obstet* 82, 369-79.
- Peh, W. L., Brandsma, J. L., Christensen, N. D., Cladel, N. M., Wu, X. & Doorbar, J. (2004). The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol* 78, 2142-51.
- Peitsaro, P., Johansson, B. & Syrjanen, 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.
- Pett, M. & Coleman, N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212, 356-67.
- Pim, D., Massimi, P. & Banks, L. (1997). Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene* 15, 257-64.
- Pizzighella, S., Pisoni, G., Bevilacqua, F., Vaona, A. & Palu, G. (1995). Simultaneous polymerase chain reaction detection and restriction typing for the diagnosis of human genital papillomavirus infection. *J Virol Methods* 55, 245-56.
- Plummer, M., Herrero, R., Franceschi, S., Meijer, C. J., Snijders, P., Bosch, F. X., de Sanjose, S. & Munoz, N. (2003). Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multi-centric case-control study. *Cancer Causes Control* 14, 805-14.
- Polz, M. F. & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64, 3724-30.
- 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., Mougin, C. & Riethmuller, D. (2008a). Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* 122, 428-32.
- Pretet, J. L., Jacquard, A. C., Carcopino, X., Monnier-Benoit, S., Averous, G., Soubeyrand, B., Leocmach, Y., Mougin, C. & Riethmuller, D. (2008b). Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer* 122, 424-7.
- 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.
- 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.
- Reagan, J. W. & Hamonic, M. J. (1956). Dysplasia of the uterine cervix. *Ann N Y Acad Sci* 63, 1236-44.
- Reid, R., Crum, C. P., Herschman, B. R., Fu, Y. S., Braun, L., Shah, K. V., Agronow, S. J. & Stanhope, C. R. (1984). Genital warts and cervical cancer. III. Subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. *Cancer* 53, 943-53.
- 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.
- Reuter, S., Bartelmann, M., Vogt, M., Geisen, C., Napierski, I., Kahn, T., Delius, H., Lichter, P., Weitz, S., Korn, B. & Schwarz, E. (1998). APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *Embo J* 17, 215-22.
- Rey, O., Baluda, M. A. & Park, N. H. (1999a). Differential gene expression in neoplastic and human papillomavirus-immortalized oral keratinocytes. *Oncogene* 18, 827-31.
- Rey, O., Lee, S., Baluda, M. A., Swee, J., Ackerson, B., Chiu, R. & Park, N. H. (2000a). The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 interacts with F-actin in vitro and in vivo. *Virology* 268, 372-81.
- Rey, O., Lee, S. & Park, N. H. (1999b). Impaired nucleotide excision repair in UV-irradiated human oral keratinocytes immortalized with type 16 human papillomavirus genome. *Oncogene* 18, 6997-7001.
- Rey, O., Lee, S. & Park, N. H. (2000b). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein represses transcription of human fibronectin. *J Virol* 74, 4912-8.
- 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. (1973). Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 8, 301-28.
- Richart, R. M. & Barron, B. A. (1969). A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 105, 386-93.
- Riethmuller, D., Gabelle, C., Ramanah, R., Sautiere, J. L., Pretet, J. L., Schaal, J. P., Kantelip, B., Mougin, C. & Maillet, R. (2008). [Importance of human papillomavirus (HPV) screening in the follow-up after CIN2-3 treatment]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 37, 329-37.
- Riethmuller, D., Gay, C., Bertrand, X., Bettinger, D., Schaal, J. P., Carbillet, J. P., Lassabe, C., Arveux, P., Seilles, E. & Mougin, 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., Schaal, J. P. & Mougin, C. (2002). [Epidemiology and natural history of genital infection by human papillomavirus]. *Gynecol Obstet Fertil* 30, 139-46.
- Rihet, S., Lorenzato, M. & Clavel, C. (1996). Oncogenic human papillomaviruses and ploidy in cervical lesions. *J Clin Pathol* 49, 892-6.

- Rombaldi, R. L., Serafini, E. P., Mandelli, J., Zimmermann, E. & Losquiavo, K. P. (2008). Transplacental transmission of Human Papillomavirus. *Virology* 5, 106.
- Ronco, G., Segnan, N., Giorgi-Rossi, P., Zappa, M., Casadei, G. P., Carozzi, F., Dalla Palma, P., Del Mistro, A., Folicaldi, S., Gillio-Tos, A., Nardo, G., Naldoni, C., Schincaglia, P., Zorzi, M., Confortini, M. & Cuzick, J. (2006). Human papillomavirus testing and liquid-based cytology: results at recruitment from the new technologies for cervical cancer randomized controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 98, 765-74.
- Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. & Howley, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12, 2061-72.
- Rose, B. R., Thompson, C. H., Jiang, X. M., Tattersall, M. H., Elliott, P. M., Dalrymple, C. & Cossart, Y. E. (1994). Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 transcripts in histologically cancer-free pelvic lymph nodes of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 52, 212-7.
- Rosini, S., Zappacosta, R., Di Bonaventura, G., Caraceni, D., Pilla, D., Di Girolamo, G., Esposito, A., Orsini, T., Setta, S., Vizzino, M., Piccolomini, M. & Piccolomini, R. (2007). Management and triage of women with human papillomavirus infection in follow-up for low-grade cervical disease: association of HPV-DNA and RNA-based methods. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20, 341-7.
- 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. N., Costes, V., Konate, I., Nagot, N., Foulongne, V., Ouedraogo, A., Van de Perre, P., Mayaud, P. & Segondy, M. (2007). Viral load and genomic integration of HPV 16 in cervical samples from HIV-1-infected and uninfected women in Burkina Faso. *J Med Virol* 79, 766-70.
- Ruesch, M. N. & Laimins, L. A. (1998). Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology* 250, 19-29.
- Rutu, M. P., Kulmala, S. M., Peitsaro, P. & Syrjanen, S. M. (2008). The performance of the HPV16 real-time PCR integration assay. *Clin Biochem* 41, 423-8.
- 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.
- Sarafi, T. R. & McBride, A. A. (1995). Domains of the BPV-1 E1 replication protein required for origin-specific DNA binding and interaction with the E2 transactivator. *Virology* 211, 385-96.
- Sathish, N., Abraham, P., Peedicayil, A., Sridharan, G., John, S. & Chandy, G. (2004). Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia. *Mol Diagn* 8, 57-64.
- Saunier, M., Monnier-Benoit, S., Mauny, F., Dalstein, V., Briolat, J., Riethmuller, D., Kantelip, B., Schwarz, E., Mouglin, C. & Pretet, J. L. (2008). HPV16 DNA load and physical state allow the identification of HPV16 infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol*.
- Sawaya, G. F. & Grimes, D. A. (1999). New technologies in cervical cytology screening: a word of caution. *Obstet Gynecol* 94, 307-10.
- Schaeffer, A. J., Nguyen, M., Liem, A., Lee, D., Montagna, C., Lambert, P. F., Ried, T. & Difilippantonio, M. J. (2004). E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice. *Cancer Res* 64, 538-46.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M. & Howley, P. M. (1994). Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8797-801.
- Scheurer, M. E., Tortolero-Luna, G., Guillaud, M., Follen, M., Chen, Z., Dillon, L. M. & Adler-Storthz, K. (2005). Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 e7 messenger RNA levels with degree of cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1948-52.
- 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. & Brinton, L. A. (1995). The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76, 1888-901.
- Schiller, J. T., Castellsague, X., Villa, L. L. & Hildesheim, A. (2008). An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26 Suppl 10, K53-61.
- 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. (2003). Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 95, 1336-43.
- Schliwa, M. & Potter, M. (1986). Relationship between the organization of actin bundles and vinculin plaques. *Cell Tissue Res* 246, 211-8.
- Schmitt, M., Bravo, I. G., Snijders, P. J., Gissmann, L., Pawlita, M. & Waterboer, T. (2006). Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 44, 504-12.
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T. & Pawlita, M. (2008). Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46, 1050-9.
- Schneider-Gadicke, A. & Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *Embo J* 5, 2285-92.
- Schneider, A., Hoyer, H., Lotz, B., Leistrizta, S., Kuhne-Heid, R., Nindl, I., Muller, B., Haerting, J. & Durst, M. (2000). Screening for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer by testing for high-risk HPV, routine cytology or colposcopy. *Int J Cancer* 89, 529-34.
- Schwartz, S. (2008). HPV-16 RNA processing. *Front Biosci* 13, 5880-91.
- 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.
- Selinka, H. C., Giroglou, T. & Sapp, M. (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 299, 279-287.
- Sellors, J. W., Nieminen, P., Vesterinen, E. & Paavonen, J. (1990). Observer variability in the scoring of colpophotographs. *Obstet Gynecol* 76, 1006-8.
- Shafti-Keramat, 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, L. & Alloul, N. (1992). Human papillomavirus type 16 expresses a variety of alternatively spliced mRNAs putatively encoding the E2 protein. *Virology* 191, 953-9.
- Sherman, L., Alloul, N., Golan, I., Durst, M. & Baram, A. (1992). Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* 50, 356-64.
- 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.
- Sherman, M. E., Wang, S. S., Wheeler, C. M., Rich, L., Gravitt, P. E., Tarone, R. & Schiffman, M. (2003). Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 1038-44.
- 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., Tanzawa, H., Matsunaga, T. & Simizu, B. (1991). Quantitative detection of spliced E6-E7 transcripts of human papillomavirus type 16 in cervical premalignant lesions. *Virology* 184, 795-8.
- Shirasawa, H., Tomita, Y., Kubota, K., Kasai, T., Sekiya, S., Takamizawa, H. & Simizu, B. (1988). Transcriptional differences of the human papillomavirus type 16 genome between precancerous lesions and invasive carcinomas. *J Virol* 62, 1022-7.
- Sichero, L., Franco, E. L. & Villa, L. L. (2005). Different P105 promoter activities among natural variants of human papillomavirus type 18. *J Infect Dis* 191, 739-42.
- Smith, J. S., Green, J., Berrington de Gonzalez, A., Appleby, P., Peto, J., Plummer, M., Franceschi, S. & Beral, V. (2003). Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* 361, 1159-67.
- Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R. & Clifford, G. M. (2007). Human

- papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer* 121, 621-32.
- Smotkin, D., Prokoph, H. & Wettstein, F. O. (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* 63, 1441-7.
- Smotkin, D. & Wettstein, F. O. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4680-4.
- 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., Schrijnemakers, H. F., Snow, G., Meijer, C. J. & Walboomers, J. M. (1990). The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71 (Pt 1), 173-81.
- Socie, G., Scieux, C., Gluckman, E., Soussi, T., Clavel, C., Saulnier, P., Birembault, P., Bosq, J., Morinet, F. & Janin, A. (1998). Squamous cell carcinomas after allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia: further evidence of a multistep process. *Transplantation* 66, 667-70.
- Soeda, E., Ferran, M. C., Baker, C. C. & McBride, A. A. (2006). Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology* 351, 29-41.
- 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.
- Sotlar, K., Selinka, H. C., Menton, M., Kandolf, R. & Bultmann, B. (1998). Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol Oncol* 69, 114-21.
- Sotlar, K., Stubner, A., Diemer, D., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R. & Bultmann, B. (2004). Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 74, 107-16.
- Spanos, W. C., Hoover, A., Harris, G. F., Wu, S., Strand, G. L., Anderson, M. E., Klingelutz, A. J., Hendriks, W., Bossler, A. D. & Lee, J. H. (2008). The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol* 82, 2493-500.
- Spink, K. M. & Laimins, L. A. (2005). Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol* 79, 4918-26.
- Srivenugopal, K. S. & Ali-Osman, F. (2002). The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene* 21, 5940-5.
- Stacey, S. N., Jordan, D., Snijders, P. J., Mackett, M., Walboomers, J. M. & Arrand, J. R. (1995). Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *J Virol* 69, 7023-31.
- Stacey, S. N., Jordan, D., Williamson, A. J., Brown, M., Coote, J. H. & Arrand, J. R. (2000). Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol* 74, 7284-97.
- Steger, G. & Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 71, 50-8.
- Steinbeck, R. G. (1997). Atypical mitoses in lesions of the oral mucosa: a new interpretation of their impact upon tumorigenesis. *Oral Oncol* 33, 110-8.
- 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.
- Stoppler, M. C., Ching, K., Stoppler, H., Clancy, K., Schlegel, R. & Icenogle, J. (1996). Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70, 6987-93.
- Storrs, C. H. & Silverstein, S. J. (2007). PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human

- papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol* 81, 4080-90.
- 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.
- 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.
- Tabora, N., Ferrera, A., Bakkers, J. M., Massuger, L. F. & Melchers, W. J. (2008). High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *Am J Trop Med Hyg* 78, 843-6.
- Takakura, M., Kyo, S., Sowa, Y., Wang, Z., Yatabe, N., Maida, Y., Tanaka, M. & Inoue, M. (2001). Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res* 29, 3006-11.
- Takizawa, S., Nagasaka, K., Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Yasugi, T., Takeuchi, T., Kanda, T., Huibregtse, J. M., Akiyama, T. & Taketani, Y. (2006). Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells* 11, 453-64.
- Tan, S. H., Baker, C. C., Stunkel, W. & Bernard, H. U. (2003). A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology* 305, 486-501.
- Tang, S., Tao, M., McCoy, J. P., Jr. & Zheng, Z. M. (2006). The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol* 80, 4249-63.
- Thomas, M., Laura, R., Hepner, K., Guccione, E., Sawyers, C., Lasky, L. & Banks, L. (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 21, 5088-96.
- Thorland, E. C., Myers, S. L., Gostout, B. S. & Smith, D. I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 22, 1225-37.
- Thorland, E. C., Myers, S. L., Persing, D. H., Sarkar, G., McGovern, R. M., Gostout, B. S. & Smith, D. I. (2000). Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 60, 5916-21.
- Tong, X. & Howley, P. M. (1997). The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4412-7.
- 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.
- Trottier, H., Mahmud, S., Prado, J. C., Sobrinho, J. S., Costa, M. C., Rohan, T. E., Villa, L. L. & Franco, E. L. (2008). Type-specific duration of human papillomavirus infection: implications for human papillomavirus screening and vaccination. *J Infect Dis* 197, 1436-47.
- Tsai, H. T., Wu, C. H., Lai, H. L., Li, R. N., Tung, Y. C., Chuang, H. Y., Wu, T. N., Lin, L. J., Ho, C. K., Liu, H. W. & Wu, M. T. (2005). Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 2544-9.
- 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.
- Tseng, C. J., Pao, C. C., Lin, J. D., Soong, Y. K., Hong, J. H. & Hsueh, S. (1999). Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *J Clin Oncol* 17, 1391-6.
- 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.
- Tucker, R. A., Unger, E. R., Holloway, B. P. & Swan, D. C. (2001). Real-time PCR-based fluorescent assay for quantitation of human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Mol Diagn* 6, 39-47.
- Tungteakkhun, S. S. & Duerksen-Hughes, P. J. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 153, 397-408.
- 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.
- Underbrink, M. P., Howie, H. L., Bedard, K. M., Koop, J. I. & Galloway, D. A. (2008). The E6 proteins from multiple beta HPV types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*.
- Unger, E. R., Vernon, S. D., Thoms, W. W., Nisenbaum, R., Spann, C. O., Horowitz, I. R., Icenogle, J. P. & Reeves, W. C. (1995). Human papillomavirus and disease-free survival in FIGO stage Ib cervical cancer. *J Infect Dis* 172, 1184-90.
- Vaccarella, S., Herrero, R., Dai, M., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Thomas, J. O., Hoang Anh, P. T., Ferreccio, C., Matos, E., Posso, H., de Sanjose, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Lazcano-Ponce, E., Ronco, G., Rajkumar, R., Qiao, Y. L., Munoz, N. & Franceschi, S. (2006). Reproductive factors, oral contraceptive use, and human papillomavirus infection: pooled analysis of the IARC HPV prevalence surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2148-53.
- Vaeteewootacharn, K., Sutra, S., Vaeteewootacharn, S., Sithigon, D., Jamjane, O., Chomvarin, C., Hahnvajjanawong, C., Thongsukulpanich, N. & Thaewnon-giew, K. (2005). Salmonellosis and the food chain in Khon Kaen, northeastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36, 123-9.
- van den Brule, A. J., Cromme, F. V., Snijders, P. J., Smit, L., Oudejans, C. B., Baak, J. P., Meijer, C. J. & Walboomers, J. M. (1991). Nonradioactive RNA in situ hybridization detection of human papillomavirus 16-E7 transcripts in squamous cell carcinomas of the uterine cervix using confocal laser scan microscopy. *Am J Pathol* 139, 1037-45.
- 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 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.
- 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.
- Varnai, A. D., Bollmann, M., Bankfalvi, A., Speich, N., Schmitt, C., Griefingholt, H., Kovacs, K., Klotz, C. & Bollmann, R. (2008). Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep* 19, 457-65.
- Veldman, T., Liu, X., Yuan, H. & Schlegel, R. (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8211-6.
- Veress, G., Murvai, M., Szarka, K., Juhasz, A., Konya, J. & Gergely, L. (2001). Transcriptional activity of human papillomavirus type 16 variants having deletions in the long control region. *Eur J Cancer* 37, 1946-52.
- Vernon, S. D., Unger, E. R., Miller, D. L., Lee, D. R. & Reeves, W. C. (1997). Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 74, 50-6.
- 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., 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., Giacchetti, 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., 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., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljev, F., Durst, M., Schneider, A. & von Knebel Doeberitz, M. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68, 307-13.
- Vinther, J., Rosenstjerne, M. W., Kristiansen, K. & Norrild, B. (2005). The 3' region of human papillomavirus type 16 early mRNAs decrease expression. *BMC Infect Dis* 5, 83.
- Wagatsuma, M., Hashimoto, K. & Matsukura, T. (1990). Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol* 64, 813-21.
- 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.
- Walsh, P. S., Erlich, H. A. & Higuchi, R. (1992). Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl* 1, 241-50.
- 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, C. C., Chen, J. J. & Yang, P. C. (2006). Multifunctional transcription factor YY1: a therapeutic target in human cancer? *Expert Opin Ther Targets* 10, 253-66.
- Wang, H. K., Duffy, A. A., Broker, T. R. & Chow, L. T. (2009). Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes Dev* 23, 181-94.
- Wentzensen, N., Ridder, R., Klaes, R., Vinokurova, S., Schaefer, U. & Doeberitz, M. K. (2002). Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions. *Oncogene* 21, 419-26.
- 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.
- Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-9.
- Wilson, R., Fehrmann, 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.
- Winer, R. L., Hughes, J. P., Feng, Q., O'Reilly, S., Kiviat, N. B., Holmes, K. K. & Koutsky, L. A. (2006). Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 354, 2645-54.
- 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.
- Wright, T. C., Jr., Massad, L. S., Dunton, C. J., Spitzer, M., Wilkinson, E. J. & Solomon, D. (2007). 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening tests. *Am J Obstet Gynecol* 197, 346-55.
- Wright, T. C., Van Damme, P., Schmitt, H. J. & Meheus, A. (2006). Chapter 14: HPV vaccine introduction in industrialized countries. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/122-31.
- 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.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Galloway, D. A., Kuypers, J., Hughes, J. P., Wheeler, C. M., Holmes, K. K. & Kiviat,

- N. B. (1997). Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89, 796-802.
- Xi, L. F., Koutsky, L. A., Hildesheim, A., Galloway, D. A., Wheeler, C. M., Winer, R. L., Ho, J. & Kiviat, N. B. (2007). Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, 4-10.
- Yeoh, G. P. & Chan, K. W. (1997). The accuracy of Papanicolaou smear predictions: cytohistological correlation of 283 cases. *Hong Kong Med J* 3, 373-376.
- Ylitalo, N., Josefsson, A., Melbye, M., Sorensen, P., Frisch, M., Andersen, P. K., Sparen, P., Gustafsson, M., Magnusson, P., Ponten, J., Gyllensten, 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.
- Zeitler, J., Hsu, C. P., Dionne, H. & Bilder, D. (2004). Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol* 167, 1137-46.
- 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.
- Zhao, X., Oberg, D., Rush, M., Fay, J., Lambkin, H. & Schwartz, S. (2005). A 57-nucleotide upstream early polyadenylation element in human papillomavirus type 16 interacts with hFip1, CstF-64, hnRNP C1/C2, and polypyrimidine tract binding protein. *J Virol* 79, 4270-88.
- Zhao, X., Rush, M. & Schwartz, S. (2004). Identification of an hnRNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene. *J Virol* 78, 10888-905.
- Zheng, P. S., Li, S. R., Iwasaka, T., Song, J., Cui, M. H. & Sugimori, H. (1995). Simultaneous detection by consensus multiplex PCR of high- and low-risk and other types of human papilloma virus in clinical samples. *Gynecol Oncol* 58, 179-83.
- Zheng, Z. M. & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11, 2286-302.
- Zheng, Z. M., Tao, M., Yamanegi, K., Bodaghi, S. & Xiao, W. (2004). Splicing of a cap-proximal human Papillomavirus 16 E6E7 intron promotes E7 expression, but can be restrained by distance of the intron from its RNA 5' cap. *J Mol Biol* 337, 1091-108.
- Zielinski, G. D., Snijders, P. J., Rozendaal, L., Voorhorst, F. J., van der Linden, H. C., Runsink, A. P., de Schipper, F. A. & Meijer, C. J. (2001). HPV presence precedes abnormal cytology in women developing cervical cancer and signals false negative smears. *Br J Cancer* 85, 398-404.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H. U. & O'Connor, M. J. (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 73, 6209-19.
- zur Hausen, H. (1999). Viruses in human cancers. *Eur J Cancer* 35, 1878-85.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2, 342-50.

Partie 5 : Annexes

Publication n°5



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet



Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus

Véronique Dalstein^a, Sandra Merlin^b, Corinne Bali^b, Maëlle Saunier^c, Roger Dachez^d, Christophe Ronsin^{b,*}

^a CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin d'Histologie, Cytologie et Biologie Cellulaire, Reims 51100, France

^b Laboratoire Biomnis – Service de Biologie Moléculaire, 78 Avenue de Verdun, B.P. 110, 94208 Ivry sur Seine, France

^c Université de Franche-Comté, IFR 133, EA 3181, Rue Ambroise Paré, 25000 Besançon, France

^d CEF (centre d'exploration fonctionnelle), 37 rue Boulard, 75014 Paris, France

ABSTRACT

Article history:

Received 6 March 2008

Received in revised form 31 October 2008

Accepted 4 November 2008

Available online xxx

Keywords:

Human papillomavirus

HPV genotyping

Hybrid capture-2

DNA chip

PapilloCheck test

Linear Array

Recently, a commercially available HPV DNA chip, the PapilloCheck test, developed by Greiner Bio-One, has become available for human papillomavirus (HPV) genotyping. The PapilloCheck test is a PCR-based test using a new consensus primer set targeting the E1 HPV gene. HPV oligoprobes immobilized on a DNA chip allow for the identification of 24 HPV types from the amplified product. In the present study, the analytical performance of the PapilloCheck test is compared to the Linear Array HPV genotyping test (Roche Diagnostics). Cervical specimens collected in PreservCyt (Cytyc) solution and obtained from women who presented abnormal cytological findings were tested primarily by the Hybrid Capture 2 High-Risk assay (HC2-HR, QJAGEN). A total of 144 samples were selected according to the signal intensity obtained with the HC2-HR test, expressed as RLU/CO value, and divided into 4 groups as follows: [0–1] RLU/CO (negative HC2-HR result, 34 samples); [1–5] RLU/CO (positive HC2-HR result, 30 samples); [5–40] RLU/CO (positive HC2-HR result, 40 samples); >40 RLU/CO (positive HC2-HR result, 40 samples). The concordance levels between the HC2-HR test and each of the genotyping assays was similar (88.8%) and the crude agreement between these assays was considered as “good”. The detailed analysis of the discrepant results confirmed a possibly high rate of false positive results of HC2-HR test in the 1–5 RLU/CO grey zone. Genotype-specific comparison analysis was limited to the 23 HPV types detected by both genotyping assays (HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 and 82). Of the 135 samples available for comparison, 91 (67.4%) showed absolute agreement between the assays (concordant genotype-specific results), 34 (25.1%) showed correspondence for some but not all genotypes detected by both assays (compatible genotype-specific results), and the remaining 10 (7.4%) samples did not show any similarity between the tests (discordant results). The majority of discordances were found in samples containing multiple HPV types and in samples harboring low amounts of HPV. For some HPV genotypes, there were slight differences in the detection rate between the two genotyping methods. The Linear Array test seemed to be more sensitive to detect HPV type 53 whereas PapilloCheck test seemed to be more sensitive to detect HPV type 56. For the other genotypes, including HPV types 16 and 18, the results obtained by the two methods did not differ significantly.

In conclusion, this study shows that the PapilloCheck test and the Linear Array test give comparable results for detecting HPV in cervical specimens. However, these results also suggest that there is a need to standardize the type-specific sensitivity of genotyping methods and to evaluate their accuracy to detect multiple HPV infections. This would be a prerequisite for the use of genotyping assays in cervical cancer screening algorithms.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer of the uterine cervix is the second most common cancer among women worldwide with an estimated 493,000 new

cases per year and approximately 270,000 deaths occurring annually (Ferlay et al., 2005). Molecular epidemiologic studies have firmly established that certain genotypes of human papillomavirus (HPV) are etiologically related to the development of cervical carcinoma (Cuzick et al., 1994; Walboomers et al., 1999; Bosch et al., 2002). More than 115 HPV genotypes have been identified of which approximately 40 can infect the mucosa of the anogenital tract. Based on their etiologic role in cervical carcinoma and its precur-

* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 59 17 90; fax: +33 1 49 59 17 98.

E-mail address: christophe.ronsin@biomnis.com (C. Ronsin).

sor lesions cervical intraepithelial neoplasia (CIN), HPV genotypes are classified into “high-risk” HPV (HR-HPV), “probable high-risk” HPV and “low-risk” HPV (LR-HPV) genotypes (Munoz et al., 2003). Recently, the classification has been updated, based on epidemiological data. The HR group includes 15 HPV genotypes (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82) which proved to be associated with cervical cancer, while the LR group includes 12 HPV genotypes (types 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, and CP6108) which are not potentially oncogenic and not involved in the development of cervical cancer. Three HPV genotypes (types 26, 53 and 66) are classified as probable high-risk genotypes because their association with cervical cancer is very difficult to assess, giving the low number of related cases (Munoz et al., 2006).

Cytology-based cervical cancer screening using the Pap smear and new cytological technologies such as liquid-based cytology have been implemented for the prevention of cervical cancer. However, the detection of HR-HPV in cervical samples, using ‘cocktail’ HPV DNA tests such as Hybrid Capture 2 High-Risk (Digene High-Risk HPV HC2 Test, QIAGEN) or Amplicor HPV (Roche Diagnostics) tests, has been proposed to improve the efficiency of cervical carcinoma screening programs, particularly for the triage of women with ASC-US or LSIL cervical smears (Arbyn et al., 2006). More recently, HPV genotyping tests have been presented as relevant for screening women management to identify which HPV-positive women have persistent oncogenic HPV infection. Indeed, several studies have shown that women presenting a persistent infection with a HR-HPV genotype are at a significantly higher risk of developing high-grade dysplasia (CIN2/3) (Ho et al., 1995; Kjaer et al., 2002; Plummer et al., 2007). Moreover, genotyping tests are regarded as interesting tools for monitoring the efficacy of HPV vaccines.

Recently, a new HPV genotyping assay based on DNA chip technology, the PapilloCheck test developed by Greiner Bio-One, has become commercially available and has received the European Community marking for *in vitro diagnostic* (CE-IVD). The PapilloCheck test is a broad spectrum PCR-based method using a new consensus primer set to target the E1 HPV DNA region, which currently allows for the simultaneous detection and identification of 24 different HPV genotypes. In this present study, we evaluated the analytical performance of the PapilloCheck genotyping test from 144 PreservCyt cervical specimens, in comparison to the Linear Array HPV genotyping test (Roche Diagnostics) which is one of the most widely used HPV genotyping assays targeting the L1 HPV DNA region (Gravitt et al., 1998). The concordance levels between each of the genotyping tests and the HC2-HR assay were also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Clinical specimens

144 cervical scrapes collected in PreservCyt medium with the ThinPrep collection device (Cytoc Corp., Marlborough, MA) between November 2006 and February 2007 and previously tested by the HC2-HR HPV DNA test were selected from the Biomnis Laboratory library of archival PreservCyt specimens. These cervical specimens were selected according to their HC2-HR results, to compose 4 representative groups in terms of RLU/CO (relative light unit/cutoff) values: (i) RLU/CO < 1 ($n = 34$); (ii) RLU/CO from 1.0 to 5.0 ($n = 30$), (iii) RLU/CO > 5.0 to 40.0 ($n = 40$), (iv) RLU/CO > 40.0 ($n = 40$). Among these samples, 111 (77.1%) corresponded to an ASCUS, 23 (16.0%) corresponded to low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and for 10 samples the results of the cytology were not available (6.9%). After DNA isolation, these specimens were analyzed by the PapilloCheck and Linear Array genotyping tests.

2.2. Hybrid Capture-2 High-Risk HPV DNA test

The Hybrid Capture 2 High-Risk (HC2-HR) HPV DNA test (Digene High-Risk HPV HC2 Test, QIAGEN) is a widely used signal amplification method based on the hybridization of the targeted HPV-DNA to synthetic RNA probes in solution. The high-risk probe set targets 13 HR-HPV genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68). The HC2-HR HPV DNA test was performed by following the manufacturer’s instructions using the automated HC2 assay system as previously described (Terry et al., 2001). For each specimen, results were expressed in relative light unit/cutoff (RLU/CO), corresponding to the ratio of the specimen luminescence relative to the luminescence of the 1.0 pg/ml HPV16 standard provided with the kit. Samples with a RLU/CO value of ≥ 1 were considered HC2-HR positive. Samples with a RLU/CO value of <1.0 were considered HC2-HR negative.

2.3. DNA extraction from cervical scrapes in liquid-based cytology medium

DNA was isolated from the PreservCyt samples by the MagnaPure LC instrument (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). After careful homogenization, a 200 μ l aliquot of each PreservCyt sample was centrifuged at 13,000 $\times g$ for 20 min prior to discarding the supernatant. The resultant cell pellet was resuspended into 200 μ l of sterile phosphate-buffered saline, which was extracted by MagnaPure LC instrument using the Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) as specified in the manufacturer’s instructions. Nucleic acids were eluted in a final volume of 100 μ l and stored at -30°C until use for PCR analysis.

2.4. Linear Array HPV Genotyping test

The Linear Array[®] HPV Genotyping Test (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA) is a PCR-based HPV detection assay coupled with a reverse line blot hybridization, which allows for the discrimination of 37 HPV genotypes, including 15 HR-HPV genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 3 probable high-risk HPV genotypes (HPV26, 53, 66), 10 LR-HPV genotypes (HPV6, 11, 40, 42, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108) and 9 genotypes for which the risk is still undetermined (HPV55, 62, 64, 67, 69, 71, 83, 84, IS39). The Linear Array test uses biotinylated PGMY09/11 primers to amplify a 450-bp fragment within the polymorphic L1 region of the HPV genome. Co-amplification of a 268 bp-region of the human β -globin gene provides a control to ensure DNA extraction adequacy and PCR efficiency. Briefly, DNA was amplified in a total volume of 100 μ l containing 50 μ l of DNA and 50 μ l of the master mixture provided by the manufacturer. PCR was performed on a thermocycler T3 (Biometra, Göttingen, Germany) under the following conditions: 2 min at 50°C and 9 min at 95°C , followed by 40 cycles of 30 s at 95°C , 1 min at 55°C , and 1 min at 72°C , with a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were stored at -30°C until use. The hybridization and detection of amplified product were performed with the AutoLIPA[™] instrument (Innogenetics, Ghent, Belgium), which can process up to 30 strips simultaneously in a perfectly standardized way. The recommended manual protocol described by the manufacturer was adapted for the automation with AutoLIPA. Colored signals on the strips were read by the naked eye and interpreted according to the Linear Array reference guide. Each hybridization strip included two β -globin probe lines (β -globin high and β -globin low), to check for the adequacy of the DNA sample. Equivocal results can be obtained with the Linear Array test for HPV52 when HPV 33, 35 or 58 are also present, as it is detected through a cross-hybridization probe for these 4 HPV types. An additional specific probe is present on the strip to confirm the detection of HPV33, 35

and 58, but it is not the case for HPV52. In this study, we considered a sample positive for HPV52 only in the absence of HPV33, 35 and 58.

2.5. PapilloCheck DNA chip

The PapilloCheck® HPV-Screening Test (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) is a PCR-based DNA microarray system for the detection and identification of 24 HPV genotypes, including 15 HR-HPV genotypes (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 2 probable high-risk HPV genotypes (HPV53, 66) and 7 LR-HPV genotypes (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 70). Each PapilloCheck DNA chip comprises 12 wells defined by elevated rims. Each well contains one PapilloCheck microarray with 28 probes, each in 5 replicate spots. These 140 spots are arranged in an array of 10 × 14 spots distributed over an area of about 10 mm².

2.5.1. Amplification

This test utilizes the amplification of an approximate 350-bp DNA fragment within the E1 gene of the HPV genome using a new broad spectrum consensus primer set. Each reverse primer was extended at the 5' end with a universal primer tag. Additionally a region within the human ADAT1 gene (Adenosine deaminase, tRNA-specific 1) is simultaneously amplified using fluorescently-labelled primers with cyanine 5 (Cy5-dUTP) in the same reaction as an internal control to assess the DNA quality and the adequacy of cellular material. PCR was performed in a final reaction volume of 25 µl containing 5 µl of DNA extracted, using a thermocycler T3 (Biometra, Göttingen, Germany) under the following conditions: an initial step of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 25 s at 55 °C, and 45 s at 72 °C, followed by 15 cycles of 30 s at 95 °C and 45 s at 72 °C. The PCR products were stored in the dark at –30 °C overnight before the hybridization step.

2.5.2. Hybridization and detection

The E1 PCR denatured products hybridize to HPV specific oligoprobes immobilized onto the DNA chip. Detection of the hybridized PCR products was performed by adding a hybridization buffer which contains a cyanine 5 (Cy5-dUTP) labelled oligoprobe. This Cy5-labelled oligoprobe hybridizes to the sequence of the tag added to all HPV reverse amplification primers. Hybridization was performed according to the manufacturer's instructions. Scanning of the PapilloCheck DNA chip was performed with the CheckScanner™ which is equipped with a 532-nm and a 635-nm laser. The PapilloCheck DNA chips were scanned at the wavelengths 532-nm and 635-nm using the CheckScanner™ and the results were automatically interpreted with the CheckReport™ Software.

2.5.3. Interpretation

Different controls are spotted on each chip in 5 replicates to check the various steps of the entire assay procedure: extraction control, amplification control, hybridization control and orientation control. These different controls must give a positive signal for the 5 measuring points at wavelength at 532-nm or 635-nm. 24 HPV type-specific probes in 5 replicates enable the detection of the 24 HPV types from the amplification product. Results can only be obtained when all controls are valid. The detailed report contains information on each of the controls, including the number of spots with a signal-to-noise ratio (SNR) greater than the defined threshold and the mean SNR values of the positive spots. Because HPV55 cross-reacts with the HPV44 probe, the test cannot distinguish between these two genotypes and HPV44/HPV55 is then indicated in the CheckReport™.

In this case, a positive signal for HPV44/55 was considered as positive for HPV55. It is also reported that HPV13 can cross-hybridize on HPV11 probe. In our study, samples were considered as positive for one given HPV type if a positive signal was observed on all of the 5 corresponding spots on the array. In order to exclude false positives, a negative control (PCR sample without DNA) was added in each PCR batch to assess contaminations which may have occurred during the laboratory workflow.

2.6. Statistical analysis

Among the three HPV detection methods used in this study, a two-by-two comparison analysis was made. For this purpose, it was necessary to take into account only HPV types that were commonly targeted by two given compared methods. HPV genotypes identified only by one of the assays did not account for a discordant result in the analysis. Hence, for the comparison between the HC2-HR test and one of the HPV genotyping assays, the samples were considered as concordant if (i) HC2-HR was negative and none of the 13 HR-HPV commonly targeted types (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68) was detected by one given genotyping assay, or (ii) HC2-HR was positive and at least one of the 13 targeted HR-HPV types was detected by one given genotyping assay. Other results were considered as discordant. This comparison was conducted on 143/144 samples, as one sample was classified as invalid (negative β-globin result) with the Linear Array test and was therefore excluded from the analysis.

For the comparison between PapilloCheck and Linear Array genotyping tests, 23 HPV types were detected in common between both methods: 15 HR-HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 2 probable HR-HPV (HPV53, 66), 5 low-risk HPV (HPV6, 11, 40, 42, 70) and 1 HPV at unknown risk (HPV55) (Table 1). Out of the 143 samples, 135 were retained for further comparison between the two genotyping methods. Indeed, eight additional samples were excluded because the PapilloCheck results were negative when a genotype uniquely identified by the Linear Array test was detected, that has to be considered as concordant results but did not add value to the comparative analysis between tests. Samples were considered as genotyping-positive when at least one of the HPV genotypes targeted in common was detected by at least one of the two methods. Infections were considered as multiple when at least one of the two methods detected more than one HPV among the group of genotypes detected in common. Conversely, infections were considered as single when no more than one genotype was detected by both methods. Results were considered as concordant when no HPV of the group detected in common was found with none of the two tests or when the same HPV type(s) among the group detected in common were found with both tests. Results were considered as discordant when the HPV pattern detected by both tests was totally different concerning the HPV group detected in common. An additional category was added for multiple infections: results were considered as compatible when at least one HPV of the group detected in common was found by the two tests.

Statistical analyses were performed using 2 × 2 contingency tables, with two-sided *P* values calculated by using both the Fisher exact test and the McNemar's test for comparison of matched-pair samples. All *P* values <0.05 were considered statistically significant. Agreement between tests was assessed by Cohen's kappa statistics, with values ranging from 0.00 to 0.20 indicating poor agreement, from 0.21 to 0.40 indicating fair agreement, from 0.41 to 0.60 indicating moderate agreement, from 0.61 to 0.80 indicating good agreement, and from 0.81 to 1.00 indicating very good to perfect agreement.

Table 1
HPV genotypes identified with the Linear Array and PapilloCheck tests.

Risk group of HPV types	HPV detected by Linear Array only	HPV detected by both Linear Array and PapilloCheck	HPV detected by PapilloCheck only
High risk			
- 13 common types ^d		16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 ^a , 56, 58, 59, 68	
- 2 additional		73, 82	
Probable high risk	26	53, 66	
Low risk	54, 61, 72, 81, CP6108	6, 11, 40, 42, 70 ^b	43, 44
Unknown risk	62, 64, 67, 69, 71, 83, 84, IS39	55 ^c	

^a Samples which co-reacts with the HPV33, 35, 52, 58 probe as well as HPV33 or HPV35 or HPV58 probe were classified respectively as HPV33, 35, 58. In these cases, HPV52 presence is equivocal. Here, only samples which co-react with the HPV33/35/52/58 cross-hybridization probe and not with HPV33, HPV35 or HPV58 specific probes were classified as HPV52.

^b HPV70 is classified as a high-risk HPV by the PapilloCheck reference guide.

^c PapilloCheck test does not distinguish between HPV55 and HPV44. Because of this the result is displayed as HPV44/55.

^d These 13 high-risk HPV types are those also targeted by the Hybrid Capture 2 cocktail test.

3. Results

3.1. HC2-HR assay results compared to the PapilloCheck or the Linear Array HPV genotyping results

HR-HPV DNA testing was positive with HC2-HR assay in 109/143 (76.2%) specimens, according to the initial selection of 4 representative groups in terms of RLU/CO values. One or several of the 13 high-risk types targeted by HC2-HR were detected in 95/143 cases (66.4%) with the PapilloCheck test and in 99/143 cases (69.2%) with the Linear Array test. The concordance levels between HC2-HR and Linear Array test and between HC2-HR/PapilloCheck test were 88.8% ($k=0.720$) and 88.8% ($k=0.730$) respectively (Table 2). The agreement between the tests for HR-HPV detection was considered as “good”. However HR-HPV positive samples for the 13 targeted types were statistically more frequent with HC2-HR assay than with the Linear Array HPV genotyping test (McNemar’s test, $P=0.0244$) and the PapilloCheck test (McNemar’s test, $P=0.0012$).

Table 2
Concordance between HC2-HR assay and LA HPV genotyping test and between HC2-HR assay and PapilloCheck test, for the 13 commonly targeted HR-HPV genotypes^a.

Linear Array test (detected HPV types)	↔	HC2-HR (RLU/CO range)		↔	PapilloCheck test (detected HPV types)	
16, 40	*	<1 (n=34)		*	40	
58, 53	*			58, 53		
no HPV detected	*	[1-5[(n=30)		*	no HPV detected	
no HPV detected	*			no HPV detected		
no HPV detected	*			no HPV detected		
6	*			6		
31, 42	*			42		
31	*			no HPV detected		
61	*			no HPV detected		
61	*			no HPV detected		
70	*			no HPV detected		
83, 84	*			no HPV detected		
66	*	[5-40[(n=39)		*	66	
67	*			no HPV detected		
51, 73	*			44/55		
58	*			no HPV detected		
70	*	>40 (n=40)		*	70	
66	*			56, 66		
62, 84	*			68		

Classification according to the HC2 RLU/CO values, each row corresponding to one discordant sample. *In bold*: HPV types belonging to the 13 targeted HR-HPVs by all three tests (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). *Not in bold*: HPV types not targeted by all 3 tests. On a light grey background: negative for the 13 targeted HR-HPVs. On a dark grey background: positive for one or several of the 13 targeted HR-HPVs. ^aDiscordant result between HC2 and one of the two genotyping tests.

Table 2
Concordance between HC2-HR assay and LA HPV genotyping test and between HC2-HR assay and PapilloCheck test, for the 13 commonly targeted HR-HPV genotypes^a.

HC2 results	Linear Array test results		PapilloCheck test results		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	96	13	94	15	109
Negative	3	31	1	33	34
Total	99	44	95	48	143

^a 13 HR-HPV genotypes targeted both by the HC2-HR, the LA HPV genotyping test and by the PapilloCheck test (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68). A positive result refers to HR-HPV detection.

The discordant results between HC2-HR and the two genotyping tests are summarized in Table 3. The rate of discordant results was dependent on the HC2-HR RLU/CO value range: respectively for Linear Array and PapilloCheck, 5.9% and 2.9% in the 0–1 range; 26.7% and 33.3% in the 1–5 range; 5.0% and 10.0% in the 5–40 range; 7.5% and 2.5% in the >40 range. The majority of discordant results

Table 4
Agreement between HPV genotypes detected by both PapilloCheck and Linear Array HPV genotyping tests in the 110 HPV positive samples^a.

Agreement	Single infections, <i>n</i> (% by column)	Multiple infections, <i>n</i> (% by column)	All infections, <i>n</i> (% by column)
Concordant	46 (88.5)	20 (34.5)	66 (60.0)
Compatible	NA	34 (58.6)	34 (30.9)
Discordant	6 (11.5)	4 (6.9)	10 (9.1)

^a HPV genotypes identified by both assays (LR or unknown risk HPV6, 11, 40, 42, 55, 70; probable HR-HPV53, 66; HR-HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82). NA: not applicable.

came from HC2-HR positive/genotyping test (GT) negative combination, which accounted for 86.7% (13/15) and 93.7% (15/16) of discrepancies, respectively for Linear Array and PapilloCheck. Moreover, these HC2+/GT– discrepancies were concentrated in the 1–5 RLU/CO range (61.5% for Linear Array and 66.7% for PapilloCheck).

3.2. PapilloCheck and Linear Array HPV genotyping results comparison

Out of the 135 eligible samples for the genotype-specific comparison, 25 samples were considered concordantly as negative, as no HPV was detected by any of the two methods. The other 110 samples were considered as genotyping-HPV positive and 52.7% (58/110) of them were considered as infected with multiple types. Concordant genotypes were found for 60.0%, compatible genotypes for 30.9% and discordant genotypes for 9.1% of the samples. The rate of concordant results was highly dependent on the number of detected types: 88.5% in single infections versus 34.5% in multiple infections (Table 4). Among the 20 multiple-infected samples with concordant results, 12 samples (18.1%) contained two different genotypes, 5 samples (7.5%) contained three HPV genotypes and 3 samples (4.5%) contained four or more HPV genotypes.

Table 5
Type-specific agreement calculated for each HPV type detected in common by Linear Array and PapilloCheck tests in 110 positive studied samples.

Oncogenic potential	HPV Genotype	No. of positive samples with Linear Array [®] test	No. of positive samples with PapilloCheck [®] test	No. of positive samples with both genotyping tests	K value (95% CI)	P value (McNemar's test)
15 High-risk	16	22	17	16	0.796 (0.647 to 0.944) ^b	0.1306
	18	6	4	4	0.793 (0.507 to 1.078) ^b	0.4795
	31	18	15	15	0.897 (0.781 to 1.012) ^a	0.2482
	33	4	4	4	1.000 (1.000 to 1.000) ^a	–
	35	3	3	2	0.659 (0.190 to 1.128) ^b	0.4795
	39	6	5	4	0.716 (0.398 to 1.034) ^b	1.0000
	45	4	1	1	0.393 (–0.287 to 1.072) ^d	0.2482
	51	6	4	4	0.793 (0.507 to 1.078) ^b	0.4795
	52	8	8	8	1.000 (1.000 to 1.000) ^a	–
	56	5	10	5	0.649 (0.348 to 0.951) ^b	0.0736
	58	4	2	2	0.660 (0.192 to 1.128) ^b	0.4795
	59	4	4	3	0.742 (0.388 to 1.097) ^b	0.4795
	68	1	3	1	0.494 (–0.201 to 1.190) ^c	0.4795
	73	3	2	1	0.389 (0.294 to 1.073) ^d	1.0000
82	1	2	1	0.663 (0.006 to 1.321) ^b	1.0000	
2 Probable High-risk	53	11	6	6	0.688 (0.420 to 0.956) ^b	0.0736
	66	5	2	2	0.562 (0.072 to 1.052) ^c	0.2482
	6	5	3	3	0.655 (0.270 to 1.041) ^b	0.4795
5 Low-risk	11	1	0	0	–	–
	40	0	0	0	–	–
	42	6	7	6	0.919 (0.761 to 1.077) ^a	1.0000
1 at Unknown risk	70	3	1	1	0.494 (–0.201 to 1.190) ^c	0.4795
	55	2	4	2	0.485 (–0.013 to 0.982) ^c	0.4795

^a Very good to perfect agreement.
^b Good agreement.
^c Moderate agreement.
^d Fair agreement.

The overall strength of agreement between the two assays was considered good ($k = 0.687$) and the agreement between the results obtained to detect the 15 HR-HPV genotypes was even higher ($k = 0.709$). The global frequency of detection of each HPV genotype was compared for both methods and the results are summarized in Table 5. For low-risk HPV11 and 40, no agreement could be calculated because they were not detected in any sample or detected only by one test. The highest kappa values were found for HPV 31, 33, 52 and 42 (perfect agreement), then for HPV 6, 16, 18, 35, 39, 51, 53, 56, 58, 59, and 82 (good agreement), then for HPV 55, 66, 68, 70 (moderate agreement) and finally the lowest for HPV 45 and 73 (fair agreement). HPV53 was detected significantly more frequently by Linear Array (11 times versus 6 by PapilloCheck) whereas HPV56 was more frequently detected by PapilloCheck (10 times versus 5 by Linear Array). For other HPV types, we did not notice any significant imbalance between the detection rate by one or the other genotyping test.

HPV16 and HPV18 are associated with 50–60% and 10–20% of cervical cancer cases, respectively, and as women with an HPV16 or HPV18 infection have a greater risk of developing a cervical cancer compared to other oncogenic HPV genotypes (Castle et al., 2005; Khan et al., 2005), these genotypes might warrant special consideration. Not surprisingly, HPV16 was the most prevalent HPV genotype, detected in 17 samples with the PapilloCheck test and in 22 samples with the Linear Array test, but this difference was not significant. Discrepant results were obtained in 9 samples for the detection of HPV16 and HPV18 and all of them contained multiple genotypes and as such were classified as compatible or discordant. To confirm the presence or absence of HPV16 and 18 in these 9 samples, a type-specific real-time PCR was performed for the HPV16 E7 region as described previously (Wang-Johanning et al., 2002) and for HPV18 E6 region (in-house real-time PCR). Among the 6 Linear Array HPV16+/PapilloCheck HPV16– samples, 3 were found positive with real-time HPV16 PCR. For the one Linear Array HPV16–/PapilloCheck HPV16+ sample, HPV16 was not detected

Table 6

Overview of the 10 samples with totally discordant results between PapilloCheck and Linear Array, for the detection of the 23 HPV genotypes targeted in common by the two tests.

Linear Array test (detected HPV types)	PapilloCheck test (detected HPV types)
No HPV detected	73
31	No HPV detected
58	No HPV detected
66	No HPV detected
70	No HPV detected
73	No HPV detected
31, 59	35
16, 35	44/55, 59
51, 73	44/55
62, 84	68

Each row corresponds to one discordant sample.

by real time PCR. Out of the 2 Linear Array HPV18+/PapilloCheck HPV18– samples, HPV18 was found by real-time PCR in only one sample (data not shown).

Ten (12.9%) of the 135 samples were considered totally discordant, since no similarity was observed between the genotypes found within the two tests (Table 6). One half of these samples were found positive for one HPV genotype by the Linear Array test and negative for the PapilloCheck test. Interestingly, the HC2-HR value was <5 RLU/CO in 7/10 samples. Six of ten samples contained a single HPV genotype detected by only one of the assays.

4. Discussion

Some authors suggested that HPV genotyping may be useful for stratifying the risk for women to develop a precancerous cervical lesion and may be a useful adjunct to cervical cancer screening programs. If genotyping has to be used for diagnosis application and not only for epidemiological studies, it would therefore require standardized and validated molecular tools for the detection and identification of a defined spectrum of oncogenic HPV genotypes. In this study, the analytical performance of the PapilloCheck HPV genotyping test was compared firstly to the FDA approved HC2-HR test for the global detection of 13 HR-HPV genotypes and secondly to the widely used Linear Array genotyping test.

The overall agreements found between HC2-HR and both Linear Array and PapilloCheck genotyping assays indicated highly comparable outcomes and were close to those observed in recent reports using different genotyping methods (Hesselink et al., 2006; Safaeian et al., 2007; Sandri et al., 2006; Stevens et al., 2007). However, the HR-HPV positivity rate was statistically higher with the HC2-HR assay than with the genotyping tests. This could be explained by probable cross-reactivity of HC2-HR test with genotypes not included in the 13 HR-HPV probe set. In particular, our results showed that HC2-HR assay cross-reacts with HPV66, 61 and 70, as previously reported (Castle et al., 2002; Hesselink et al., 2006; Peyton et al., 1998; Safaeian et al., 2007; Vernon et al., 2000). Moreover, it is of interest to note that a significant number of discordant results between the HC2-HR assay and genotyping methods were observed for samples with a RLU/CO ratio value between 1.0 and 5.0. This confirms the lack of specificity of the HC2-HR assay for the samples which exhibit a low positive RLU/CO ratio (Muldrew et al., 2007; Seme et al., 2006). The results strengthen the idea that the HC2-HR positive threshold should be increased at least from 1 to 2 RLU/CO and that it is necessary to introduce a grey-zone around the positive cutoff, in order to improve the specificity of the HC2-HR assay. These borderline samples could then be retested with a validated genotyping method, to conclude whether they are positive or not for the 13 targeted high-risk genotypes.

Globally, the genotype-specific results obtained with Linear Array and PapilloCheck were highly comparable, with 91% of con-

cordant or compatible results. HPV typing discrepancies observed between the two tests indicate that neither method seemed to have a propensity towards a highest detection rate than the other. However, as expected, total or partial discrepancies between the genotyping results were much more frequent for infections classified as multiple, as compared to single infections. Moreover, when considering the quantitative values obtained with the PapilloCheck test, we observed that samples with discordant results harbored notably low SNR values (≤ 25) while Linear Array tested negative. Thus, low SNR values should be cautiously interpreted, suggesting a non-specific hybridization signal leading to a false positive result or suggesting very low amounts of this HPV type. A positive detection with the Linear Array did not lead to numeric values so the opposite situation could not be verified.

Not surprisingly, the two genotyping methods showed different detection rates for individual HPV genotypes. The specific strength of agreement for each HPV genotype detectable by both assays varied between fair to perfect. A marked difference was seen in the ability of Linear Array to amplify better HPV53 and of PapilloCheck to better amplify HPV56. On the other hand, for HPV52 which is a HPV genotype indirectly detected by Linear Array, results were in perfect agreement in our series with the direct detection by the PapilloCheck test, whereas others studies reported the indirect detection of HPV 52 by the Linear Array as a shortcoming of this assay (Coutlee et al., 2006; Sabol et al., 2008). Most importantly, a relatively high number of discordant results was found for HPV16 and HPV18, all in multiple infected samples. The information supplied by the type-specific real-time PCR experiments suggests an initial low amount of HPV16 or 18 in these discordant samples, because the threshold cycle (C_t) values were high, between 34 and 38 C_t (data not shown). So, in accordance with the observation concerning the low SNR values in the above paragraph, it may be hypothesized that most of the samples with discrepant results for one HPV contained low amounts of this genotype.

Another source of variation for genotyping results could be from the pre-analytical step. Indeed, a number of studies comparing different HPV genotyping methods revealed that the analytical sensitivities and specificities for HPV genotyping vary largely, depending also on the type and quality of the biological specimen and the choice of the DNA extraction method (Dunn et al., 2007). In our study, HPV DNA extraction was performed by the automated Magna Pure LC extraction system that should warrant a high level of standardization for the DNA extraction step. The DNA amount that is loaded for each PCR is different but was in accordance with the supplier's recommendations, and as such, is supposed to be the optimal condition for each technique. Finally, an effort was made in this study to standardize the hybridization step of the Linear Array method with an automated AutoLipa staining system, a recently proposed protocol (Stevens et al., 2006). Indeed, this step appeared to us as an important source of variation in the intensity of the revealed bands.

Finally, the performances of HPV genotyping assays is related to the use of different primer sets to achieve multiplex PCR reactions, as reported previously (van Doorn et al., 2002; van Hamont et al., 2006). The fact that these two PCR-based genotyping assays did not detect all HPV genotypes similarly may be due to minor preferential amplification of each PCR primer set for some specific HPV genotypes, especially if the HPV viral load is low or if one HPV is present at a very low concentration in a sample containing multiple genotypes (Gillio-Tos et al., 2006). This must be emphasized because the two compared methods target two different HPV genes L1 and E1. It is interesting to note that during the HPV integration in the host genome, the E1 region located near the E2 region, could be more susceptible to DNA sequence modifications, such as partial deletions, than the L1 region. It seems important to investigate the analytical sensitivity and specificity of the PapilloCheck test in

such conditions which are not evaluated in our present study. This would warrant the use of a standardized panel of single and multiple infected cervical samples harboring various viral loads, what would be the essential tool to compare analytical sensitivity and specificity of genotyping methods.

In conclusion, the genotyping results obtained from this retrospective study with either the PapilloCheck DNA chip test or the Linear Array test were comparable. However, these results illustrate the difficulty of obtaining in a systematic way, the same pattern through different genotyping methods, in particular for multiple HPV infections and/or for low viral loads. The availability of HPV genotyping methods with demonstrated reliable clinical performance would be a necessary prerequisite before HPV genotyping assays can be used for cervical cancer screening and for the identification of genotype-specific persistent infections as well as for the monitoring of the efficacy of HPV vaccines.

Acknowledgements

We thank Pr. Christine Clavel (University Hospital, Laboratory of Histology, Cytology and Cellular Biology, Reims, France) and Pr. Christiane Mougin (Franch-Comté University, IFR133, EA3181, Besançon, France) for their help in performing the viral load assessment for HPV16 and HPV18 respectively by real time type-specific PCR. We thank Sarah Liger and Catherine Butler who proofread the manuscript.

We thank Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France, for supplying the PapilloCheck reagents.

References

- Arbyn, M., Sasieni, P., Meijer, C.J., Clavel, C., Koliopoulos, G., Dillner, J., 2006. Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine* 24, 578–589.
- 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, 244–265.
- Castle, P.E., Schiffman, M., Burk, R.D., Wacholder, S., Hildesheim, A., Herrero, R., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Lorincz, A., 2002. Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11, 1394–1399.
- Castle, P.E., Solomon, D., Schiffman, M., Wheeler, C.M., 2005. 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, 1066–1071.
- Coutlee, F., Rouleau, D., Petignat, P., Ghattas, G., Kornegay, J., Schlagg, P., Boyle, S., Hankins, C., Vézina, D., Cote, P., Macleod, J., Voyer, H., Forest, P., Walmsley, S., Franco, E.L., 2006. Enhanced detection and typing of human papillomavirus DNA in anogenital samples with PGM1 primers and the Linear Array HPV genotyping test. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1998–2006.
- Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T., Anderson, M., 1994. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer.* 69, 167–171.
- Dunn, S.T., Allen, R.A., Wang, S., Walker, J., Schiffman, M., 2007. DNA extraction: an understudied and important aspect of HPV genotyping using PCR-based methods. *J. Virol. Methods* 143, 45–54.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D.M., 2005. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 2.0. IARC Cancer Base No. 5. IARC Press, Lyon, France (Online). <http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>.
- Gillio-Tos, A., De Marco, L., Ghisetti, V., Snijders, P.J., Segnan, N., Ronco, G., Merletti, F., 2006. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR. *J. Clin. Virol.* 36, 126–132.
- Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Apple, R.J., Wheeler, C.M., 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3020–3027.
- Hesselink, A.T., Bulkman, N.W., Berkhof, J., Lorincz, A.T., Meijer, C.J., Snijders, P.J., 2006. Cross-sectional comparison of an automated hybrid capture 2 assay and the consensus GP5+/6+ PCR method in a population-based cervical screening program. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3680–3685.
- 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, 1365–1371.
- Khan, M.J., Castle, P.E., Lorincz, A.T., Wacholder, S., Sherman, M., Scott, D.R., Rush, B.B., Glass, A.G., Schiffman, M., 2005. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *Natl. Cancer Inst.* 97, 1072–1079.
- Kjaer, S.K., van den Brule, A.J., Paull, G., Svare, E.I., Sherman, M.E., Thomsen, B.L., Sun-tum, M., Bock, J.E., Poll, P.A., Meijer, C.J., 2002. 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* 325, 572–576.
- Muldrew, K.L., Beqaj, S.H., Han, J., Lum, S.H., Clinard, V., Schultenover, S.J., Tang, Y.W., 2007. Evaluation of a Digene-recommended algorithm for human papillomavirus low-positive results present in a “retest zone”. *Am. J. Clin. Pathol.* 127, 97–102.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Horroero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., 2003. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518–527.
- Munoz, N., Castellsagué, X., Berrington de Gonzalez, A., Gissmann, L., 2006. HPV in etiology of human. *Vaccine* 24, S3–S10.
- Peyton, C.L., Schiffman, M., Lorincz, A.T., Hunt, W.C., Mielzynska, I., Bratti, C., Eaton, S., Hildesheim, A., Morera, L.A., Rodriguez, A.C., Herrero, R., Sherman, M.E., Wheeler, C.M., 1998. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3248–3254.
- Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P.E., Maucort-Boulch, D., Cosette, M., Wheeler, C.M., 2007. A 2-Year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *JID* 195, 1582–1589.
- Sabol, I., Salakova, M., Smahelova, J., Pawlita, M., Schmitt, M., Gasperov, N.M., Grce, M., Tachezy, R., 2008. Evaluation of different techniques for identification of human papillomavirus types of low prevalence. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1606–1613.
- Safaeian, M., Herrero, R., Hildesheim, A., Quint, W., Freer, E., Van Doorn, L.J., Porras, C., Silva, S., Gonzalez, P., Bratti, M.C., Rodriguez, A.C., Castle, P., 2007. Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 Assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1447–1454.
- 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, 2141–2146.
- Seme, K., Fujs, K., Kocjan, B.J., Poljak, M., 2006. Resolving repeatedly borderline results of Hybrid Capture 2 HPV DNA Test using polymerase chain reaction and genotyping. *J. Virol. Methods* 134, 252–256.
- Stevens, M.P., Rudland, E., Garland, S.M., Tabrizi, S.N., 2006. 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, 2428–2433.
- Stevens, M.P., Garland, S.M., Rudland, E., Tan, J., Quinn, M.A., Tabrizi, S.N., 2007. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2130–2137.
- Terry, G., Ho, L., Londesborough, P., Cuzick, J., Mielzynska-Lohns, I., Lorincz, A., 2001. Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *J. Med. Virol.* 65, 155–162.
- van Doorn, L.J., Quint, W., Kleter, B., Molijn, A., Colau, B., Martin, M.T., Kravang, L., Torrez-Martinez, N., Peyton, C.L., Wheeler, C.M., 2002. Genotyping of human papillomavirus in liquid cytology cervical specimens by the PGM1 line blot assay and the SPF10 line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 40, 979–983.
- 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, 3122–3129.
- 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, 651–655.
- 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, 12–19.
- 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, 2199–2210.

Publication n°6

Human Papillomavirus Genotype Distribution in External Acuminata Condylomata: A Large French National Study

François Aubin,^{1,3} Jean-Luc Prétet,³ Anne-Carole Jacquard,⁵ Maëlle Saunier,³ Xavier Carcopino,⁴ Fatiha Jaroud,⁵ Pierre Pradat,^{6,7,8} Benoît Soubeyrand,⁵ Yann Leocmach,⁵ Christiane Mougin,³ and Didier Riethmuller,^{2,3} for the EDiTH Study Group

¹Service de Dermatologie and ²Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Saint Jacques, and ³EA3181, IFR133, Université de Franche-Comté, Besançon, ⁴Service de Gynécologie-Obstétrique, Marseille, ⁵Sanofi Pasteur, ⁶Service d'Hépatogastroentérologie, Hotel-Dieu, Hospices Civils de Lyon, ⁷IFR62 Lyon-Est, Université Claude Bernard, and ⁸INSERM U871, Lyon, France

Background. External acuminata condylomata (EAC) are among the most common sexually transmitted diseases. Although it is understood that low-risk human papillomavirus (HPV) genotypes 6 and 11 are associated with EAC, there have only been a few, small, published studies reporting the genotype-specific prevalence of HPV. The objective of our study was to assess the prevalence of HPV genotypes for a large number of cases involving both men and women and to evaluate the potential benefit of a quadrivalent (genotypes 6, 11, 16, and 18) HPV vaccine in France.

Methods. A total of 256 women and 260 men who presented with EAC to French gynecologists, dermatologists, and proctologists were prospectively recruited during the period January through April 2007. Specimens were collected with a cytobrush, and the HPV genotype was determined using the INNO-LiPA assay (Innogenetics), which detects 24 HPV genotypes.

Results. Four hundred twenty-three β -globin-positive samples could be analyzed. The median age of patients was 30 years (range, 18–72 years). The overall prevalence of HPV DNA in patients with EAC was 99% (33% of patients were coinfecting with another pathogen). Low-risk genotypes predominated, with a prevalence of 89%. The most prevalent genotypes were 6 (69%) and 11 (16%), followed by 16 (9%), 51 (8%), 52 (7%), 66 (6%), 53 (5%), 31 (3%), and 18 (3%). The cumulative prevalence of genotypes 6 and 11 was 83%, and the cumulative prevalence of genotypes 6, 11, 16, and 18 was 88%.

Conclusions. This study is, to our knowledge, the first large, multicenter survey to provide solid data on HPV genotype distribution among patients with EAC. Our results provide strong evidence that, in France, the most prevalent HPV genotypes in persons with EAC are 6 and 11. Because of its 99% efficacy for the prevention of EAC and a vaccine coverage of 100%, the quadrivalent HPV vaccine could prevent 62%–87% of EAC cases in France.

External acuminata condylomata (EAC) are among the most common sexually transmitted diseases worldwide. The incidence of EAC seems to be increasing [1–4], with a peak incidence observed in the 20–24-year-old age group [3, 4]. In the United States, the incidence of

genital condyloma increased from 118 cases per 100,000 person-years at risk in 1998 to 205 cases per 100,000 person-years at risk in 2001 [5]. Few studies are available from France. In 2000, Lukasiewicz et al. [6] reported a similar trend, with a yearly incidence of 107 new cases per 100,000 inhabitants, and more recently, Monsonego et al. [7] estimated that the overall incidence was 229 cases per 100,000 female persons aged 15–65 years, corresponding to ~48,000 women per year receiving treatment from gynecologists.

The association between genital warts and presence of human papillomavirus (HPV) infection has been described elsewhere [8, 9]. HPV transmission usually occurs after epithelial contact with an HPV-infected

Received 30 January 2008; accepted 17 April 2008; electronically published XX July 2008.

Reprints or correspondence: Dr. François Aubin, Service de Dermatologie, Hôpital Saint-Jacques, 2, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex, France (francois.aubin@univ-fcomte.fr).

Clinical Infectious Diseases 2008;47:000–000

© 2008 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

1058-4838/2008/4705-00XX\$15.00

DOI: 10.1086/590560

surface and depends on sexual behavior. Previous studies have reported that, in fact, HPV infection is highly related to the lifetime number of sexual partners [10, 11] and that condoms have a very limited role in preventing the transmission of the virus [12].

Although most EAC cases will spontaneously resolve, therapy is often preferred to avoid long-lasting psychosocial and psychosexual concerns associated with a slow regression process [13]. However, treatment is expensive and painful, and there is a high risk of recurrence [14, 15].

A quadrivalent (HPV genotype 6, 11, 16, and 18) virus-like particle vaccine protecting against the most common HPV infections has been developed and is now licensed [16]. Although it is known that, worldwide, low-risk HPV-6 and HPV-11 are associated with EAC in ~90% of cases [17, 18], data concerning the HPV genotype distribution among patients with EAC are scarce. Because such data are not yet available in France, the objective of this study was to estimate the HPV genotype-specific prevalence in EAC and to evaluate the potential benefit of quadrivalent HPV vaccination in this country.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Patients. This French prospective, multicenter, national study was based on clinical reports from physicians involved in the treatment of patients with EAC. A total of 102 gynecologists, 96 dermatologists, and 24 proctologists participated in the survey. For patients to be included, they had to be ≥ 18 years of age and to have had EAC diagnosed during clinical examination. All patients had to provide written informed consent. Enrollment continued until 250 men and 250 women had been enrolled. Patients with immunodeficiency due to HIV infection or receipt of any kind of immunosuppressive therapy were excluded. Patient data (e.g., age at diagnosis, area of residence, date of sample collection, presence of lesions, and sampling sites) were extracted from medical records.

Sample collection. Biological samples were obtained atraumatically from the most typical EAC lesions using a cytobrush (DNAPAP Cervical Sampler; Digene). A standardized sampling protocol (mandating three 360° rotations counterclockwise) was provided to each physician. The brush was then placed in Cervical Specimen Transport Medium (Digene) and sent to the Department of Cellular and Molecular Biology (Besançon, France) for DNA extraction and genotype assessment. Prior to study initiation, the technique had been tested on 9 patients with EAC, with a 100% success rate for detection of HPV.

DNA extraction and HPV genotype assessment. DNA extraction was performed with the MagNA Pure Compact robot (Roche Diagnostics) and the MagNA Pure Compact NA Isolation kit I (Roche Diagnostics), in accordance with the manufacturer's instructions. HPV genotypes were determined using the INNO-LiPA HPV Genotyping v2 test (Innogenetics) after

amplification with specific biotinylated SF10 primers. After denaturation, PCR products were incubated with HPV-specific oligonucleotide probes immobilized on nylon strips. The INNO-LiPA kit allows the detection of 24 HPV genotypes (13 high-risk genotypes and 11 low-risk genotypes), as follows: high-risk HPV genotypes, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68; and low-risk HPV genotypes, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 66, 70, and 74.

A detailed procedure using this method is described elsewhere [19]. Positive and negative controls, consisting of DNA from CaSki cells (harboring HPV-16) and molecular biology grade water, respectively, were systematically used in parallel with DNA from the cervical specimen for each run.

DNA quality was assessed in HPV-negative samples using a β -globin PCR. β -Globin-negative samples were excluded from analysis.

Ethics consideration. In accordance with French law (Public Health Code, modified by the law n° 2004-806, 9 August 2004; and the Huriet-Sérusclat act 88-1138, 20 December 1988), because this study was conducted during patients' routine clinical follow-up, without any modification, no ethics committee approval was necessary. This study complies with the Declaration of Helsinki, and written informed consent was obtained from each patient.

Statistical analysis. The sample size had to be large enough to accurately estimate the prevalence of specific HPV genotypes. The number of subjects was thus maximized, using $p = 50\%$ and a precision of 5%, yielding a total of 385 patients. This number was increased by 20% to compensate for possible drop-outs, reaching a total of ~500 cases. The overall prevalence of HPV genotypes was calculated. The distribution of specific HPV genotypes was expressed as the proportion of HPV DNA-positive specimens among all cases of EAC. Qualitative variables were studied using the 2-sided χ^2 test or Fisher's exact test, as appropriate. Quantitative data are expressed as mean (\pm SD) and range. Data analysis was conducted using SAS software, version 8.2 (SAS Institute). P values $< .05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

Patient characteristics. Two hundred fifty-six women and 260 men were prospectively recruited during the period January 2007 through April 2007. Patients were recruited after presenting to 102 gynecologists (220 patients), 96 dermatologists (231 patients), and 24 proctologists (65 patients) scattered throughout the country. Among recruited patients, 6 did not meet the inclusion criteria (3 were receiving immunosuppressive therapy, and 3 had HIV infection) and were thus excluded from the analysis. Moreover, 87 patients (17%) who tested negative for both HPV and β -globin, suggesting the absence of HPV DNA suitable for PCR, were also excluded. These HPV

q10 DNA–negative samples were equally distributed among participating centers (data not shown). For women, these samples were collected from lesions mainly located in the perineum (34%) and the perianal region (29%), whereas HPV DNA–
 q11 negative samples obtained from men were most often collected from the penis (59%). The remaining 423 samples were analyzed for the presence of HPV by genotype analysis; their characteristics are presented in table 1. The median age of patients
 q12 was 30 years (range, 18–72 years) for the entire group, but the median age varied slightly between men and women (32 vs. 28 years; $P = .01$).

Thirty-seven percent of all EAC cases were recurrent cases. This percentage varied from 29% for women to 45% for men ($P < .001$) and increased with increasing age at enrollment in the study ($P = .04$, by χ^2 for test trend). At the time of diagnosis, 8% of women with EAC were pregnant. The rate of recurrence appeared to be higher for pregnant women (41%) than for nonpregnant women (28%), although this difference was not statistically significant ($P = .27$).

In women, EAC lesions were often located on the vulva (68% of cases), perineum (43%), and perianal region (30%), whereas, for men, the penis (42%) and perianal region (27%) were the most frequent sites (table 1).

HPV prevalence. HPV DNA was detected in 418 of 423 EAC cases, yielding an overall prevalence of 98.8%. Only 5 samples tested negative for HPV DNA. Presence of 1 HPV genotype only was observed in 266 (63%) of 423 cases, whereas 132 cases (32%) involved infection with ≥ 2 genotypes. Fifteen other cases (3.5%) tested positive for HPV but could not be further characterized using this genotyping method (so-called undetermined HPV).

q13 On the basis of the Lipa low-risk/high-risk genotype classification, presence of ≥ 1 low-risk HPV genotype was found in 381 (90%) of 423 cases, and presence of ≥ 1 high-risk genotype was found in 139 cases (33%). These proportions varied significantly with sex; the presence of ≥ 1 low-risk genotype was more common among men than among women (93.8% vs. 86.4%; $P = .011$). In contrast, presence of ≥ 1 high-risk genotype was more common among women (40.7%) than
 q14 among men (24.9%; $P < .001$). Two hundred sixty-four (62%) of 423 EAC samples demonstrated infection with ≥ 1 low-risk genotype (without high-risk genotypes); 22 (5%) demonstrated infection ≥ 1 high-risk genotype (without low-risk genotypes), whereas 117 (28%) demonstrated coinfection with low-risk and
 q15 high-risk genotypes (table 2). The presence of ≥ 1 high-risk genotype occurred as frequently in new cases as in recurrent cases (32%; $P = .69$) and did not vary on the basis of age ($P = .57$). However, the proportion of high-risk genotypes seemed to be higher among pregnant women (53%) than among nonpregnant women (36%), although this difference was not statistically significant ($P = .17$).

Table 1. Characteristics of 423 French patients with external acuminata condylomata.

Characteristic	Value
Sex^a	
Male	209 (49.4)
Female	214 (50.6)
Age, median years (range)	30 (18–72)
Age group years	
18–24 years	88 (20.8)
24–30 years	127 (30.0)
30–40 years	125 (29.6)
40–50 years	62 (14.7)
50–60 years	16 (3.8)
>60 years	5 (1.2)
Pregnant at time of diagnosis (n = 214)	
Yes	17 (8.0)
No	196 (92.0)
Data not available	1 (<1)
Area of residence at diagnosis	
Paris area	85 (20.4)
Western or central France	66 (15.9)
Northern or northeastern France	103 (24.8)
Southeastern France or Corsica	99 (23.8)
Southwestern France	62 (14.9)
Other	1 (0.2)
Data not available	7 (<1)
Type of EAC diagnosis	
New diagnosis	266 (63.2)
Recurrent disease	155 (36.8)
Data not available	2 (<1)
Location of lesions^b	
Women (n = 214)	
Vulva	146 (68.2)
Perineum	91 (42.5)
Labia minora	39 (18.2)
Labia majora	24 (11.2)
Perianal region	64 (29.9)
Other	27 (12.6)
Men (n = 209)	
Penis	87 (41.6)
Prepuce	57 (27.3)
Glans	18 (8.6)
Preputial furrow	24 (11.5)
Coronna	9 (4.3)
Meatus	9 (4.3)
Perianal region	78 (37.3)
Other	51 (24.4)

NOTE. Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. EAC, external acuminata condylomata.

^a Equal numbers of men and women were recruited, although not all were enrolled.

^b Several locations were possible for each patient.

Prevalence of specific HPV genotypes. The most frequently encountered HPV genotypes were as follows, by decreasing order of frequency: HPV-6 (68%), HPV-11 (16%), HPV-16 (9%), HPV-51 (8%), HPV-52 (6.4%), and HPV-66 (5.7%) (table 3). DNA from HPV-6 and/or HPV-11 (alone or in asso-

Table 2. Prevalence of human papillomavirus (HPV) infection in external acuminata condylomata lesions, according to the low-risk and high-risk classification.

Variable	No. (%) of cases			P
	Men (n = 209)	Women (n = 214)	Total (n = 423)	
One or several low-risk genotypes (without high-risk genotypes)	152 (72.7)	112 (52.3)	264 (62.4)	<.001
One or several high-risk genotypes (without low-risk genotypes)	8 (3.8)	14 (6.5)	22 (5.2)	.21
Low- and high-risk genotypes	44 (21.0)	73 (34.1)	117 (27.7)	.003
Undetermined genotypes	4 (1.9)	11 (5.1)	15 (3.5)	.11
HPV negative	1 (0.5)	4 (1.9)	5 (1.2)	.37
Samples infected with ≥ 1 low-risk genotype (associated or not with any type of HPV)	196 (93.8)	185 (86.4)	381 (90.0)	.011
Samples infected with ≥ 1 high-risk genotype (associated or not with any type of HPV)	52 (24.9)	87 (40.7)	139 (32.9)	<.001

ciation with each other) was found in 56.7% of cases. DNA from these 2 genotypes was detected in combination with DNA from other HPV types in 26.5% of EAC cases, yielding an overall prevalence of HPV-6 and/or HPV-11 infection of 83.2%. Similarly, DNA from HPV-16 and/or HPV-18 (alone or in association with each other) was observed in 2.8% of specimens. DNA from HPV-16 and/or HPV-18 was further detected in combination with DNA from other HPV genotypes in 8.3% of EAC cases, yielding an overall prevalence of infection with HPV-16 and/or HPV-18 of 11.1%. DNA from HPV-6, HPV-11, HPV-16, and/or HPV-18 (alone or in association with each other) was observed in 63.1% of all cases of EAC. Finally, at least 1 of these 4 genotypes (alone or in combination with other genotypes) was found in 88.2% of cases.

Low-risk HPV genotypes 6 and/or 11 were found more frequently in men than in women (90.4% vs. 76.2%; $P < .001$). Conversely, high-risk HPV genotypes 16 and/or 18 were more common among women than among men (15.4% vs. 6.7%; $P = .004$).

DISCUSSION

This large, national, multicenter, prospective study reports the prevalence of specific HPV genotypes among patients with EAC in France. Because of the large number of participating health care centers and the good coverage of the national territory (all regions of the country were equally represented), our study provides a reasonable representation of EAC cases in France. The median age at inclusion observed in our study is somewhat higher than that reported in the United Kingdom, where first-attack anogenital warts were most often observed among persons aged 20–24 years [20]. This could be explained by our study's inclusion of recurrent EAC cases and exclusion of patients aged <18 years. Our results are indeed in accordance with a previous French study conducted in 2000 that involved 700 general practitioners who belonged to the Sentinelles network, in which recurrent cases were also included [6]. The difference in the median age observed between men and women (32 and

28 years, respectively) could be partly explained by the higher recurrence rate observed in men (45% vs. 29%). It is also possible that, because women undergo routine screening and follow-up with gynecologists, EAC cases are detected earlier in women than in men, for whom EAC is often diagnosed at sexually transmitted infection clinics or by dermatologists. This difference between men and women in age distribution was previously observed in the United Kingdom [20].

Seventeen percent of the initially included cases could not be analyzed, because no cellular DNA was found (i.e., the cases were β -globin negative). This proportion did not depend on the health care center and likely reflects the difficulty in retrieving cells from some EAC-associated samples. Most of the lesions were cutaneous and located in the perineum and perianal region in women and on the penis in men. Difficulties in the correct sampling of external genital organs, especially for men, have been reported elsewhere [11, 21]. We suggest that cutaneous lesions may be less adequate or productive than mucosal lesions for cell retrieval. Although the cytobrush was probably not the best tool for cell collection, it was surely the most appropriate, because it was noninvasive and represented an easy and acceptable sampling method for patients. In a review of genital HPV infection in men [22], the authors reported that, regardless of the type of cytobrush used, the proportion of β -globin-negative samples ranged from 16% to 26%, which is in accordance with our results (17%).

The higher proportion of recurrent EAC cases observed among men may have resulted from the different age distributions for men and women. In fact, in our study population, the recurrence rate increased with age. Another possible explanation for this higher proportion could involve the inclusion of male subjects with at-risk behaviors. For example, having multiple sex partners—a common situation among men who have sex with men—was shown to be associated with an elevated risk of EAC recurrence [23].

The observed overall prevalence of HPV infection of 99% suggests that EAC lesions almost never occur in the absence

q16

q17

Table 3. Prevalence of specific human papillomavirus (HPV) genotypes among 423 cases of external acuminata condylomata, by decreasing order of frequency.

HPV genotype	No. (%) of cases	
	Cases of single infection	All infections (single or multiple)
HPV-6	195 (46.1)	289 (68.3)
HPV-11	42 (9.9)	68 (16.1)
HPV-16	11 (2.6)	38 (9.0)
HPV-51	2 (0.5)	34 (8.0)
HPV-52	1 (0.2)	27 (6.4)
HPV-66	2 (0.5)	24 (5.7)
HPV-53	5 (1.2)	21 (5.0)
HPV-31	1 (0.2)	14 (3.3)
HPV-18	...	11 (2.6)
HPV-40	...	11 (2.6)
HPV-68	2 (0.5)	10 (2.4)
HPV-44	2 (0.5)	9 (2.1)
HPV-54	1 (0.2)	9 (2.1)
HPV-59	...	8 (1.9)
HPV-39	...	7 (1.7)
HPV-45	...	6 (1.4)
HPV-56	...	6 (1.4)
HPV-43	1 (0.2)	5 (1.2)
HPV-58	1 (0.2)	5 (1.2)
HPV-33	...	4 (0.9)
HPV-70	...	4 (0.9)
HPV-35	...	3 (0.7)
HPV-42	...	1 (0.2)
Undetermined	15 (3.5)	34 (8.0)
HPV negative	5 (1.2)	5 (1.2)

of HPV infection. In other studies that used the same methodology and genotype analysis method, we have previously shown that the prevalence of HPV infection is similarly high for other genital lesions—namely, those associated with invasive cervical cancer [24] and cervical intraepithelial neoplasia 2/3 [19]—but also in smears evocative of low-grade squamous intraepithelial lesions [25], with a prevalence of ~98%.

The analysis of the prevalence of specific HPV genotypes provides strong data regarding the distribution of HPV genotypes in EAC. It provides evidence that, in France, the most prevalent HPV genotypes in patients with EAC are HPV-6 and HPV-11. These 2 genotypes, either alone or in combination with other HPV genotypes, occur in 83% of cases. It has been suggested that low-grade lesions due to HPV-6 and HPV-11 have a very low risk of progression to malignancy, because these viruses do not integrate their DNA into the chromosome of the infected cells [26]. Nevertheless, our results indicate that 33% of all patients with EAC harbor high-risk HPV DNA. They represent productive lesions in which high-risk HPV DNA likely remains under episomal form. This allows a careful reg-

ulation of viral genes (in particular, E6 and E7 oncogenes are repressed), leading to the production of virions in the most differentiated layer of the epithelium [27]. Most of these infections will be controlled by an effective immune response, resulting in viral clearance. In some cases, however, HPV DNA will integrate into the chromosomes of the infected cells, resulting in cell immortalization. Subsequent cell transformation following expression of the HPV E6 and E7 oncogenes may then occur, leading to malignancy [28]. In our study, the proportion of persons with EAC who harbored high-risk HPV DNA was significantly higher among women than men (41% vs. 25%). This is probably related to the fact that high-risk HPV DNA is frequently encountered in women with cervical HPV infection [19, 24, 29]. Another possible explanation is the lower sampling quality of EAC lesions for men than for women [30, 31].

Low-risk and high-risk HPV genotypes share a common route of transmission. Thus, presence of EAC indicates HPV exposure and a risk of also being exposed to high-risk HPV. It has been reported that cervical cancer and cancer of the vulva, vagina, and penis share common causes and are related to genital warts [32]. Another study showed that men who have sex with men who have anal condylomata had a 50-fold higher risk of developing anal cancer [33]. EAC are typically benign lesions with a low risk of progression to invasive cancer but represent a clinical marker of risk of developing a high-risk HPV genotype-related malign lesion.

Because the incidence of EAC in France is high, and because the costs of treatment are considerable [7], preventing the occurrence of these lesions appears to be essential. Two multivalent HPV-L1 virus-like particle vaccines have been developed. One of the vaccines is directed against the most common cervical cancer-causing genotypes (genotypes 16 and 18) and the most common genital wart-causing genotypes (genotypes 6 and 11) and showed a 99% efficacy for the prevention of EAC [34]. With a 99% efficacy and a vaccine coverage of 100%, such a vaccine could prevent between 62% of EAC cases (i.e., those due to genotype 6, 11, 16, or 18, in the absence of another genotype) and 87% of EAC cases (99% × 88.2%) in France.

A cost-effectiveness analysis conducted in France reported that adding a quadrivalent HPV vaccine (given to girls at age 14 years) to the current screening program was a cost-effective strategy for reducing the burden of cervical cancer, precancerous lesions, and genital warts caused by HPV genotypes 6, 11, 16, and 18 [35]. Another study that attempted to estimate the impact of HPV vaccination on the incidence of genital warts reported that, if quadrivalent HPV vaccine was widely used in both male and female subjects, the incidence of this disease could decrease by as much as 97% [36]. Our results could support the recommendation of HPV vaccination for persons

q18

q19

q20

of both sexes. However, the health benefits and economic impact of such a strategy should be further evaluated.

Acknowledgments

We gratefully thank Rama Kane (Sanofi Pasteur) for her precious help, Ludivine Ragot (THERAPHARM Recherches; Boulogne Billancourt, France) for data management and analysis, Nubia Muñoz for critically commenting the manuscript, and all members of the EDiTH Study Group, including gynecologists, dermatologists and proctologists, who actively participated in EAC collection

Financial support. Région de Franche Comté, the Institut National du Cancer, and Sanofi Pasteur. M.S. is the recipient of a predoctoral scholarship from Région de Franche Comté.

Potential conflicts of interest. J.-L.P., X.C., and D.R. have served as consultants to Sanofi Pasteur. All other authors: no conflicts.

References

1. Koutsky LA, Galloway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* **1988**;10:122–63.
2. Lyttle PH. Surveillance report: disease trends at New Zealand sexually transmitted disease clinics 1977–1993. *Genitourin Med* **1994**;70:329–35.
3. Persson G, Andersson K, Krantz I. Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture. *Acta Obstet Gynecol Scand* **1996**;75:287–90.
4. Simms I, Fairley CK. Epidemiology of genital warts in England and Wales: 1971 to 1994. *Genitourin Med* **1997**;73:365–7.
5. Koshiol JE, Laurent SA, Pimenta JM. Rate and predictors of new genital warts claims and genital warts-related healthcare utilization among privately insured patients in the United States. *Sex Transm Dis* **2004**;31:748–52.
6. Lukasiewicz E, Aractingi S, Flahault A. Incidence and management of condylomata acuminata by French general physicians [in French]. *Annales de Dermatologie et de Venerologie* **2002**;129:991–6.
7. Monsonego J, Breugelmanns JG, Bouee S, Lafuma A, Benard S, Remy V. Anogenital warts incidence, medical management and costs in women consulting gynaecologists in France [in French]. *Gynecol Obstet Fertil* **2007**;35:107–13.
8. Dupin N. Genital warts. *Clin Dermatol* **2004**;22:481–6.
9. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* **2006**;24(Suppl 1):S1–15.
10. Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* **1996**;174:679–89.
11. Hippelainen M, Syrjanen S, Hippelainen M, et al. Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finnish conscripts. *Sex Transm Dis* **1993**;20:321–8.
12. Wiley DJ, Harper DM, Elashoff D, et al. How condom use, number of receptive anal intercourse partners and history of external genital warts predict risk for external anal warts. *Int J STD AIDS* **2005**;16:203–11.
13. Harper DM. Why am I scared of HPV? *CA Cancer J Clin* **2004**;54:245–7.
14. Alam M, Stiller M. Direct medical costs for surgical and medical treatment of condylomata acuminata. *Arch Dermatol* **2001**;137:337–41.
15. Wiley D, Masongsong E. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv* **2006**;61:S3–14.
16. 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.
17. Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in *Condylomata acuminata* lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3316–22.
18. Potocnik M, Kocjan BJ, Seme K, Poljak M. Distribution of human papillomavirus (HPV) genotypes in genital warts from males in Slovenia. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* **2007**;16:91–6, 98.
19. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer* **2008**;122:424–7.
20. Trends in anogenital warts and anogenital herpes simplex virus infection in the United Kingdom: 1996 to 2005. *CDR Wkly* **2006**;16:1–4.
21. Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, et al. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis* **2007**;196:1128–36.
22. Partridge JM, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection in men. *Lancet Infect Dis* **2006**;6:21–31.
23. Van Den Eeden SK, Habel LA, Sherman KJ, McKnight B, Stergachis A, Daling JR. Risk factors for incident and recurrent condylomata acuminata among men: a population-based study. *Sex Transm Dis* **1998**;25:278–84.
24. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer* **2008**;122:428–32.
25. Pretet JL, Jacquard AC, Saunier M, et al. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade squamous intraepithelial lesions in France and comparison with CIN2/3 and invasive cervical cancer: the EDiTH III study. *Gynecol Oncol* **2008** [Epub ahead of print].
26. Ferenczy A. Epidemiology and clinical pathophysiology of condylomata acuminata. *Am J Obstet Gynecol* **1995**;172:1331–9.
27. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **2006**;110:525–41.
28. Wise-Draper TM, Wells SI. Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* **2008**;13:1003–17.
29. Dalstein V, Riethmuller D, Sautiere JL, et al. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population: benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* **2004**;40:1225–32.
30. Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, et al. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J Infect Dis* **2007**;196:1146–52.
31. Nielson CM, Flores R, Harris RB, et al. Human papillomavirus prevalence and type distribution in male anogenital sites and semen. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**;16:1107–14.
32. Schmauz R, Owor R. Epidemiological aspects of cervical cancer in tropical Africa. *IARC Sci Publ* **1984**;413–31.
33. Daling JR, Weiss NS, Hislop TG, et al. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. *N Engl J Med* **1987**;317:973–7.
34. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine* **2006**;24:5571–83.
35. Bergeron C, Langeron N, McAllister R, Mathevet P, Remy V. Cost-effectiveness analysis of the introduction of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in France. *Int J Technol Assess Health Care* **2008**;24:10–9.
36. Elbasha EH, Dasbach EJ, Insinga RP. Model for assessing human papillomavirus vaccination strategies. *Emerg Infect Dis* **2007**;13:28–41.

q21

q22

Publication n°7

HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN

Jenny Briolat^{1,2}, Véronique Dalstein^{1,2,3}, Maëlle Saunier⁴, Karine Joseph¹, Stéphanie Caudroy^{1,2,3}, Jean-Luc Prétet⁴, Philippe Birembaut^{1,2,3} and Christine Clavel^{1,2,3*}

¹CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Laboratoire Pol Bouin, Reims, F-51100 France

²Inserm UMRS 514, Reims, F-51100 France

³Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Médecine Reims, F-51100 France

⁴Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, IFR 133, EA 3181, Besançon, F-25000 France

Human papillomavirus (HPV) infection is the most important event in malignant transformation of human cervical epithelium. We analysed in cervical smears, HPV genotypes with a focus on single/multiple infections, then characteristics of HPV-16 infections (presence of other genotypes, viral load and physical state) according to the grade of histological lesions. The purpose of this study was to know if these parameters could allow to differentiate histological diagnoses. DNA was extracted from 363 cervical samples corresponding to 24 cases without lesion, 96 CIN1, 92 CIN2, 144 CIN3 and 7 cancers. Our results show that HPV-16 was predominant and its prevalence increased with the severity of lesions (CIN1: 27.1%; CIN3: 65.3%). In addition, we showed that the frequency of single infections, as compared with multiple infections, increased with the severity of the lesion (CIN1: 25.0%; CIN3: 54.8%). Among HPV-16 positive samples ($n = 170$), we found that viral load, determined on cervical samples by real-time PCR, did not vary significantly according to the different CIN grades. Concerning HPV-16 integration, the mixed and integrated HPV-16 forms, already present in women with normal histology, increased to the benefit of pure episomal forms with the severity of lesions (normal cervix: 28.6%; CIN3: 73.8%). Thus, our data raise the question of the viral load as a valuable clinical parameter to discriminate between lesion grades. Moreover, we emphasize integration as an early event in cervical carcinogenesis, increasing with the severity of lesions. Finally, this study underlines the importance of single versus multiple infections linked to the severity of CIN.

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: HPV; cervical cancer; genotyping; viral load; viral DNA integration

Cervical cancer is the second most frequent malignant tumour of women worldwide. The recognized association of human papillomaviruses (HPV) as the most significant etiological factor in cervical cancer is now well established.^{1,2} More than 40 genotypes infect the anogenital area and are associated with a large spectrum of diseases from benign proliferation to invasive cancers. The low-risk (LR-) HPV are linked to benign lesions whereas high-risk (HR)-HPV, principally types 16 and 18, are associated with malignant lesions. The most common HR-HPV type in squamous cell cervical cancer is HPV-16, found in over 50% of the cases.^{3,4}

Recent studies have suggested that HR-HPV viral load, notably for HPV-16, may be a molecular biomarker of risk for developing cervical (pre-) cancerous lesions. Indeed several studies found a high correlation between high viral load and HSIL (High grade Squamous cell Intraepithelial Lesion)^{5–8} whereas other reports concluded that there was no correlation.^{9–13} Also, despite multiple investigations, using various study designs and methodologies, the clinical utility of HR-HPV load remains unclear.

The physical status of HR-HPV in pre-neoplastic cervical lesions may be a further promising marker for the progression to cervical cancer. Molecular biological studies have shown that HPV DNA is in an episomal state during a common infection or in most pre-malignant lesions,¹⁴ but in an integrated state or in both integrated and episomal states in most cervical carcinomas and in cell lines derived from these carcinomas.^{15,16} The disruption of the E2 gene during viral integration results in a loss of its function as a regulator of the viral oncogenes expression¹⁷ and a sub-

sequent up-regulation of E6/E7 gene transcription. E6 and E7 oncoproteins deregulate cell-cycle control through interaction with different cell cycle proteins, respectively tumor suppressor gene products p53 and retinoblastoma protein (Rb), thereby initiating the transformation and immortalization of HPV-infected cells.^{18,19} Thus, the physical state of HPV may be used as an early marker of cervical lesion for the follow-up of patients with chronic infection.

In the present study, our aim was to characterize the type-specific prevalence of HR-HPV types, notably HPV-16, the presence of single versus multiple HPV infections, HPV-16 viral load and HPV-16 physical status in 363 HPV positive DNA cervical smears corresponding to lesions of different histological grades.

Material and methods

Clinical samples

We selected a population of 363 women with a HR-HPV infection presenting lesions from ASC-US to HSIL at cytology according to the Bethesda classification (26 ASC-US, 29 ASC-H, 3 AGC, 98 LSIL, 178 HSIL) and 29 cases without any detectable lesion but with a prolonged recurrent HR-HPV infection (from 9 to 35 months, mean = 19 months). All these women had a histological control from multiple histological biopsies to cone biopsies showing as normal cervix (24 cases), CIN1 (96 cases), CIN2 (92 cases), CIN3 (144 cases) and invasive carcinoma (7 cases). The histopathologist had no access to initial cytology interpretations nor to HPV testing results.

All molecular analyses were performed on the liquid-based cervical samples collected in PreservCyt Medium (ThinPrep, Cytoc Corp, Marlborough, Mass) and tested initially positive with the HCII assay.

HPV testing with hybrid capture 2 assay

After slide preparation for cytological examination, 4 mL of the remaining samples were centrifuged and the cell pellet was resuspended in 200 μ L of phosphate-buffered saline for HPV testing.

Abbreviations: ASC-US, atypical squamous cells of undetermined significance; ASC-H, atypical squamous cells, cannot exclude HSIL; CIN, cervical intraepithelial lesion; HPV, human papillomavirus; HR-HPV, high risk human papillomavirus; HSIL, high grade squamous intraepithelial lesion; LSIL, low grade squamous intraepithelial lesion.

Original study on 363 women with cytology and a systematic histological control, addressing the interest of viral load, physical status of HPV-16 and single/multiple HPV infections on liquid-based cytology samples as diagnostic markers associated with different grades of histological lesions.

Grant sponsors: Cancéropôle Grand-Est, the Région Champagne-Ardenne, the association "Un Euro contre le Cancer" and the Lion's Clubs of Soissons and Villers-Cotterets.

*Correspondence to: Laboratoire Pol Bouin, Hôpital Maison Blanche, CHU Reims, 45 Rue Cognacq-Jay, F-51100 REIMS. Fax: +33.3.26.78.77.39. E-mail: cclavel@chu-reims.fr

Received 26 December 2006; Accepted after revision 16 May 2007

DOI 10.1002/ijc.22959

Published online 26 July 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

TABLE 1 – SEQUENCES OF PRIMERS AND PROBES USED FOR REAL-TIME PCR TO DETERMINE THE HPV16 PHYSICAL STATE

Primer name	Sequence 5'-3'	Nb of bases
16E2F	AAC GAA GTA TCC TCT CCT GAA ATT ATT AG	29
16E2R	CCA AGG CGA CGG CTT TG	17
16E6F	GAG AAC TGC AAT GTT TCA GGA GC	23
16E6R	TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCT GTG C	25
16E2-PRO	Texas Red-CAC CCC GCC GCG ACC CAT A-BHQ-2	19
16E6-PRO	6-FAM-CAG GAG CGA CCC AGA AAG TTA CCA CAG TT-BHQ-1	29

For the episomal state, E2 primers and a probe for the episomal viral load were used. For the integrated and episomal states together, E6 primers and a probe for the total viral load were used. F, forward primer; R, reverse primer; BHQ, Dark Quencher, 6-FAM, 6-carboxyfluorescein.

HPV DNA detection was performed by the commercially available hybrid capture 2 (HCII) System (Digene, Gaithersburg, MD). All scrapes were analysed for the global presence of HR-HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68. Samples were classified as positive for HR-HPV DNA if the relative light unit (RLU) reading obtained from the luminometer was equal or greater than the mean value of a triplicate of positive control supplied with the HCII kit. As some authors have reported that increasing HPV DNA levels of the HR-HPV types were the principal predictors of CIN,²⁰ we used, as proposed, the ratio RLU/positive controls values to quantify HR-HPV DNA in our samples.

Extraction of DNA from cervical smears

DNA extraction was performed with the EZ1 DNA tissue kit (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) and the BioRobot EZ1 (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were lysed using proteinase K at 56°C for 3 hr and extractions were realized in an elution volume of 200 µL.

Linear array HPV genotyping test

The linear array (LA) HPV genotyping test (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) is a qualitative *in vitro* test for the determination of 37 HPV DNA genotypes (15 HR-HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82, 3 potentially HR-HPV, 26,53,66 15 LR-HPV 6, 11, 40, 42, 54, 55, 61, 64, 67, 69, 70, 72, 81, IS39 and CP6108) and 4 HPV at indeterminate risk. 62,71,83,84

PCR amplification of HPV DNA: The LA test uses biotinylated PGMY primers to amplify a 450 bp fragment within the polymorphic L1 region of the HPV genome. The PGMY amplification system has been described previously.²¹ An additional primer pair targets the human β -globin gene (268 bp amplicon) to provide a control for cell adequacy, extraction and amplification. PCR was performed in a final reaction volume of 100 µL, containing 50 µL HPV master mix, 40 µL DNase-RNase-free water, and 10 µL isolated DNA. The mixture was incubated as described by the manufacturer. DNase-RNase-free water as negative control and DNA extracted from baculoviruses having integrated different known HPV types as positive controls were included in each PCR run of 24 samples to assess the validity of the reaction.

Hybridization and detection: Following amplification, the HPV and human β -globin amplicons were denatured by immediately adding 100 µL of denaturation solution to each PCR tube. The strips were manually interpreted using the LA HPV reference guide, by reading the individual types down the length of the strip.

Real-time PCR

The determination of HPV-16 physical status and quantification of albumin gene using Taqman probes, were performed on the iCycler iQTM (BIO-RAD, Marne-la-Coquette, France), using the qPCRTM Mastermix-No ROX (EUROGENTEC, Seraing, Belgium) in a 50 µL final volume. The data collected with the iCycler

iQTM were analyzed with the iCycler iQTM Real-time PCR Detection System Software version 3.0A (BIO-RAD).

Detection of HPV-16 physical status. Real-time PCR for HPV-16 E2 and E6 was performed as described elsewhere²² except that the E6 and E2 probes were labelled with 6-FAM and Texas-Red at the 5' end, respectively (EUROGENTEC, Seraing, Belgium). The primers' sequences are provided in Table I. Briefly, a PCR was carried out in a 50 µL reaction volume containing 1X qPCRTM Mastermix-No ROX (EUROGENTEC, Seraing, Belgium) and 50 ng of target DNA from cervical smears. The amplification conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and a two-steps cycle of 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec for a total of 45 cycles. The final primers and probes concentrations, in a total volume of 50 µL, were 0.3 and 0.1 µM, respectively. Two standard curves were obtained by amplification of a dilution series of 5 million to 500 copies of an HPV-16 plasmid provided by the BIO-RAD Company. At least 2 no-template control reaction mixtures (water) and 2 controls of SiHa cell line were included in each run. All experiments were performed twice in duplicate. The results were recorded as copy numbers in 50 ng of total DNA. Assignment of integrated, mixed or episomal physical status was calculated for each clinical sample as proposed elsewhere.²² This calculation assumed that E2 and E6 gene segments are present in equivalent proportions within each episomal HPV genome and that integrated HPV genome forms would have the E2 target deleted or absent. Thus, integration was determined by subtracting the copy numbers of E2 (episomal) from the total copy numbers of E6 (episomal and integrated). The ratio of episomal E2 gene target to the integrated E6 gene target represents the amount of the HPV episomal form in relation to the integrated form. Integration was defined by absence of the E2 signal or ratios of 0.001–0.003. Ratios of less than 1 (range, 0.004–0.99) indicated the presence of both integrated and episomal forms, and ratios of greater than 1 (range, 1.00–2.01) indicated a predominance of episomal forms.

Determination of viral load. Each DNA sample was submitted to an albumin real-time PCR, twice in duplicate, in order to determine the number of cells. Quantification of human albumin gene was performed as previously described.²³ 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 152,000; 15,200; 1,520; 152; 15.2 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) (Table II). The albumin reaction was carried out in a final volume of 50 µL containing 1X qPCRTM Mastermix-No ROX (EUROGENTEC, Seraing, Belgium), 0.1 µM each primer, 0.1 µM Taqman probe and 5 µL of DNA corresponding to 50 ng of cellular DNA. Thermal cycling consisted in a step of 10 min at 95°C in order to activate the DNA polymerase, followed by 45 two-steps cycles of 15 sec at 95°C and 60 sec at 65°C.

Data analysis

Quantitative variables were presented as mean values \pm standard errors. To assess the relation between the different histological

TABLE II – SEQUENCES OF PRIMERS AND PROBE USED FOR REAL-TIME PCR TO AMPLIFY THE ALBUMIN GENE

Primer name	Sequence 5'-3'	Nb of bases
Alb-F	GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T	22
Alb-R	ACT CAT GGG AGC TGC TGG TTC	21
Alb-PRO	6-FAM -GGA GAG ATT TGT GTG GGC ATG ACA GG- BHQ-1	26

F, forward primer; R, reverse primer; BHQ, Dark Quencher, 6-FAM, 6-carboxyfluorescein.

TABLE III – CORRELATION BETWEEN CYTOLOGY AND HISTOLOGY FINDINGS

	Cytological diagnosis	Histological diagnosis		
		Normal-CIN1 (n=120)	CIN2+ (n=243)	Total (n=363)
	Normal	14	15	29
	ASC-US	14	12	26
	ASC-H	8	21	29
	AGC	0	3	3
	LSIL	64	34	98
	HSIL	20	158	178
	Good correlation (%)	76.7	74.9	75.5
	Underestimated cytological diagnosis (%)	0	25.1	16.8
	Overrated cytological diagnosis (%)	23.3	0	7.7

Dark grey: overrated diagnoses; Pale grey: underestimated diagnoses.

lesions and their potential determinants, Pearson χ^2 tests and Fisher's exact tests were used for qualitative variables (age group, multiple infections, HPV-16 presence, HPV-16 physical status). For quantitative variables (age, HC2 RLU and HPV-16 viral load), comparisons were assessed with Student's *t*-tests, two-samples Wilcoxon rank-sum tests and one-way variance analysis. All analyses were carried out using the STATA Statistical Software (Release 5.0; StataCorp. 1997, College Station, TX).

Results

Correlation between cytology and histology findings

The study comprised 363 cases, all positive with the HCII assay. The relationships between cytological and histological diagnoses are summarized in Table III. There was 74.9% of good correlation between cytology and histology findings for CIN2+ diagnosis (CIN2,-3 and cervical cancer) and a rate of 76.7% of good correlation for Normal-CIN1 diagnosis. In 25.1% of CIN2+ cases, cytological diagnosis underestimated the severity of lesions. By contrast, in 23.3% of Normal-CIN1 cases, the cytological diagnosis overrated the severity of lesions. In all these cases, multiple biopsies and cone biopsies were performed excluding a CIN2+ lesion. Moreover, in the follow-up of these women, no CIN2+ appeared and most of the cytological lesions disappeared. Thus, for the subsequent analysis, assuming that histology is accurate, only histological diagnoses were considered.

Relationship between age and cervical lesions

The mean age was 38.5 ± 3.3 years in 24 women with normal histology, 32.3 ± 1.2 in 96 women with CIN1, 34.8 ± 1.1 in 92 women with CIN2, 36.0 ± 0.9 in 144 women with CIN3 and 48.4 ± 3.7 in 7 women with cervical cancer. To be noticed, our population was older than the average ages of acute HPV infection. There was a significant association between the age of patients and increasing severity of cervical lesions ($p = 0.007$).

HPV genotyping

The frequencies of main types of HR-HPV in normal-CIN1 group and CIN2+ group, are summarized in Figure 1. The most prevalent HR-HPV types in this study were: HPV-16 (46.8%), HPV-31 (18.7%), HPV-51 (14.9%), HPV-58 (8.5%), HPV-56

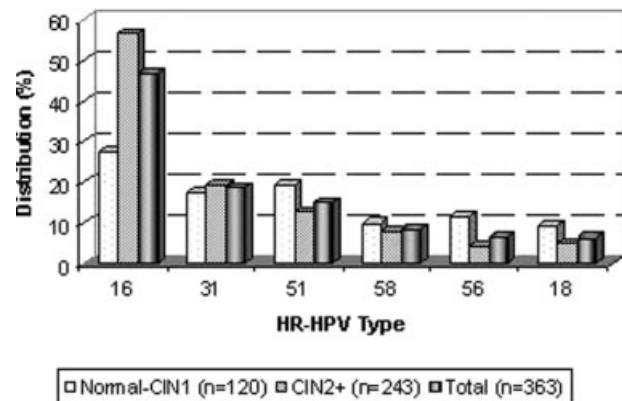


FIGURE 1 – Distribution of HR-HPV types in 363 women with different histological diagnosis. The prevalence of HR-HPV was estimated as percentage of the total number of HPV infections observed in this sample set ($n = 363$).

(6.6%) and HPV-18 (6.3%). The prevalence for the other types was low. As expected, HPV-16 predominated and its prevalence increased statistically with the stages of histological lesions: 29.2% for patients with normal histology, 27.1% for patients with CIN1, 42.4% for patients with CIN2 and 65.3% for patients with CIN3 ($p = 0.001$).

Concerning the LR-HPV, the distribution was HPV-42 (6.3%), HPV-61 (6.1%) and HPV-54 (5.2%), other types being much less common.

In 18 samples (5%), only LR-HPV could be detected with the LA genotyping test while HCII detected HR-HPV. These discrepancies are in accordance with the general data of the literature and are attributed to cross-reactions.

Single/multiple HPV infections

To determine single/multiple infection, we did not consider HPV-52 because the genotyping kit of Roche Diagnostic does not permit to discriminate HPV-52 only. Furthermore, we ranged

TABLE IV – FREQUENCY OF SINGLE AND MULTIPLE INFECTIONS ACCORDING TO THE HISTOLOGICAL DIAGNOSIS

Histological diagnosis	A (n)	%	B (n)	%	C (n)	%	D (n)	%	E (n)	%	F (n)	%	Total
Normal	6	25.0	2	8.3	2	8.3	1	4.2	9	37.5	4	16.7	24
CIN1	22	22.9	17	17.7	5	5.2	3	3.1	29	30.2	20	20.9	96
CIN2	39	42.4	11	11.9	4	4.3	1	1.1	18	19.6	19	20.7	92
CIN3	79	54.8	23	16.0	2	1.4	0	0	21	14.6	19	13.2	144
Cancer	5	71.4	1	14.3	0	0	0	0	0	0	1	14.3	7
Total	151	41.6	54	14.9	13	3.6	5	1.4	77	21.2	63	17.3	363

A: Samples with one HR-HPV; B: More than one HPV-HR; C: One LR-HPV; D: More than one LR-HPV; E: One HR-HPV and one or more than one LR-HPV; F: More than one HPV-HR and more than one HPV-LR.

TABLE V – FREQUENCY OF SINGLE AND MULTIPLE INFECTIONS IN HPV-16 SAMPLE, ACCORDING TO THE HISTOLOGICAL DIAGNOSIS

Histological diagnosis	A (n)	%	B (n)	%	C (n)	%	D (n)	%	E (n)	%	Total
Normal	4	57.1	0	0	0	0	2	28.6	1	14.3	7
CIN1	5	19.2	2	7.7	7	26.9	6	23.1	6	23.1	26
CIN2	15	38.5	4	10.3	1	2.6	6	15.4	13	33.3	39
CIN3	49	52.1	4	4.3	12	12.8	13	13.8	16	17.0	94
Cancer	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Total	77	45.3	10	5.9	20	11.8	27	15.9	36	21.2	170

A: Samples with HPV-16 only; B: HPV-16 with an other HR-HPV; C: HPV-16 with more than one other HR-HPV; D: HPV-16 with one or more LR-HPV; E: HPV-16 with more than one HR-HPV and more than one LR-HPV.

HPV potentially at high risk and HPV at indeterminate risk in the LR-HPV category.

As shown in Table IV, out of the 363 samples, 151 (41.6%) were defined as single infections (with one HR-HPV only). Interestingly, the frequency of single infections with HR-HPV significantly increased with the severity of lesions: 22 (22.9%) of 96 women with CIN1, 39 (42.4%) of 92 with CIN2, 79 (54.8%) of 144 with CIN3 and 5 (71.4%) of 7 with cervical cancer ($p = 0.001$). By contrast, the frequency of LR-HPV decreased with the severity of lesions. In the same way, the prevalence of multiple infections whatever the genotypes (LR- and HR-HPV) decreased with the severity of lesions.

Since HPV-16 infections predominated and increased with histological grades, we analyzed subjects with specific HPV-16 infection (Table V). As previously shown, the rate of single HR-HPV infection increased with the importance of lesions: 5 (19.2%) of 26 women with CIN1, 15 (38.5%) of 39 with CIN2, 49 (52.1%) of 94 with CIN3 and 4 (100%) of 4 with cervical cancer ($p = 0.0001$).

HR-HPV DNA amounts measured by the HCII assay

In our study, HR-HPV DNA levels did not correlate positively with the severity of CIN. By contrast, we obtained a mean value of 429 ± 136 RLU/CO for patients without histological lesions, an increase of this value for patients with CIN1 lesions (806 ± 99 RLU/CO) and then a decrease for patients with high grade lesions (CIN2: 536 ± 76 , CIN3: 463 ± 52 RLU/CO). The value obtained for CIN1 lesions was significantly higher than for the other groups ($p = 0.025$). When considering single versus multiple infections, we could not find any significant difference.

HPV-16 viral load estimated by quantitative real-time PCR

Among the 170 HPV-16 positive samples, 122 (72%) were available for viral load measurement. As expected, the lowest viral load values were observed for patients with normal histology with a mean viral load of $2,114 \pm 1,615$ copies/100 cells ($n = 7$). On the other hand, there was no important change in the mean viral loads according to the severity of lesions: $113,168 \pm 70,878$ ($n = 15$) for CIN1; $122,023 \pm 80,770$ ($n = 32$) for CIN2; $122,764 \pm 41,365$ ($n = 65$) for CIN3. However, there was a slight decrease in viral load value for women with cervical cancer ($76,519 \pm 50,057$ copies/100 cells, $n = 3$). Overall, women without any lesion at

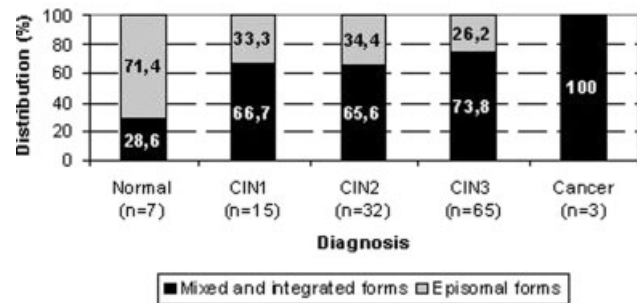


FIGURE 2 – Distribution of HPV-16 physical status according to histological diagnosis.

histology or with CIN1 were found to have lower HPV-16 viral loads ($77,833 \pm 49,103$, $n = 22$) than women with CIN2+ ($121,140 \pm 37,079$, $n = 100$) ($p = 0.011$). There was a slight difference in HPV-16 viral load values when HPV-16 was found as a single HPV type ($95,028 \pm 39,151$, $n = 50$) or was associated with other HPV types ($126,040 \pm 46,334$, $n = 72$) ($p = 0.06$).

Physical status of HPV-16

As for HPV-16 viral load, physical status has only been assessed in 122/170 HPV-16 positive samples, and results were considered as pure episomal forms versus mixed and integrated forms. In women with normal histology, pure episomal forms predominated (71.4%, 5/7), whereas they accounted for only 26.2% (17/65) in women with CIN3 (Figure 2). Moreover, only 3 pure integrated forms were found and they were limited to CIN2 and CIN3 lesions. Overall, we found a decrease of the pure episomal forms to the benefit of mixed and pure integrated forms, as the grade of the lesion increased. This association between physical status and lesion severity was not found to be statistically significant ($p = 0.093$), but one can argue that this was due to a lack of power due to the very small size of the normal group ($n = 7$).

Discussion

Our study is a transversal approach addressing the interest of HPV genotyping, HPV-16 presence, its viral load and its physical

status related to histological grade lesions. We considered only the final histological diagnosis even if there were some discrepancies between cytology and histology (16.8% of underestimation and 7.7% of overestimation) in our series. The histological controls (multiple biopsies and cone biopsies) and the subsequent follow-up strengthen our choice to evaluate the various parameters for predicting a CIN2+.

For each cervical lesion, except for cervical cancer, the most prevalent HR-HPV types were -16, -31 and -51. Our findings are in agreement with those reported in the meta-analyses of Clifford *et al.*^{24,25} In another hand, the prevalence of HPV-18 in our series was relatively low as compared to other studies,²⁶ maybe because of the limited number of cancer cases. Whatever the lesions observed, the differences in the relative prevalence of HPV types might be also related to the complex geographical and biological interplay between different HPV types or variants and host immunogenetic factors (HLA polymorphisms).²⁷ Our genotyping results revealed a single HR-HPV type infection in 41.6% of cases. Currently, there is a lack of consensus within the literature about the extent and implications of single and multiple HPV infections, with a reported prevalence of multiple infections varying from 17.5% in a gynaecological referral clinic population²⁸ to 46% in cancer biopsies²⁹ and 58.9% in women with low grade lesions.³⁰ In our study, multiple HPV infections were more frequently found in women with CIN1, these women being also the youngest. This observation suggests that a greater sexual activity of younger women may be associated with sexual transmission of multiple HPV types. Moreover, our data plead in favour of the transient nature of the majority of multiple HPV infections, since we observed a significantly higher prevalence of single HR-HPV infections in the most severe cervical lesions (54.8% in CIN3 and 71.4% in carcinomas). In a similar manner, in women with HPV-16 infection, the number of single HPV-16 infection does not cease augmenting with the worsening of lesions (19.2% in CIN1; 52.1% and 100% in CIN3 and carcinomas, respectively). Thus, a single infection, especially with HPV-16, may select a population already having CIN2+.

Several studies have reported the association of a high viral load with the risk for cervical cancer and its precursors. A large bunch of studies used the HCII assay to measure viral load, and while some found viral load to be positively associated with an increased risk for prevalent or incident disease,^{31,5,6} others did not.^{9,32} Studies using quantitative PCR (q-PCR) to determine HPV load have more consistently demonstrated an association between viral load and evolution of lesions.³³⁻³⁵ In our study, we explored the relationship between HR-HPV viral load and CIN severity using 2 different methods: HCII assay and q-PCR for HPV-16. In agreement with other investigators,^{10,36,11} we did not find any significant correlation between RLU ratio and severity of CIN lesions but, like Tsai *et al.*³⁷ and Sherman *et al.*,¹¹ we observed a slight decrease of HR-HPV DNA load with progression of CIN lesion. This fact could be explained by a productive infection with high levels of viral replication in the early development of CIN lesions. So, in our experience, the HCII assay for the assessment of the viral load could not clearly distinguish among cases with CIN2+. One major bias of the HCII viral load is that this test does not provide an evaluation of the cell numbers, which can vary substantially from 1 sample to another. Moreover, the global high viral load detected by HCII is rather confusing, since it may represent single or multiple HPV types among the 13 high-risk types detected by the kit. However, even when we considered only the single infections, we failed to detect any significant differences. Thus, in our hands, HR-HPV DNA load levels determined by HCII in PreservCyt samples cannot be used as a discriminating parameter for the diagnosis. Using an HPV-16 specific q-PCR, we found that the average of HPV-16 copies per 100 cells were not significantly different in the CIN1, -2 and -3 cases. However, the viral load estimated in women with normal histology, presented a significant lower value than women with cervical neoplasia. Thus, in our present series, the HPV-16 viral load presented a limited

value for diagnostic purpose. Supporting our conclusion, in an elegant study, Sherman *et al.*¹¹ underlined 2 limits at the viral load determination on liquid-based cytology samples: (i) variability in the severity, extent and HPV DNA content of lower grade lesions surrounding the lesion diagnosed as the most severe pathology present, (ii) the intrinsic characteristics of exfoliated specimens obtained by scraping, which necessarily consist mainly of surface epithelium.

In most cervical immortalized cells, HR-HPV DNA often integrates into the host cell genome. This integration is processed by disrupting some part of E2 gene^{16,18} causing overexpression of the E6 and E7 proteins.^{38,39} Most authors agree with the hypothesis that the integration of the HPV genome takes place very early in the development of cancer. Indeed, Gallo *et al.*⁴⁰ and Do Horto *et al.*⁴¹ reported early integration of HPV-16 DNA in 54% and 43% of LSIL cases, respectively. Andersson *et al.*⁴² also found mixed forms of HPV-16 in CIN1. By contrast, Hudeslist *et al.*⁴³ reported that in normal epithelium and in CIN1 and CIN2, HPV-16 and HPV-18 were exclusively found in the episomal form. In our experience, we also observed an early viral integration in normal epithelium and CIN1 but a near-to-significance correlation between the physical state of viral DNA and the increasing grade of cervical neoplasia (71.4% of episomal forms in normal histology vs. 26.2% in CIN3 lesions). Moreover, the rare fully integrated forms were limited to CIN2 and CIN3. Contrary to many studies, we found a low proportion of cases with complete integration (only 2 cases out of 65 CIN3 and 1 case out of 32 CIN2). The frequency of viral integration varies between the reports and may be explained by differences in the technical approaches employed. For example, we cannot exclude that HPV-16 integration, detected by the method of Peitsaro *et al.* that we used, may be underestimated when it is associated with deletions outside an intact E2 ORF. However, our present data show that if integration of HPV-16 is an early event in cervical carcinogenesis, even present in normal cervical samples, the prevalence of mixed and integrated forms is higher in CIN3 and in carcinomas (respectively 73.8% and 100%). The role of viral DNA integration into the host genome as a major event leading to malignant transformation of dysplastic cervical epithelium is still discussed. In fact, this phenomenon seems to be HPV type-dependant. Indeed, Ho *et al.*⁴⁴ showed that in patients with cervical cancer, the mixed and integrated forms of HPV-52 and -58 was found in 25.0% and 12.5% of swabs, respectively, while OHPV-16 and -18 was found in 82.6% and 100% of swabs, respectively. In addition, Van Tine *et al.*⁴⁵ demonstrated that numerous integrated viral DNA copies are transcriptionally inactive, the DNA methylation being partially responsible for transcription silencing. At last, although an accumulation of integrated HPV genome was observed at few loci, a general integration hot spot could not be identified except for the common fragile sites. The cause for HPV integration seems to be rather related to the accessibility of these fragile genomic areas than due to selection of clones that harbour integrated HPV in regions with tumour relevant genes.^{46,47} So, the viral integration of HR-HPV types does not seem to be a critical prerequisite in the development of cervical cancer.

In conclusion, our study, performed on a large number of cervical smears with a systematic histological control, shows that the RLU/CO value seems not to be an adequate marker for discriminating cervical lesions. Also, the viral load of HPV-16, determined by quantitative real-time PCR is of limited value for the diagnosis. HPV-16 genome integration occurs at an early step and we observed an increase of mixed and integrated forms with the severity of lesions. Nevertheless, the lack of significance for the discrimination of lesion grades with this parameter suggests that it could not be adequate for triage in a cost-effective fashion. At last, we emphasize the importance of a single HR-HPV infection associated with CIN2+. The interest of this parameter for the follow-up of infected women has to be evaluated in longitudinal studies.

Acknowledgements

We thank Pr. Christian Quéreux and the gynaecologists of his group and all the women who participated in this study. We

thank Marie Martin, Isabelle Puteaud, Christelle Mangeonjean and Claire Kiletzky, for excellent technical assistance. We thank the Bio-RAD company for assistance with HPV-16 plasmids.

References

- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244–65.
- Zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:F55–F78.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. 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.
- Munoz N, Bosch FX, de SS, 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.
- Sun CA, Lai HC, Chang CC, Neih 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;83:95–99.
- 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.
- Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 1994;69:167–71.
- Beskow AH, Gyllensten UB. Host genetic control of HPV 16 titer in carcinoma in situ of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2002;101:526–31.
- Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, Rush BB, Gravitt PE, Schussler JE, Schiffman M. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002;360:228–9.
- Bory JP, Cucherousset J, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P, Clavel C. 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.
- Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1038–44.
- Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1590–97.
- Castle PE, Schiffman M, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE, Wacholder S, Lorincz AT. Semiquantitative human papillomavirus type 16 viral load and the prospective risk of cervical precancer and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1311–14.
- Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1997;78 (Part 5):1095–101.
- Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *J Virol* 1991;65:606–12.
- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 1985;66 (Part 7):1515–22.
- Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, III, Durst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 1987;6:3745–53.
- Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1654–8.
- Park TW, Richart RM, Sun XW, Wright TC, Jr. Association between human papillomavirus type and clonal status of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:355–8.
- Hernandez-Hernandez DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jimenez M, Presa-Garcia T, Varado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, Mohar-Betancourt A, Garcia-Carranca A. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecol Oncol* 2003;90:310–17.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357–61.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen 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.
- Laurendeau I, Bahau M, Vodovar N, Larramendy C, Olivi M, Bieche I, Vidaud M, Vidaud D. 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.
- 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.
- Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1157–64.
- Beby-Defaux A, Bourgoin A, Ragot S, Battandier D, Lemasson JM, Renaud O, Bouguermouh S, Vienne Md ML, Agius G. Human papillomavirus infection of the cervix uteri in women attending a Health Examination Center of the French social security. *J Med Virol* 2004;73:262–8.
- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 2002;89:229–40.
- Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, Hundley RS, Zhao M, Apple RJ, Wheeler CM. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. *J Infect Dis* 2001;183:1554–64.
- Bachtiary B, Obermair A, Dreier B, Birner P, Breitenacker G, Knocke TH, Selzer E, Potter R. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer* 2002;102:237–43.
- ALTS. 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.
- Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail CK, 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.
- Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst* 2002;94:102–7.
- Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, Andersen PK, Sparen P, Gustafsson M, Magnusson P, Ponten J, Gyllensten U, Adami HO. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res* 2000;60:6027–32.
- Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1336–43.
- 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;112:23–33.
- Clavel C, Masure M, Bory JP, Puteaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Nazeyrollas P, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. 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.
- Tsai HT, Wu CH, Lai HL, Li RN, Tung YC, Chuang HY, Wu TN, Lin LJ, Ho CK, Liu HW, Wu MT. Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasia risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2544–9.
- Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* 1989;63:4317–24.

39. Romanczuk H, Thierry F, Howley PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 1990;64:2849–59.
40. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, Zamparelli A, Sanseverino F, Giovagnoli MR, Vecchione A, Giordano A. Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 2003;56:532–6.
41. do Horto dos Santos Oliveira, Rodrigues EV, de Salles Lopes AP, Fernandez AP, Cavalcanti SM. HPV 16 detection in cervical lesions, physical state of viral DNA and changes in p53 gene. *Sao Paulo Med J* 2003;121:67–71.
42. Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *Br J Cancer* 2005;92:2195–2200.
43. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. 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* 2004;92:873–80.
44. Ho CM, Chien TY, Huang SH, Lee BH, Chang SF. Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2006;102:54–60.
45. Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD, Meijer CL, Snijders PJ, Chatis P, Broker TR, Moen PT, Jr., Chow LT. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol* 2004;78:11172–86.
46. Popescu NC. Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Lett* 2003;192:1–17.
47. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel DM. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004;64:3878–84.

Publication n°8

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF₁₂₁) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism

Nicolas Clere^{a,b,*}, Laurent Bermont^{a,b}, Sylvie Fauconnet^a, Isabelle Lascombe^a,
Maëlle Saunier^a, Lucie Vettoretti^d, Marie-Laure Plissonnier^a, Christiane Mougina^{a,c}

^aEA 3181-IFR N°133, Université de Franche-Comté, Besançon, France

^bLaboratoire de Biochimie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France

^cLaboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France

^dEA 3186-IFR N°133, Université de Franche-Comté, Besançon, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 11 December 2006

Revised version received

15 June 2007

Accepted 19 June 2007

Available online 17 July 2007

Keywords:

HPV18

E6 oncoprotein

Cervical cancer

Angiogenesis

VEGF

ABSTRACT

Altered angiogenic response is associated with high-grade cervical dysplasia and with invasive squamous carcinoma of the cervix. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is one of the most potent inducers of angiogenesis and is up-regulated in carcinoma of the cervix. Infection by high-risk human papillomavirus and persistent expression of viral oncogene E6 are etiologically linked to the development of cervical cancer. E6 is able to immortalize cells and induce malignant transformation by inactivating p53. In cervical cancer, regulation of VEGF expression is poorly described. Thus, we investigated whether E6 oncoprotein could regulate VEGF expression in HPV18-positive cervical cancer-derived HeLa cells harboring a wild-type p53. The alternative splicing of *vegf* mRNA renders three major isoforms of 121, 165 and 189 amino-acids in humans. We have designed isoform specific real time QRT-PCR assays to quantitate *vegf* transcripts and VEGF₁₂₁ was the predominant isoform. Silencing HPV18 E6 mRNA with specific siRNA reduced VEGF₁₂₁ expression by at least 50% whereas silencing of p53 did not alter its expression. Treatment with cycloheximide did not inhibit E6-induced VEGF₁₂₁ expression. Collectively, these results suggest that HPV18 E6 oncoprotein contributes to tumor angiogenesis by inducing VEGF transcription from the promoter in a p53-independent manner.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are epitheliotropic viruses that infect cutaneous or mucosal epithelial cells. One of the most common sites for HPV infections is the lower genital tract and certain types of HPV have unequivocal oncogenic

potential. HPVs are small DNA viruses and more than 90 different types have been identified on the basis of differences in their DNA structure. Among the 40 types targeting the genital tract, about 20 have been associated with the development of cervical cancer. Indeed, the so-called high-risk types (i.e. 16, 18 and 31) have been found in 99.7% of

* Corresponding author. Nicolas CLERE, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, EA 3181-IFR N°133, UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex 3, France. Fax: +3 33 63 08 22 80.

E-mail address: nicolas.clere@univ-fcomte.fr (N. Clere).

cervical cancers [1], strongly suggesting that HPV is a causative agent of this disease [2].

In precancerous and cancerous lesions, a subset of several oncoproteins is expressed under a complex regulatory network of cellular and viral transcription factors. The tumorigenicity of HPV is dependent on the activity of two virally encoded oncoproteins, E6 and E7. HPV E7 interacts with and inactivates the retinoblastoma protein (pRb) and the pRb-related proteins p107 and p130. E7 inactivation of pRb activates E2F transcription factors, resulting in increased transcription of E2F-responsive genes and S-phase cell cycle progression. The activity of high-risk HPV E6 proteins that is clearly associated with carcinogenesis is the stimulation of the ubiquitin-mediated degradation of the p53 tumor suppressor protein [3,4]. Nevertheless, whereas both viral proteins are able to immortalize cells, they are not sufficient for the development of solid tumors.

In cervical cancers infected by high-risk HPV, vascular abnormalities are numerous and are a criterion for the classification of the lesions. According to a commonly accepted concept, induction of angiogenesis is a condition for tumor growth beyond a certain size and for metastasis invasion. Tumor angiogenesis is the proliferation of a network of blood vessels that penetrates into the tumor, supplying nutrients and oxygen and removing waste products. In order to meet the demand of rapidly expanding neoplastic tissues, tumor cells are able to produce angiogenic factors which in turn initiate angiogenesis [5]. Angiogenesis is orchestrated by various activators and inhibitors [6]. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF or VEGF-A) is considered to be one of the most important angiogenic regulator in tumor angiogenesis. It is a secreted dimeric glycoprotein that selectively binds to high affinity tyrosine kinase receptors, VEGFR-1/Flt1 and VEGFR-2/KDR, primarily expressed in endothelial cells [7]. VEGF mRNA undergoes alternative splicing events that lead to the production of five mature dimeric proteins, each monomer having respectively 121, 145, 165, 189 and 206 amino acids [8]. The two larger variants, VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆, remain bound to heparan sulfate proteoglycans at the cell surface, whereas the two smaller forms, VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ are secreted soluble glycoproteins. VEGF₁₆₅ is expressed in most tissues [9], whereas the expression pattern of the other VEGF isoforms is not well established [10]. Moreover, VEGF₁₂₁, which lacks the basic residues of both exons, does not bind heparin-containing cell surface proteoglycan and is freely soluble. The different isoforms have different biological activities [11]. Several studies have shown that the expression of certain VEGF isoforms is correlated with tumor progression of colon, lung and breast cancer [12–15]. Furthermore, the expression of HPV16 E6 and E7 in keratinocytes increases expression of VEGF 121, 145, 165 and 189 [6].

VEGF expression is tightly controlled via different regulatory mechanisms that are not fully characterized. It is induced in response to stress signals such as hypoxia and various cytokines such as IL1, IL6, IL8 and TNF α [16]. Some nuclear receptors called peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) modulate its expression as demonstrated by our team in bladder cancer cells [17]. It is also regulated by many growth factors such as Insulin-like Growth Factor I [18], and tumor suppressor genes such as p53 which favors downregulation of VEGF expression [19,20].

The role of oncogenes as regulators of VEGF expression in human tumors is under intense investigation. P53 is a well-known anti-oncogene that is involved in the pathogenesis of cervical adenocarcinomas [21] and some reports show that mutations of p53 might be connected to angiogenesis through an upregulation of VEGF expression [22,23].

VEGF plays a central role in switching on the angiogenic phenotype during early cervical carcinogenesis. Recently, Soufla et al. [24] highlight a correlation between VEGF mRNA expression levels and the malignant transformation of the uterine cervix, suggesting a prognostic value of VEGF, but few authors have been interested in the regulation of VEGF expression in cervical cancer. Several works have indicated that the HPV16 E6 oncoprotein contributed to tumor angiogenesis by a direct stimulation of the VEGF gene promoter via Sp1 binding sites [25] and that HPV16 E7 oncoprotein enhanced the release of angiogenic factors such as VEGF and angiogenic cytokines, including TNF alpha, IL-1 beta and IL-6 [16]. Very recently, it has been shown that HPV16 E5 oncoprotein up-regulated the expression of VEGF through the activation of epidermal growth factor receptor and MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt cellular signaling pathways [26].

According to a previous study performed by Muñoz et al. in 2003 [27], we have chosen a HPV18 infected cervical adenocarcinoma model because this virus is the second high-risk human papillomavirus (11% of all infected women) responsible for approximately 13% of cervical cancers with a bad course. Thus, we have investigated the role of HPV18 E6 oncoprotein in the regulation of VEGF expression in HeLa cells. After the identification of VEGF 121, 165 and 189 transcripts, we conclude by using RNA interference against E6 and p53 mRNA, that (i) for the first time, HPV18 E6 oncoprotein up-regulates the expression of the three VEGF transcripts, (ii) HPV18 E6 oncoprotein seems to regulate VEGF₁₂₁ mRNA expression by a direct molecular mechanism on VEGF promoter, (iii) HPV18 E6 protein action on VEGF expression is p53-independent.

Materials and methods

Cell line and culture conditions

HeLa cells (human cervical carcinoma, HPV18-positive), C33A cells (HPV negative) and SiHa cells (human squamous cell carcinoma, HPV16-positive) were grown in Essential Modified Eagle's Medium (EMEM, Biowhittaker). CaSki cells (human cervical carcinoma, HPV16-positive) were grown in RPMI 1640 (Sigma). Each medium was supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 1% antibiotic antimycotic mixture (10 mg/ml streptomycin, 10,000 U/ml penicillin, 25 μ g/ml amphotericin B) and 2 mM glutamine (Sigma).

DNA extraction and PCR analysis

DNA was isolated from HeLa, CaSki, SiHa and C33A cells using QIAamp DNA Minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA amplifications for HPV16 E6 and HPV18 E6 detection were performed with specific oligonucleotide primers

as follows: HPV16 E6, sense: 5'-GCAAGCAACAGTTACTGAGACGT-3 and antisense: 5'-GCAACAAGACATACATCGACCGG-3'; HPV18 E6, sense: 5'-TGGTGTATAGAGACAGTATACCCC-3' and antisense: 5'-GCCTCTATAGTGCCAGCTATGT-3'. The PCR mixtures were initially denatured for 4 min at 94 °C and subjected to 39 cycles of amplification. Each cycle included a denaturing step at 94 °C for 1 min, an annealing step at 50 °C (HPV16 E6) or 48 °C (HPV18 E6) for 2 min and a chain elongation step at 72 °C for 1 min 30 s. A final elongation step was performed for another 5 min at 72 °C and 30 s at 30 °C. The housekeeping gene GAPDH was used as control and was amplified with the following specific primers: GAPDH, sense: 5'-CAT CTC TGC CCC CTC TGC TGA-3' and antisense: 5'-AGG CTG TGG GCA AGG TCA TCC-3'. The PCR mixtures were denatured for 3 min at 94 °C and were subjected to 36 cycles of amplification by denaturation (94 °C, 30 s), hybridization (55 °C, 1 min), and elongation (72 °C, 1 min). A final elongation step was performed for another 5 min at 72 °C and 30 s at 30 °C. Based on the primers used, amplified fragments were expected to have 322 bp for HPV16 E6, 247 bp for HPV18 E6 and 305 bp for GAPDH in length. The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide.

siRNAs

All siRNA sequences were designed according to the manufacturer's recommendations and subjected to a BLAST search of the National Center for Biotechnology Information's expressed sequence tag library to ensure that they targeted only the desired genes. They were synthesized and HPLC purified by Dharmacon (Dharmacon Research Inc.). The initial concentration of all siRNA was 40 μ M in provided buffer. The target sequence of E6 siRNA was RNA duplexes (19 bases) with a 2 nucleotide deoxythymidine overhang at the 3' end. The siRNA target sequences were as follows: HPV18 E6 sense strand: 5'-CUAACUAACACUGGGUUAUdTdT-3'; HPV18 E6 antisense strand: 5'-AUAACCCAGUGUUAGUUAGdTdT-3'; p53 sense strand: 5'-GCAUGAACCCGAGGCCCAUdTdT-3'; p53 antisense strand: 5'-AUGGGCCUCCGGUUCAUGCdTdT-3'; siRNA control sense strand: 5'-AGAGUUCAAAAGCCCUUCAdTdT-3'; siRNA control antisense strand: 5'-UGAAGGGCUUUUGAACUCUdTdT-3'. A control siRNA with no significant homology with any known human or viral sequence was used as a non-specific control.

siRNA inhibition of E6 and p53 transcription

The transfection of siRNA was performed under optimal conditions. Briefly, HeLa cells were seeded in 12-well plates at a concentration of 1.5×10^5 cells per well in EMEM supplemented with 5% FBS and were grown to 40% to 60% confluence. Double-stranded siRNA (5 nM) were transfected, in serum free EMEM medium, by using GeneEraser[®] transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Stratagene) for 6 h. After this period, siRNA were removed and cells were incubated with new culture medium for 12 h. Total RNA extraction was performed 18 h post-transfection (i.e. 6 h of transfection plus 12 h in new culture medium) and E6, E7, p53, and *vegf* transcript expression was measured by RT-PCR and by real time quantitative PCR as described below. Cell

lysates were also analyzed 18 h post-transfection by western blotting assay with a specific antibody against p53 as described below.

Flow cytometry

Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. HeLa cells (1.5×10^5) were seeded in triplicate in 12-well plates 24 h before transfection. They were transfected with E6 siRNA or control siRNA during 6 h. Then, cells were washed twice with PBS, harvested by trypsinization (Bio Whittaker), washed again twice with PBS and centrifuged at $700 \times g$ for 10 min. Cells were resuspended and fixed overnight with 70% (v/v) cold ethanol. Fixed cells were washed 3 times with cold PBS before the addition of 1 mg/ml RNaseA DNase-free (Sigma) for 10 min and 10 μ g/ml propidium iodide (Sigma) for 30 min. The percentage of cells with Sub-G1 DNA was calculated. Cells were analyzed on a FACScan Epics[®] Altra flow cytometer (FACScalibur Becton Dickinson, Beckman Coulter, Miami, FL, USA). A minimum of 10,000 events was collected for each sample. The analyses, performed on a gated cell population in order to discard cellular debris, were conducted using the expo-32 software (Beckman Coulter).

Transfection of pCG-E6 plasmid

The pCG-E6 construct encoding HPV18 E6 oncoprotein was a gift from Dr. F. Thierry (Pasteur Institute, Paris, France). Cells were seeded in 12-well plates at a concentration of 1.5×10^5 cells per well in EMEM supplemented with 5% FBS and were grown to 40% to 60% confluence. They were transfected with different concentrations of plasmid with 6 μ l of TransPEI[®] transfection reagent as specified by the manufacturer's recommendations (Eurogentec) for 12 h. At 24 h post-transfection, cells were harvested for total RNA and proteins. In the inhibitory experiment of protein synthesis, cells were incubated for 30, 60 and 120 min after transfection with 10 μ g/ml cycloheximide (CHX) and were then harvested for total RNA and proteins.

RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from HeLa cells using TRIzol[®] reagent purchased from Invitrogen. Contaminating genomic DNA was removed with RNase-free DNase I (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed from 3 μ g of total RNA extracted with the Reverse Transcription System[®] kit (Promega) using Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase and oligo(dT) primers as suggested by the manufacturer. A control without reverse transcriptase and negative controls performed in the absence of mRNA or directly on mRNA were also added for assaying contamination with DNA. Subsequent amplifications of cDNA encoding *vegf* transcripts, E6, E7 and p53 were performed using 2 μ l of reverse-transcribed mixture. To reach high conformity of the PCR kinetics for the VEGF splice variants, a common forward primer *ex3fo* (5'-CCCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3') located in exon 3 was designed. Amplification of each splice variants was performed exclusively with specific reverse primers spanning the variant exon

boundaries: *ex5/8re*: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAC-3' for VEGF₁₂₁, spanning the boundaries of exons 5 and 8; *ex5/7re*: 5'-AACGCTCCAGGACTTATACCG-3' for VEGF₁₆₅, spanning the boundaries of exons 5 and 7; *ex 6re*: 5'-AGCAAGGCCACAGG-GATTT-3' for VEGF₁₈₉, located in exon 6. HPV18 E6, HPV18 E7 and p53 primers were as follows: HPV18 E6, forward: 5'-GCGACCTACAAGCTACCTG-3', reverse: 5'-GCACTGGCCTC-TATAGTGCC-3'; HPV18 E7, forward: 5'-ATGCATGGACC-TAAGGCAAC-3', reverse: 5'-TTACTGCTGGGATGCACAC-3'; p53, forward: 5'-GAAGACCCAGGTCCAGATGA-3', reverse: 5'-CTCCGTCATGTGCTGTGACT-3'. The housekeeping gene β 2-microglobulin (β 2-M) was used as a reference gene for normalization with the following primers: β 2-M, forward 5'-GATGAGTATGCCTGCCGTGTG-3' and reverse 5'-CAATC-CAAATGCGGCATCT-3'. PCR reactions for *vegf* transcript amplification were performed in a total volume of 20 μ l in the presence of 5 μ l of buffer 10 \times , 1.5 mM MgCl₂, 0.2 nM dNTP, 0.125 mM of each oligonucleotide primer and 0.5 unit of *Taq* DNA recombinant polymerase (Invitrogen). The PCR mixtures were subjected to 35 cycles of amplification with the following cycling parameters: 30 s at 95 °C, 30 s at 59 °C and 30 s at 72 °C. PCR reactions for E6, E7 and p53 amplification were also performed in a total volume of 20 μ l in the presence of 5 μ l of buffer 10 \times , 4 mM MgCl₂, 50 μ M dNTP, 10 pM of each oligonucleotide primer and 1.25 unit of *Taq* DNA recombinant polymerase. The PCR mixtures were subjected to 24 cycles of amplification with the following cycling parameters: 1 min at 95 °C, 2 min at 50 °C and 90 s at 72 °C. The PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide.

Quantification of cDNA by real time quantitative PCR

Quantification of the mRNA encoding for different VEGF isoforms was performed using the Light Cycler technology (Roche Diagnostics®) with TaqMan or SyBrGreen technologies. The same primers that those previously described for *vegf* transcripts were used as well as a specific fluorescent hydrolyzation probe for *vegf* (5'-ATCCTGTGTGCCCTGATGC-GATGCGGT-3') and β 2-microglobulin (5'-CCTCCAT-GATGCTGCTTACATGTCTCGATCCC-3'). Hydrolyzation probes were labeled with a reporter dye (FAM) at the 5' end and a quencher dye (TAMRA) at the 3' end. Quantitative PCR was performed in a total volume of 20 μ l containing 0.25 μ M of each oligonucleotide primer, 0.1 μ M of specific probe and 2 μ l of cDNA according to the QuantiTect® probe PCR kit procedure (Qiagen). The cycling parameters were 95 °C for 15 min and then 60 cycles of denaturation at 95 °C for 8 s, annealing at 68 °C for 12 s and extension at 72 °C for 20 s. In order to establish a calibration curve and to determine the copy number of the target transcripts, two plasmids were used: one for VEGF and one for β 2-microglobulin. The calibration curve was performed by successive dilutions and was plotted between 5×10^6 and 5×10^2 copies of transcripts.

Western blotting analysis

Cells were lysed in RIPA lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, EDTA 1 mM) and the total protein concentration was determined

with the BCA Protein Assay® kit (Pierce). Equal amounts of proteins were boiled in sample loading buffer (60 μ M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2 β -mercaptoethanol, 0.002% bromophenol) and resolved by sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were transferred to Hybond™ C PVDF membranes (Amersham), blocked in 5% non fat milk, probed with a p53 monoclonal primary antibody at a 1:1000 dilution (clone DO-1, PharMingen), p21 monoclonal primary antibody at a 1:1000 dilution (clone 6B6, PharMingen), pRb polyclonal primary antibody (clone SC-50, Santa Cruz) or β -actin (Sigma) at a 1:10,000 dilution according to standard procedures. Then membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at a 1:10,000 dilution (PharMingen). The immune complexes were visualized using the ECL reagent (Amersham) and the signals were detected by using Hyperfilm (Amersham).

VEGF protein levels in HeLa cell-conditioned media

After transfection with E6 siRNA during 18 h, cell-conditioned media were collected and centrifuged to discard all cellular fragments. VEGF protein levels were determined by ELISA, using a human VEGF immunoassay (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol. Data are expressed in pg/ml and are the mean values of three independent experiments in triplicates.

Statistical analysis

Experiments subjected to a statistical analysis (data from real-time RT-PCR and VEGF protein quantification) were performed independently at least three times with similar results. The significance of the data was determined using Student's *t*-test (two-tailed). *P*s < 0.05 were deemed significant. Before performing *t*-test, the data were tested using a *F*-test for their variance homogeneity. The data presented are the mean values and standard deviations of the mean values.

Results

HPV16 and HPV18 DNA analysis in different cervical cancer cell lines

We first checked E6 oncogene expression by PCR analysis in HPV18 and HPV16 positive cervical carcinoma cell lines, or HPV negative cell line, such as HeLa, SiHa, CaSki and C33A. The results obtained are shown in Fig. 1. As expected SiHa and CaSki cells are HPV16 positive. C33A are HPV deficient. HeLa cells are HPV16 negative and we confirm that these cells are HPV18 positive.

Introduction of siRNA against HPV18 E6 oncoprotein in HeLa cells inhibits selectively and specifically E6 mRNA expression

Synthetic double-stranded siRNA was designed to target the mRNA encoding HPV18 E6 protein. The siRNA was targeted to 20 base pair-region from base 276 to base 295 of E6 coding sequence and was designed to avoid a simultaneous knockdown

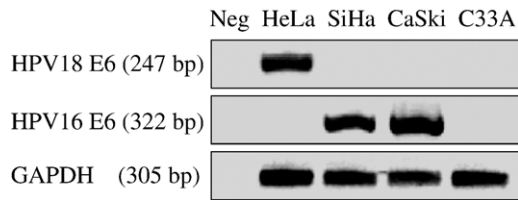


Fig. 1 – HPV16 E6 and HPV18 E6 detection in human cervical cancer cell lines. DNA was extracted from HeLa, SiHa, CaSki and C33A cells and 300 ng were subjected to PCR amplification with specific primers as outlined in Materials and methods. The housekeeping gene GAPDH was used as control. Neg, negative control without DNA.

of HPV18 E7 protein, as E6 and E7 are translated from an alternatively spliced bicistronic mRNA. E6 is expressed from the unspliced transcript, which includes the complete E6 and E7 open reading frames, while E7 is translated from a transcript that has been spliced to remove an intron that lies entirely within the E6 open reading frame. siRNA was therefore targeted to the intron region to specifically knockdown E6 expression without affecting E7 expression [28,29]. All of the experiments described in this study used a final concentration of 5 nM siRNA, which has been shown to be within the optimal range for observing siRNA silencing while minimizing off-targeting events and nonspecific effects. Moreover, as observed by flow cytometry, the efficient inactivation of HPV18 E6-dependent degradation of p53 had no effect on the distribution of cells in the cell cycle or in the number of apoptotic cells. As presented in Fig. 2, in our experimental

conditions, the percentage of HeLa cells with hypodiploid (apoptotic) DNA content is similar between control siRNA transfected cells (9.11%) and E6 siRNA transfected cells (11.13%). E6 mRNA expression was first analysed by classical RT-PCR as described in detail in Materials and methods. As shown in Fig. 3A, transfection of E6 siRNA into HeLa cells resulted in a complete inhibition of E6 mRNA expression. Negative controls, performed in the absence of mRNA or directly on mRNA or without reverse transcriptase, yielded no detectable band (data not shown). The analysis of E6 mRNA expression by real-time RT-PCR using SybrGreen technology (Fig. 3B) showed that E6-expressing transcripts were reduced to approximately 80% by the E6 siRNA and as a further control for the specificity of the E6 siRNA, we determined that it did not affect E7 transcript levels. This was confirmed by the study of pRb protein expression that showed no difference between control siRNA transfected cells and E6 siRNA transfected cells (Fig. 3C). Immunoblots demonstrating the knockdown of E6 protein is not shown because of the difficulty in detecting the low levels of E6 protein in HeLa cells with available antibodies. On the other hand, the effect of E6 siRNA on p53 protein level was evaluated by western blotting (Fig. 3D). C33-A cells were used as a positive control for the quality of p53 antibody. P53 protein is expressed in control HeLa cells in spite of the presence of E6 oncoprotein. E6 oncoprotein is known to inactivate p53 by its cytoplasmic sequestration and degradation through the ubiquitin–proteasome pathway, thereby inhibiting the transcriptional activation of p53-responsive genes. In E6 siRNA transfected HeLa cells, the p53 protein level was increased by 2.3-fold due to a less degradation of the protein compared to control cells (Fig. 3E).

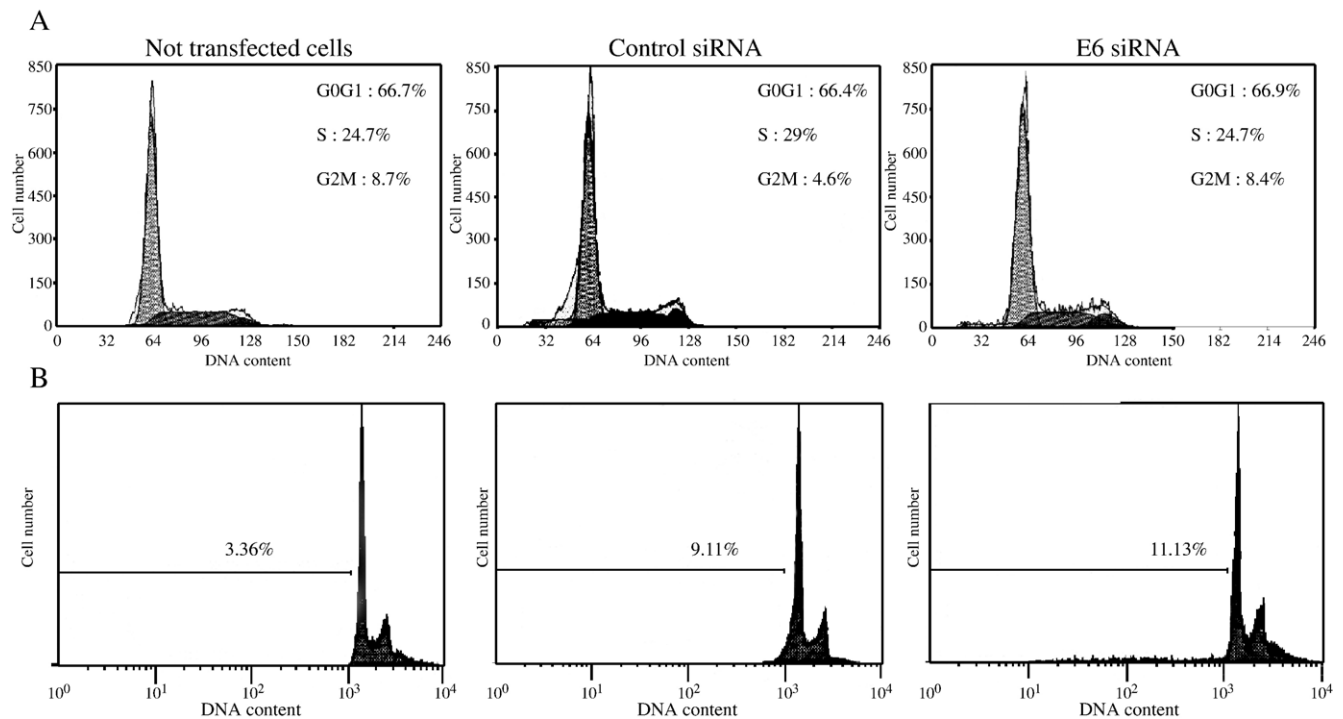


Fig. 2 – Inhibition of E6 expression by siRNA does not induce cell death. HeLa cells were not transfected or transfected with control siRNA or E6 siRNA. (A) Analysis of the distribution of cells in the cell cycle. (B) The percentage of cells in the Sub-G1 region. For each panel, the percentage of HeLa cells with hypodiploid (apoptotic) DNA content is indicated. The results shown are representative of analyses of at least two independent experiments.

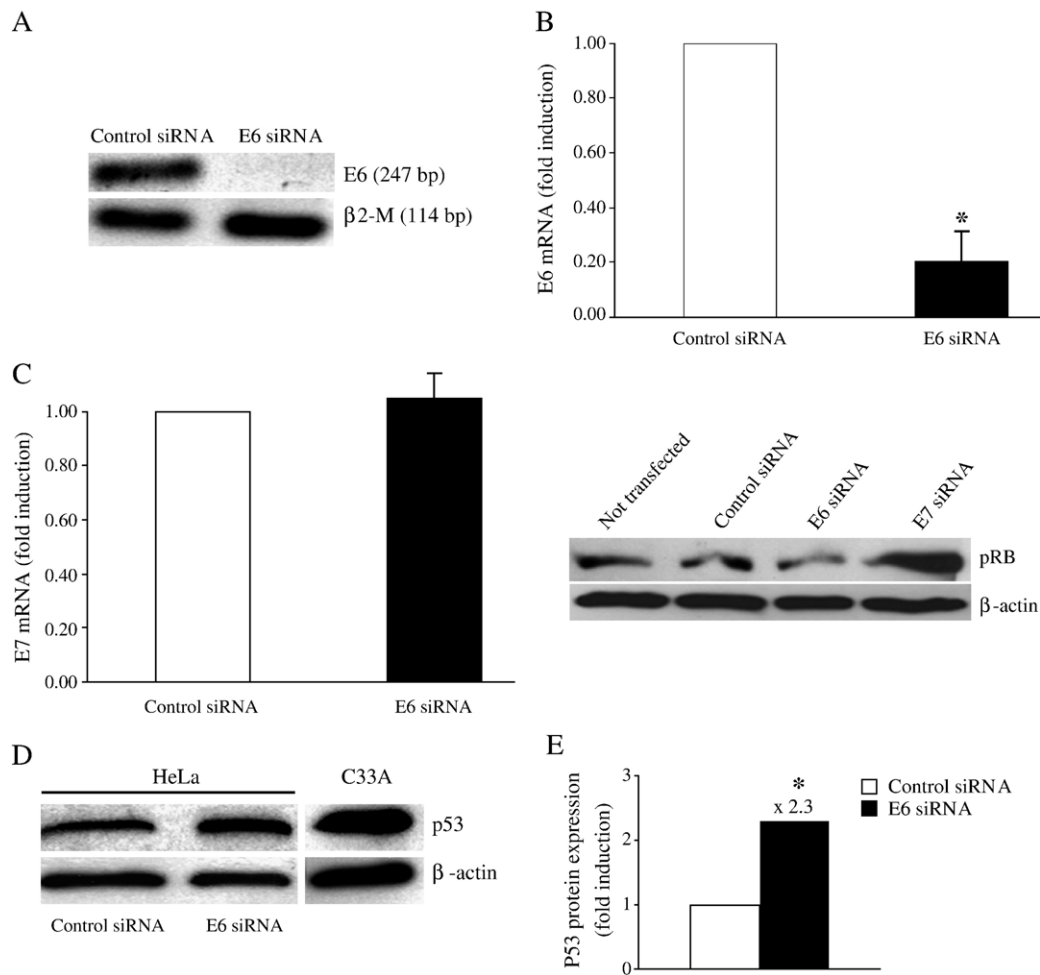


Fig. 3 – Efficiency of siRNA E6-mediated silencing in HeLa cells. (A) RT-PCR analysis of HPV18 E6 expression with specific primers as outlined in Materials and methods. β 2-microglobulin (β 2-M) was used as a control. (B) Quantitative RT-PCR (SybrGreen technology) expression analysis of E6 mRNA. Results are representative of three independent experiments and were normalized to the reference gene expression. *, $p < 0.05$. (C, left panel) HPV18 E7 mRNA expression in E6 siRNA transfected HeLa cells. (C, right panel) Western blotting of HeLa cell extracts with goat polyclonal antibody against pRb. (D) Western blotting of HeLa cell extracts with a mouse monoclonal antibody against p53. (E) The level of p53 in E6 siRNA transfected cells is evaluated by densitometric analysis. C33A cells were used as a positive control since these cells expressed high levels of p53. β -actin was used as a protein loading control.

VEGF₁₂₁ is the most expressed VEGF transcript in HeLa cells

We performed RT-PCR experiments and the results obtained are shown in Fig. 4. In HeLa cells, three VEGF transcripts are expressed, namely VEGF 121, 165 and 189. To quantify these different transcripts, real time quantitative PCR (TaqMan probe) was carried out with the same primers. It appears that the transcript encoding VEGF₁₂₁ was the most expressed (nearly 95% of all transcripts) compared to the transcripts encoding VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ (less than 5% and 1% of all transcripts respectively).

HPV18 E6 oncoprotein up-regulates VEGF expression

To demonstrate whether HPV18 E6 protein regulates VEGF expression, the different VEGF transcripts were analyzed by quantitative RT-PCR (TaqMan probe) in E6 siRNA transfected HeLa cells. As shown in Fig. 5A, E6 transcription silencing

significantly reduced VEGF₁₈₉ transcript by 40% and the transcripts encoding VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ by about 50% compared to their expression level in control siRNA transfected cells ($p < 0.05$). Thus, the loss of E6 protein expression leads to inhibition of VEGF expression suggesting that E6 protein up-regulates VEGF. To determine whether decreased VEGF expression in E6 siRNA transfected cells is associated with a decrease in VEGF protein level, we evaluated by ELISA assay the effect of E6 siRNA on total VEGF protein expression in conditioned media 24 h after transfection. Results are shown in Fig. 5B. A significant decrease by 40% ($p < 0.05$) of VEGF protein level was observed in E6 siRNA transfected cells compared to control siRNA transfected cells. E6 siRNA led to a decrease of VEGF mRNA expression and this was correlated to a decrease in VEGF protein level. Thus, we confirm the positive regulator role of HPV18 E6 oncoprotein on VEGF expression both at mRNA and protein level.

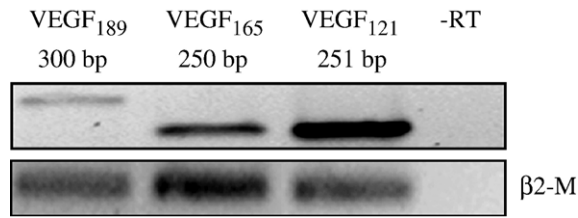


Fig. 4 – Identification of the different VEGF isoforms expressed in HeLa cells by RT-PCR analysis of different VEGF transcripts. Three micrograms of total RNA were subjected to RT-PCR analysis with specific primers for the VEGF splice variants as outlined in Materials and methods. β2-microglobulin (β2-M) was used as a control. PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel. –RT, control without RT. Data are representative of three independent RT-PCR analyses from three independent experiments.

HPV18 E6 oncoprotein overexpression induces an increase of VEGF expression

To confirm the effect of E6 oncoprotein in the upregulation of VEGF expression, we examined the expression of the different VEGF transcripts after HPV18 E6 protein overexpression. Different amounts of HPV18 E6 plasmid encoding E6 protein were transfected in HeLa cells and mRNA expression was evaluated by quantitative RT-PCR (SybrGreen technology). As shown in Fig. 6A, E6 mRNA level increased 20- and 23-fold with 250 ng and 500 ng pCG-E6 construct respectively indicating that the transfection was effective. To demonstrate the E6 protein functionality, a western blotting analysis was performed to evaluate p53 protein level in HeLa cells transfected with 250 ng pCG-E6 plasmid (Insert, Fig. 6A). The result confirmed the effect of E6 oncoprotein overexpression on the target protein p53 by the decrease of p53 protein level. Nevertheless, E6 overexpression did not favor the complete degradation of p53 since p53 expression was still observed in cells transfected with HPV18 E6 construct whatever the plasmid amount used. The expression of the different VEGF transcript was evaluated by quantitative RT-PCR (SybrGreen technology) after a 24 h period of transfection with HPV18 E6 plasmid (Fig. 6B). Compared with control cells, the level of the three VEGF transcripts was higher in transfected cells whatever the E6 plasmid amount used. VEGF₁₈₉ increased about 1.5- and 1.2-fold with 250 ng pCG-E6 and 500 ng pCG-E6 respectively. As for VEGF₁₆₅, its expression was increased 1.8- and 1.4-fold with 250 ng pCG-E6 and 500 ng pCG-E6 respectively. For VEGF₁₂₁, its expression was increased 2.5- and 2-fold with 250 ng pCG-E6 and 500 ng pCG-E6 respectively. The induction of VEGF is lower with 500 ng of pCG-E6 plasmid than with 250 ng. This difference could be due to a competition for transcription factors leading to a quenching process and/or to a saturation phenomenon. Thus, in the presence of high amount of pCG-E6 plasmid, transcription factors are captured by the CMV promoter which is present in the pCG-E6 construct to produce E6 protein. This would be done to the detriment of the VEGF promoter. Anyway, the most important is the induction of VEGF transcript expression after E6 overexpression.

HPV18 E6 oncoprotein up-regulates VEGF promoter activity

The above results indicate an up-regulation of VEGF by E6 oncoprotein. According to these results and data in the literature, E6 oncoprotein could interact through two different regulatory pathways. Thus, we were interested in investigating

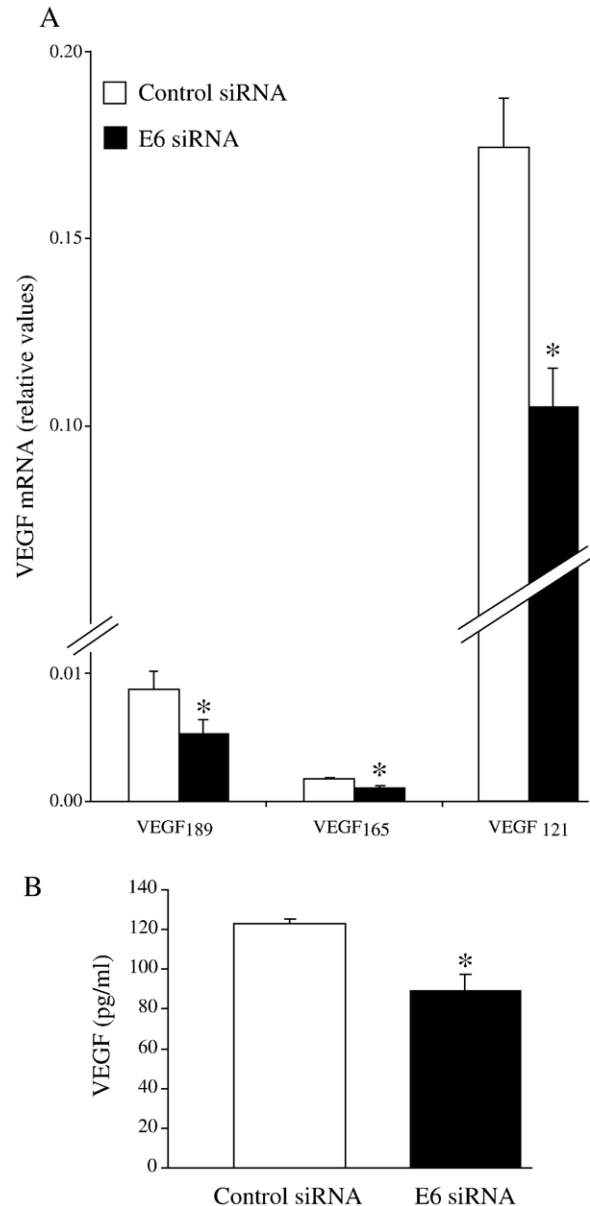


Fig. 5 – (A) Quantitative real-time RT-PCR expression analysis of VEGF transcript levels after E6 siRNA-mediated silencing. HeLa cells were transfected with E6 siRNA or with control siRNA. Data from three experiments are expressed as the mean of relative values ± the standard deviation (S.D.) compared with control siRNA transfected cells. *, p < 0.05. (B) Measurement of VEGF concentration by ELISA in conditioned media of HeLa cells transfected with E6 siRNA or with control siRNA. Data are expressed in pg/ml. Values represent the means ± S.D. for n = 12 measurements from three independent experiments. *, p < 0.05.

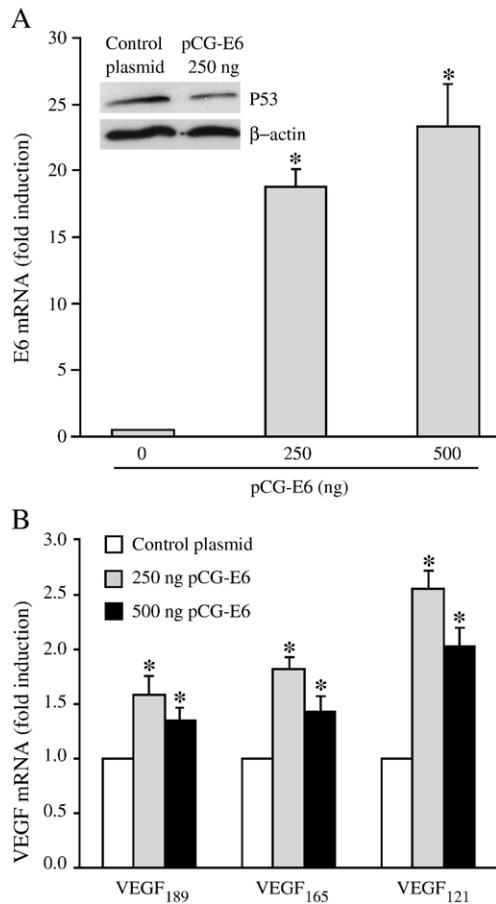


Fig. 6 – Overexpression of HPV18 E6 oncoprotein up-regulates VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₂₁. (A) Transient transfection of HeLa cells with different amounts of pCG-E6 construct (250 ng or 500 ng). E6 mRNA expression is evaluated by quantitative RT-PCR (SybrGreen technology) as outlined in Materials and methods. The results shown are an average of fold inductions of three independent experiments with standard deviations displayed. *, $p < 0.05$. Inset, western blotting of HeLa cell extracts, obtained after transfection with or without 250 ng of pCG-E6 plasmid, with a mouse monoclonal antibody against p53. (B) Quantification of the different VEGF transcripts by real-time RT-PCR in pCG-E6-transfected HeLa cells in comparison with control plasmid transfected HeLa cells. The results shown are representative of three independent experiments and were normalized to $\beta 2$ -microglobulin expression. *, $p < 0.05$.

whether E6 effect implies a direct action on the promoter or an indirect mechanism involving an intermediary protein factor. HeLa cells were transfected or not with HPV18 E6 plasmid to be sure to have some E6 oncoprotein and 24 h after E6 plasmid transfection, they were treated with a protein synthesis inhibitor such as cycloheximide (CHX) for 30, 60 and 120 min. Thus, E6 oncoprotein was present at the time point of CHX treatment. We focused our attention on VEGF₁₂₁ since it was the most expressed isoform in HeLa cells. Thus, the VEGF₁₂₁ transcripts were quantified by real-time RT-PCR (TaqMan probe). As shown in Fig. 7B, at 30 min of CHX treatment, VEGF₁₂₁ mRNA was increased (3.5-fold) in pCG-E6 plasmid

transfected cells compared to the control plasmid transfected cells. In these conditions, we showed that E6 oncoprotein is still present as checked by a decrease of p53 protein level compared to control plasmid transfected cells (Fig. 7A) and active since it increased *vegf* expression. At 60 min of CHX treatment, the VEGF₁₂₁ mRNA level is still increased (2.5-fold) in pCG-E6 plasmid transfected cells compared to control plasmid transfected cells. As described at 30 min of CHX treatment, E6 oncoprotein is present since the p53 protein level is decreased in pCG-E6 plasmid transfected cells compared to the control plasmid transfected cells. At 120 min of CHX treatment, p53 protein expression is abolished. It means that we still have an increase of VEGF₁₂₁ expression whereas there is no *de novo* protein synthesis. Thus, E6 oncoprotein could act directly on the *vegf* promoter. In addition, the induction of VEGF is lesser at 120 min than at 30 and 60 min (Fig. 7B, inset). This is caused by the decreased expression of E6 oncoprotein since the half-life of E6 varies between 30 min and 5 h according authors (in the presence of or there are no more

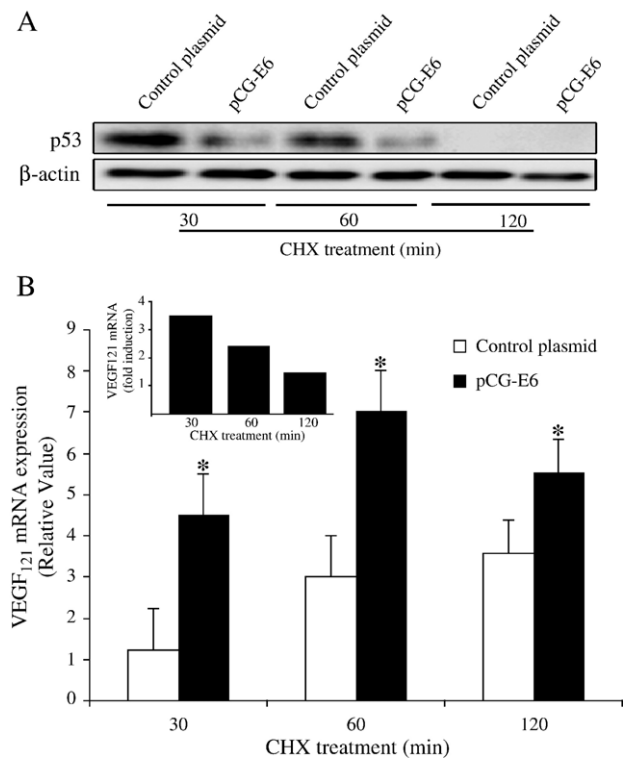


Fig. 7 – Up-regulation of VEGF₁₂₁ transcript expression by E6 oncoprotein is independent of the synthesis of new proteins in HeLa cells. HeLa cells were transfected with 250 ng of pCG-E6 plasmid or control plasmid for 12 h and then treated for 30, 60 or 120 min with 10 μ g/ml cycloheximide (CHX). (A) Western blotting of HeLa cell extracts with a mouse monoclonal antibody against p53. (B) Total RNA was isolated and analyzed by quantitative RT-PCR (TaqMan probe) for the expression of the VEGF₁₂₁ transcript as outlined in Materials and methods. The results shown are representative of three independent experiments and were normalized to $\beta 2$ -microglobulin expression. Data are expressed as the mean of relative values \pm S.D. compared with control plasmid transfected cells. *, $p < 0.05$, pCG-E6 vs. control plasmid.

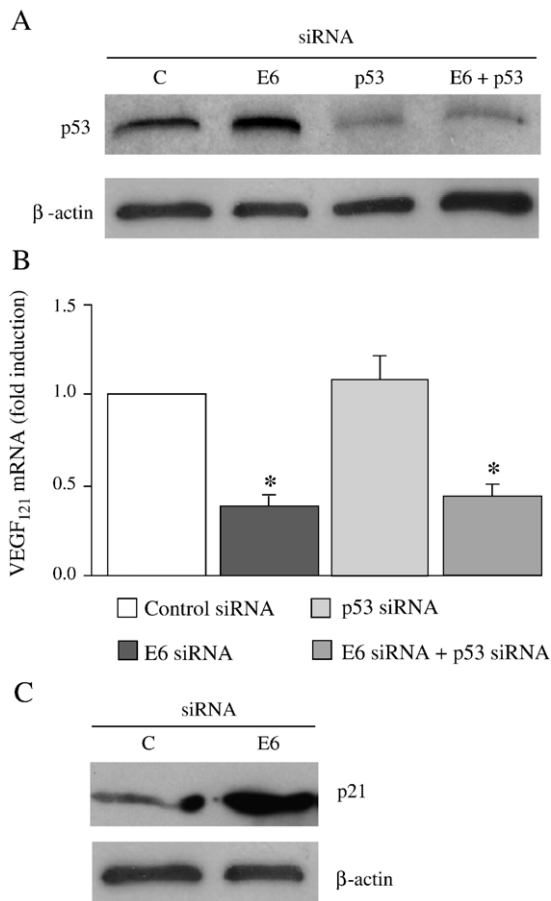


Fig. 8 – P53 knockdown did not alter the expression of the VEGF₁₂₁ transcript. (A) Western blotting analysis of whole-cell lysates from HeLa cells transfected with E6 siRNA and p53 siRNA alone or in combination is shown. Resolved proteins were probed using a mouse monoclonal antibody against p53. β -actin was used as a protein loading control. (B) Quantitative RT-PCR (TaqMan probe) expression analysis of the VEGF₁₂₁ transcript level. Data from three independent experiments are expressed as the mean of relative values \pm S.D. compared with control siRNA transfected HeLa cells. *, $p < 0.05$. (C) Western blotting analysis of protein extracts from HeLa cells after transfection with control siRNA or E6 siRNA is shown. Resolved proteins were probed using mouse monoclonal antibody against p21. β -actin was used as a protein loading control.

regulatory proteins overexpressing VEGF₁₂₁. Thus, the treatment with CHX increased significantly the level of E6-induced VEGF₁₂₁ expression ($p < 0.05$). These data demonstrate that HPV18 E6 induces VEGF₁₂₁ gene expression by direct promoter transcriptional activation. Nevertheless, we cannot exclude an indirect molecular mechanism involving an intermediary factor since after 30 and 60 min of CHX treatment, VEGF₁₂₁ induction was higher than that observed at 120 min of CHX treatment.

Up-regulation of VEGF₁₂₁ expression by HPV18 E6 oncoprotein is mediated via a p53-independent mechanism

Wild-type p53 is known to negatively modulate VEGF expression as a part of its tumor suppressor function [30]. The

activity of the high-risk HPV E6 proteins that is most clearly associated with carcinogenesis is the stimulation of the ubiquitin-mediated degradation of p53 [31]. We showed that HPV18 E6 oncoprotein up-regulated VEGF₁₂₁ expression. We investigated whether E6 effect on VEGF expression could be due to a lower level of p53 in cells. HeLa cells were transfected with p53 siRNA or control siRNA alone or co-transfected with HPV18 E6 siRNA. As shown in Fig. 8A, p53 protein level was increased in E6 siRNA transfected cells compared to control siRNA transfected cells. As expected, p53 protein level was lower in p53 siRNA transfected HeLa cells compared with control cells but the inhibition was not complete. P53 silencing did not modify the expression of the VEGF₁₂₁ transcripts (real time RT-PCR with TaqMan probe) whereas the co-transfection with E6 and p53 siRNAs favored a significant decrease to the same extent than the transfection with E6 siRNA alone by approximately 60% (Fig. 8B). Moreover, we showed by western blotting analysis that p53 was transcriptionally active by evaluating p21 protein expression, a major transcriptional target of p53 (Fig. 8C). In E6 siRNA transfected cells, we showed an increase of p21 protein level which was correlated to the increase of p53 protein level. Taken together, these results demonstrate that p53 is not involved in the E6 protein effect on the regulation of VEGF₁₂₁ expression in HeLa cells.

Discussion

Several studies showed that some VEGF isoform expression is related to tumor progression. Very few works have focused on the expression of VEGF isoforms in cervical cancer. In a recent study, the transcript levels of VEGF splicing variants have been compared between normal cervical tissues and cultured cervical carcinoma cells such as HOKUG, NUZ, OMC-4, CAC-1 cell lines. Transcript levels of VEGF splicing variants were increased in cervical carcinoma cells compared to normal cervical tissues but not associated with the invasive activity of tumor cells. VEGF isoforms might be involved in the process leading to the transformation of normal cervical cells rather than in the development of cervical carcinomas [32]. Van Trappen et al. [33] reported that VEGF isoform (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉) gene expression were at least 10-fold increased in malignant compared to normal cervical tissues with the highest levels in the primary tumors.

In our study, we detected by real-time RT-PCR using TaqMan technology three isoforms namely VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ in HeLa cells. VEGF₁₂₁ was predominant. Interestingly, it is worth noting that in cervical cancer the major isoform is a secreted soluble isoform which is in fact the more rapidly available form to allow tumor growth.

Little is known about the role of viral oncoproteins on the intracellular pathways that regulate angiogenesis and VEGF production. E6 and E7 oncoproteins of HPV16 have been shown to increase VEGF expression in primary foreskin keratinocytes [6] and in human cervical carcinoma cell lines [25]. However, the functional role of HPV18 E6 on the regulation of the different VEGF isoforms has not been studied to date. In the present work, we used an siRNA approach to explore HPV18 E6 effect on the different VEGF splice variants.

Several studies [28,29] reported that synthetic small interfering siRNA, specifically directed against the antiapoptotic HPV E6 oncogene, restored dormant tumor suppressor pathways in HPV-positive cancer cells that are otherwise inactive in the presence of E6. This resulted in massive apoptotic cell death, selectively in HPV-positive tumor cells. In our experiments, transfection conditions such as transfection period and post-transfection time have been optimized and they did not induce apoptosis whereas the specificity of siRNA against E6 mRNA was checked according to the work of Butz et al. [29] and Tang et al. [34]. As expected, in our experimental conditions, we demonstrated an increase of p53 protein expression in E6 siRNA transfected HeLa cells. Nonetheless, with these experimental conditions we did not induce apoptosis. Indeed, the percentage of HeLa cells with hypodiploid (apoptotic) DNA content is similar between control siRNA transfected cells and E6 siRNA transfected cells. In addition, as presented by the cell cycle distribution analysis, a significant percentage of HeLa cells are in S-phase and there is no difference between not transfected cells, control siRNA transfected cells and E6 siRNA transfected cells. Thus, in our experimental conditions, we showed that E6 silencing induced a significant reduction of all VEGF transcript expression, suggesting a positive regulator role of E6 in VEGF expression at the transcriptional and/or post-transcriptional levels. We focused our attention on VEGF₁₂₁ regulation since it is the most expressed among all transcripts.

We therefore addressed the question of whether HPV18 E6 oncoprotein could trigger VEGF gene expression in a direct manner since HPV major oncoproteins are known to act as selective transcription regulatory factors. E6 from HPV16 has been demonstrated to activate transcription from the VEGF gene promoter in a dose-dependent manner in HaCaT human immortalized keratinocytes and in NIH3T3 fibroblasts [25]. We performed experiments in the presence of the protein synthesis inhibitor, cycloheximide (CHX). CHX was added after E6 expression. It is generally agreed that available antibodies do not reliably detect the presumably very low amounts of endogenous E6 oncoprotein in HPV-positive cancer cells. We indirectly checked the presence of E6 through the decrease of p53 expression. In the presence of CHX, there is no more protein synthesis. That is why, before CHX treatment, we transfected cells by pCG-E6 in order to increase the amount of E6 protein and to be sure to have E6 protein in cells. We analysed the presence of E6 by detecting p53 protein level. The overall results showed that E6-mediated VEGF₁₂₁ up-regulation was increased after CHX treatment suggesting a direct stimulation of the VEGF promoter. As described by Lopez-Ocejo et al. [25] in HPV16 infected cervical adenocarcinoma-derived cell line, E6 viral oncoprotein stimulates VEGF promoter activity through Sp1 binding sites. Further experiments in the presence of other promoter constructs are necessary to better understand the molecular mechanism involved in HPV18 E6-mediated VEGF₁₂₁ mRNA expression. At 120 min of CHX treatment, there is no more detectable p53 protein but E6 is still present since there is an increase of VEGF₁₂₁ and consequently no more others proteins likely to increase *vegf* expression since CHX early inhibits protein synthesis. But, before 120 min of CHX treatment, our data suggest that both direct and indirect mechanisms could be involved to transactivate the *vegf* promoter. Indeed, at 30 and 60 min of CHX treatment, some regulatory protein could

still be present to increase VEGF expression. Indirect induction of VEGF expression by HPV18 E6 oncoprotein could involve regulatory factors such as HIF-1 α . Indeed, epigenetic changes such as hypoxia increase VEGF. In this context, E6 could contribute to amplifying this effect. According to this hypothesis, Ravi et al. [35] showed that p53 inhibits HIF-1 activity by targeting the HIF-1 subunit for Mdm2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation. Conversely, the loss of p53 enhanced hypoxia-induced HIF-1 levels and augmented HIF-1-dependent expression of VEGF in tumor cells. They further demonstrated that forced expression of HIF-1 in p53-expressing tumor cells promoted VEGF expression and neovascularization of tumor xenografts. These findings indicated that inactivation of p53 in tumor cells contributes to activation of the angiogenic switch via amplification of normal HIF-1-dependent responses to hypoxia and in HeLa cells p53 is subjected to degradation via E6 action. Very recently, Tang et al. [36] demonstrated that E6 oncoprotein induces HIF-1 α protein accumulation in human cervical cancer cells.

According to our results, HPV18 E6 oncoprotein-mediated VEGF₁₂₁ overexpression appears independent of p53. Indeed, p53 knockdown with a specific p53 siRNA led to a decrease of p53 protein level but did not alter VEGF mRNA expression. This result is particularly surprising given the existing evidence of the p53-mediated repression of VEGF promoter [37] and the demonstrated role of HPV18 E6 protein in targeting wild-type p53 ubiquitination via an E3-ubiquitin ligase such as E6AP and degradation [38,39]. Indeed, it was reasonable to speculate that silencing of p53 could lead to an induction of VEGF expression. Previous study showed that loss of p53 results in up-regulation of VEGF [35]. Other studies showed that adding p53 to cell lines that were in a pro-angiogenic state resulted in a reversion to an anti-angiogenic phenotype [40]. In p53^{-/-} mouse embryonic fibroblast cells, E6 transactivated the VEGF promoter via Sp-1 transcription factor binding sites [25]. Thus, in our experiments, the absence of E6-mediated VEGF induction after p53 silencing argued for a p53-independent mechanism. Transactivation of the VEGF promoter by HPV18 E6 oncoprotein is independent of its ability to interfere with the function of wild-type p53 protein.

In short, HPV18 E6 oncoprotein was known to be an etiological agent in the development of cervical cancers and we demonstrated a new pro-angiogenic activity via an increase of VEGF expression. Thus, silencing of E6 expression or blockade of E6 function could allow to define new original therapeutic strategy leading to indirect suppression of cervical cancer *in vivo* growth through a mechanism involving downregulation of VEGF-mediated angiogenesis. A recently published study [41] showed that direct injection of siRNA specific to HPV16 E6 into subcutaneous tumors in female nude mice resulted in tumor suppression effect. Thus, RNA interference may play an important role for treating and curing cervical cancers.

Acknowledgments

We thank Evelyne Chezy, Claudine Haughey-Castellani, Virginie Mougey and Cécile Vaultot for their contribution to this study. We are grateful to Pr. F. Thierry from Institut

Pasteur for providing pCG-E6 plasmid. This work was supported by a grant from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Doubs).

REFERENCES

- [1] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, N. Muñoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J. Pathol.* 189 (1999) 12–19.
- [2] H. zur Hausen, Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes, *Semin. Cancer Biol.* 9 (1999) 405–411.
- [3] K. Munger, P.M. Howley, Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Res.* 89 (2002) 213–228.
- [4] J. Doorbar, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer, *Clin. Sci. (Lond)* 110 (2006) 525–541.
- [5] J. Folkman, Y. Shing, Angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10931–10934.
- [6] E. Toussaint-Smith, D.B. Donner, A. Roman, Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors, *Oncogene* 23 (2004) 2988–2995.
- [7] N. Ferrara, T. Davis-Smyth, The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 4–25.
- [8] E. Tischer, R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J.C. Fiddes, J.A. Abraham, The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 11947–11954.
- [9] H.F. Dvorak, M. Detmar, K.P. Claffey, J.A. Nagy, L. van de Water, D.R. Senger, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107 (1995) 233–235.
- [10] K.A. Houck, D.W. Leung, A.M. Rowland, J. Winer, N. Ferrara, Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 26031–26037.
- [11] N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, D.W. Leung, Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins, *Endocr. Rev.* 13 (1992) 18–32.
- [12] Y. Ohta, Y. Watanabe, S. Murakami, M. Oda, Y. Hayashi, A. Nonomura, Y. Endo, T. Sasaki, Vascular endothelial growth factor and lymph node metastasis in primary lung cancer, *Br. J. Cancer* 76 (1997) 1041–1045.
- [13] P.A. Scott, K. Smith, R. Poulosom, A. De Benedetti, R. Bicknell, A.L. Harris, Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA vs protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E, *Br. J. Cancer* 77 (1998) 2120–2128.
- [14] T. Tokunaga, Y. Oshika, Y. Abe, Y. Ozeki, S. Sadahiro, H. Kijima, T. Tsuchida, H. Yamazaki, Y. Ueyama, N. Tamaoki, M. Nakamura, Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer, *Br. J. Cancer* 77 (1998) 998–1002.
- [15] X. Li, K. Aase, H. Li, G. von Euler, U. Eriksson, Isoform-specific expression of VEGF-B in normal tissues and tumors, *Growth Factors* 19 (2001) 49–59.
- [16] M. Bequet-Romero, O. Lopez-Ocejo, Angiogenesis modulators expression in culture cell lines positives for HPV-16 oncoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277 (2000) 55–61.
- [17] S. Fauconnet, I. Lascombe, E. Chabannes, G.L. Adessi, B. Desvergne, W. Wahli, H. Bittard, Differential regulation of vascular endothelial growth factor expression by peroxisome proliferator-activated receptors in bladder cancer cells *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23534–23543.
- [18] L. Belmont, F. Lamielle, S. Fauconnet, H. Esumi, A. Weisz, G.L. Adessi, Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor-I in endometrial adenocarcinoma cells, *Int. J. Cancer* 85 (2000) 117–123.
- [19] M.E. Beckner, Factors promoting tumor angiogenesis, *Cancer Invest.* 17 (1999) 594–623.
- [20] T. Fujisawa, J. Watanabe, Y. Kamata, M. Hamano, H. Hata, H. Kuramoto, Effect of p53 gene transfection on vascular endothelial growth factor expression in endometrial cancer cells, *Exp. Mol. Pathol.* 74 (2003) 276–281.
- [21] M.F. Parker, G.F. Arroyo, J. Geradts, A.L. Sabichi, R.C. Park, R.R. Taylor, M.J. Birrer, Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix, *Gynecol. Oncol.* 64 (1997) 242–251.
- [22] Y. Kondo, S. Aii, M. Furutani, S. Isigami, A. Mori, H. Onodera, T. Chiba, M. Imamura, Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma, *Cancer* 88 (2000) 1820–1827.
- [23] B. Linderholm, B. Lindh, B. Tavelin, K. Grankvist, R. Henriksson, p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma, *Int. J. Cancer* 89 (2000) 51–62.
- [24] G. Soufla, S. Sifakis, S. Baritaki, A. Zafiroopoulos, E. Koumantakis, D.A. Spandidos, VEGF, FGF2, TGF β 1 and TGF β 1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix, *Cancer Lett.* 221 (2005) 105–118.
- [25] O. Lopez-Ocejo, A. Vilorio-Petit, M. Bequet-Romero, D. Mukhopadhyay, J. Rak, R.S. Kerbel, Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner, *Oncogene* 19 (2000) 4611–4620.
- [26] S.H. Kim, Y.S. Juhnn, S. Kang, S.W. Park, M.W. Sung, Y.J. Bang, Y.S. Song, Human papillomavirus 16 E5 up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor through the activation of epidermal growth factor receptor, MEK/ERK1,2 and PI3K/Akt, *Cell. Mol. Life Sci.* (2006).
- [27] N. Muñoz, F.X. Bosch, S. de Sanjose, R. Herrero, X. Castellsague, K.V. Shah, P.J. Snijders, C.J. Meijer, Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 518–527.
- [28] M. Jiang, J. Milner, Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference, *Oncogene* 21 (2002) 6041–6048.
- [29] K. Butz, T. Ristriani, A. Hengstermann, C. Denk, M. Scheffner, F. Hoppe-Seyler, siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells, *Oncogene* 22 (2003) 5938–5945.
- [30] M. Bouvet, L.M. Ellis, M. Nishizaki, T. Fujiwara, W. Liu, C.D. Bucana, B. Fang, J.J. Lee, J.A. Roth, Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer, *Cancer Res.* 58 (1998) 2288–2292.
- [31] M. Scheffner, N.J. Whitaker, Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin–proteasome system, *Semin. Cancer Biol.* 13 (2003) 59–67.
- [32] K. Kanda, M. Ueda, H. Futakuchi, H. Yamaguchi, K. Mori, Y. Terai, M. Ueki, Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas, *Gynecol. Oncol.* 98 (2005) 453–461.
- [33] P.O. Van Trappen, A. Ryan, M. Carroll, C. Lecoeur, L. Goff, V.G. Gyselman, B.D. Young, D.G. Lowe, M.S. Pepper, J.H. Shepherd, I.J. Jacobs, A model for co-expression pattern analysis of

- genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer, *Br. J. Cancer* 87 (2002) 537–544.
- [34] S. Tang, M. Tao, J.P. McCoy Jr., Z.M. Zheng, The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation, *J. Virol.* 80 (2006) 4249–4263.
- [35] R. Ravi, B. Mookerjee, Z.M. Bhujwala, C.H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L.E. Dillehay, A. Madan, G.L. Semenza, A. Bedi, Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha, *Genes Dev.* 14 (2000) 34–44.
- [36] X. Tang, Q. Zhang, J. Nishitani, J. Brown, S. Shi, A.D. Le, Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 2568–2576.
- [37] D. Mukhopadhyay, L. Tsiokas, V.P. Sukhatme, Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression, *Cancer Res.* 55 (1995) 6161–6165.
- [38] M. Scheffner, J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra, P.M. Howley, The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell* 75 (1993) 495–505.
- [39] T. Crook, J.A. Tidy, K.H. Vousden, Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation, *Cell* 67 (1991) 547–556.
- [40] O.V. Volpert, K.M. Dameron, N. Bouck, Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity, *Oncogene* 14 (1997) 1495–1502.
- [41] X.Y. Niu, Z.L. Peng, W.Q. Duan, H. Wang, P. Wang, Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo, *Int. J. Gynecol. Cancer* 16 (2006) 743–751.