



UNIVERSITE IBN ZOHR AGADIR
Faculté des Sciences
et
UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques



THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université IBN ZOHR Agadir

et

Docteur de l'Université de Franche-Comté Besançon

Spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement à Agadir le **4 novembre 2015**

Par **Essaada BELGLAIAA**

Née le 15 Avril 1987 à Aouint Yghomane, Assa Zag (Maroc)

Génotypage moléculaire des papillomavirus humains chez des femmes à risque de cancer du col de l'utérus : Implication pour le dépistage et la prévention

Composition du jury :

Président :	Pr. Ahmed BELMOUDEN	Université IBN ZOHR, Agadir, Maroc
Directeurs de thèse :	Pr. Christiane MOUGIN	Université de Franche-Comté, Besançon, France
	Pr. Said CHOUHAM	Université IBN ZOHR, Agadir, Maroc
Rapporteurs :	Pr. Aicha KHARBACH	Université Mohammed V, Rabat, Maroc
	Pr. Michel SEGONDY	Université de Montpellier I, Montpellier, France
	Pr. Elmostapha ZEGGARI	Université IBN ZOHR, Agadir, Maroc
Examineurs :	Pr. Jean-Luc PRETET	Université de Franche-Comté, Besançon, France
	Pr. Yassir AIT BENKADDOUR	Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc
Invités :	Pr. Omar AKHAYAT	Université IBN ZOHR, Agadir, Maroc
	Dr. Abdelmoula BOULAMIZAT	Direction Régionale de la Santé, Agadir, Maroc

Remerciements

Je tiens à remercier vivement Madame le Professeur Christiane Mougin de m'avoir accueillie au sein de ses deux laboratoires (Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire et de l'EA3181) et de m'avoir donné la chance de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. Je tiens aussi à lui exprimer ma gratitude pour sa présence et ses conseils, ainsi que pour m'avoir transmis ses connaissances, sa rigueur, son enthousiasme et son goût pour la recherche.

Je remercie également mon directeur marocain, le Professeur Said Chouham, pour m'avoir formée et guidée tout au long de cette thèse avec rigueur et passion, et pour m'avoir fait si souvent confiance.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur Jean-Luc Prétet, pour l'attention et le soutien dont il a fait preuve à mon égard, en toutes circonstances.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à :

Monsieur le Professeur Ahmed BELMOUDEN, président

Madame le Professeur Aicha KHARBACH, rapporteur,

Monsieur le Professeur Michel SEGONDY, rapporteur,

Monsieur le Professeur Yassir AIT BENKADDOUR, examinateur,

Monsieur le Professeur Elmostapha ZEGGARI, examinateur,

Monsieur le Professeur Omar AKHAYAT, invité,

Monsieur le Docteur Abdelmoula BOULAMIZAT, invité,

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.

Merci à l'équipe de recherche du laboratoire de biologie Cellulaire et Génétique Moléculaire de l'université IBN ZOHR d'Agadir.

Un très grand merci aux membres du service d'Anatomie-pathologique du Centre Hospitalier Régional Hassan II d'Agadir (Maroc) (Dr Mouaouya, Dr Aksim, Ajgali Fatima, Nasr Fatima) pour leur aide précieuse et leur travail de grande qualité dans le recrutement des femmes marocaines et le diagnostic cytologique des frottis.

Merci à l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire du 5^{ème} Hôpital Militaire de Guelmim (Dr Hicham El annaz, Osama....) pour votre accueil chaleureux et votre aide.

Un très grand merci à tous les membres de l'équipe de recherche EA3181 et du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du CHRU Jean Minjoz de Besançon : Adrien, François, Elise, Adeline, Anne, Julie, Aurélie, Sophie, Mariette, Evelynne, Lise, Alice, Laurence, David, Pascale, Sandra,

Sandrine, Charlie, Olivier,....J'ai beaucoup apprécié de travailler au sein d'une équipe aussi formidable, compétente et sérieuse et en même temps si conviviale et même amicale.

Merci aux membres de l'AFFDU (Association Française des Femmes Diplômées des Universités) : Geneviève, Catherine, Claude, Anne.....

Je dédie cette thèse à ma mère, ma sœur Jila, ma famille et mes ami(e)s, c'est grâce à vous que je suis arrivée au bout de cette thèse.

Financements

- Le projet français concernant les femmes françaises âgées de plus de 65 ans a été financé par la Ligue Contre le Cancer (Comité du Doubs et CCIR-GE) et la région de Franche-Comté.
- Le projet Marocain concernant le dépistage chez des femmes Marocaines de la région de Souss a bénéficié d'un financement de la part de l'Université de Franche-Comté, la Ligue Contre le Cancer (CCIR-GE).
- Mon premier séjour à Besançon, France (6 mois) a été financé par l'Université de Franche-Comté et l'AFFDU » de Paris, France (Bourse « Leclère-Giry »).
- Mon deuxième séjour (5 mois) a été financé par l'équipe de recherche « EA3181 » et deux aides financières de l'AFFDU de Besançon et Dole (France).
- Ma participation (inscription, transport, hébergement, nourriture) à deux congrès : i) africain (à Marrakech, Maroc) intitulé AORTIC 2015 « 10th International Conference on Cancer in Africa ». ii) international (Lisbonne, Portugal) intitulé « 30th International Papillomavirus Conference » a été financée par l'Ecole Doctorale « Environnement et Santé » de l'Université de Franche-Comté, Besançon, France.

Résumé

A l'échelle mondiale, le cancer du col de l'utérus (CCU) constitue un problème majeur de santé publique touchant 528 000 femmes, il est responsable de 266 000 décès chaque année. Son taux d'incidence varie d'un pays à l'autre et reste remarquablement plus élevé dans les pays en voie de développement où l'accès aux soins, même primaires reste précaire. De nombreuses études épidémiologiques ont démontré qu'environ 99,7 % des cancers du col de l'utérus sont associés à l'infection par des Papillomavirus Humains (HPV) oncogènes, en particulier les HPV16 et 18. Ces données ont permis le développement de vaccins prophylactiques dirigés contre ces deux génotypes viraux. Il s'agit d'un des cancers les plus faciles à prévenir et à traiter à condition qu'il soit détecté suffisamment tôt et traité correctement. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier deux populations de femmes à risque du CCU qui vivent sur deux continents différents (Afrique/Europe). Ces deux populations étaient référées auprès de médecins hospitaliers pour des problèmes gynécologiques. La majorité des femmes n'avaient pas été dépistées (femmes marocaines), ou avaient été sous-dépistées selon les recommandations de l'ANAES (femmes françaises de plus de 65 ans). Au cours de cette étude, les femmes ont eu un frottis cervico-utérin (FCU) pour une analyse cytologique et une recherche d'ADN d'HPV, soit par amplification de cible (PCR ; population marocaine), soit par amplification de signal (test hc2 ; population française). Les échantillons HPV positifs ont ensuite été génotypés, soit par génotypage complet (INNO-LiPA ; population marocaine), soit par génotypage partiel (qPCR HPV16, 18 et 45 ; population française). Les frottis étaient normaux dans la majorité des cas : chez 81,9% des femmes marocaines et 68,6% des femmes françaises. Les frottis de signification indéterminée (ASC-US) ont été diagnostiqués chez 15,8% des femmes françaises. Les frottis en faveur d'une lésion de bas grade (LGSIL) étaient observés chez 12,9% des femmes marocaines et 7,4% des femmes françaises. Les frottis en faveur d'une lésion de haut grade (HGSIL) étaient de 5,2% chez les femmes marocaines et 4% chez les femmes françaises. Les frottis évocateurs de cancer ont été décelés uniquement dans la population française (2,9%). La prévalence d'HPV était du même ordre de grandeur (23%) dans les 2 populations et augmentait avec la sévérité de la lésion cytologique pour atteindre 75% dans les frottis HGSIL chez les femmes marocaines et plus de 90% chez les femmes françaises. La quasi-totalité des échantillons en faveur d'un CCU étaient infectés par un HPV. Par ailleurs, dans les deux populations, le génotype prévalent dans tous les types de frottis était l'HPV16, génotype le plus carcinogène. Un tiers (36,2%) de la cohorte des femmes marocaines était infecté par le VIH, qui s'est avéré le plus important facteur prédictif de l'infection HPV, indépendamment des autres facteurs de risque étudiés (caractéristiques sociodémographiques, comportement sexuel, tabagisme...). En France, le dépistage du CCU est préconisé tous les trois ans chez les femmes de 25 à 65 ans. Toutefois, les femmes âgées de plus de 65 ans dont l'espérance de vie est élevée et qui n'ont pas été ou qui ont été mal dépistées pourraient bénéficier d'un test HPV dont la Valeur Prédictive Négative est très élevée. Au Maroc, en l'absence de dépistage organisé, il est aussi souhaitable de proposer un test HPV dans le cadre du dépistage du CCU. La vaccination anti-HPV pourrait aussi prévenir ce cancer.

Mots clés : Dépistage du cancer du col utérin, HPV, frottis cervico-utérin, femmes marocaines, femmes françaises de plus de 65 ans.

Abstract

Worldwide, cervical cancer (CC) is a major public health problem affecting 528 000 women and responsible for 266 000 deaths every year. Its incidence rate varies from one country to another and remains remarkably higher in developing countries where access to care, even primary remains precarious. Many epidemiological studies have shown that approximately 99.7% of cancers of the cervix are associated with infection with oncogenic Human Papillomavirus (HPV), especially HPV16 and 18. These data allowed the development of prophylactic vaccines directed against these two viral genotypes. It is one of the easiest cancers to prevent by early detection of precancerous lesions. The objective of this PhD thesis work was to study two populations of women at risk of CC who live on two different continents (Africa / Europe). These two populations were referred to hospital doctors for gynecological problems. The majority of women were not screened (Moroccan women) or were under-screened according to ANAES recommendations (French women over 65 years). At entry in the study, women had a cervical smear for cytology and HPV DNA research, either by target amplification (PCR; Moroccan population) or signal amplification (hc2 test; French population). HPV positive samples were then genotyped, either with full genotyping (INNO-LiPA; Moroccan population) or with partial genotyping (qPCR targeting HPV16, 18 and 45; French population).

Smears were normal in most cases: in 81.9% of Moroccan women and 68.6 % of French women. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US) were diagnosed in 15.8% of French women. Smears in favour of low grade lesion (LGSIL) were observed in 12.9% of Moroccan women and 7.4 % of French women. Smears in favour of high grade lesion (HGSIL) were in 5.2 % of Moroccan women and 4% of French women. Smears suggestive of cancer were detected only in the French population (2.9%).

The prevalence of HPV was of the same order of magnitude (23%) in both populations; and increased with the severity of cytological lesions to reach 75% in HGSIL smears among Moroccan women and over 90% among French women. Almost all samples with CC were infected with high risk HPV. Furthermore, in both populations, the most prevalent genotype in all types of smear was HPV16, known to be the most carcinogenic. One third (36.2%) of the cohort of Moroccan women was infected with HIV, which was the most powerful predictor of HPV infection, independent of other risk factors studied (sociodemographic characteristics, sexual behavior, smoking ...).

In France, CC screening is recommended every three years for women 25 to 65 years. However, women over 65 whose life expectancy is high and who have not been or have been poorly screened could benefit from an HPV test. In Morocco, in absence of organized screening, it is also desirable to provide an HPV test as a part of CC screening. The HPV vaccines could improve the situation by reducing the incidence and mortality from this cancer.

Keywords: cervical cancer screening, HPV, cervical smear, Moroccan women, French women over 65 years.

ملخص

يعتبر سرطان عنق الرحم مشكلا رئيسيا للصحة العمومية في العالم، حيث يؤثر على ٥٢٨٠٠٠ من النساء و مسؤول عن ٢٦٦٠٠٠ حالة وفاة كل سنة. معدل الإصابة به يختلف من بلد إلى آخر، و يبقى أعلى بشكل ملحوظ في البلدان النامية حيث الحصول على الرعاية الصحية الروتينية تظل محفوفة بالمخاطر. لقد أظهرت العديد من الدراسات الوبائية والمخبرية أن حوالي ٩٩,٧٪ من سرطانات عنق الرحم ترتبط بالإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري (HPV)، خاصة النوعين ١٦ و ١٨ وقد مكنت هذه المعطيات من تطوير لقاح ضد هذين النوعين. إنه من أسهل أنواع السرطانات من حيث الوقاية و العلاج شرط أن يتم الكشف عنه مبكرا و علاجه بشكل صحيح. لهذا كان الهدف من هذه الأطروحة دراسة مجموعتين من النساء المعرضات لخطر الإصابة بسرطان عنق الرحم، و اللواتي يعشن في قارتين مختلفتين (أفريقيا/أوروبا). هؤلاء النساء مرسلات من طرف أطباء المستشفى بسبب ظهور مشاكل صحية نسائية. غالبية النساء لم يقمن بالفحص المبكر لسرطان عنق الرحم (النساء المغربيات) أو تم فحصهن بشكل غير صحيح وفقا لتوصيات ANAES (النساء الفرنسيات البالغات أكثر من 65 سنة). أثناء الدراسة قامت النساء بمسحة عنق الرحم (FCU) للتحليل الخلوي والبحث عن الحمض النووي (ADN) لفيروس الورم الحليمي البشري (HPV)، إما عن طريق التضخيم الهدف (PCR، النساء المغربيات) أو تضخيم الإشارات (اختبار hc2، النساء الفرنسيات). بعد ذلك تم خضع العينات المصابة بفيروس HPV للتنميط الجيني : إما بواسطة التنميط الجيني الكامل (INNO-LiPA، النساء المغربيات) أو التنميط الجيني الجزئي (qPCR HPV ١٦, ١٨, ٤٥، النساء الفرنسيات). تبين النتائج المحصل عليها أن مسحة عنق الرحم كانت طبيعية في معظم الحالات: عند ٨١,٩٪ من النساء المغربيات و ٦٨,٦٪ من النساء الفرنسيات. تم تشخيص مسحات الخلايا الشاذة الشائكة بدون دلالة محددة (ASC-US) في ١٥,٨٪ من النساء الفرنسيات و مسحات من فئة درجة منخفضة (LGSIL) في ١٢,٩٪ من النساء المغربيات و ٧,٤٪ من النساء الفرنسيات أما المسحات من فئة الدرجة العالية (HGSIL) فقد شخضت في ٥,٢٪ من النساء المغربيات و ٤٪ من النساء الفرنسيات. تم كشف مسحات الأورام السرطانية فقط عند النساء الفرنسيات (٢,٩٪). لقد بلغ معدل رصد فيروس HPV نفس الترتيب من حيث الحجم (٢٣٪) في كلتا المجموعتين حيث يرتفع هذا المعدل حسب شدة الآفات الخلوية حيث وصل في محسات (HGSIL) إلى ٧٥٪ عند النساء المغربيات و أكثر من ٩٠٪ عند النساء الفرنسيات. لقد لوحظ أن غالبية المسحات السرطانية مصابة بفيروس HPV. علاوة على ذلك، في كلتا المجموعتين يعتبر HPV16 هو النمط الأكثر سيادة و الأكثر مسرطن. ثلث النساء المغربيات المشاركات (٣٦,٢٪) مصابات بفيروس نقص المناعة البشرية المكتسب (VIH)، الذي تبين أنه أهم مؤشر للإصابة بفيروس HPV، بغض النظر عن العوامل الأخرى المدروسة (الخصائص الاجتماعية والديمغرافية، السلوك الجنسي، التدخين...).

في فرنسا، ينصح بالكشف عن سرطان عنق الرحم كل ثلاث سنوات للنساء المتراوحة أعمارهن ما بين ٢٥ و ٦٥ سنة. النساء البالغات من العمر أكثر من ٦٥ سنة واللواتي لم يتم فحصهن أو تم فحصهن بشكل غير صحيح، يمكن أن يستفدن من اختبار HPV، الذي يتميز بقيمة تنبئية سلبية جد مرتفعة. في المغرب، وفي غياب الفحص المنظم، فمن المستحسن أيضا إقتراح اختبار HPV كجزء من نظام الكشف المبكر عن سرطان عنق الرحم. اللقاح المضاد لهذا الفيروس يمكن أن يمنع هذا النوع من السرطان.

الكلمات المفتاحية: الكشف عن سرطان عنق الرحم، فيروس الورم الحليمي البشري (HPV)، مسحة عنق الرحم، النساء المغربيات، النساء الفرنسيات البالغات أكثر من 65 سنة.

Table des matières

Liste des tableaux	- 8 -
Liste des abréviations	- 10 -
Préambule	- 11 -
Partie 1 : Revue de la littérature	- 13 -
I. Papillomavirus et cancer du col de l'utérus	- 15 -
1. Classification et tropisme des papillomavirus	- 15 -
2. Structure générale des HPV	- 16 -
3. Causalité entre infection par un HPV et cancer du col de l'utérus	- 17 -
4. Histoire naturelle de l'infection cervicale à HPV muqueux	- 17 -
4.1. Structure anatomique du col de l'utérus	- 17 -
4.2. Transmission sexuelle	- 18 -
4.3. Transmission non sexuelle	- 18 -
4.4. Cycle viral des HPV	- 19 -
5. Histoire naturelle des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus	- 20 -
5.1. Lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus	- 20 -
5.1.1. Condylomes cervicaux	- 20 -
5.1.2. Dysplasies cervicales	- 20 -
5.1.3. Cancers invasifs du col utérin	- 21 -
5.2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus	- 21 -
5.2.1. Facteurs influençant la progression des lésions dysplasiques du col utérin	- 23 -
a. Facteurs liés au virus	- 23 -
b. Facteurs liés à l'hôte	- 24 -
c. Facteurs liés à l'environnement	- 25 -
5.2.2. Facteurs influençant la régression des lésions dysplasiques du col utérin	- 25 -
II. Epidémiologie du cancer du col de l'utérus	- 26 -
1. Situation dans le monde	- 26 -
1.1. Données d'incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde	- 26 -
1.2. Données de mortalité liées au cancer du col de l'utérus dans le monde	- 26 -
2. Situation en Europe et en France	- 28 -
2.1. Données d'incidence du cancer du col de l'utérus en France	- 29 -

2.2.	Données de mortalité liées au cancer du col de l'utérus en France	- 30 -
3.	Situation au Maroc	- 31 -
3.1.	Données d'incidence du cancer du col de l'utérus au Maroc	- 31 -
3.2.	Données de mortalité liée au cancer du col de l'utérus au Maroc	- 34 -
3.3.	Travaux de recherche sur l'infection à HPV et les lésions du col de l'utérus chez les femmes marocaines	- 36 -
4.	Données épidémiologiques de l'infection à VIH et son association avec le développement du cancer du col de l'utérus en Afrique et au Maroc.....	- 41 -
4.1.	Estimation de l'épidémie de l'infection à VIH	- 41 -
4.1.1.	Situation en Afrique.....	- 41 -
4.1.2.	Situation au Maroc	- 43 -
4.2.	Association épidémiologique entre infection à VIH et cancer du col de l'utérus	- 44 -
III.	Prévention du cancer du col de l'utérus	- 45 -
1.	Prévention primaire	- 45 -
1.1.	Vaccination prophylactique.....	- 45 -
1.2.	Systèmes et programmes de vaccination anti-HPV	- 46 -
2.	Prévention secondaire : Dépistage des lésions du col de l'utérus	- 47 -
2.1.	Techniques de dépistage des lésions du col de l'utérus	- 47 -
2.1.1	Dans les pays développés.....	- 47 -
a.	Frottis cervico-utérin (FCU)	- 47 -
b.	Colposcopie	- 49 -
2.1.2	Dans les pays en voie de développement	- 50 -
2.2.	Techniques de détection du génome viral	- 51 -
2.2.1.	Southern blot.....	- 51 -
2.2.2.	Hybridation in situ (HIS).....	- 52 -
2.2.3.	Hybridation en phase liquide : Hybrid Capture 2 (hc2)	- 52 -
2.2.4.	Techniques de PCR conventionnelles.....	- 53 -
a.	Couples d'amorces consensus.....	- 53 -
b.	Couples d'amorces spécifiques	- 54 -
2.2.5.	Génotypage	- 54 -
2.2.6.	PCR quantitative en temps réel (qPCR pour quantitative PCR).....	- 55 -
3.	Dépistage et prise en charge thérapeutique du cancer invasif du col utérin en France ..	- 56 -
3.1.	Organisation du dépistage en France.....	- 56 -

3.2.	Conduite diagnostique à tenir devant un frottis anormal.....	- 57 -
3.2.1.	Frottis évocateur d'un ASC-US	- 57 -
3.2.2.	Frottis évocateur d'une lésion de bas grade	- 58 -
3.2.3.	Frottis évocateur d'une lésion de haut grade	- 59 -
3.2.4.	Frottis évocateur de cancer.....	- 59 -
3.2.5.	Frottis anormal dans certaines situations	- 60 -
a.	Chez la femme enceinte	- 60 -
b.	Chez la femme ménopausée	- 60 -
c.	Chez une femme séropositive pour le VIH	- 60 -
4.	Dépistage et prise en charge thérapeutique du cancer invasif du col utérin au Maroc...	- 60 -
Partie 2 : Travaux personnels		- 63 -
I.	Publication n°1	- 65 -
1.	Objectifs.....	- 67 -
2.	Matériels et Méthodes.....	- 67 -
2.1.	Echantillons cliniques	- 67 -
2.2.	Diagnostic cytologique	- 67 -
2.3.	Test Hybrid Capture 2 (hc2).....	- 67 -
2.4.	Extraction de l'ADN	- 67 -
2.5.	PCR en temps réel (qPCR).....	- 67 -
3.	Résultats	- 68 -
3.1.	Diagnostic cytologique en fonction des groupes d'âge.....	- 68 -
3.2.	Prévalence d'HPV-HR	- 69 -
3.3.	Suivi cytologique des patientes	- 70 -
4.	Conclusion	- 70 -
Publication n°2		- 79 -
Publication n°2		- 79 -
Publication n°2		- 79 -
Publication n°2		- 79 -
1.	Objectifs.....	- 81 -
2.	Matériels et Méthodes.....	- 81 -
2.1.	Population étudiée	- 81 -
2.2.	Réalisation des frottis cervico-utérins (FCU).....	- 81 -

2.2.1.	Recueil de l'information	- 81 -
2.2.2.	Prélèvement pour FCU et test HPV	- 82 -
a.	Frottis conventionnel	- 82 -
b.	Milieu liquide pour test HPV	- 83 -
2.2.3.	Méthode de coloration des FCU.....	- 83 -
2.2.4.	Méthode de lecture des lames.....	- 83 -
2.2.5.	Prise en charge des lésions.....	- 83 -
2.3.	Etude moléculaire des HPV	- 83 -
2.3.1.	Extraction de l'ADN	- 84 -
2.3.2.	Détection de l'ADN d'HPV	- 84 -
a.	PCR β -globine	- 84 -
b.	PCR HPV consensus	- 84 -
c.	Electrophorèse et migration sur gel.....	- 85 -
d.	Révélation à l'aide de la lumière ultraviolette	- 85 -
2.3.3.	Génotypage d'HPV : technique INNO-LiPA HPV Genotyping Extra®	- 85 -
2.3.4.	Analyse statistique	- 86 -
3.	Résultats	- 86 -
3.1.	Caractéristiques des patientes	- 86 -
3.2.	Résultats de cytologie.....	- 87 -
3.3.	Prévalence et distribution des HPV	- 87 -
3.4.	Facteurs de risque	- 87 -
4.	Conclusion	- 89 -
5.	Résultats complémentaires.....	- 90 -
Partie 3: Discussion et perspectives		- 103 -
Conclusion		- 120 -
Références bibliographiques		- 121 -
Annexes		- 137 -

Liste des figures

Figure 1: Classification phylogénétique des papillomavirus (de Villiers 2013a)	- 15 -
Figure 2 : Représentation schématique du génome d'HPV16	- 16 -
Figure 3: Diagramme du col utérin représentant la zone de jonction entre l'épithélium pavimenteux et l'épithélium glandulaire (Cartier 1984).....	- 18 -
Figure 4 : Infection productive par HPV après une microlésion de l'épithélium malpighien de l'exocol de l'utérus (Middleton et al. 2003)	- 20 -
Figure 5 : Aspect histologique des dysplasies du col de l'utérus (Bioimage.free.fr)	- 21 -
Figure 6 : Schématisation de l'histoire naturelle des lésions du col de l'utérus	- 22 -
Figure 7 : Taux d'incidence et mortalité par cancer du col de l'utérus, standardisés sur l'âge, dans le monde (Ferlay et al. 2015)	- 27 -
Figure 8 : Taux d'incidence et mortalité par cancer du col de l'utérus, standardisés sur l'âge, par zones géographiques européennes et pays d'Europe (Ferlay et al. 2013)	- 28 -
Figure 9 : Taux d'incidence du cancer du col de l'utérus par rapport aux autres cancers féminins (tous âges confondus) en France en 2012 (WHO/ICO 2014a)	- 29 -
Figure 10 : Taux de mortalité par cancer du col de l'utérus par rapport aux autres cancers féminins (tous âges) en France, 2012 (WHO/ICO 2014a).	- 30 -
Figure 11 : Variation de l'incidence et de la mortalité du cancer du col de l'utérus en fonction de l'âge en France, 2012 (WHO/ICO 2014a)	- 31 -
Figure 12 : Taux d'incidence du cancer du col de l'utérus chez la femme marocaine par rapport aux autres cancers féminins (tous âges confondus) en 2012 (WHO/ICO 2014b).....	- 32 -
Figure 13 : Taux d'incidence du cancer du col utérin, standardisé sur l'âge, dans les pays d'Afrique du Nord en 2012 (WHO/ICO 2014b)	- 33 -
Figure 14 : Nombre annuel de nouveaux cas de cancer du col de l'utérus (par groupe d'âge) au Maroc en 2012 (WHO/ICO 2014b).	- 33 -
Figure 15: Taux de mortalité par cancer du col de l'utérus chez la femme marocaine par rapport à d'autres cancers féminins tous âges confondus au Maroc en 2012 (WHO/ICO 2014b).....	- 34 -
Figure 16: Taux de mortalité par cancer du col utérin, standardisé sur l'âge, au Maroc et dans les pays de l'Afrique du Nord (WHO/ICO 2014b).	- 35 -

Figure 17: Nombre annuel de décès par cancer du col de l'utérus au Maroc en 2012 (par groupe d'âge) (WHO/ICO 2014b).	35 -
Figure 18 : Prévalence du VIH parmi les jeunes entre 15 et 24 ans en Afrique : période 2001-2013 (ONUSIDA 2015)	42 -
Figure 19: Nouvelles infections par le VIH parmi les jeunes entre 15 et 24 ans en Afrique : période 2001-2013 (ONUSIDA 2015)	42 -
Figure 20: Répartition des cas VIH/sida notifiés pour la période 1986-2013 (ONUSIDA 2014).....	43 -
Figure 21 : Évolution des cas de VIH/sida notifiés pour la période 2009-2013 (ONUSIDA 2014)....	43 -
Figure 22 : Prévalence du VIH chez les professionnelles du sexe. National et Souss-Massa-Drâa. Surveillance sentinelle 2001-2012 (ONUSIDA 2014).....	44 -
Figure 23: Col de l'utérus normal sans coloration (à gauche) et après coloration au Lugol (à droite) -	49 -
Figure 24: Col de l'utérus anormal après coloration à l'acide acétique (à gauche) et au Lugol (à droite).....	49 -
Figure 25: Principe de la technique hc2	53 -
Figure 26: PCR-Electrophorèse des produits amplifiés (image empruntée à C. Mougin et L.Madoz, avec leur accord)	54 -
Figure 27: Localisation des sondes spécifiques d'HPV sur une bandelette d'INNO-LiPA.....	55 -
Figure 28: Principe de la quantification absolue par PCR en temps réel.	55 -
Figure 29 : Conduite diagnostique en cas de frottis avec atypies des cellules malpighiennes (ASC) (ANAES 2002).....	57 -
Figure 30 : Conduite diagnostique en cas de frottis avec lésion malpighienne intraépithéliale de bas grade (LSIL) (ANAES 2002).....	59 -
Figure 31 : Algorithme de la détection précoce du cancer du col utérin au Maroc (ALSC 2011)	61 -
Figure 32: Courbes d'amplification de la gamme albumine.....	69 -
Figure 33: Courbes d'amplification de la gamme duplex 16/18	69 -
Figure 34 : Courbes d'amplification de la gamme d'HPV45.....	70 -
Figure 35 : Charge virale des HPV16 et HPV18 dans les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus chez les femmes âgées de plus de 65 ans.....	71 -
Figure 36 : Matériel utilisé pour la réalisation du frottis cervico-utérin classique, sur lames.....	82 -
Figure 37: Milieu de transport UTM TM pour frottis en milieu liquide	83 -
Figure 38 : Migration sur gel d'agarose des produits de PCR MY09/11.....	85 -

Figure 39: Prévalence des géotypes d'HPV dans les infections simples et multiples chez 14 femmes marocaines non infectées par le VIH.....	- 91 -
Figure 40 : Situation des registres du cancer en France métropolitaine	- 107 -
Figure 41: Ensemble des obstacles au dépistage du CCU par frottis chez les femmes (Badet 2012)-	111 -

Liste des tableaux

Tableau 1 : Potentiel évolutif des lésions du col de l'utérus en fonction du diagnostic cytologique (Melnikow et al. 1998)	- 23 -
Tableau 2 : Potentiel évolutif des lésions du col de l'utérus en fonction du diagnostic histologique (Ostör 1993)	- 23 -
Tableau 3 : Taux d'incidence du cancer du col chez la femme en France en 2012 comparé à l'Europe de l'Ouest et au Monde (WHO/ICO 2014a)	- 30 -
Tableau 4 : Taux de mortalité par cancer du col de l'utérus en France en 2012 comparé à l'Europe de l'Ouest et au Monde (WHO/ICO 2014a)	- 31 -
Tableau 5 : Taux d'incidence du cancer du col chez la femme marocaine en 2012 comparé à l'Afrique du Nord et au Monde (WHO/ICO 2014b).....	- 32 -
Tableau 6 : Taux de mortalité par cancer du col chez la femme marocaine en 2012 comparé à l'Afrique du Nord et au Monde (WHO/ICO 2014b).....	- 34 -
Tableau 7: Distribution de l'infection HPV dans le col de l'utérus dans les principales études marocaines	- 38 -
Tableau 8: Résumé du système de Bethesda 2001.....	- 48 -
Tableau 9: Séquences des amorces et sondes utilisées en qPCR.....	- 68 -
Tableau 10 : Analyse multivariée* des caractéristiques associées à l'infection par des HPV oncogènes.	- 88 -
Tableau 11 : Analyse multivariée* des caractéristiques associées aux anomalies cytologiques (lésions intraépithéliales de bas et de haut grade).	- 89 -
Tableau 12 : Prévalence des infections HPV simples et multiples et distribution des HPV16 chez les femmes infectées par le VIH	- 90 -

Annexes

Annexe 1 : Questionnaire : Dépistage de l'infection à HPV par FCU chez les femmes marocaines de la région Souss

Annexe 2 : Interprétation graphique de la lecture des résultats de génotypage par INNO-LiPA

Liste des abréviations

A

ADC : Adénocarcinome ou « *Adenocarcinoma* »
 ADN : Acide DésoxyriboNucléique
 AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé
 AGC : *Atypical Glandular Cells* ou atypies des cellules glandulaires
 AIS : Adénocarcinome *in situ*
 ALCS : Association de Lutte contre le SIDA
 ALSC : Association Lalla Salma de lutte contre le Cancer
 AMO : Assurance Maladie obligatoire
 Anaes : Agence Nationale de l'Accréditation et de l'Evaluation des Soins
 ARN : Acide Ribonucléoprotéique
 ASC-H: *Atypical Squamous Cells - cannot exclude a High Grade Squamous Intraepithelial Lesion*
 ASC-US: *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*

C

CAS : Carcinome AdénoSquameux ;
 CCU : Cancer du Col de l'utérus
 CE : Carcinome Epidermoïde
 CIC, Carcinome Invasif du Col utérin
 CIN : *Cervical Intraepithelial Neoplasia* ou néoplasie intraépithéliale cervicale
 CIS : Carcinome *in situ*
 CNR : Comité national des registres
 Cq : *Cycle of quantification*
 CSI : Cancer Squameux Invasif
 CV : Charge Virale

E

E1BS: *E1 Binding Site*
 E : *Early*

F

FCU: Frottis Cervico-Utérin
 FNPEIS : Fonds National de Prévention, d'Éducation et d'Information Sanitaires **H**
 hc2 : Hybrid Capture 2
 HIS : Hybridation *In Situ*
 HPV BR : HPV Bas Risque
 HPV HR : HPV Haut Risque
 HPV : *Human PapillomaVirus*
 HSIL: *High grade Squamous Intraepithelial Lesion*

I

IARC: International Agency for Research on Cancer
 IC : intervalles de confiance
 ICO : Centre d'Information sur l'HPV et Cancers
 INAYA : Terme Arabe qui veut dire 'prendre soin de vous'

INS : Inflammation Non Spécifique
 INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
 IVA : Inspection Visuelle à Acide acétique
 IVL : Inspection Visuelle au Lugol

J

JPC : Jonction Pavimento-Cylindrique

L

L : *Late*
 LCR : *Long Control Region*
 LI : Lésion inflammatoire
 LSIL: *Low grade Squamous Intraepithelial Lesion*

N

NILM: *Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy*

O

ORF : *Open Reading Frame*
 ori : origine de la replication

P

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
 PCR : *Polymerase Chain Reaction*
 PG : Patti Gravitt
 PV : Papillomavirus

Q

qPCR : *quantitative PCR*

R

RAD : Résection à l'Anse Diathermique
 RAMEL : Régime d'Assistance Médicale aux Economiquement Démunis
 RDS : *Respondent-Driven Sampling*
 RNHE : Registre national de l'hémopathie de l'enfant
 RNTSE : Registre national des tumeurs solides de l'enfant

S

SCC : *Squamous Cell Carcinoma* ou Carcinome à Cellules Squameuses
 SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

T

TAG : Transformation Atypique de Grade

U

UTM : *Universal Transport Medium*

V

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

Préambule

Le cancer du col de l'utérus (CCU) est le 4^{ème} cancer féminin le plus fréquent, et le 7^{ème} au classement général (toutes localisations confondues) au monde, avec environ 528 000 nouveaux cas et 266 000 décès estimés chaque année. Environ 85% des nouveaux cas surviennent dans les pays en voie de développement où il représente près de 12% de tous les cancers féminins (Ferlay et al. 2015).

En France, malgré l'absence d'un programme de dépistage organisé, l'introduction de frottis cervico-utérin (FCU), la détection précoce et le traitement des lésions pré-invasives du col ont permis de réduire le nombre de nouveaux cas par an de 6000 en 1975 (Belot et al. 2008) à 2862 en 2012 (WHO/ICO. 2014a). Le nombre de décès a par conséquent chuté de 2500 en 1975 (Belot et al. 2008) à 1167 en 2012 (WHO/ICO. 2014a). Aujourd'hui, le CCU est, en France, le 12^{ème} en terme d'incidence et le 14^{ème} en terme de mortalité (WHO/ICO. 2014a).

Si l'incidence et la mortalité dues à cette pathologie ont diminué de façon considérable dans les pays où se pratique le dépistage, elles restent élevées au Maroc où peu de femmes se font dépister. Ce fléau, représente une des atteintes les plus graves pour la santé des femmes marocaines. Avec 2258 nouveaux cas et 1076 décès chaque année, le CCU représente le 2^{ème} cancer féminin après le cancer du sein (WHO/ICO. 2014b). Il touche la femme jeune et n'est le plus souvent découvert qu'à un stade avancé. Les constatations cliniques non systématiques dans les différents centres de prise en charge rapportent des diagnostics à des stades avancés et un taux de pertes de vue élevé ce qui rend les résultats thérapeutiques modestes et le coût de la prise en charge élevé.

Ce cancer présente une particularité biologique. Il est considéré comme la seule tumeur humaine quasi totalement viro-induite (zur Hausen 2000). Ce sont des Papillomavirus Humains (HPV) oncogènes, en particulier les HPV16 et 18 qui sont responsables du développement des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (de Sanjose et al. 2010 ; Guardado-Estrada et al. 2014). La possibilité de détecter l'ADN des HPV, et l'utilisation possible de cette détection pour le dépistage des lésions du col utérin a suscité un intérêt considérable. Par ailleurs, Le développement de stratégies de prévention, de détection précoce et de prise en charge du CCU passe par une meilleure connaissance de son épidémiologie. Un certain nombre de données sont indispensables pour une politique de santé optimum en vue d'une meilleure prévention et prise en charge.

Dans le cadre de ce travail de thèse nous avons réalisé une étude épidémiologique chez deux cohortes de femmes à risque du CCU (une cohorte de femmes françaises âgées de plus de 65 ans issues de la région de Franche-Comté (France) et une population de femmes marocaines de la région Souss (Maroc)). Notre travail avait pour but d'évaluer par co-testing la prévalence des HPV à haut

risque notamment les HPV 16, 18 et 45 ainsi que la fréquence des frottis pathologiques chez les femmes françaises âgées de plus de 65 ans et étudier l'épidémiologie moléculaire des HPV chez les femmes marocaines.

Ce manuscrit rapporte mon travail de thèse en trois parties :

La première partie est une revue bibliographique présentant des généralités sur la biologie des HPV et l'histoire naturelle des lésions du col utérin associées à ces virus et les facteurs de risque, puis l'épidémiologie du CCU et enfin la prévention du CCU.

La seconde partie présente les résultats des travaux réalisés au cours de ma thèse, sous forme de publications

1. Les résultats d'une étude portant sur une cohorte hospitalière de femmes française âgées de plus de 65 ans dans un but de déterminer s'il existe un intérêt à poursuivre le dépistage du CCU après 65 ans.
2. Les résultats d'une étude portant sur une cohorte hospitalière de femmes marocaines de la région Souss, dans un but d'évaluer la prévalence et la distribution des génotypes d'HPV ainsi que la cytologie, en tenant compte des facteurs sociodémographiques, du style de vie et du statut VIH qui peuvent influencer l'infection aux HPV.

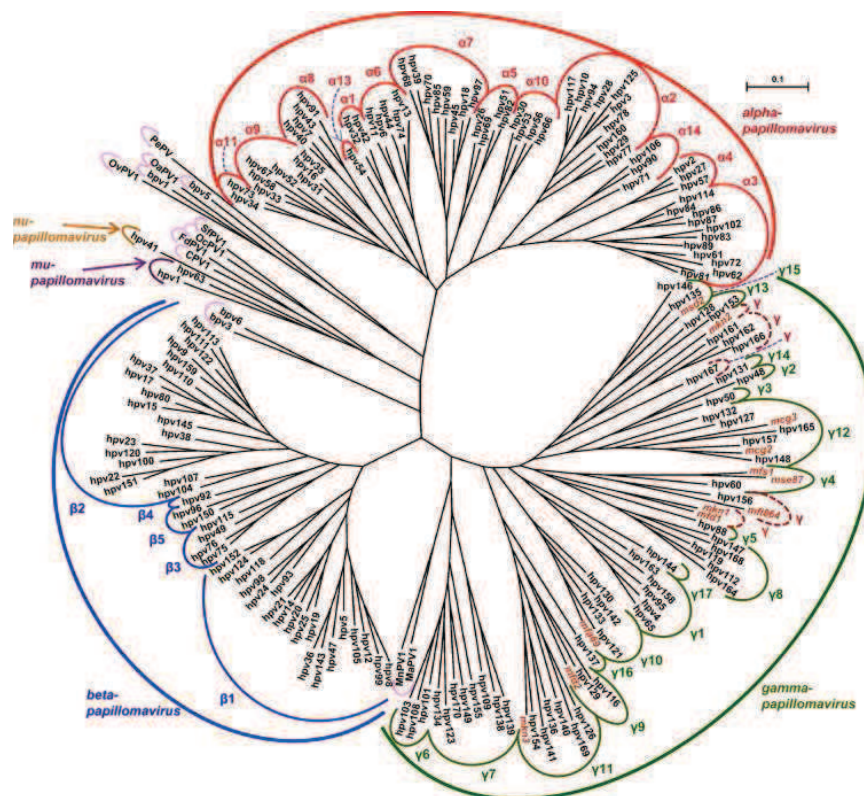
Pour terminer, **la troisième partie de ce manuscrit est une discussion générale de mon travail à laquelle font suite des perspectives et une conclusion générale.**

Partie 1 : Revue de la littérature

I. Papillomavirus et cancer du col de l'utérus

1. Classification et tropisme des papillomavirus

Les papillomavirus (PV) appartiennent à la famille des *Papillomaviridae*. A ce jour, 189 génotypes sont caractérisés et intégralement séquencés (Bernard et al. 2010). Les PV sont classés en genres, en espèces et en variants. Ils sont hautement spécifiques de leur hôte: il n'y a pratiquement pas d'exemple de transmission croisée entre espèces (Jenson et al. 1980). Cent soixante-dix papillomavirus, les PapillomaVirus Humains ou HPV (Human PapillomaVirus) (de Villiers 2013a), sont spécifiques de l'Homme et appartiennent aux genres alpha, bêta, gamma, mu et nu (Figure 1).



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), tels que HPV6 et HPV11, sont le plus souvent responsables de lésions bénignes comme les condylomes acuminés (Brown et al. 1999; Aubin et al. 2008), alors que les HPV dits à Haut Risque (HPV-HR), comme HPV16 et HPV18, sont le plus souvent associés aux cancers du col de l'utérus (Muñoz et al. 2003 ; Smith et al. 2007; Prétet et al. 2008a ; de Sanjose et al. 2010 ; Guardado-Estrada et al. 2014). Ces deux génotypes sont aussi à l'origine d'autres cancers tels que les cancers du canal anal (De Vuyst et al. 2009 ; Abramowitz et al. 2010 ; Valmary-Degano et al. 2013; Alemany et al. 2015) et les cancers des voies aérodigestives supérieures (Ritchie et al. 2003 ; Vlachtsis et al. 2005 ; Jayaprakash et al. 2011 ; St Guily et al. 2011).

2. Structure générale des HPV

Les HPV sont des virus non enveloppés, de petite taille (entre 52 et 55 nm), très résistants, dont la capsid est composée de 72 capsomères disposés selon une symétrie icosaédrique avec deux unités protéiques : la protéine majeure L1 (55kDa) et la protéine mineure L2 (72 kDa) (Baker et al. 1991; Hagensee et al. 1993) (Figure 2).

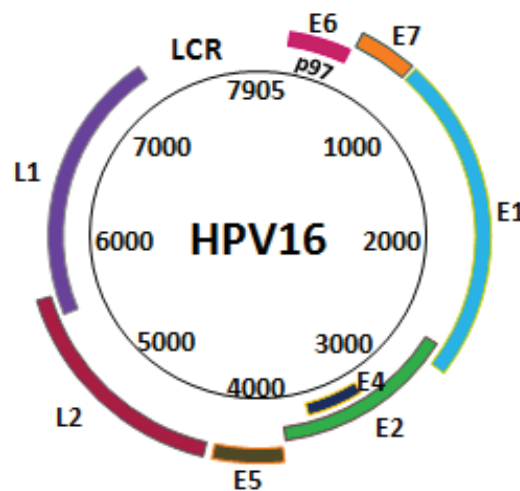


Figure 2 : Représentation schématique du génome d'HPV16

Le génome viral est constitué d'un ADN double brin circulaire, super-enroulé, d'environ 8000 paires de bases. Les séquences codant les protéines virales sont regroupées sur un seul brin d'ADN en phases ouvertes de lecture (open reading frame, ORF). Les ORF sont groupées en une région E (pour Early), codant des protéines non structurales dites « précoces », E1, E2, E4, E5, E6 et E7 et en une région L (pour Late), codant les protéines de capsid, L1 et L2. Il existe une région non codante appelée LCR (long control region) qui contient principalement des séquences régulatrices de la réplication et de la transcription virale.

3. Causalité entre infection par un HPV et 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 sont présents dans 90% à 100% des cancers du col de l'utérus (Walboomers et al. 1999 ; Bosch et de Sanjose 2007 ; Prétet et al. 2008a ; Lebelo et al. 2015).

4. Histoire naturelle de l'infection cervicale à HPV muqueux

4.1. Structure anatomique du col de l'utérus

Le col de l'utérus est situé à l'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 composée 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 sécrétantes, séparées du chorion par une lame basale.

La zone de jonction pavimento-cylindrique (Figure 3) : 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 effet, cette zone de jonction est particulièrement sensible, de par sa complexité, sa fragilité mécanique et la fréquence de ses micro-érosions, dues en particulier aux relations sexuelles. Elle a aussi été décrite comme une zone de fragilité immunitaire. Ainsi, cette zone est considérée comme la cible des HPV et le lieu de naissance de la majorité des lésions cervicales (Burghardt et Ostör 1983 ; Herfs et al. 2013).

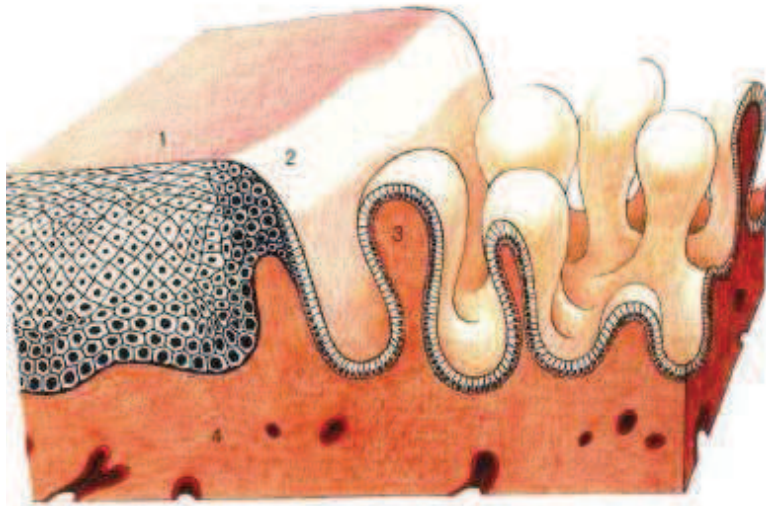


Figure 3: Diagramme du col utérin représentant la zone de jonction entre l'épithélium pavimenteux et l'épithélium glandulaire (Cartier 1984)

- 1 : Epithélium pavimenteux normal chargé en glycogène
- 2 : Petite zone d'épithélium pavimenteux dépourvu de glycogène et correspondant au liseré blanc
- 3 : Papille de la muqueuse glandulaire
- 4 : Tissu conjonctif

4.2. Transmission sexuelle

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. En effet, les infections à HPV se retrouvent rarement chez de jeunes femmes vierges (Andersson-Ellström et al. 1994). La prévention de la transmission est très difficile car le virus peut être présent sur la plupart de la zone anogénitale. A ce jour, seule l'utilisation du préservatif assure une diminution du risque de transmission (Winer et al. 2006). De façon moins fréquente, les infections à HPV peuvent être transmises par des voies non sexuelles.

4.3. Transmission non sexuelle

Etant très résistants à la dessiccation et à la chaleur, les HPV peuvent aussi se transmettre par des contacts non sexuels comme par exemple avec des objets souillés (vêtements, serviettes) ou des surfaces contaminées (piscine et douches) (Laurent et Kienzler 1985 ; Roden et al. 1997).

La transmission verticale de la mère à l'enfant, après passage transplacentaire du virus ou lors de l'accouchement par voie basse, serait responsable de papillomatoses laryngées, de conjonctivites ou d'infections anogénitales chez l'enfant. En effet, 69% des enfants HPV16 positifs auraient été infectés par leur mère lors de la naissance (Puranen et al. 1996).

Dans les infections à HPV, les phénomènes d'auto-inoculation et/ou hétéro-inoculation des HPV lors d'un contact peau-peau sont impliqués dans le développement et/ou la dissémination des verrues cutanées, voire des infections péri-anales que l'on observe le plus souvent chez l'enfant.

4.4. Cycle viral des HPV

Les HPV accèdent aux cellules basales de l'épithélium du col utérin *via* une microlésion. L'adsorption des virions sur les cellules se fait par l'intermédiaire des héparanes sulfates et l'entrée dans les cellules se fait par endocytose médiée par les vésicules à clathrine (i.e. HPV16 et 58) ou par les cavéoles (i.e. HPV31) (Bousarghin et al. 2003). Les HPV utilisent ensuite les filaments d'actine et/ou les microtubules pour rejoindre le noyau. La décapsidation est nécessaire avant l'entrée du génome viral dans le noyau.

Le cycle viral étroitement lié à la différenciation cellulaire peut être schématiquement divisé en 2 phases distinctes :

Une phase non productive : Elle se déroule dans les cellules basales et parabasales, avec réplication de l'ADN viral au rythme des divisions cellulaires ; au cours de cette phase, seules les protéines précoces sont exprimées. Les protéines E1 et E2 agissent en synergie pour activer la réplication. De plus, la protéine E2 par son action transinhibitrice limite l'expression des protéines E6 et E7 qui sont nécessaires pour maintenir les cellules en cycle.

Une phase productive : Elle correspond à la formation de nouveaux virions et à leur libération avec les cellules qui desquament. Elle est étroitement dépendante de la différenciation des cellules épithéliales (Figure 4). La réplication de l'ADN viral se fait selon trois étapes distinctes :

- Une étape d'établissement, qui consiste en une amplification limitée du génome viral (50-100 copies) dans les cellules basales de l'épithélium. Les protéines précoces E1 et E2 sont nécessaires à cette réplication. Elles se fixent sur des séquences spécifiques E1BS (E1 binding site) et E2BS localisées dans le LCR, correspondant au site ori (site d'origine de la réplication). Toutes les autres protéines nécessaires à la réplication sont mises à la disposition par la cellule hôte, qui produit l'ADN polymérase *alpha* primase, l'ADN polymérase PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et les topoisomérases I et II. Il faut noter que les protéines E6 et E7, qui perturbent le cycle cellulaire en bloquant les activités régulatrices de p53 et pRb, participent à l'induction de la prolifération cellulaire, bénéfique au cycle viral productif.

- Une étape de maintenance, qui correspond à une réplication stable par ségrégation des génomes viraux à chaque division cellulaire.

- Une étape d'amplification du génome viral grâce à un mécanisme en cercle roulant dans les cellules différenciées. Ces cellules ne sont plus en division et ne produisent plus les protéines nécessaires à la réplication. Les virus se trouvant alors dans un environnement défavorable n'ont plus qu'une alternative, se répliquer de façon unidirectionnelle.

Les protéines précoces nécessaires à la réplication de l'ADN viral sont surtout exprimées dans les cellules basales et parabasales, tandis que les protéines de la capsid codées par les gènes L1 et L2 ne sont exprimées que dans les cellules différenciées. La protéine E4 est elle aussi exprimée tardivement; elle facilite l'encapsidation du génome, la destruction des filaments de cytokératine et la libération des virions (Peh et al. 2002).

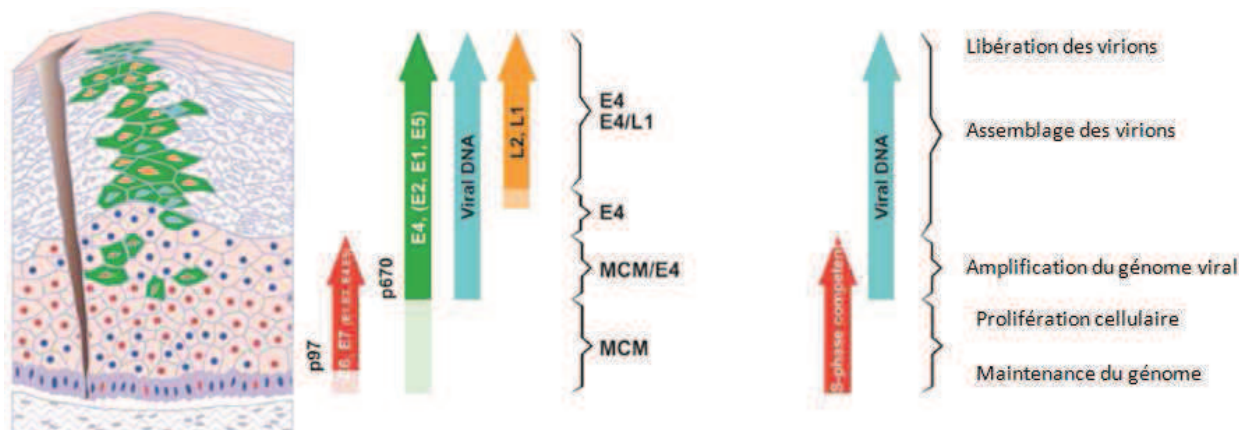


Figure 4 : Infection productive par HPV après une microlésion de l'épithélium malpighien de l'exocol de l'utérus (Middleton et al. 2003)

5. Histoire naturelle des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus

5.1. Lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus

5.1.1. Condylomes cervicaux

Ils représentent très souvent une manifestation de l'infection productive à HPV, et ont l'apparence de verrues localisées sur le col de l'utérus. Différentes formes cliniques sont retrouvées. Certaines sont associées aux HPV-BR, ce sont les condylomes acuminés. D'autres formes sont associées aux HPV-HR, et ce sont les condylomes plans (aussi dits maculaires ou diffus). Les condylomes acuminés présentent un aspect polyploïde et restent cantonnés aux couches superficielles de l'épithélium. Les condylomes plans sont, eux, considérés comme des lésions intra-épithéliales de bas grade.

5.1.2. Dysplasies cervicales

Les dysplasies ou néoplasies intra-épithéliales cervicales (CIN) représentent des anomalies dont l'aspect histocytologique est intermédiaire entre l'épithélium normal et le carcinome *in situ*. 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 5):

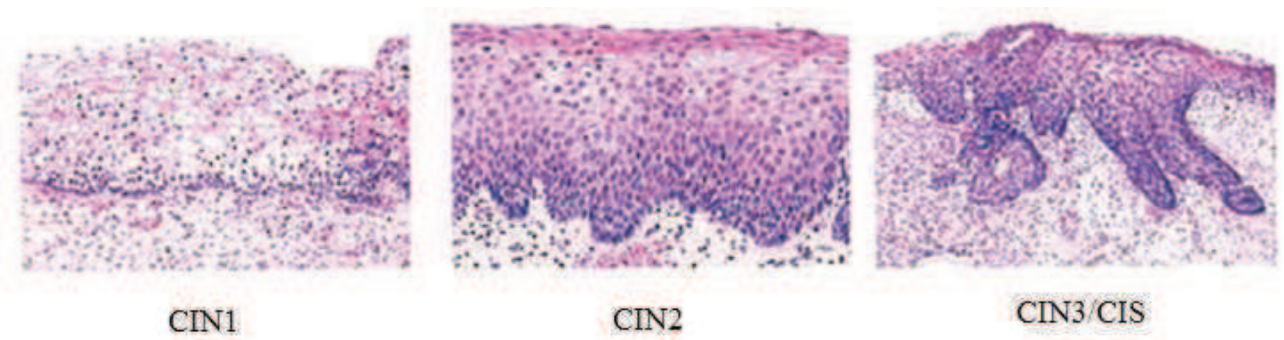


Figure 5 : Aspect histologique des dysplasies du col de l'utérus (Bioimage.free.fr)

- CIN1 (dysplasies légères et condylomes plans) : atteinte du tiers inférieur de l'épithélium
- CIN2 (Dysplasie moyenne ou modérée) : atteinte des 2/3 inférieurs de l'épithélium
- CIN3/CIS (Dysplasie sévère et carcinome *in situ*) : atteinte de toute la hauteur de l'épithélium.

5.1.3. Cancers invasifs du col utérin

Les cancers invasifs sont caractérisés par une effraction de la lame basale, et un envahissement du chorion sous-jacent, par les cellules tumorales. Deux formes histologiques sont décrites :

- Le cancer invasif épidermoïde ou SCC (« Squamous-cell Carcinoma »), développé à partir de l'épithélium malpighien de l'exocol, de loin la forme la plus fréquente (environ 85% des cas en France).
- L'adénocarcinome ou ADC (« Adenocarcinoma »), développé à partir de l'épithélium glandulaire de l'endocol représente environ 15% (en France) des cancers infiltrants du col de l'utérus.

D'autres types de cancers, beaucoup moins fréquents, incluent les carcinomes adénoquameux ou les carcinomes à petites cellules par exemple.

5.2. Histoire naturelle du cancer du col de l'utérus

L'histoire naturelle du cancer du col de l'utérus (Figure 6) se déroule selon un continuum de lésions précancéreuses, faisant suite à la persistance de l'infection génitale par un HPV-HR. Certains stades précancéreux sont des stades facultatifs à l'apparition d'un cancer invasif.

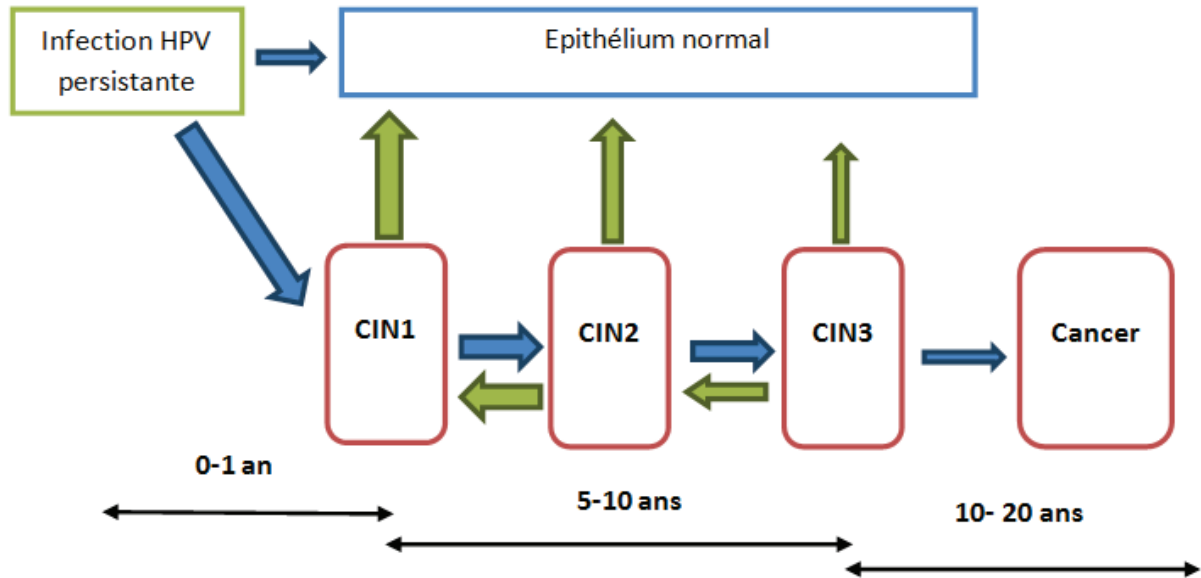


Figure 6 : Schématisation de l'histoire naturelle des lésions du col de l'utérus

Suite à l'infection par un HPV, deux cas de figure peuvent se présenter :

- Un retour à la normale de l'épithélium après élimination de l'infection par HPV.
- Le développement de lésions histologiques de type CIN, faisant suite à la persistance de l'infection génitale par un HPV-HR. On observe une évolution en passant par des stades facultatifs (CIN1 et CIN2) et d'autres, en revanche nécessaires (CIN3) à l'apparition d'un cancer invasif.

Pour chaque grade de lésions cervicales précancéreuses, il existe une probabilité de régression (de 32 à 57 % en fonction de la gravité de la lésion) vers un épithélium normal, suivant la clairance virale, et une probabilité de persistance ou de progression vers un stade plus avancé (Tableaux 1 et 2).

Ainsi les lésions de bas grade (CIN1) montrent une fréquence de régression élevée et une fréquence de progression vers une CIN plus sévère ou un cancer faible. En revanche, les lésions de haut grade (CIN2 et CIN3) régressent à un degré moindre alors que la fréquence de progression vers un carcinome invasif est élevée.

Tableau 1 : Potentiel évolutif des lésions du col de l'utérus en fonction du diagnostic cytologique
(Melnikow et al. 1998)

	Régression (%)	Persistance (%)	Progression vers LSIL (%)	Progression vers ICC (%)
ASC-US	70	23	7	<1
LSIL	50	40	10	<1
HSIL	35	63	-	2

Tableau 2 : Potentiel évolutif des lésions du col de l'utérus en fonction du diagnostic histologique
(Ostör 1993)

	Régression (%)	Persistance (%)	Progression vers CIN3 (%)	Progression vers ICC (%)
CIN1	60	30	9	1
CIN2	40	40	15	5
CIN3	33	55	-	12

5.2.1. Facteurs influençant la progression des lésions dysplasiques du col utérin

Les facteurs qui influencent la progression des lésions dysplasiques du col utérin peuvent être classés en trois catégories : les facteurs liés au virus, les facteurs liés à l'hôte, et enfin les facteurs environnementaux.

a. Facteurs liés au virus

Dans 10 à 20% des cas, l'infection virale persiste, la persistance étant définie par certains auteurs par la présence d'un même type d'HPV sur deux prélèvements cervico-utérins à un an d'intervalle au moins. C'est la persistance de l'infection à HPV-HR qui est le principal facteur de risque de développement des lésions pré-invasives du col de l'utérus, de leur progression vers un cancer invasif et du maintien du phénotype malin (Dalstein et al. 2003 ; Schiffman et al. 2007).

Type viral

Le risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses prévalentes est deux fois supérieur chez les patientes infectées par HPV16 et/ou 18 (10%) comparativement aux patientes infectées par un autre HPV-HR (4%) (Wright et al. 2012). Une étude a montré une progression plus rapide des lésions HPV16 positives comparativement aux lésions associées aux autres types d'HPV-HR (Wentzensen et al. 2013).

Charge virale HPV

De nombreuses études ont démontré que la charge virale d'HPV augmentait avec le grade de la lésion (Hernández-Hernández et al. 2003 ; Tsai et al. 2005 ; Gravitt et al. 2007 ; Lowe et al. 2011).

Schmitt *et al.* ont décrit une charge virale HPV-HR globale significativement plus élevée dans des frottis anormaux (ASC-US, LSIL et HSIL) comparativement aux frottis normaux (Schmitt *et al.* 2013). De nombreux auteurs ont confirmé l'augmentation de la charge virale HPV16 avec la sévérité des lésions (Saunier *et al.* 2008 ; Boulet *et al.* 2009 ; Carcopino *et al.* 2012 ; Broccolo *et al.* 2013 ; Jacquin *et al.* 2014).

Infections multiples

Certaines études ont montré que les multi-infections étaient le plus souvent associées à une persistance accrue (Perrons *et al.* 2005), et qu'un HPV16 présent avec un autre type d'HPV persiste plus longtemps que lorsqu'il est seul (Woodman *et al.* 2001). Plusieurs études ont montré une association entre l'infection par plusieurs types d'HPV et le développement des néoplasies intraépithéliales voire le cancer du col de l'utérus (Baldez da Silva *et al.* 2009 ; Soto-De Leon *et al.* 2011).

b. Facteurs liés à l'hôte

Age

La majorité des infections à HPV, et en particulier les HPV-HR, sont transitoires avant 35 ans. La majorité des femmes concernées par cette infection après 35 ans sont celles qui ont une infection persistante et pour lesquelles une lésion cervicale actuelle ou future a une forte probabilité d'être détectée. Un âge plus élevé entraîne un taux de clairance plus faible (Kim *et al.* 2012).

Activité sexuelle

Il a été démontré que le comportement sexuel de l'individu et/ou de son partenaire influence largement le risque d'infection par un HPV et donc le développement de lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (Schiffman *et al.* 1993 ; Franco 1995). En effet, plus le nombre de partenaires sexuels est important, plus le premier rapport sexuel est précoce, plus le risque de développer des lésions de haut grade voire de CIC est élevé (Collins *et al.* 2005 ; Herrero *et al.* 2005 ; Flores *et al.* 2008 ; Castellsagué *et al.* 2014 ; Liu *et al.* 2015).

Etat immunitaire

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 par le VIH en particulier ont un risque plus important de développer des lésions précancéreuses et cancéreuses par rapport à la population générale (Keller *et al.* 2012 ; Denslow *et al.* 2014 ; Thorsteinsson *et al.* 2015 ; Massad *et al.* 2015).

Le cancer du col de l'utérus est par ailleurs considéré depuis 1993 comme l'une des maladies du stade SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) (From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993).

Multiparité et grossesse

Il a été démontré qu'une parité élevée était associée à une augmentation du risque de développement de lésions précancéreuses et cancéreuses (Muñoz *et al.* 2002 ; Franceschi *et al.* 2003 ;

International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer 2006 ; Srivastava et al. 2014; Thakur et al. 2015); 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 virale.

c. Facteurs liés à l'environnement

Contraceptifs oraux

En 2007, la collaboration internationale des études épidémiologiques en rapport avec le cancer du col a procédé à une analyse groupée de 24 études, elle a démontré que le risque de cancer du col de l'utérus augmente d'un facteur de 1,07 pour chaque année d'utilisation de la contraception hormonale (ou 1,38 (1,30 à 1,46) pour 5 ans d'utilisation) (International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer et al. 2007). L'association entre la prise de contraceptif hormonal et le cancer du col de l'utérus a été démontrée aussi par Ghanem *et al.* (Ghanem et al 2011). Une autre étude publiée en 2013 par l'Association du Planning Familial d'Oxford concernant 17 032 femmes de 25 à 39 ans a conclu que le risque de développement de cancer du col augmente avec la durée d'utilisation de la contraception orale (Vessey et Yeates 2013).

Tabac

Le tabagisme a été considéré également comme un cofacteur pouvant influencer le risque de développement de cancer du col, à cause de son effet cancérigène qui induit une réduction de réponse immunitaire (Trimble et al. 2005 ; Ma et al. 2011).

Niveau socioéconomique

L'appartenance à une classe sociale défavorisée pourrait contribuer au risque de développer un cancer du col utérin (Eggleston et al. 2006 ; Adewuyi et al. 2008 ; Cheng et al. 2011). Ceci peut être dû à une mauvaise hygiène génitale, un niveau d'éducation faible, un manque de sensibilisation, une stigmatisation sociale et un accès limité au dépistage et aux soins médicaux.

5.2.2. Facteurs influençant la régression des lésions dysplasiques du col utérin

Parallèlement au mécanisme de progression lésionnelle, dont le facteur principal identifié est la persistance des HPV oncogènes, il paraît logique de supposer que le facteur principal favorisant la régression des lésions soit la clairance des HPV oncogènes.

Les mécanismes responsables de l'élimination du virus semblent impliquer des réponses immunitaires innées et adaptatives chez l'hôte. Il est estimé que 80 à 90% des infections à HPV ne sont pas détectables après deux ans (Moscicki et al. 2006). Toutefois, le concept d'infection latente est à ce jour discuté. La réinfection par le même type d'HPV est un phénomène rare (Xi et al. 1995).

Le virus pourrait se maintenir dans les cellules basales de l'épithélium à raison de quelques copies par cellule, et se réactiver des années plus tard suite à une modification de l'immunité (Gravitt 2012).

II. Epidémiologie du cancer du col de l'utérus

1. Situation dans le monde

1.1. Données d'incidence du cancer du col de l'utérus dans le monde

A l'échelle mondiale, le cancer du col de l'utérus est le quatrième cancer féminin le plus fréquent, et le septième au classement général (toutes localisations confondues), avec environ 528 000 nouveaux cas estimés en 2012. Le taux d'incidence standardisé de ce cancer (sur la structure d'âge de la population mondiale) varie de 9,9 pour 100 000 femmes dans les pays développés à 15,7 pour 100 000 femmes dans les pays en voie de développement. Environ 85% des nouveaux cas surviennent dans les pays en voie de développement où il représente près de 12% de tous les cancers féminins (Ferlay et al. 2015). Ceci est dû à l'accès aux soins limité et au manque de programmes de dépistage dans ces pays.

Bien que le nombre de cas ait augmenté, le cancer du col de l'utérus a diminué en importance relative : il était au deuxième rang des cancers les plus fréquents chez la femme en 1975 (Parkin et al. 1984). Ceci est corrélé à la mise en place du dépistage du cancer par frottis cervico-utérin et à sa généralisation.

Il existe une importante variation des taux d'incidence de ce cancer dans le monde : les taux les plus élevés sont observés en Afrique de l'Est (42,7), en Mélanésie (33,3), en Afrique du Sud (31,5) et en Afrique Centrale (30,6), alors que des taux faibles sont observés en Australie/Nouvelle-Zélande (5,5) et en Asie de l'Ouest (4,4) (Figure 7). Le cancer du col de l'utérus reste le cancer le plus fréquent chez la femme en Afrique de l'Est et en Afrique Centrale.

1.2. Données de mortalité liées au cancer du col de l'utérus dans le monde

En 2012, le cancer du col de l'utérus a fait 266 000 morts dans le monde, ce qui représente 7,5% des décès par cancers féminins. Environ neuf sur dix (87%) décès se produisent dans les pays à ressources limitées, pays dans lesquels ce cancer est la 3^{ème} cause de mortalité féminine (Ferlay et al. 2015).

Le risque moyen de décès par ce cancer avant l'âge de 75 ans est trois fois plus élevé dans les pays en voie de développement (0,9 pour 100 000 femmes) comparé aux pays développés (0,3 pour 100 000 femmes). Ceci est dû à la mise en place des stratégies de dépistage et de prise en charge thérapeutique efficaces qui résultent en une réduction spectaculaire de la mortalité dans ces pays. Ces tendances sont cependant variables d'un pays à l'autre, en raison de nombreux facteurs qui influencent l'efficacité d'un programme de dépistage. Cette mortalité varie de moins de 2 pour 100 000 femmes en Asie de l'Ouest (1,9), en Europe de l'Ouest (1,8) et en Australie/Nouvelle Zélande

(1,5), à plus de 20 pour 100 000 en Mélanésie (20,6), en l'Afrique Centrale (22,2) et en Afrique de l'Est (27,6) (Figure 7).

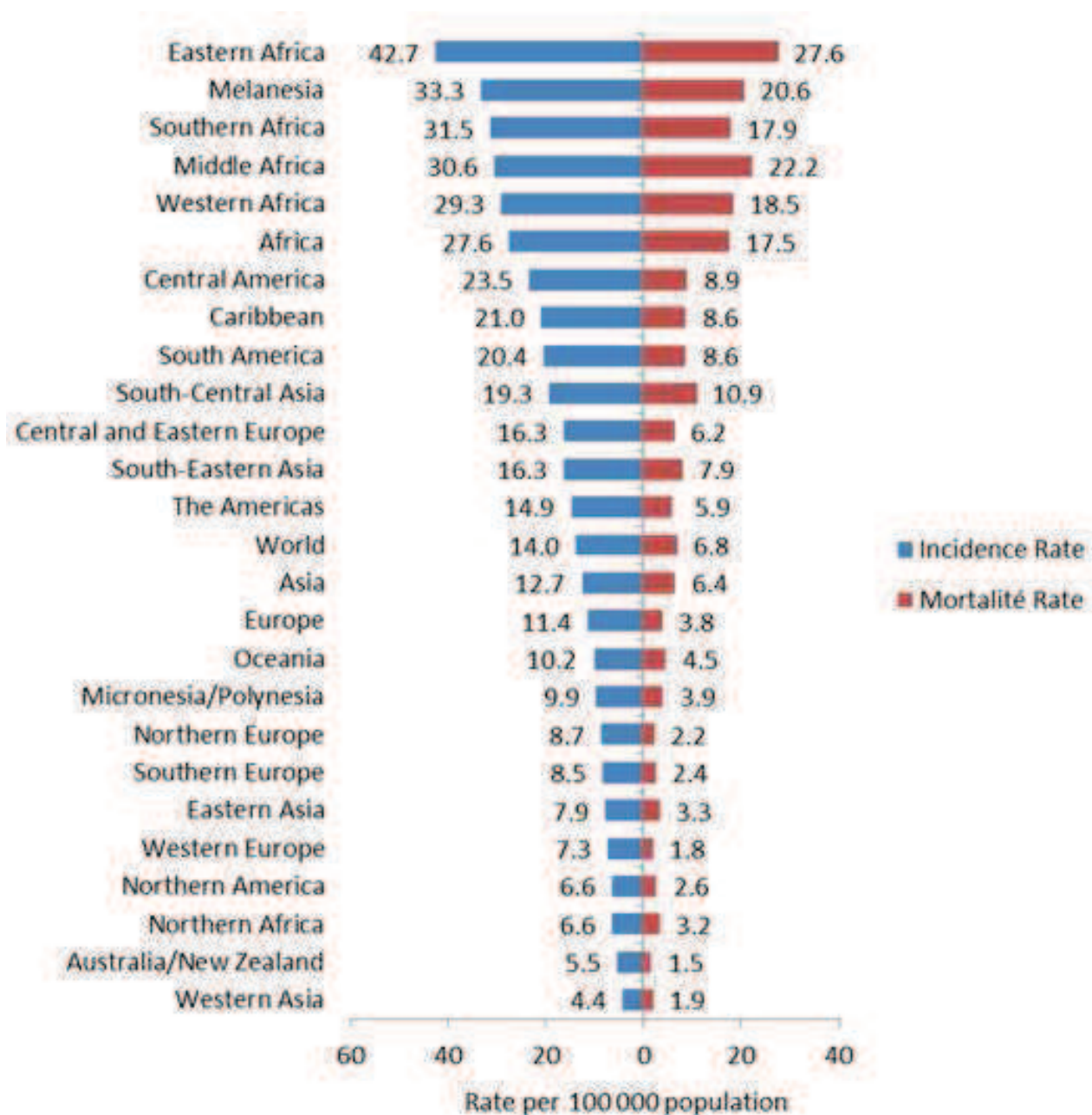


Figure 7 : Taux d'incidence et mortalité par cancer du col de l'utérus, standardisés sur l'âge, dans le monde (Ferlay et al. 2015)

2. Situation en Europe et en France

Des estimations de l'IARC (International Agency for Research on Cancer) indiquent, qu'en 2012, environ 58 373 cas de cancer du col ont été diagnostiqués en Europe (13,4 pour 100 000 femmes) et environ 24 404 femmes sont décédées (4,9 pour 100 000 femmes) (Ferlay et al. 2013). La situation est hétérogène selon les régions et les pays d'Europe. Le taux d'incidence standardisé sur l'âge varie de 4 à 35 pour 100 000 femmes et le taux de mortalité de 1 à 14 pour 100 000 femmes (Figure 8).

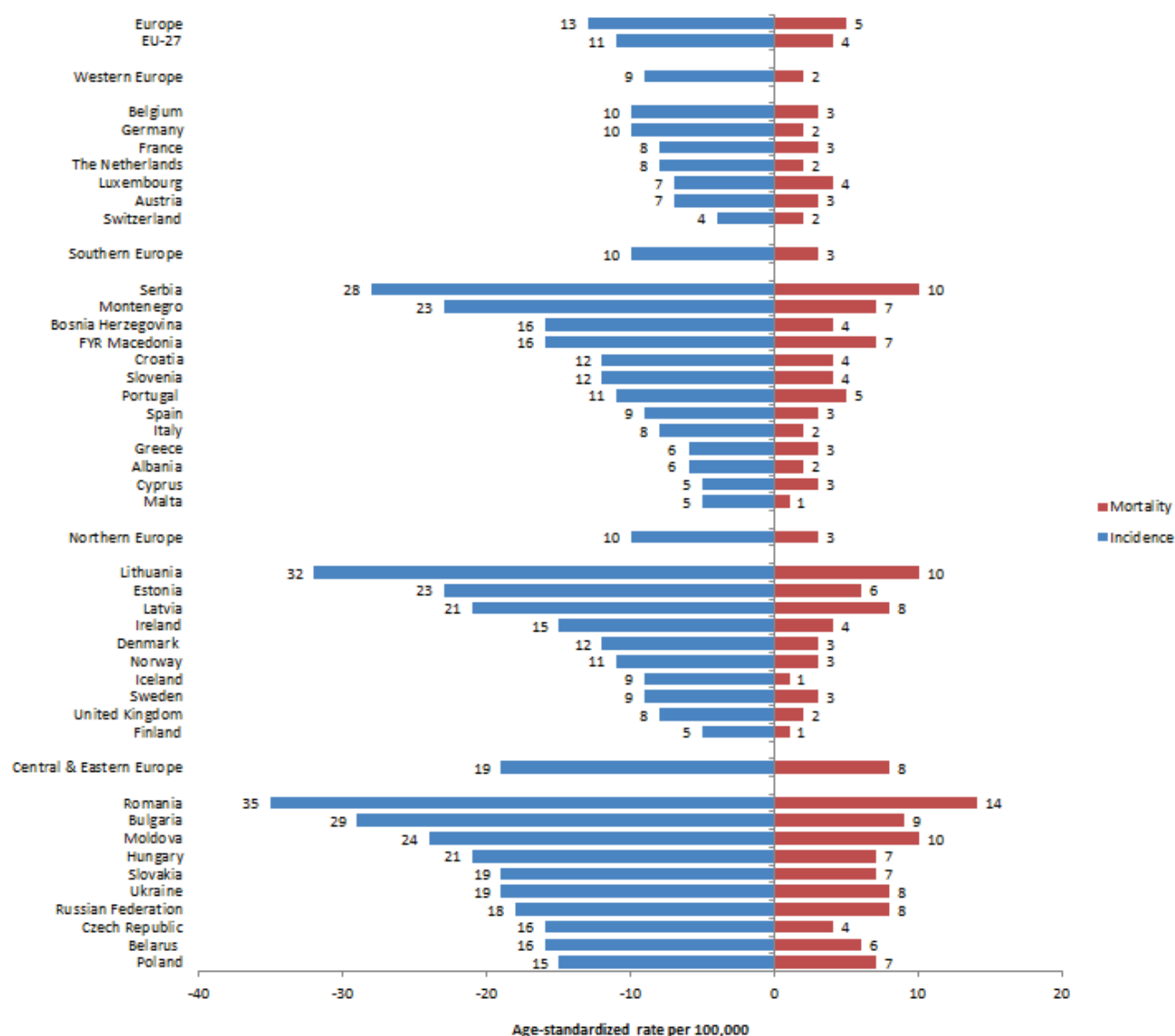


Figure 8 : Taux d'incidence et mortalité par cancer du col de l'utérus, standardisés sur l'âge, par zones géographiques européennes et pays d'Europe (Ferlay et al. 2013)

2.1. Données d'incidence du cancer du col de l'utérus en France

En France, en 2012, le cancer du col de l'utérus est situé en 12^{ème} position (8,8 % des cancers féminins) (Figure 9) avec 2862 nouveaux cas enregistrés (WHO/ICO 2014a). C'est le 4^{ème} cancer le plus fréquent chez les femmes entre 15 et 44 ans. Son incidence standardisée sur l'âge dans la population française est de 6,8 nouveaux cas par an pour 100 000 femmes (Tableau 3).

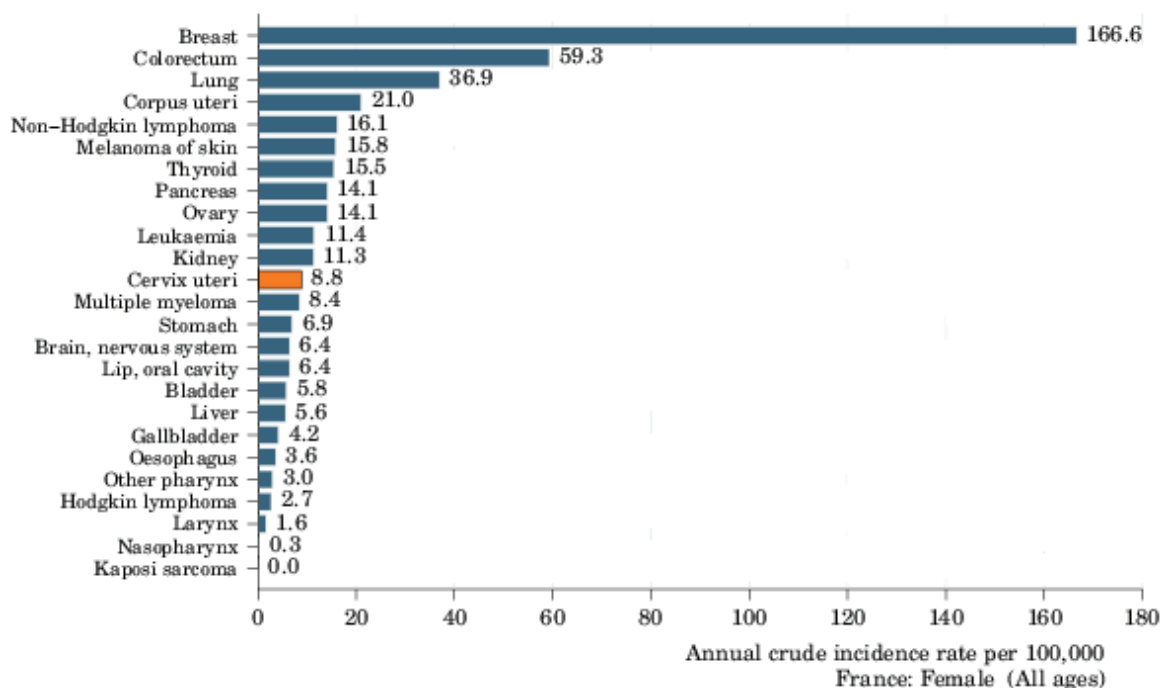


Figure 9 : Taux d'incidence du cancer du col de l'utérus par rapport aux autres cancers féminins (tous âges confondus) en France en 2012 (WHO/ICO 2014a)

Le taux d'incidence du cancer du col de l'utérus a connu une diminution significative entre 1980 et 2012 (-2,5% par an en moyenne). Toutefois, cette décroissance a tendance à se ralentir depuis les années 2000 (-1,3% par an en moyenne entre 2000 et 2012) (DREES 2015). Ces baisses constantes sont très vraisemblablement expliquées en grande partie par la pratique largement répandue du dépistage par le FCU en France. Par ailleurs, la diffusion des pratiques vaccinales contre le papillomavirus pourrait contribuer à l'amélioration de la situation.

Tableau 3 : Taux d'incidence du cancer du col chez la femme en France en 2012 comparé à l'Europe de l'Ouest et au Monde (WHO/ICO 2014a)

Indicateur	France	Europe de l'Ouest	Monde
Nombre annuel de nouveaux cas de cancer	2862	9824	527 624
Taux d'incidence brut ^a	8,8	10,2	15,1
Taux d'incidence (standardisé sur l'âge) ^a	6,8	7,3	14
Risque cumulatif (%) à 75 ans	0,6	0,7	1,4

a: Taux pour 100 000 femmes par an

2.2. Données de mortalité liées au cancer du col de l'utérus en France

En France, le cancer du col de l'utérus est la 14^{ème} cause de mortalité chez la femme (3,1 % des cancers féminins) (Figure 10) avec 1167 décès enregistrés en 2012 (WHO/ICO 2014a). C'est le 3^{ème} cancer le plus fréquent chez les femmes entre 15 et 44 ans. Son taux d'incidence standardisé sur l'âge dans la population française est de 7 décès pour 100 000 femmes (Tableau 4).

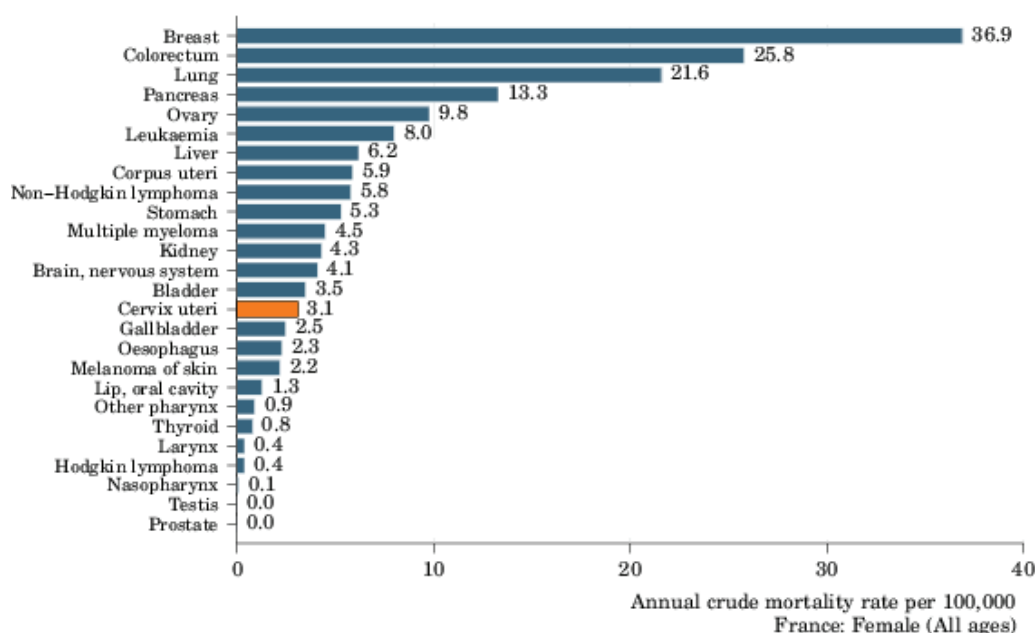


Figure 10 : Taux de mortalité par cancer du col de l'utérus par rapport aux autres cancers féminins (tous âges) en France, 2012 (WHO/ICO 2014a).

En France, 3 femmes décèdent chaque jour d'un cancer du col de l'utérus. Le pronostic de ces cancers reste sombre: la survie relative du cancer du col de l'utérus est de 75% à 3 ans et de 70% à 5 ans.

Tableau 4 : Taux de mortalité par cancer du col de l'utérus en France en 2012 comparé à l'Europe de l'Ouest et au Monde (WHO/ICO 2014a)

Indicateur	France	Europe de l'Ouest	Monde
Nombre annuel de décès	1167	3479	265 653
Taux d'incidence brut ^a	3,6	3,6	7,6
Taux de mortalité (standardisé sur l'âge) ^a	1,9	1,8	6,8
Risque cumulatif (%) à 75 ans	0,2	0,2	0,8

a: Taux pour 100 000 femmes par an.

Le pic d'incidence de ce cancer survient vers l'âge de 40 ans. Deux pics de mortalité sont observés, le premier vers l'âge de 50 ans, puis le deuxième, au-delà de 65 ans (Figure 11).

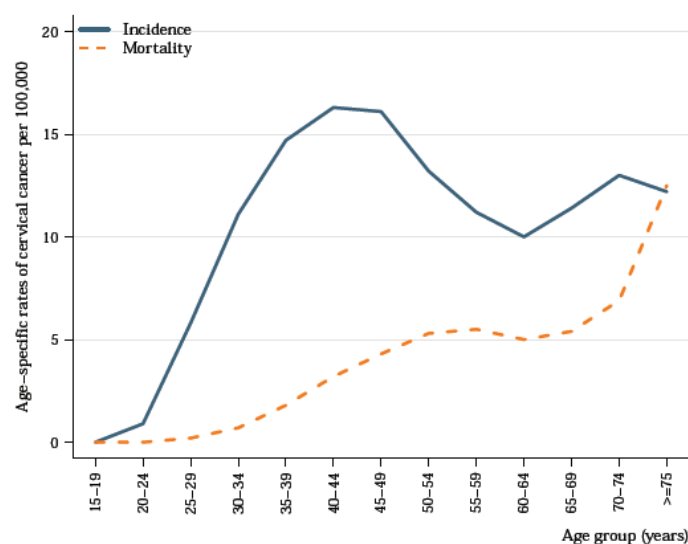


Figure 11 : Variation de l'incidence et de la mortalité du cancer du col de l'utérus en fonction de l'âge en France, 2012 (WHO/ICO 2014a)

3. Situation au Maroc

3.1. Données d'incidence du cancer du col de l'utérus au Maroc

Au Maroc, le cancer du col de l'utérus occupe le 2^{ème} rang après le cancer du sein (13,6% des cancers féminins) (Figure 12) avec 2258 nouveaux cas enregistrés en 2012.

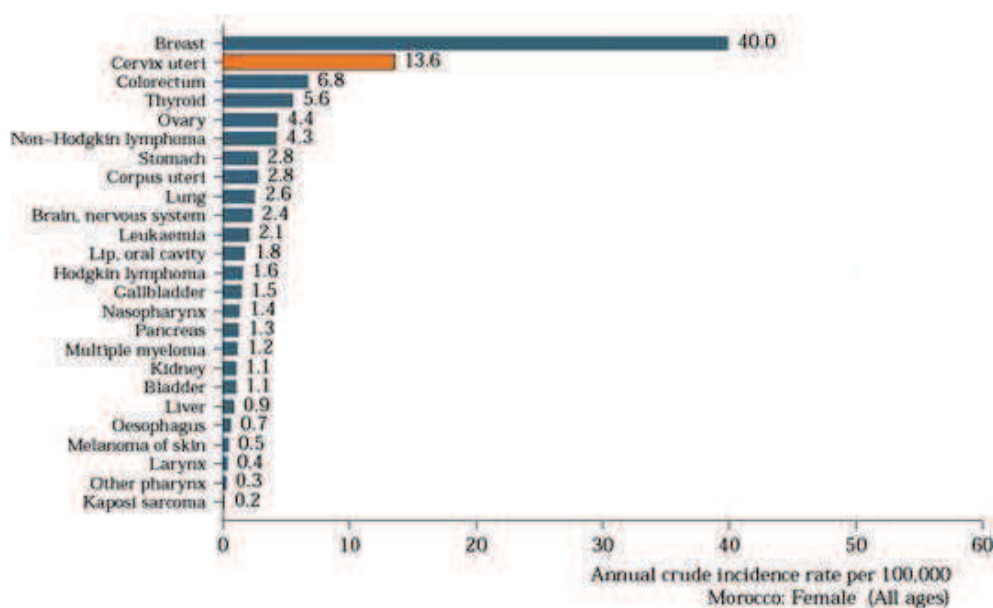


Figure 12 : Taux d'incidence du cancer du col de l'utérus chez la femme marocaine par rapport aux autres cancers féminins (tous âges confondus) en 2012 (WHO/ICO 2014b)

Son incidence standardisée sur l'âge dans la population marocaine est de 14,3 nouveaux cas par an pour 100 000 femmes (Tableau 5) (WHO/ICO 2014b)

Tableau 5 : Taux d'incidence du cancer du col chez la femme marocaine en 2012 comparé à l'Afrique du Nord et au Monde (WHO/ICO 2014b).

Indicateur	Maroc	Afrique du Nord	Monde
Nombre annuel de nouveaux cas de cancer	2258	5813	527624
Taux d'incidence brut ^a	13,6	5,6	15,1
Taux d'incidence (standardisé sur l'âge) ^a	14,3	6,6	14
Risque cumulatif (%) à 75 ans	1,6	0,7	1,4

a: Taux pour 100 000 femmes par an

L'incidence standardisée du cancer du col de l'utérus dans la population marocaine est de 14,3 pour 100 000 femmes par an, valeur supérieure à celle de l'Algérie (8,5) et trois fois supérieure à celle de la Tunisie (4,8) (Figure 13).

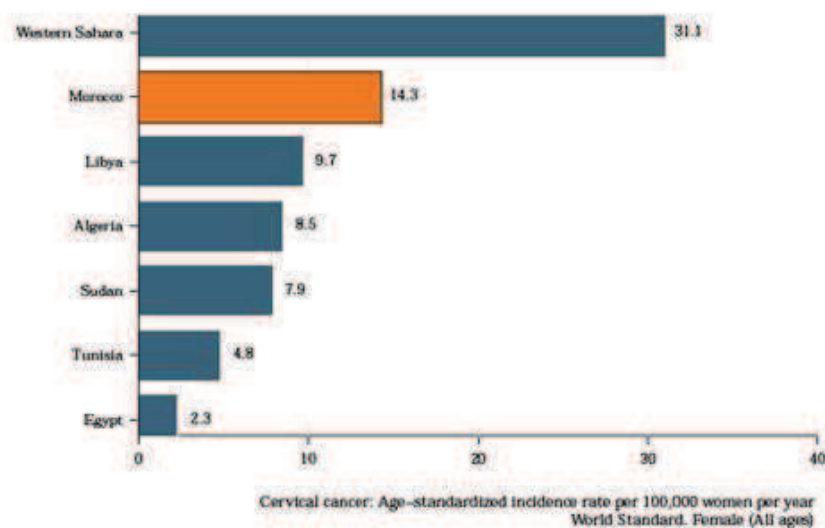
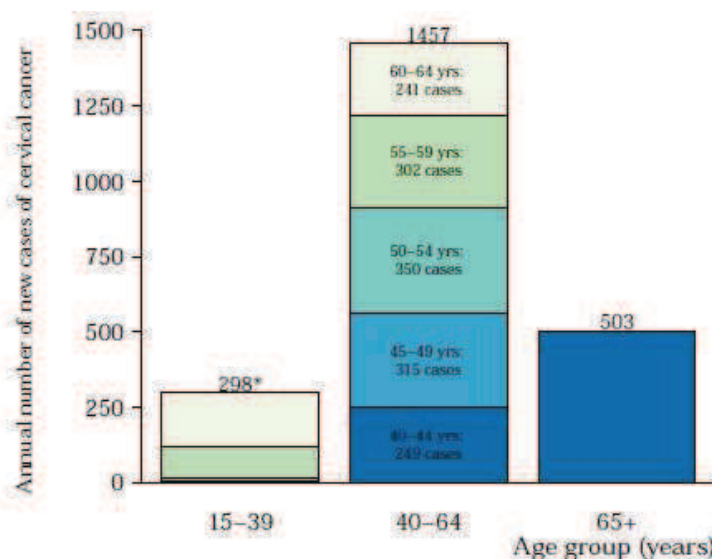


Figure 13 : Taux d'incidence du cancer du col utérin, standardisé sur l'âge, dans les pays d'Afrique du Nord en 2012 (WHO/ICO 2014b)

La faible incidence du cancer du col utérin en Tunisie est bien documentée et a été attribuée à la monogamie et au respect de l'âge légal du mariage (17 ans) (Sahli 1992). Au Maroc et en Algérie, la polygamie n'est pas interdite et l'âge légal du mariage pour les filles est de 16 ans en Algérie, 18 ans au Maroc depuis 2003, et 15 ans avant 2003 (ALSC 2011).

Le nombre de nouveaux cas le plus élevé était estimé chez les femmes entre 40 et 64 ans avec 1457 nouveaux cas de cancer pour 100 000 femmes (Figure 14).



*15-19 ans: 0 cas. 20-24 ans: 4 cas. 25-29 ans: 13 cas. 30-34 ans: 101 cas. 35-39 ans: 180 cas

Figure 14 : Nombre annuel de nouveaux cas de cancer du col de l'utérus (par groupe d'âge) au Maroc en 2012 (WHO/ICO 2014b). .

3.2. Données de mortalité liée au cancer du col de l'utérus au Maroc

Le cancer du col de l'utérus est la deuxième cause de mortalité par cancer après le cancer du sein chez la femme marocaine (6,5% des cancers féminins). Le taux brut de mortalité lié à ce cancer est de 6,5 pour 100 000 femmes ce qui correspond à 1076 décès par an (Figure 15).

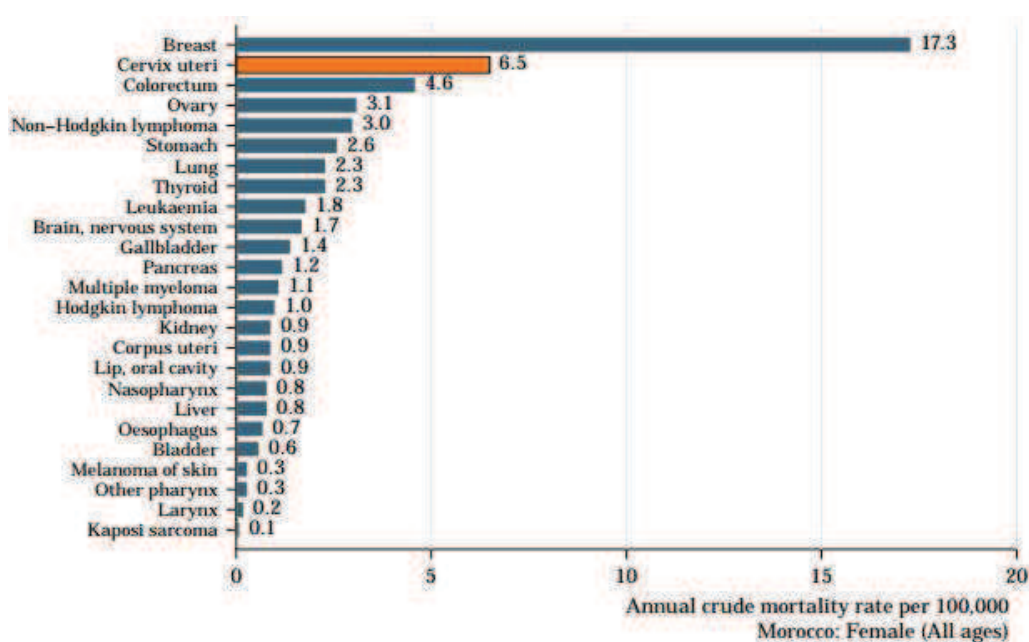


Figure 15: Taux de mortalité par cancer du col de l'utérus chez la femme marocaine par rapport à d'autres cancers féminins tous âges confondus au Maroc en 2012 (WHO/ICO 2014b)

La mortalité standardisée sur la population marocaine est de 7 et sur la population mondiale de 6,8 décès pour 100 000 femmes (Tableau 6) (WHO/ICO 2014b).

Tableau 6 : Taux de mortalité par cancer du col chez la femme marocaine en 2012 comparé à l'Afrique du Nord et au Monde (WHO/ICO 2014b)

Indicateur	Maroc	Afrique du Nord	Monde
Nombre annuel de décès	1076	2717	265 653
Taux d'incidence brut ^a	6,5	2,6	7,6
Taux de mortalité (standardisé sur l'âge) ^a	7,0	3,2	6,8
Risque cumulatif (%) à 75 ans	0,8	0,4	0,8

a: Taux pour 100,000 femmes par an.

La mortalité standardisée du cancer du col de l'utérus dans la population marocaine est de 7 pour 100 000 femmes par an, valeur 2 fois supérieure à celle observée en Algérie (3,5) et 3,7 fois supérieure à celle observée en Tunisie (1,9) (Figure 16).

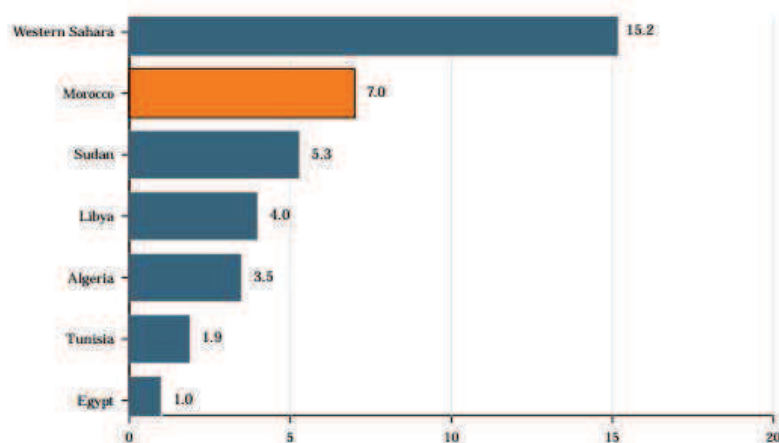


Figure 16: Taux de mortalité par cancer du col utérin, standardisé sur l'âge, au Maroc et dans les pays de l'Afrique du Nord (WHO/ICO 2014b).

Le nombre de décès le plus élevé est estimé à 607 décès liés à ce cancer pour 100 000 femmes chez les femmes entre 40 et 64 ans (Figure 17)

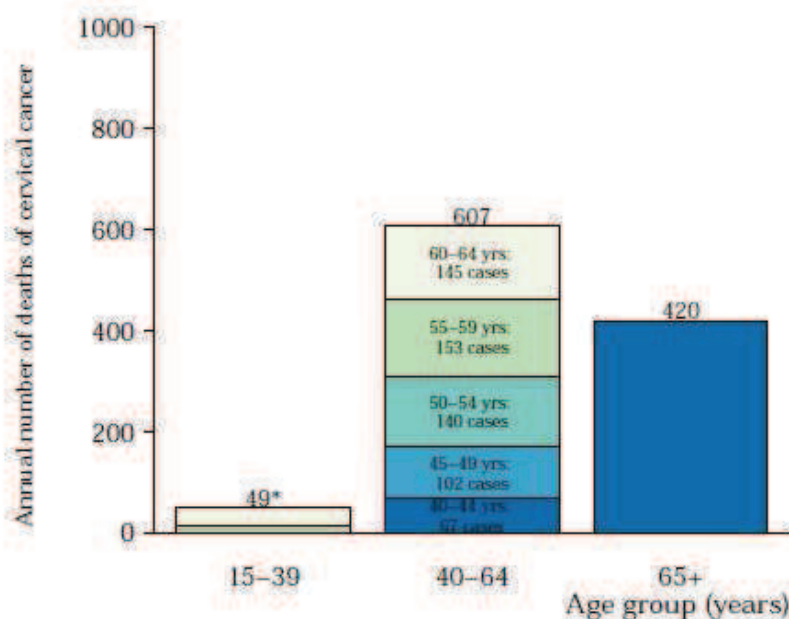


Figure 17: Nombre annuel de décès par cancer du col de l'utérus au Maroc en 2012 (par groupe d'âge) (WHO/ICO 2014b).

*15-19 ans: 0 cas. 20-24 ans: 0 cas. 25-29 ans: 1 cas. 30-34 ans: 12 cas. 35-39 ans: 36 cas.

Il est important de signaler que ces statistiques doivent, tout de même, être considérées avec grande précaution. En effet, selon les professionnels de santé et en l'absence d'un registre national des cancers au Maroc, l'incidence devrait être encore plus importante étant donné que les cas recensés ont été limités à quelques centres d'oncologie (Alhamany et al. 2010).

3.3. Travaux de recherche sur l'infection à HPV et les lésions du col de l'utérus chez les femmes marocaines

L'analyse de la situation avant 2007, en matière de travaux de recherche sur le cancer du col au Maroc, montre l'absence de travaux scientifiques avec une vision de santé publique. Les travaux disponibles sur cette période portent le plus souvent sur des études hospitalières mono-centriques avec habituellement une approche descriptive ou une approche purement clinique ou microbiologique de la problématique.

Par rapport à ce type d'approche, les études épidémiologiques peuvent avoir des implications importantes dans les domaines de la prévention, du dépistage, du diagnostic et du traitement du cancer. L'analyse de ces données est susceptible de fournir une description précise du fardeau du cancer du col au niveau de la population et de générer un certain nombre d'hypothèses qui seront testées à l'aide d'études analytiques. Il est clair qu'une politique sanitaire visant à réduire la charge de morbidité et de mortalité liées aux cancers ne peut se passer des données épidémiologiques qui restent à l'heure actuelle insuffisantes.

Dans ce contexte, la rétrospective de toutes les études en relation avec le cancer du col au Maroc (49 depuis 1972 selon la base de données : www.ncbi.nlm.gov/PubMed cervix+ cancer+ Morocco) montre que toutes ont des contributions importantes mais affichent aussi une fragmentation et une dispersion dans leurs approches méthodologiques, techniques, et en terme de taille de l'échantillon et de sa représentativité.

Une étude publiée en 1977, dont le but était de révéler les nouveaux cas de cancer du col de l'utérus en Israël sur une période de 5 ans allant de 1961 au 1965, a conclu que le cancer du col de l'utérus était très prévalent chez les femmes d'origine marocaine et les femmes divorcées (Sharon et al. 1977).

Deux études européennes ont abordé les risques d'apparition de cancers chez des migrants d'origine méditerranéenne vivant en France ou en Australie (Khlal 1995). Ainsi Khlal M. de l'Institut National d'Etudes Démographiques a conclu que les marocaines étaient très exposées au risque du cancer du col. La deuxième étude a abordé la mortalité par cancer chez les migrants en France d'origine Nord Africaine, et il apparaît dans cette étude que les femmes d'origine marocaine présentent un risque de mortalité par cancer du col plus élevé par rapport aux femmes d'origine algérienne et tunisienne (Bouchardy et al. 1996).

Une étude néerlandaise a estimé l'incidence du cancer du col dans une population de femmes vivant au nord de la Hollande selon leur pays de naissance. Ainsi, il apparaît que l'incidence du cancer du col (carcinome épidermoïde ou adénocarcinome) chez les femmes nées au Maroc est beaucoup plus élevée que chez celles nées en Hollande (Arnold et al. 2013).

Berraho *et al.*, en 2012, sur un pool de données de deux centres d'oncologie à Casablanca, sur une population de femmes d'un âge moyen de 52 ans, a pu conclure que plus de 90% des cancers du col de l'utérus étaient des carcinomes épidermoïdes (Berraho et al. 2012).

En 2013, pour la période 2005-2007, l'étude de Bouchbika *et al.* a montré de manière très précise que l'incidence du cancer du col de l'utérus est de 13,9/100 000 femmes, largement supérieure à

celle de la Tunisie (14,2) et très inférieure à celle de l'Algérie (20,2/100 000). L'étude a été réalisée sur la base des données du registre du grand Casablanca (Bouchbika et al. 2013).

Nous avons tenté de réaliser une synthèse des travaux de recherche au Maroc portant sur l'infection à HPV, les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Le tableau 7 illustre les principales études marocaines décrivant la distribution de l'infection à HPV au niveau du col de l'utérus.

Tableau 7: Distribution de l'infection HPV dans le col de l'utérus dans les principales études marocaines

Auteurs	Ville Echantillonnage	Technique d'extraction d'ADN	Méthode de géotypage	Méthode de détection des HPV	Prévalence des HPV	Résultats cyto-histo/HPV+	Facteurs de risque
Chaouki et al 1998, Int J Cancer	Rabat - 214 biopsies cervicales tumorales congelées (âge 21-73) - 203 FCU en milieu liquide (âge 18-70)	Non mentionnée	PCR (GP5+/GP6+)	Hybridation moléculaire avec des sondes pour 30 types d'HPV	<u>Biopsies tumorales :</u> HPV+ (94,6%), HPV16 (67,7%), HPV18 (8,1%) Infection simple (8,5%), infections multiples (91,5%) <u>Frottis en milieu liquide</u> HPV+ (20,5% =, HPV16 (4,3%), HPV18 (1,1%) Infection simple (5,3%), infections multiples (94,7%)	Histo : CE (71%) ; ADC/CAS (7,4%) ; CCU (21,5%) Prévalence d'HPV similaire entre CE et ADC avec prédominance d'HPV16.	Durée d'utilisation de contraception orale (≥5 ans) Multiparité Rapports sexuels avec multiples partenaires avant l'âge de 20 ans Niveau socio-économique bas
Amrani et al 2002, J Maroc Med	Rabat - 147 biopsies cervicales incluses en paraffine (âge 26 – 92) - 45 biopsies cervicales bénignes incluses en paraffine (âge 35-65)	Phénol Chloroforme et précipitation à l'alcool	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire avec une sonde HPV16/18/ 31 puis 2ème hybridation avec des sondes HPV 16 et HPV18	HPV+ (64%), HPV 16 (45%), HPV18 (17%)	NS : HPV+ (73%) HPV16 (41%), HPV18 (523%) condylomes (1 cas HPV16)	
Lalaoui et al 2003, Clin Microbiol Infect	Rabat 129 biopsies cervicales incluses en paraffine	Phénol Chloroforme et précipitation à l'alcool	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire (sondes HPV16 et HPV18)	HPV+ (70,5%), HPV 16 (49%), HPV 18 (22%), HPV16/18 (2 cas)	LI (26%), CIN de bas grade (60%), CIN de haut grade et CI (CSI et ADC) (67%) Distribution similaire d'HPV16 et HPV18 entre les LI du col et CIC	
El Gnaoui et al 2009	Rabat - 147 biopsies cervicales incluses en paraffine (âge 26 – 92) - 447 frottis en milieu liquide	Phénol Chloroforme et précipitation à l'alcool	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire avec une sonde HPV16/18/31 puis 2ème hybridation avec des sondes HPV 16 et HPV18	<u>Biopsies incluses en paraffine</u> HPV+ (62%), HPV 16 (45%), HPV 18 (19%), HPV 16/18 (3%) <u>Frottis en milieu liquide</u> HPV + (6%), HPV 16 (28%), HPV18 (21%)	Lésions malignes (carcinome, sarcome) HPV+ (62%), HPV16 (48%), HPV18 (17%), HPV16/18 (5%) Lésions bénignes (INS) HPV+ (73%), HPV16 (41%), HPV18 (23%) Frottis en milieu liquide /HPV+ Cytologie normale (14%), INS (32%), ectropion (4%), métaplasies épidermoïdes (18%)	

Auteurs	Ville Echantillonnage	Technique d'extraction d'ADN	Méthode de génotypage	Méthode de détection des HPV	Prévalence des HPV	Résultats cyto-histo/HPV+	Facteurs de risque
Khair et al 2009, J Med Virol	Casablanca 89 biopsies cervicales tumoraes congelées (âge 34-88)	Phénol Chloroforme et précipitation à l'alcool	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire avec des sondes HPV16,18, 31,33,45 et 59	HPV+ (92%), HPV 16 (71%), HPV 18 (46,5%) Infection simple: HPV16 (36,6%), HPV18 (19,5%) Double ou multi-infections (35,5%), HPV 16/18 (21%), HPV 16/45 (8,5%) HPV 45 et 59 sont associés aux HPV16 et /ou HPV18 Pas d'infection par HPV31 et HPV33	SCC : HPV+ (93,5%), HPV16 (35,1%), HPV18(16,8%),HPV16/18 (18,2%) ADC:HPV+ (66,7%), HPV16(33,3%),HPV18 (0%), HPV16/18 (33,3%)	
El Gnaoui et al 2009, Eur J Sc Res	Casablanca - 281 biopsies cervicales tumorales incluses en paraffine (âge 25-80) - 281 FCU en milieu liquide (âge 30-65)	Digestion protéique à la protéinase K	HIS avec amplification de signal	Hybridation moléculaire avec des sondes HPV6/11, HPV16/18 et HPV31/33	<u>Tumeurs</u> : HPV+ (78%), HPV16/18 (63%), HPV31/33 (15%), HPV6/11 (0%) <u>FCU en milieu liquide</u> : HPV+ (16%), HPV6/11 (34%)		Mariage à un jeune âge Multiplicité des partenaires sexuels Grossesse à un âge précoce Multiparité et longue durée d'utilisation de contraception orale
Khair et al 2009, Cell Mol Biol	Mohammedia 113 biopsies cervicales congelées	Non mentionnée	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire avec des sondes HPV16, 18, 31, 33, 45,59	HPV + (88%), HPV 16 (65%), HPV 18 (44,4%)		
El Hamdani et al 2010, Cell Mol Biol	Rabat 53 biopsies cervicales tumoraes incluses en paraffine (âge 31-84)	Kit MagneSil®	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire avec des sondes HPV 16, 18, 31, 33, 35 et 45	HPV + (79,2%) Seule ou en coinfection: HPV16 (76,2%), HPV 18 (38,1 %), HPV 31 (23,8%) Infections multiples : HPV+ (59,52 %), HPV 16/18 (8 cas), HPV 16/31 (8 cas)	Histo : CE (96,2%), ADC mucineux (1,8%), CAS (1,8%)	
Alhamany et al 2010, J Infect Dev Ctries	Rabat 938 FCU en milieu liquide (âge 17-80)	Phénol Chloroforme et précipitation à l'alcool	PCR (MY09/MY11)	Hybridation moléculaire avec des sondes HPV 16, 18, 31, 33, 35 et 46	HPV+ (15,6%) Seule ou en coinfection : HPV16 (15,75%), HPV18 (10,96%)	Groupe normal : HPV+ : (15,8%), HPV16 (13,7%), HPV 18 (8,9%) Groupe anormal (INS, ASC-US, ASCH, LSIL, HSIL) : HPV+ : (14,4%), HPV16/18 (2 cas), HPV16/18/31 (1 cas)	Utilisation de la contraception orale

Auteurs	Ville Echantillonnage	Technique d'extraction d'ADN	Méthode de génotypage	Méthode de détection des HPV	Prévalence des HPV	Résultats cyto-histo/HPV+	Facteurs de risque
Bennani <i>et al</i> 2012, J Infect Dev Ctries	Fès 925 FCU en milieu liquide (âge 17-81)	Digestion à la protéinase K	PCR (MY09/MY11)	Non mentionnée	HPV + (42,5%)	L'étude concerne des frottis normaux	Antécédents d'évènements gynécologiques (fausses couches, fibromes, kystes)
Qmichou <i>et al</i> 2013, BMC Infect Dis	Rabat/Casablanca 129 biopsies cervicales tumorales congelées (âge 28-80)	Phénol Chloroforme et précipitation à l'alcool	PCR (MY09/MY11) et (GP5+/GP6+)	Séquençage direct	HPV+ (91,47%), HPV16 (87,29%), HPV18 (5,08%), HPV31 (2,54%) HPV33 (1,69%), HPV35 (0,85%)	SCC: HPV+ (89,1%) ADC: HPV+ (75%)	Association entre les variants E6 d'HPV16 et le développement du cancer du col de l'utérus
Birrou <i>et al</i> 2015, Int J Res Med Sc	Rabat 277 FCU en milieu liquide (âge 25-65)	Non mentionnée	Non mentionnée	INNO-LiPA test (28 types d'HPV)	HPV+ (76%), HPV-HR (32%) Infection multiples (21%) HPV16 (31%), HPV18 (20%)	Frottis normal : HPV+ (36%) Frottis anormal (INS, ASC-US, LSIL, HSIL): HPV+ (36%)	Antécédents de problèmes gynécologiques

Abréviations : FCU, frottis cervico-utérin; PCR, Polymerase Chain Reaction ; HIS, Hybridation *In Situ* ; HPV, PapillomaVirus Humain ; CE, Carcinome Epidermoïde ; ADC, ADénoCarcinome ; CAS, Carcinome AdénoSquameux ; CCU, cancer du col de l'utérus; LI, Lésions inflammatoires ; CIN, Néoplasie Intraépithéliale Cervicale ; CSI, Cancer Squameux Invasif ; CIC, Carcinome Invasif du Col utérin ; SCC, Carcinome à Cellules Squameuses; INS, Inflammations Non Spécifiques ; ASC-US, Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance ; ASC-H, Atypical Squamous Cells - cannot exclude a High Grade Squamous Intraepithelial Lesions; LSIL, Low grade Squamous Intraepithelial Lesion ; HSIL, High grade Squamous Intraepithelial Lesion ; HPV-HR, HPV à haut risque.

Les études citées dans le tableau 7 ont été réalisées essentiellement dans des populations féminines du Nord du Maroc (Rabat, Casablanca, Mohammedia et Fès). La différence de prévalence d'HPV observée s'explique par :

- La nature des échantillons (Biopsies incluses en paraffine, Biopsies congelées, FCU en milieu liquide) : La qualité de l'ADN extrait à partir des biopsies congelées et les FCU en milieu liquide est meilleure comparé à l'ADN extrait de biopsies incluses en paraffine.
- La technique moléculaire utilisée pour la détection du génome viral (PCR suivie d'un génotypage ou d'un séquençage, hybridation *in situ*): la PCR est plus sensible que l'hybridation *in situ*. De plus la prévalence d'HPV est plus élevée avec l'utilisation d'un large spectre de sondes à HPV que lors d'un séquençage.
- Le diagnostic histologique et cytologique (Frottis N, ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, Cancer).
- La qualité des travaux qui sont très inégaux.

4. Données épidémiologiques de l'infection à VIH et son association avec le développement du cancer du col de l'utérus en Afrique et au Maroc

Dans cette revue de littérature, il nous est apparu important de décrire, dans un premier temps, la situation épidémiologique de l'infection à VIH chez les femmes africaines et notamment marocaines, puis de mieux documenter le lien entre l'infection à VIH et l'existence d'un cancer du col de l'utérus.

4.1. Estimation de l'épidémie de l'infection à VIH

4.1.1. Situation en Afrique

Les taux d'infection à VIH chez les jeunes, dans le monde et en Afrique, entre 15 et 24 ans sont en déclin (459 000 nouvelles infections en 2013 par rapport à presque 715 000 nouvelles infections dix ans plus tôt). Malgré ce déclin, on estime à environ 250 000 nouvelles infections/an par le VIH chez les adolescents (garçons et filles), dont 64% touchent des filles (Figures 18 et 19). En Afrique, 74% des infections touchant les adolescents surviennent chez les filles. De plus, la première cause de mortalité chez l'adolescente est liée à l'infection à VIH (Biddlecom et al. 2009), bien que des traitements antirétroviraux soient disponibles c'est la deuxième cause de décès chez les femmes en âge de procréer.

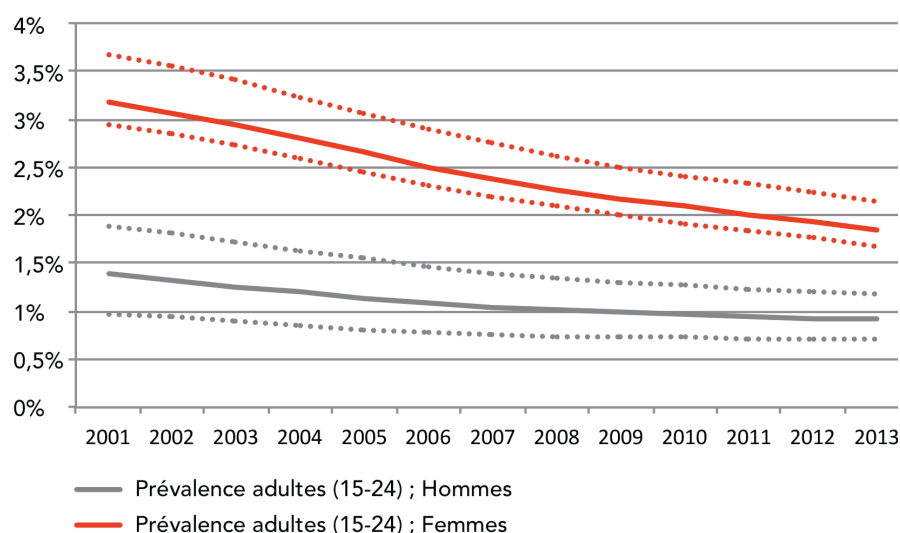


Figure 18 : Prévalence du VIH parmi les jeunes entre 15 et 24 ans en Afrique : période 2001-2013 (ONUSIDA 2015)

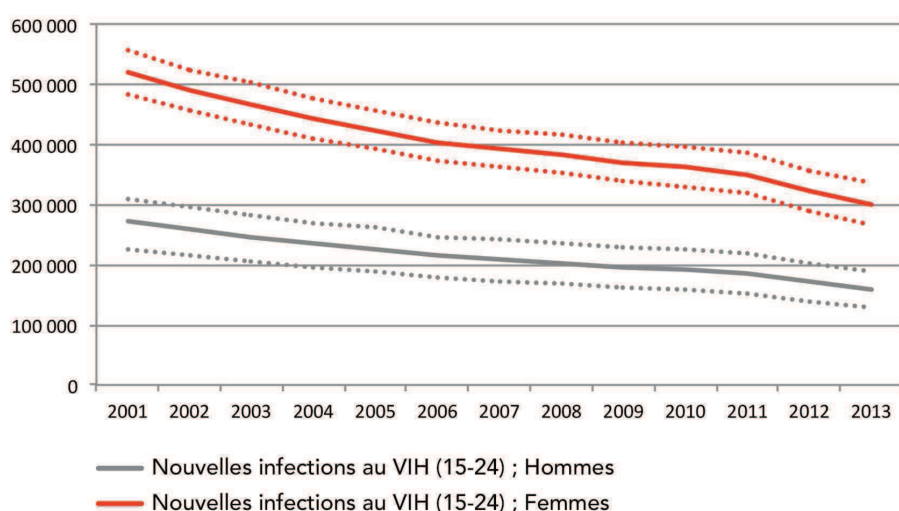


Figure 19: Nouvelles infections par le VIH parmi les jeunes entre 15 et 24 ans en Afrique : période 2001-2013 (ONUSIDA 2015)

Toutes les heures, environ 34 jeunes femmes africaines sont nouvellement infectées par le VIH. Les jeunes femmes issues de groupes socialement marginalisés (telles que les populations à haut risque et vulnérables) encourrent un grand risque de contracter le VIH, car elles font face à de nombreux défis. La discrimination, la stigmatisation, les lois répressives et le manque de protection sociale augmentent le risque de contracter le VIH, surtout chez les jeunes femmes professionnelles du sexe, les jeunes femmes transgenres, les jeunes migrantes et les jeunes femmes consommatrices de drogues (ONUSIDA 2015).

4.1.2. Situation au Maroc

Depuis le premier cas en 1986, le nombre de cas de VIH/sida notifié a atteint 8705 en 2013. Cinquante pour cent des cas ont été notifiés au cours de la période 2009-2013 (ONUSIDA 2014) (Figures 20 et 21).

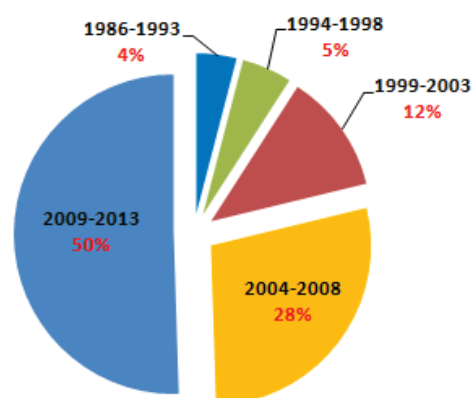


Figure 20: Répartition des cas VIH/sida notifiés pour la période 1986-2013 (ONUSIDA 2014)

La proportion de personnes vivant avec le VIH diagnostiquées à un stade asymptomatique a évolué de 32% en 2009 à plus de 50% en 2012-2013, principalement en milieu urbain (79%).

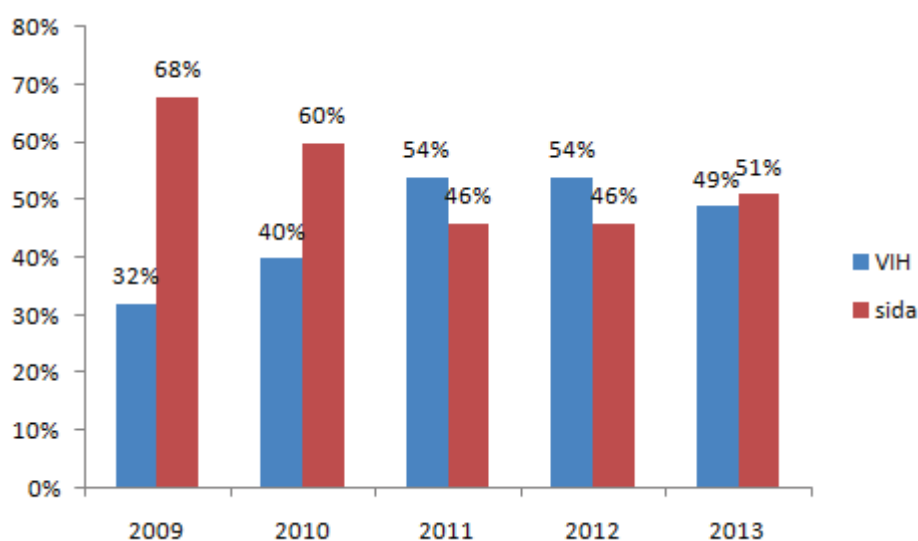


Figure 21 : Évolution des cas de VIH/sida notifiés pour la période 2009-2013 (ONUSIDA 2014)

Sur le plan géographique, 5 régions sur 16 (Souss-Massa-Drâa, Marrakech-Tensift-Al Haouz, Grand Casablanca, Rabat –Salé-Zemmour-Zaër et Tanger-Tétouan) cumulent 68,4% des cas notifiés. Par rapport à l'âge, 3% correspondent aux enfants de moins de 15 ans, 11% aux jeunes de 15-24 ans et

75% à la population de 25-44 ans. Concernant le sexe, 50% des cas notifiés sont de sexe féminin. Ce pourcentage est de 59% parmi les jeunes de 15-24 ans.

La surveillance sentinelle révèle chez les femmes professionnelles du sexe une prévalence moyenne nationale entre 2% et 3% depuis l'année 2001 (2,7% en 2012). Des taux au-delà de 5% sont rapportés sur plusieurs années dans la région de Souss-Massa-Draa, ce qui témoigne d'une épidémie concentrée (Figure 22). Ces données ont été confirmées par l'étude bio-comportementale, utilisant la méthodologie d'échantillonnage RDS (Respondent-Driven Sampling) menée en 2011 au niveau des villes d'Agadir, Rabat, Fès et Tanger, avec une prévalence moyenne de 2%, et de 5% au niveau de la ville d'Agadir (Région de Souss-Massa-Drâa).

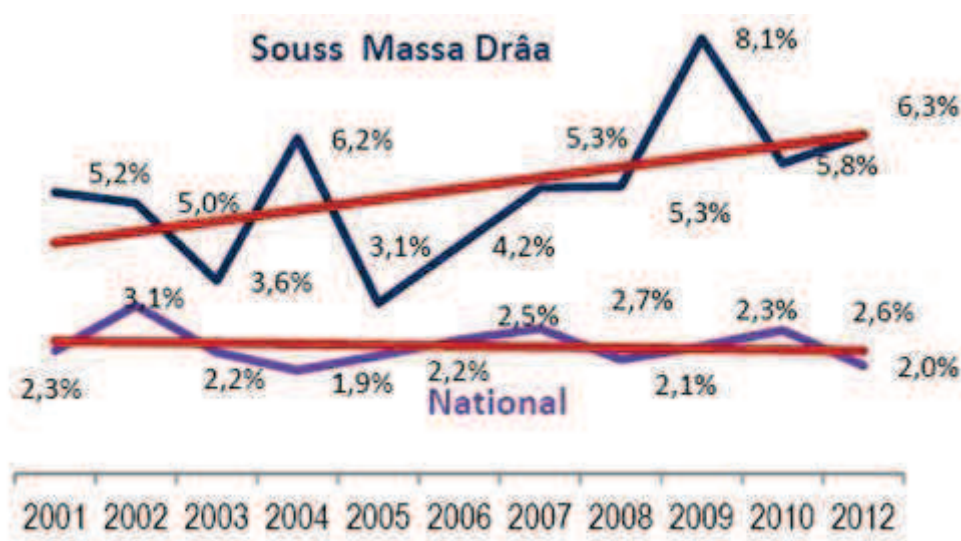


Figure 22 : Prévalence du VIH chez les professionnelles du sexe. National et Souss-Massa-Drâa. Surveillance sentinelle 2001-2012 (ONUSIDA 2014)

4.2. Association épidémiologique entre infection à VIH et cancer du col de l'utérus

En 1993, le Cancer invasif du col (CIC) a été ajouté à la liste des cancers (sarcome de Kaposi et lymphomes non-hodgkiniens) définis comme faisant entrer la femme infectée par le VIH au stade SIDA selon la classification du SIDA du « Center for Disease Control » (From the Centers for Disease Control and Prevention 1993).

Peu de pays africains ont mis en place des registres des cancers fiables et pérennes. De plus la faible espérance de vie des femmes infectées par le VIH et non traitées par les antirétroviraux rendent difficile l'élaboration des preuves de l'association entre CIC et infection à VIH. Devant cette situation, les premières études épidémiologiques publiées à ce propos ont été basées sur la relation entre l'infection à VIH et les lésions précancéreuses du col utérin identifiées par FCU suivi d'un examen cytologique.

Les infections à HPV et les lésions du col associées chez les femmes VIH-positives diffèrent à plusieurs niveaux par rapport aux femmes VIH-négatives :

- L'infection HPV est plus fréquente et a tendance à persister plus longtemps chez les femmes VIH-positives (Ng'ayo et al. 2008 ; Banura et al. 2008 ; Ezechi et al. 2014).
- L'infection à VIH est aussi le plus souvent associée au développement des lésions précancéreuses du col de l'utérus voire du cancer (Hawes et al. 2006; Didelot-Rousseau et al. 2006 ; Moodley et al. 2006 ; Koffi et al. 2010 ; McDonald et al. 2014).
- Le taux de récurrence des lésions dysplasiques est plus élevé chez les femmes infectées par le VIH par rapport aux femmes VIH-négatives (Berrébi et al. 2008).
- La charge virale HPV est plus élevée chez les patientes avec un taux de CD4 inférieur à 200/ μ L (Heard et al. 2000).

En conclusion, la carcinogenèse du col de l'utérus est un processus long et multi-étapes. Il faut généralement entre 10 à 20 ans pour que les lésions précancéreuses provoquées par le virus évoluent en cancer invasif. La lenteur avec laquelle une dysplasie légère évolue jusqu'au stade de carcinome fait du cancer du col une maladie relativement facile à prévenir et justifie donc son dépistage et en particulier chez les femmes infectées par le VIH.

III. Prévention du cancer du col de l'utérus

1. Prévention primaire

1.1. Vaccination prophylactique

L'étiologie virale du cancer du col de l'utérus a fortement encouragé la recherche de stratégies prophylactiques permettant de prévenir les infections par HPV et d'empêcher donc le développement des lésions précancéreuses et cancéreuses associées.

Récemment, deux vaccins prophylactiques ciblant les HPV oncogènes 16 et 18 ont été développés et commercialisés dans différents pays (Kemp et al. 2012; Schiller et al. 2012). L'un bivalent, Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgique) dirigé contre les HPV16 et 18, a pour objectif la prévention des dysplasies de haut grade du col de l'utérus (CIN2/3) et du cancer du col de l'utérus ; et l'autre quadrivalent, Gardasil® (Merck & Co, Whitehouse Station, NJ USA) qui cible les HPV16 et 18 ainsi que deux HPV-BR (HPV6 et 11), a pour objectif la prévention des dysplasies de haut grade du col de l'utérus (CIN2/3), des cancers du col de l'utérus, des dysplasies de haut grade de la vulve (VIN 2/3) et des verrues génitales externes (condylomes acuminés).

Ces vaccins sont préparés à partir de pseudo-particules virales ou *Virus Like Particles* (VLP) auto-assemblées et hautement purifiées de la principale protéine de la capside L1. Ces VLP ne

contiennent pas d'ADN viral : elles n'ont ni la capacité d'infecter les cellules ni celle de se multiplier. Elles ne peuvent en aucun cas provoquer de lésions ou induire un cancer.

Les vaccins anti-HPV sont indiqués pour une population bien particulière. Ce sont les jeunes filles/femmes entre 9 ans et 26 ans et qui n'ont pas encore débuté leur activité sexuelle (Monnat et Wallington 2013). Dans cette population, la probabilité d'avoir déjà eu une infection HPV est très minime, voire nulle, vu le mode « sexuel » de transmission du virus.

Ces vaccins sont administrés par voie intramusculaire selon un schéma vaccinal consistant en trois injections. Ce schéma est pratiquement le même pour les deux vaccins avec des injections réalisées 2 mois et 6 mois après la première pour le vaccin quadrivalent (Gardasil®) et 1 mois et 6 mois après la première pour le vaccin bivalent (Cervarix®).

Bien que l'introduction sur le marché de cette première génération de vaccins contre l'HPV représente un élément important dans la prévention du cancer, plusieurs aspects supplémentaires doivent être résolus ou améliorés pour optimiser l'efficacité du vaccin.

La spécificité de type d'HPV représente une des principales limites. En effet, l'efficacité du vaccin concerne les types d'HPV ciblés avec une protection croisée minimale contre d'autres types d'HPV oncogènes. Par conséquent, un certain nombre de cancers (20 à 30%) liés à d'autres génotypes ne pourront pas être évités. Enfin, le coût de ces vaccins est sûrement un frein à leur application à grande échelle, dans la majorité des pays à ressources faibles ou moyennes, où le cancer du col utérin est très répandu. Des modifications de l'assemblage des VLP, basées sur des protocoles moins coûteux, sont en cours d'évaluation pour réduire les coûts de production. En outre, les études en cours sont actuellement axées sur l'amélioration de l'immunogénicité du vaccin en testant des composants antigéniques nouveaux, tels que des adjuvants, pour booster le système immunitaire. Cela contribuera à obtenir une protection plus longue contre l'infection virale et à réduire le coût nécessaire pour une protection complète (Einstein 2014). Une étude récente a montré l'efficacité d'un nouveau vaccin nonavalent contre l'infection à HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 et 58 (Joura et al. 2015) et son impact potentiel pour la population française (Riethmuller et al. 2015).

1.2. Systèmes et programmes de vaccination anti-HPV

Actuellement la vaccination anti-HPV est pratiquée à l'échelle mondiale. De nombreux pays industrialisés ont instauré un programme de vaccination national subventionné par l'état, avec des modalités différentes. Dans certains d'entre eux, comme l'Australie, le Portugal et le Royaume Uni, la vaccination anti-HPV est assurée gratuitement *via* un programme scolaire. Les estimations indiquent une couverture vaccinale atteignant les 80% de la population ciblée dans ces programmes. Dans d'autres pays, comme la Hollande, l'Italie ou le Danemark, la vaccination anti-HPV est aussi gratuite, mais assurée par les services sanitaires avec une couverture vaccinale qui varie entre 45 et 58% (Kessels et al. 2012).

En France, la vaccination anti-HPV est recommandée par la Haute Autorité de Santé pour les jeunes filles de 11 à 14 ans avec un rattrapage possible jusqu'à 20 ans. Par ailleurs, un remboursement de 65% est proposé pour cette vaccination (HAS 2013).

Dans les pays en voie de développement, là où environ 88% des cas de mortalité par cancer du col utérin surviennent, la vaccination, en général, ne rentre pas dans les programmes nationaux de vaccination (Graham et Mishra 2011). Cependant, de nombreuses études ont été faites dans ces pays, afin de définir les stratégies les plus efficaces et les plus acceptables permettant une mise en place de la vaccination anti-HPV. Les études sur l'acceptabilité de la vaccination au sein de ces pays ont montré des niveaux satisfaisants voire excellents quand il s'agit d'un vaccin gratuit. Ainsi, en l'absence de programmes gouvernementaux finançant entièrement, ou en grande partie, les frais de la vaccination, le prix du vaccin constitue à ce jour la barrière principale.

Au Maroc, le ministère de la santé en collaboration avec l'Association Lalla Salma de lutte contre le Cancer (ALSC) procède à la mise en place d'un programme de vaccination anti-HPV. En effet, une seule étude a été réalisée sur l'acceptabilité de la vaccination anti-HPV dans la population marocaine. Cette étude a révélé un taux de vaccination nul (0%) avec un très faible niveau de sensibilisation (14%) et d'acceptabilité (35%) parentale concernant ce moyen de prévention. Elle a montré que l'acceptabilité parentale de la vaccination anti-HPV est fortement liée à sa recommandation par le corps médical ainsi qu'au prix du vaccin (Mouallif et al. 2014).

Les vaccins anti-HPV prophylactiques disponibles, et dont la protection attendue contre le cancer du col est de 70% ne protègent pas contre tous les types d'HPV. Ils ne modifient donc pas la pratique du dépistage par FCU qui doit être poursuivie.

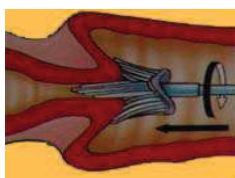
2. Prévention secondaire : Dépistage des lésions du col de l'utérus

2.1. Techniques de dépistage des lésions du col de l'utérus

2.1.1 Dans les pays développés

Dans les pays développés, des programmes de dépistage du cancer du col de l'utérus ont été mis en place afin de repérer les lésions précancéreuses et de les traiter tôt. Ces programmes, qui prévoient de multiples visites médicales, s'appuient en général sur un dépistage basé sur la cytologie (frottis) suivi d'une colposcopie et d'une biopsie ou d'une pièce opératoire (histologie) lorsque cela est indiqué. C'est ce que l'on appelle le triépistage cytologie/colposcopie/histologie.

a. Frottis cervico-utérin (FCU)



Le test de dépistage de référence des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin repose sur un examen cytologique : le FCU. La procédure décrite en 1943 par Papanicolaou consiste à prélever des cellules du col de l'utérus. Le matériel prélevé est ensuite étalé et fixé sur une lame, dans le cas d'un frottis dit conventionnel ou mis en suspension dans un flacon contenant un liquide de conservation dans le cas d'un frottis en phase liquide, aussi nommé frottis en couche mince. L'interprétation du FCU par les anatomo-pathologistes se base actuellement sur le système de Bethesda (ANAES 2002) (Tableau 8). La découverte de cellules suspectes, dysplasiques, ou de cellules tumorales doit être confirmée par l'examen histologique d'un prélèvement biopsique.

Tableau 8: Résumé du système de Bethesda 2001

Extrait des recommandations de l'Agence Nationale de l'Accréditation et de l'Evaluation des Soins (ANAES 2002).

QUALITÉ DU PRÉLÈVEMENT

- **Satisfaisant pour évaluation**
- **Non satisfaisant pour évaluation (préciser la raison)**

INTERPRÉTATION/RÉSULTAT

- **Absence de lésion malpighienne intra-épithéliale ou de signe de malignité (Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy).**

S'il y a lieu, préciser :

- présence de micro-organismes : Trichomonas vaginalis ; éléments mycéliens, par exemple évoquant le candida ; anomalies de la flore vaginale évoquant une vaginose bactérienne ; bactéries de type actinomyces; modifications cellulaires évoquant un herpès simplex;
- autres modifications non néoplasiques : modifications réactionnelles (inflammation, irradiation, ou présence d'un dispositif intra-utérin) ; présence de cellules glandulaires bénignes post-hystérectomie ; atrophie.
- **Anomalies des cellules malpighiennes :**
 - atypies des cellules malpighiennes (ASC) : de signification indéterminée (ASC-US) ou ne permettant pas d'exclure une lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (ASC-H);
 - lésion malpighienne intra-épithéliale de bas grade (LSIL), regroupant koilocytes/dysplasie légère/CIN1;
 - lésion malpighienne intra-épithéliale de haut grade (HSIL), regroupant dysplasies modérée et sévère, CIS/CIN2 et CIN3. Le cas échéant présence d'éléments faisant suspecter un processus invasif (sans autre précision);
 - carcinome malpighien.
- **Anomalies des cellules glandulaires :**
 - atypies des cellules glandulaires (AGC) : endocervicales, endométriales ou sans autre précision (Not Other Specified);
 - atypies des cellules glandulaires en faveur d'une néoplasie : endocervicales ou sans autre précision (Not Other Specified);
 - adénocarcinome endocervical in situ (AIS);
 - adénocarcinome.
- **Autres (liste non limitative) :**
 - cellules endométriales chez une femme âgée de 40 ans ou plus.

Préciser si l'examen est automatisé et si la recherche des HPV a été réalisée.

Notes et recommandations concises, formulées en termes de suggestions, et si possible accompagnées de références.

b. Colposcopie



La colposcopie consiste à faire un examen du col de l'utérus, voire du vagin à l'aide d'une loupe binoculaire grossissant de vingt à cinquante fois.

Cet examen se déroule en trois temps :

- Une observation sans préparation en regardant au colposcope le col, et la glaire (Figure 23).
- Examen après application d'acide acétique afin de visualiser les cellules présentant une anomalie. L'acido-réaction permet de distinguer des lésions dites « acidophiles » qui apparaissent blanchâtres (Figure 24).
- Examen après application de Lugol (Test de Schiller) qui distingue les zones anormales (non colorées), des zones saines. Les lésions dans ce cas sont dites iodo-négatives (Figure 24).

La colposcopie n'est pas recommandée comme outil de dépistage. Mais c'est le seul examen qui permet d'objectiver la zone de développement des lésions intraépithéliales, de préciser la topographie, d'apprécier la gravité des lésions et de diriger la biopsie pour aboutir au diagnostic histologique. Elle oriente aussi les gestes thérapeutiques en fonction de la visibilité ou non de la jonction.



Figure 23: Col de l'utérus normal sans coloration (à gauche) et après coloration au Lugol (à droite) (Image empruntée de Pr. D. Riethmuller)

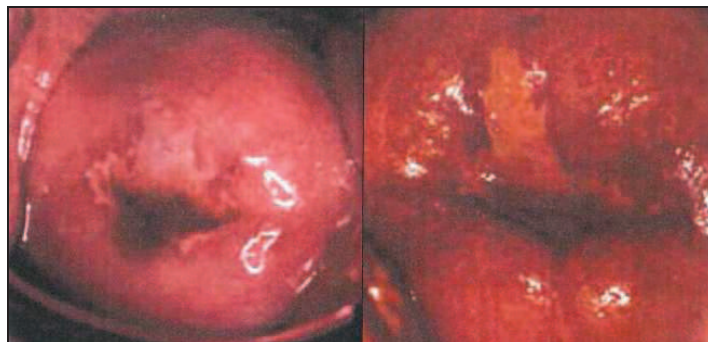
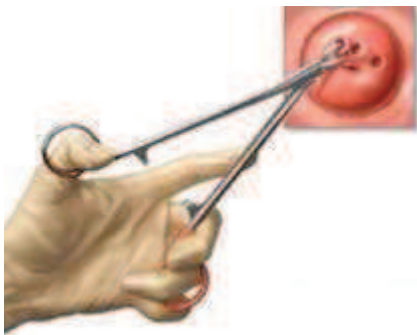


Figure 24: Col de l'utérus anormal après coloration à l'acide acétique (à gauche) et au Lugol (à droite) (Image empruntée de Pr. D. Riethmuller)

Après ces trois étapes, on définira des complexes colposcopiques permettant de classer les cols (Monsonego 2003) :

- Col normal
- Transformation normale : correspond à la métaplasie, ou transformation d'un épithélium glandulaire par un épithélium malpighien.
- Transformation atypique de grade 1 (TAG 1) ou anomalie mineure : correspond le plus souvent à des lésions dystrophiques ou au maximum à des lésions de bas grade.
- Transformation atypique de grade 2 (TAG 2) ou anomalie majeure : correspond le plus souvent à des lésions de haut grade voire à des cancers micro-invasifs ou invasifs.
- Lésions diverses (ex : polypes, condylomes....).

c. Biopsie



La biopsie cervicale représente l'étape ultime du diagnostic. La biopsie est faite sur la partie la plus suspecte de la lésion et qui se trouve la plus proche de la jonction pavimento-cylindrique. La biopsie doit ramener à la fois un épithélium de surface et un stroma sous-jacent pour permettre de porter le diagnostic d'une lésion purement intra-épithéliale ou d'une lésion envahissant le stroma. Elle doit comporter un matériel interprétable, c'est-à-dire ne pas présenter de signes de thermocoagulation et être fixée rapidement pour permettre une inclusion et une coloration de bonne qualité. L'examen histologique du prélèvement permet de poser un diagnostic de certitude quant au type de lésion, par étude microscopique de l'architecture cellulaire (cf chapitre 5.1).

2.1.2 Dans les pays en voie de développement

Dans les pays en voie de développement, en revanche, les services de dépistage et de traitement ne sont généralement pas disponibles ou accessibles. Et là où ils sont disponibles, les programmes peuvent être inefficaces en raison des difficultés en matière de formation, de contrôle de qualité ou de logistique.

La méthode la plus recommandée et la plus accessible pour le dépistage du cancer du col de l'utérus dans ces pays est appelée inspection visuelle après application d'acide acétique (IVA) ou Lugol (IVL).

Inspection visuelle après application d'acide acétique (IVA)

Il s'agit d'un examen gynécologique avec un spéculum pendant lequel un personnel de santé applique de l'acide acétique (vinaigre) dilué (à 3-5%) sur le col utérin. Le tissu anormal est visible temporairement car il blanchit lorsqu'il est exposé au vinaigre. Il s'agit d'une technique simple, facile à apprendre par tout personnel de santé non médecin, et qui nécessite un minimum d'infrastructure. Les coûts de mise en place et de maintenance sont faibles, les résultats des tests sont disponibles immédiatement ce qui rend possible le dépistage et le traitement des femmes au cours d'une même visite. Par exemple au Pérou, dans un programme de « dépistage et traitement » (see and treat) seulement 9% des femmes avec un résultat positif n'ont pas reçu de traitement dans le cadre d'une visite unique. En comparaison, 44% de femmes n'ont pas reçu de traitement sur le modèle des visites multiples (Gage et al. 2003 ; Luciani et Winkler 2006).

Cette méthode de dépistage a été appliquée avec succès en Inde (où la première cause de mortalité féminine est le cancer du col de l'utérus), à toutes les femmes de 35 à 64 ans tous les 2 ans et a conduit à une chute de la mortalité de 31% dans l'état du Maharashtra (Shastri et al. 2014).

2.2. Techniques de détection du génome viral

Nous n'évoquerons dans cette partie que les techniques classiques et celles utilisées au cours de ce travail de thèse.

L'ensemble des techniques habituellement utilisées en virologie reste limité en pratique pour la détection des infections à HPV, en particulier par le fait que la culture de ces virus est extrêmement difficile, voire impossible en routine. La recherche des anticorps produits au cours des infections à HPV n'offre actuellement qu'un intérêt limité dans la mesure où leur présence inconstante rend leur utilisation pour des études épidémiologiques et le suivi des infections et de la réponse au traitement aléatoire. Ainsi, la place de la sérologie dans le suivi des infections à HPV reste encore à définir. Cependant, certaines données montrent qu'elle pourrait être un outil de diagnostic efficace en cas de vaccination (Seillès et al. 1999 ; Stanley 2010).

Les chercheurs se sont donc tournés vers les méthodes de détection de l'ADN viral. Ainsi, des outils de biologie moléculaire de plus en plus adaptés aux contraintes de la détection des HPV ont été développés ces dernières années.

2.2.1. Southern blot

Cette technique a longtemps été considérée comme la méthode de référence. Elle permet de différencier différents types d'HPV et de déterminer l'état physique de l'ADN viral (épisomal ou intégré).

C'est une méthode lourde et onéreuse nécessitant une quantité importante d'ADN (10 µg) ; elle n'est donc pas utilisable en routine.

2.2.2. Hybridation *in situ* (HIS)

Cette technique est réalisée sur des cellules ou des coupes de tissus fixées sur lame. Elle 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. Elle permet de localiser précisément les génomes d'HPV dans les lésions au niveau du col utérin.

Cette technique présente certains inconvénients : tout d'abord sa sensibilité ne descend pas en dessous de 20 copies virales par cellule et c'est une technique longue et délicate. C'est pour ces raisons qu'elle a été progressivement remplacée, dans les années 90, par des techniques plus sensibles, plus rapides, faciles et automatisables, telles que l'hybridation en phase liquide et la PCR (Polymerase Chain Reaction).

2.2.3. Hybridation en phase liquide : Hybrid Capture 2 (hc2)

Une trousse commerciale permettant la détection des HPV a été enregistrée en 1998 par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de la Santé) en France. Ce test, appelé Hybrid Capture 2 (hc2), repose sur une hybridation en phase liquide utilisant des sondes ARN reconnaissant plusieurs types d'HPV (Figure 25).

Le test hc2 distingue 13 types d'HPV-HR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). Il existe un 2^{ème} coffret pour distinguer en plus de ces 13 HPV-HR, 5 autres types d'HPV-BR (6, 11, 42, 43, 44).

Après dénaturation de l'échantillon cellulaire, l'ADN est hybridé avec un cocktail de sondes ARN. Les hybrides ADN/ARN 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 luminométrie. Les résultats sont exprimés en picogrammes d'ADN viral par millilitre de prélèvement (pg/ml). Le système comporte un témoin négatif et un calibrateur positif titré, ainsi que 2 contrôles de qualité titrés en HPV (HPV6 et HPV16) permettant de valider chaque série d'analyses. Ainsi, les résultats obtenus sont positifs ou négatifs, signalant la présence ou l'absence d'HPV au-delà du seuil clinique dans l'échantillon testé. Cette méthode est très utilisée aujourd'hui, mais ne permet pas de connaître le/ou les types d'HPV présents.

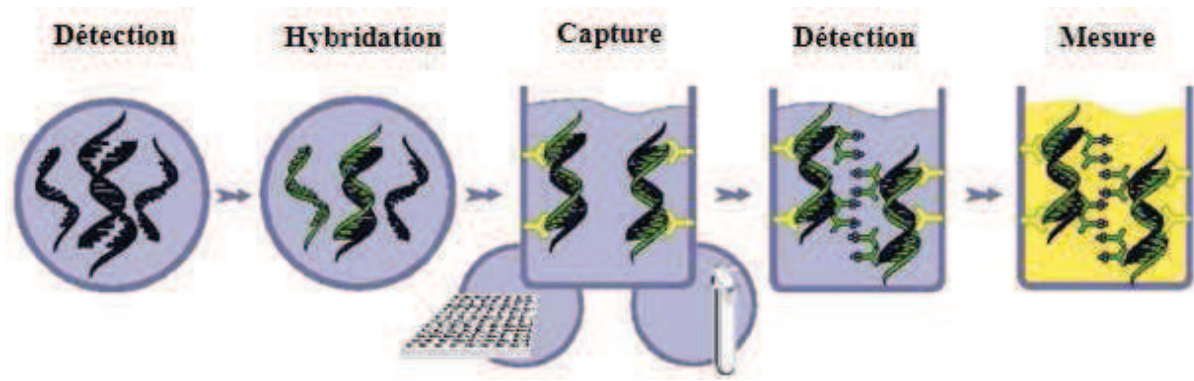


Figure 25: Principe de la technique hc2

2.2.4. Techniques de PCR conventionnelles

La détection des HPV par PCR a la particularité de nécessiter une faible quantité d'ADN cible au départ, d'être sensible, spécifique, rapide et en partie automatisable.

La grande diversité des génotypes d'HPV a conduit au développement de différents systèmes d'amplification reposant sur l'utilisation de couples d'amorces : des amorces consensus et des amorces spécifiques de types d'HPV.

a. Couples d'amorces consensus

Ces amorces permettent l'étude d'un large spectre de génotypes de séquence connue ou inconnue (Snijders et al. 1990). Elles ont été utilisées pour amplifier les régions très conservées du génome des HPV (en particulier la région L1). Actuellement, trois couples d'amorces sont utilisés : les amorces MY09/MY11, les amorces GP5/GP6, et SPF.

Amorces MY09/MY11: ce sont des amorces dégénérées (un nucléotide est incorporé aléatoirement à certaines positions lors de la synthèse) qui conduisent à un amplicon de 450 paires de base (Figure 26) (Resnick et al. 1990). Elles ont été améliorées, devenant PGMY09/11 (« PG » pour « Patti Gravitt ») (Gravitt et al. 2001), ce qui permet d'améliorer la reproductibilité et la sensibilité de la réaction.

Amorces GP5/GP6: ces amorces conduisent à un amplicon beaucoup plus court de 150 paires de bases (van den Brule et al. 1990 ; Snijders et al. 1991). Ceci améliore la sensibilité, surtout pour l'amplification de l'ADN qui a été endommagé. Elles ont été améliorées par ajout de séquences très conservées en 3' des deux amorces, devenant GP5+/GP6+ et permettant d'augmenter la sensibilité analytique de 10 à 100 fois plus qu'avec le couple GP5/GP6 (de Roda Husman et al. 1995).

Amorces SPF ou SPF10: Ces amorces génèrent un amplicon de 65 pb, permettant une détection très sensible d'un large spectre d'HPV (Kleter et al. 1999).

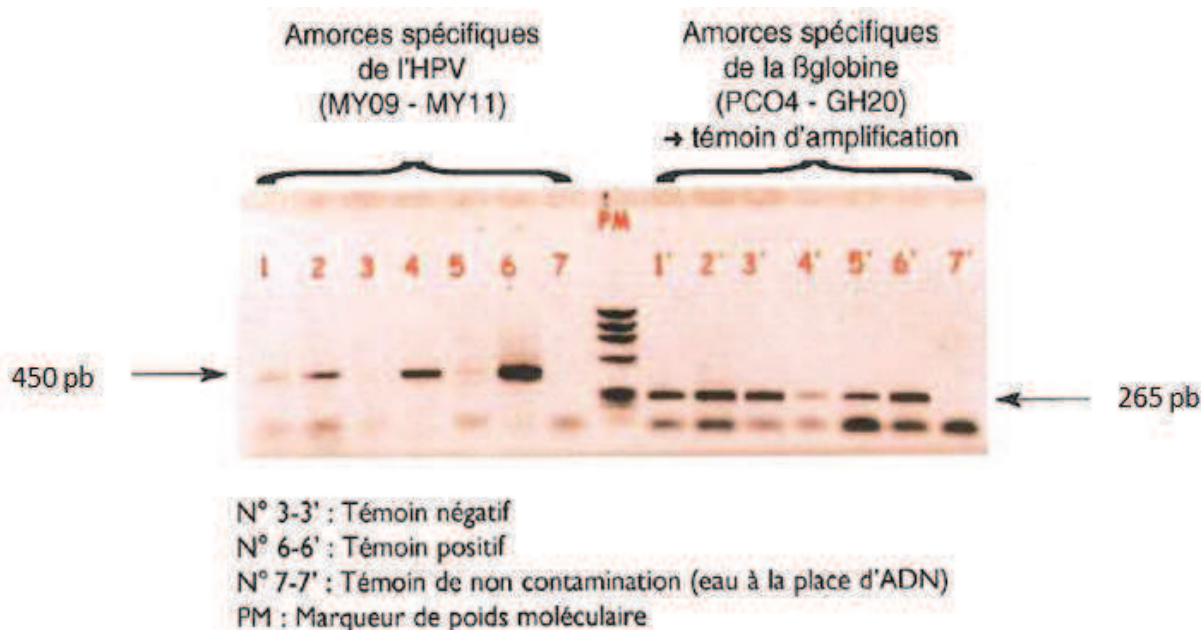


Figure 26: PCR-Electrophorèse des produits amplifiés
 (image empruntée à C. Mougin et L.Madoz, avec leur accord)

b. Couples d'amorces spécifiques

Des amorces spécifiques de types d'HPV ont été développées en premier lieu pour amplifier l'ADN d'un seul type d'HPV (Shibata et al. 1988). Puis, des PCR utilisant plusieurs couples d'amorces spécifiques dans le même milieu réactionnel (PCR multiplexe) ont été développées (Soler et al. 1991). Ces PCR, qu'elles soient multiplexes ou non, permettent seulement la détection des HPV ciblés.

2.2.5. Génotypage

Ces amplifications doivent être suivies d'une étape d'identification des types amplifiés. Ceci peut se faire par :

- **Séquençage** : Cette technique souffre du fait qu'elle n'est pas discriminante, en particulier en cas d'infections multiples (il est vraisemblable que le type majoritaire soit préférentiellement séquencé).
- **Hybridation inverse sur bandelette** : A titre d'exemple, le test INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Fujirebio, Courtaboeuf, France) permet de détecter 28 génotypes : 18 HPV-HR (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), 7 HPV-BR (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) et 3 types additionnels (69, 71, 74) (Figure 27 et Annexe 2). Cette trousse commerciale, qui utilise des amorces SPF, permet de faire le génotypage d'HPV sur tous types de prélèvements (même des échantillons fixés et inclus en paraffine). C'est une technique spécifique et sensible (Kleter et al. 1999).

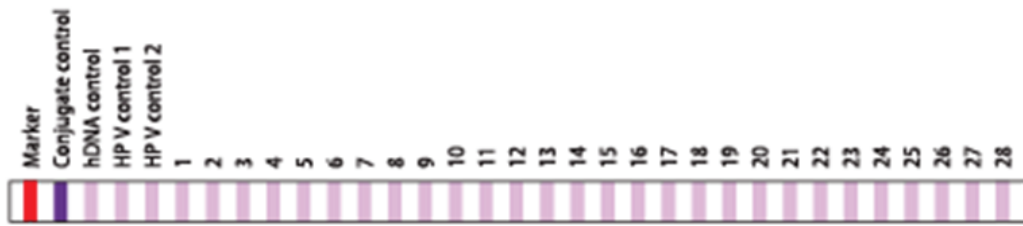


Figure 27: Localisation des sondes spécifiques d'HPV sur une bandelette d'INNO-LiPA.

2.2.6. PCR quantitative en temps réel (qPCR pour quantitative PCR)

Cette technique cible spécifiquement des portions des gènes viraux E6, E7 et parfois L1. Elle repose sur le suivi, en temps réel, cycle par cycle de la réaction d'amplification. Elle est basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques (sondes d'hydrolyse TaqMan) ou non (SyBR Green).

A partir de la cinétique d'amplification est déterminé le Cq (pour *Cycle of quantification*) qui désigne le nombre de cycles d'amplification à partir duquel la fluorescence émise est significativement plus élevée que celle du bruit de fond, le Cq est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible initialement présent dans un échantillon (Figure 28).

Une technique appelée qPCR duplex HPV16/18 récemment publiée par l'équipe de Besançon avait pour but la détection et la quantification des HPV16 et 18 dans la même réaction. Ces deux PCR en duplex permettent des économies de temps, d'échantillons et aussi de réactifs (Jacquin et al. 2013).

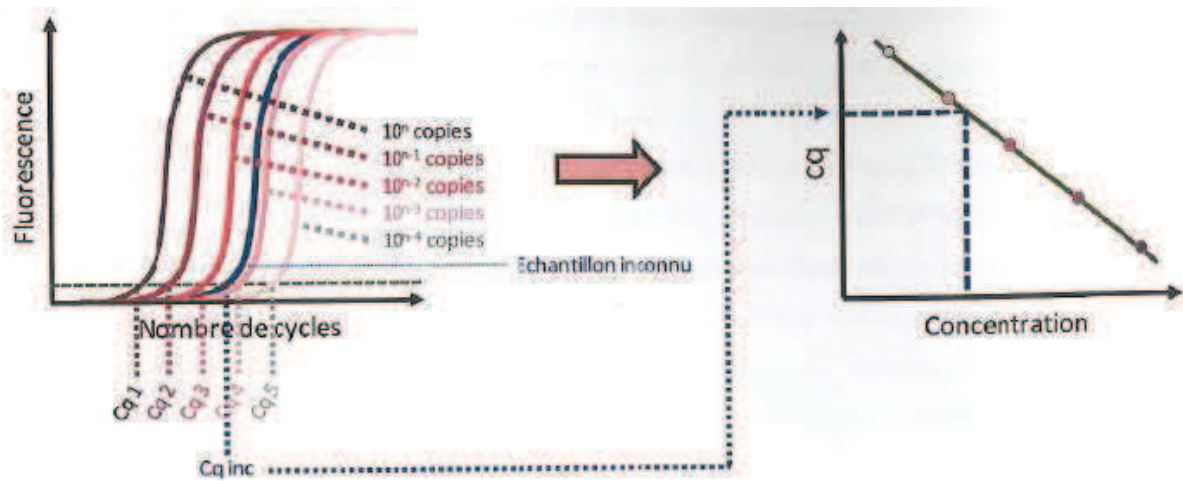


Figure 28: Principe de la quantification absolue par PCR en temps réel.

Mesure de la charge virale

La quantification absolue du nombre de copies d'ADN cible initialement présent dans un échantillon est basée sur l'élaboration d'une gamme d'étalonnage réalisée à partir de dilutions en série d'une solution de concentration en ADN cible connue (ex : solution de plasmide contenant tout ou partie du génome viral).

De par sa sensibilité et sa répétabilité élevées (Gravitt et al. 2003 ; Fontaine et al. 2005), la PCR en temps réel permet la mesure de la charge virale à partir de différents prélèvements: lignées cellulaires, biopsies fixées et incluses en paraffine, résidus de frottis liquide ou de milieu de transport (STM) QIAGEN.

La quantification absolue d'un gène cellulaire tel que celui de l'albumine, de la β -globine, de la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) en parallèle permet la normalisation de la charge virale alors exprimée en équivalents génomes (eg) viraux par cellule (copies de génomes viraux/copies du gène cellulaire/2).

Intégration des génomes viraux : Ratio E2/E6

L'intégration du génome des HPV dans celui de la cellule hôte est une étape cruciale propre aux HPV-HR. Ce processus peut favoriser l'immortalisation et la transformation cellulaire par deux mécanismes: la surexpression des oncoprotéines virales E6 et E7, suite à l'inactivation de la protéine E2, et la mutagenèse insertionnelle.

Une qPCR ciblant les gènes viraux E6 (amplifiables à partir des épisomes et des génomes intégrés) et E2 (amplifiables à partir des épisomes) permet le calcul du ratio E2/E6 (Yoshinouchi et al. 1999; Lukaszuk et al. 2003).

- Ratio E2/E6 = 1 : présence d'épisomes uniquement
- Ratio E2/E6 =] 0 ; 1 [: coexistence d'épisomes et de génomes intégrés
- Ratio E2/E6 = 0 : présence de génomes intégrés uniquement.

3. Dépistage et prise en charge thérapeutique du cancer invasif du col utérin en France

3.1. Organisation du dépistage en France

En France, le dépistage est individuel, spontané, non organisé. Il est recommandé à partir de 25 ans et jusqu'à 65 ans, par un FCU tous les 3 ans après deux frottis normaux réalisés à 1 an d'intervalle (chez les femmes asymptomatiques ayant une activité sexuelle) (HAS 2010).

Chaque année, environ 6 millions de frottis sont réalisés en France. Le taux de couverture entre 1998 et 2000 était de 60 % chez les femmes de 20 à 49 ans, et 48 % chez les femmes de 50-59 ans. Le

rythme de dépistage varie d'une population à l'autre et une proportion non négligeable de la population féminine n'effectue pas de frottis [femmes en situation de précarité (Rousseau et al. 2002), ou immigrées ou ménopausées (Abenhaim 2003)]. Par ailleurs, de fortes disparités régionales et socio-économiques en terme de consommation de frottis sont également constatées (Rousseau et al. 2002).

Au-delà de 65 ans, le dépistage n'est plus préconisé si la femme a bien suivi les recommandations. Dans le cas contraire, toute femme qui n'aurait pas été dépistée et qui consulte un gynécologue pour des troubles divers et variés (saignements, douleurs pelviennes...), il nous paraît souhaitable qu'elle puisse bénéficier d'un FCU associé ou non à un test HPV.

3.2. Conduite diagnostique à tenir devant un frottis anormal

Ces données sont extraites des recommandations de l'ANAES (2002)

3.2.1. Frottis évocateur d'un ASC-US

La prise en charge dans ce cas de frottis est différente selon le type : ASC-US et ASC-H (Figure 29).

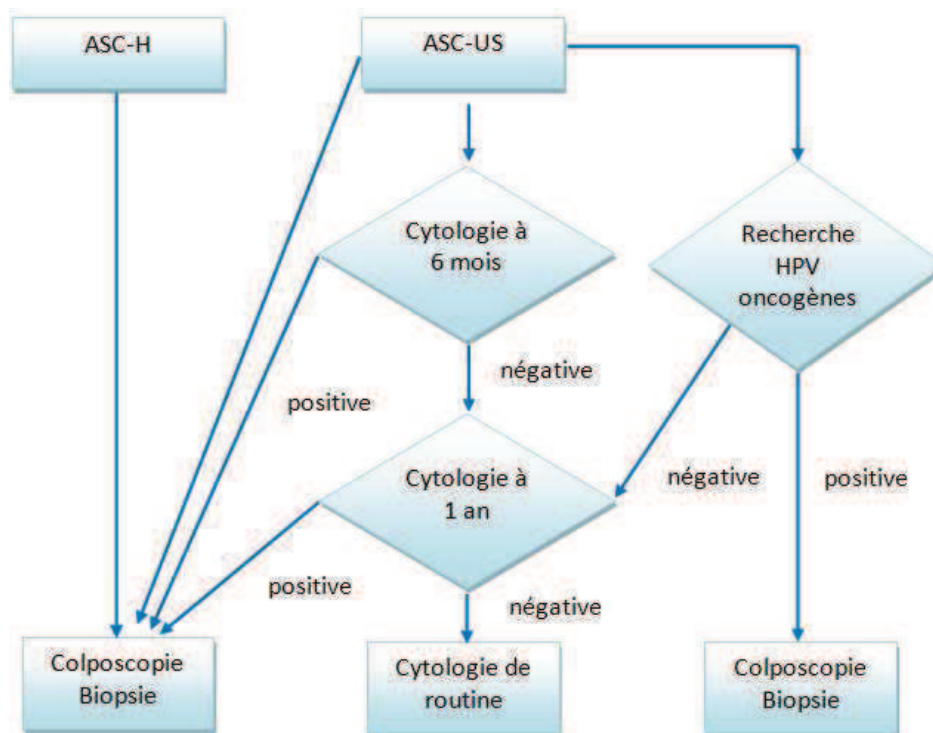


Figure 29 : Conduite diagnostique en cas de frottis avec atypies des cellules malpighiennes (ASC) (ANAES 2002)

En cas d'ASC-H (ne permet pas d'éliminer une lésion de haut grade), une colposcopie d'emblée avec biopsie est recommandée.

En cas d'ASC-US, trois possibilités sont proposées :

- soit une colposcopie d'emblée avec biopsie ;
- soit un frottis de contrôle pratiqué 6 mois plus tard : si au cours de ce frottis de contrôle les anomalies cytologiques ont régressé, une surveillance régulière est justifiée, nécessitant 2 frottis normaux à des intervalles de 12 mois, en raison du risque d'apparition secondaire d'un cancer. Si au cours de cette surveillance des anomalies cytologiques réapparaissent, une colposcopie est impérative, quels que soient leurs sévérités et leurs délais d'apparition;
- soit une recherche des HPV oncogènes : si elle est négative, un frottis de contrôle est pratiqué 6 mois plus tard, et en fonction des résultats de ce frottis, la patiente est adressée soit à la colposcopie, soit à la cytologie de routine.

3.2.2. Frottis évocateur d'une lésion de bas grade

La recherche des HPV oncogènes n'est pas recommandée en première intention dans la prise en charge des lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade car cette recherche est positive dans plus de 80 % de ces cas.

Il est recommandé devant un frottis LSIL de proposer à la patiente :

- soit 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 la cytologie de routine.
 - si la colposcopie n'est pas satisfaisante, une nouvelle colposcopie est réalisée après traitement (traitement oestrogénique local ou curage du col ou conisation à visée diagnostique).
- soit un frottis cervico-utérin de contrôle pratiqué 6 mois plus tard
 - si au cours de ce frottis de contrôle les anomalies cytologiques ont persisté, la patiente est référée à la colposcopie.
 - si au cours de ce frottis de contrôle pratiqué 6 mois plus tard, les anomalies cytologiques ont régressé, une surveillance régulière est justifiée, en raison du risque d'apparition secondaire d'un cancer, exigeant 2 frottis normaux à des intervalles de 12 mois. Si au cours de cette surveillance des anomalies cytologiques réapparaissent, une colposcopie est impérative, quels que soient leur sévérité et leur délai d'apparition (Figure 30).

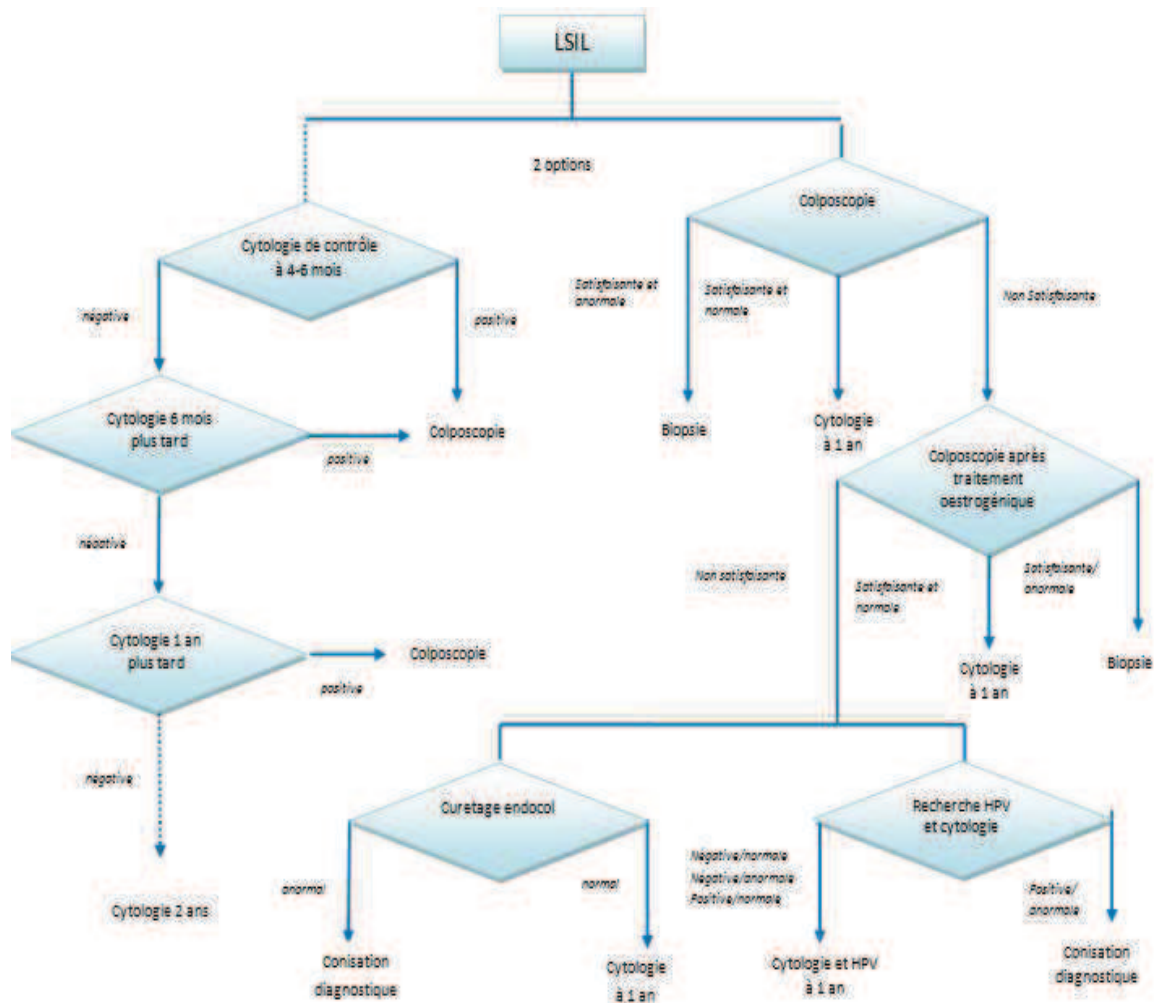


Figure 30 : Conduite diagnostique en cas de frottis avec lésion malpighienne intraépithéliale de bas grade (LSIL) (ANAES 2002)

3.2.3. Frottis évocateur d'une lésion de haut grade

Après un frottis cervico-utérin évoquant une lésion de haut grade, il est recommandé de faire une colposcopie d'emblée.

3.2.4. Frottis évocateur 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. Nous ne détaillerons pas ce chapitre dans cette thèse.

3.2.5. Frottis anormal dans certaines situations

a. Chez la femme enceinte

Dans le cas des anomalies cytologiques de types CIN, confirmées par une biopsie, un examen colposcopique est conseillé à 6-7 mois de grossesse. Une nouvelle biopsie dirigée est justifiée en cas d'aggravation du résultat cytologique ou de l'aspect colposcopique.

Dans le cas d'un frottis évocateur d'une lésion de haut grade ou d'un cancer, la conisation est recommandée.

b. Chez la femme ménopausée

La découverte d'un frottis anormal après la ménopause nécessite un examen colposcopique après une préparation oestrogénique de 7 à 10 jours au minimum. Si la colposcopie n'est pas satisfaisante du fait d'une sténose de l'orifice cervical ou d'une zone de jonction endocervicale non visible, une conisation est recommandée.

c. Chez une femme séropositive pour le VIH

Dans le cas de frottis normal, il est recommandé de suivre la patiente au-moins une fois par an (CDC 1998 ; Torrisi et al. 2000). Dans le cas d'anomalies cytologiques, il est recommandé de faire une colposcopie

La recherche d'HPV serait intéressante pour le dépistage des lésions de haut grade chez les femmes séropositives, chez lesquelles la valeur de la cytologie semble compromise du fait du taux élevé des faux négatifs (atypies cellulaires, inflammation).

4. Dépistage et prise en charge thérapeutique du cancer invasif du col utérin au Maroc

Au Maroc, le dépistage du cancer du col de l'utérus concerne toute femme âgée de 30 à 49 ans révolus. Sont exclues les patientes déjà traitées pour cancer du col, les femmes enceintes à partir de la 8^{ème} semaine d'aménorrhée et les femmes durant la période du post partum jusqu'à la 6^{ème} semaine après l'accouchement. Le dépistage du cancer du col utérin au Maroc est basé sur la pratique régulière et systématique de l'Inspection Visuelle du col utérin avec l'Acide acétique (IVA). Le test s'effectue au niveau des centres de santé urbains et communaux par un professionnel de santé dûment formé. La prise en charge de la patiente sera fonction des aspects retrouvés (Figure 31).

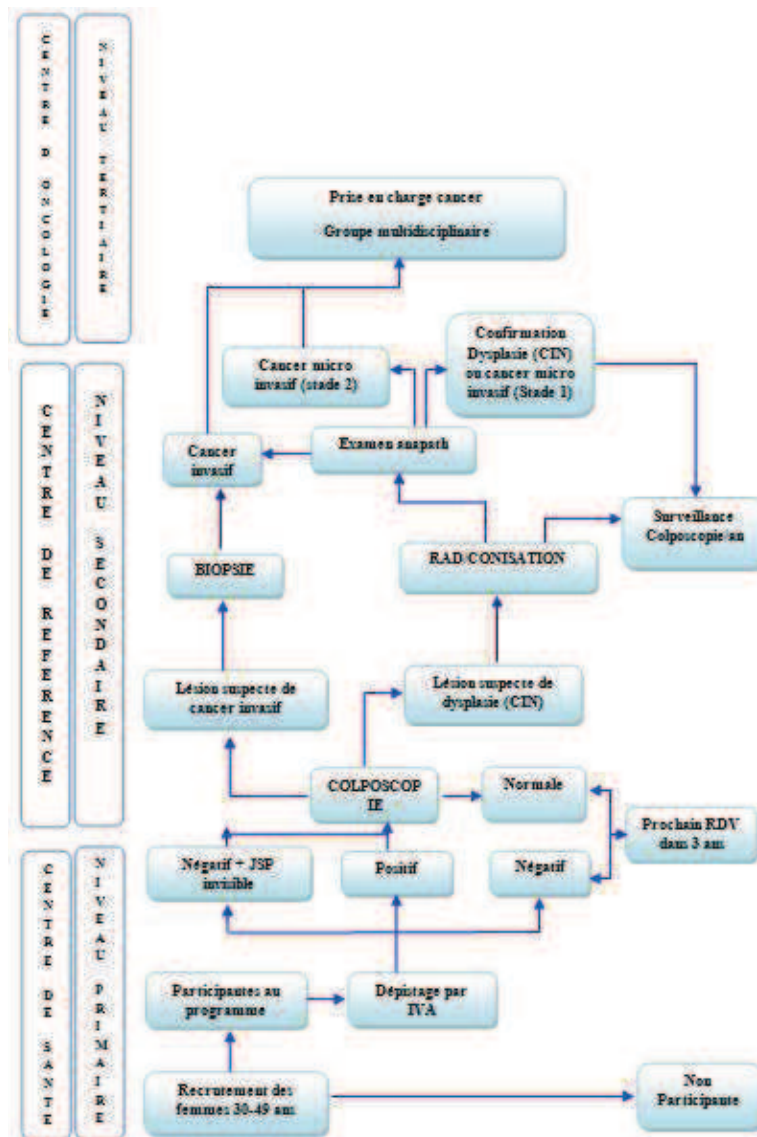


Figure 31 : Algorithme de la détection précoce du cancer du col utérin au Maroc (ALSC 2011)

- Si le résultat d'IVA est négatif, le professionnel de santé est tenu d'annoncer le résultat à la participante en la rassurant sur le caractère normal du test et en lui recommandant de refaire un nouvel examen après une période de 3 ans.
- Si le résultat d'IVA est positif, ou négatif et la Jonction Pavimento-Cylindrique (JPC) non visible, le professionnel de santé est tenu d'annoncer le résultat de l'examen à la participante, de l'orienter systématiquement vers le Centre de référence de santé reproductive afin de bénéficier d'une colposcopie pour un diagnostic plus précis.
 - Si la colposcopie montre un col d'aspect normal : le gynécologue annonce à la participante que l'examen est normal en lui recommandant de revenir au centre de santé après une période de 3 ans.

- Si la colposcopie révèle un aspect de cancer invasif du col utérin, le gynécologue va prélever une biopsie au niveau de la tumeur cervicale et l'envoyer au laboratoire d'anatomopathologie.
 - Si le résultat de l'examen anatomopathologique confirme le diagnostic de cancer invasif la patiente sera référée au centre de traitement pour une prise en charge par un staff spécialisé multidisciplinaire.
 - Si le résultat de l'examen anatomopathologique confirme une lésion intra-épithéliale quel que soit son grade (CIN1, CIN2 ou CIN3), ou un cancer micro invasif, le gynécologue propose à la patiente une Résection à l'Anse Diathermique (RAD).

Pour clore cette première partie bibliographique, il est nécessaire de mentionner que le cancer du col de l'utérus est un cancer viro-induit qui touche beaucoup de femmes dans le monde. Il peut souvent être détecté à un stade précoce et même évité grâce à un dépistage basé sur des frottis réguliers. La prévention de ce cancer repose sur ce dépistage et depuis quelques années sur la vaccination anti-HPV. Mais les pays pauvres ne peuvent bénéficier de ces outils de prévention.

Partie 2 : Travaux personnels

I. Publication n°1

High prevalence of abnormal cervical smears in a hospital cohort of French women beyond the upper age limit screening program

E. Belglaiaa, A. Luquain, D. Guenat, S. Vrecko, D. Riethmuller, S. Valmary-Degano, I. Bedgedjian, S. Chouham, J.L. Prétet, C. Mougin

Manuscrit soumis à *Preventive Medicine* (après révision)

Travail présenté à :

Société de Biologie de Besançon (SBB),

Besançon, France, 12 Décembre 2013

Faut-il poursuivre le dépistage du cancer du col de l'utérus chez les femmes âgées de plus de 65 ans ?

E. Belglaiaa, A. Luquain, A. Morel, E. Jacquin, S. Valmary-Degano, D. Riethmuller, J.L. Prétet, C. Mougin.

30th International Papillomavirus Conference,

Lisbonne, Portugal, 17-21 Septembre 2015

High prevalence of abnormal cervical smears in underscreened French women beyond the upper age limit screening program

E. Belglaiaa, A. Luquain, D. Guenat, D. Riethmuller, S. Valmary-Degano, I. Bedgedjian, S. Chouham, J.L. Prétet, C. Mougin.

1. Objectifs

L'objectif de ce travail était d'estimer la fréquence des frottis pathologiques et la prévalence des HPV-HR notamment HPV16, 18 et 45 chez une cohorte hospitalière de femmes françaises âgées de plus de 65 ans, qui n'ont pas bénéficié de dépistage du cancer du col de l'utérus ou n'ont pas suivi les recommandations du dépistage au cours de leur vie. Cette étude rétrospective fait partie du débat actuel concernant l'intérêt de continuer le dépistage du cancer du col utérin après 65 ans en tenant compte des problématiques de santé publique.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Echantillons cliniques

Il s'agit d'une étude portant sur une cohorte hospitalière de 796 femmes françaises âgées de plus de 65 ans (intervalle d'âge 66-99 ans, âge moyen de 70 ans), issues de la région de Franche-Comté, France. Les prélèvements pour cytologie et test HPV ont été réalisés au cours d'une consultation médicale au département de Gynécologie et Obstétrique du CHRU de Besançon, France, centre de référence régional pour la colposcopie et le test HPV, entre Janvier 2002 et Décembre 2012. Les patientes ont été référées pour des symptômes gynécologiques (lésions vaginales, douleurs abdominales et pelviennes...) ou pour un suivi de maladies chroniques (post-greffe, maladies auto-immunes). Cette cohorte est composée de 693 femmes (87%) pour lesquelles nous n'avons aucune donnée de dépistage et 103 femmes (13%) ayant eu un FCU au cours de leur vie.

2.2. Diagnostic cytologique

Les frottis ont été classés selon la classification Bethesda en : Normal (NILM), lésions malpighiennes (ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, SCC), et lésions glandulaires (AGC, ADC).

2.3. Test Hybrid Capture 2 (hc2)

La détection d'ADN d'HPV a été réalisée par la trousse commerciale hc2 (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) qui permet de détecter 13 types d'HPV-HR.

2.4. Extraction de l'ADN

Sur les échantillons hc2 positifs, nous avons effectué une extraction d'ADN par la trousse QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) à partir de 320 µL de solution dénaturée et reprise dans 80 µL de solution P3 (5 M acide acétique, 3 M d'acétate de potassium). Brièvement, les suspensions cellulaires ont été incubées une nuit à 56°C en présence de 400 µL de tampon de lyse (AL buffer, QIAGEN) et de 40 µL de protéinase K (QIAGEN). Les lysats cellulaires ont été purifiés à l'aide des colonnes QIAamp Mini Spin (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur et l'ADN a été élué dans 80 µL de tampon d'élution (QIAGEN).

2.5. PCR en temps réel (qPCR)

Des qPCR duplex HPV16/18 ciblant simultanément le gène E6 d'HPV16 et HPV18 ont été réalisées (Jacquin et al. 2013). Ensuite, nous avons réalisé une qPCR HPV45 ; le mélange réactionnel de 25 µL contenait: Taqman® Gene Expression Master Mix 1X (Applied Biosystems), 300 nM d'amorces sens E6

HPV16 et E6 HPV18, 300 nM d'amorces anti-sens E6 HPV16 et E6 HPV18, 250 nM de sonde Taqman E6 HPV16 et E6 HPV18 (Eurogentec) et 4 µL d'extrait d'ADN.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur AB7500 (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France) selon le programme suivant : 50°C-2min (x1), 95°C-10min (x1), 95°C-15sec, 60°C-1min (x40).

Parallèlement à ces deux qPCR, une qPCR ciblant le gène cellulaire codant le gène d'albumine (présent en 2 copies dans chaque cellule diploïde eucaryote) a été réalisée, d'une part pour confirmer la qualité de l'extrait analysé, et d'autre part pour calculer les charges virales.

La formule de calcul de la charge virale est :

$$\text{Charge virale (CV)} = \frac{\text{Nombre de copies d'E6 HPV16}}{\text{Nombre de copies d'albumine} / 2}$$

Les amorces et sondes en qPCR utilisées dans la détection et la quantification des HPV16/18/45 sont représentées dans le tableau 9.

Tableau 9: Séquences des amorces et sondes utilisées en qPCR

Cible	Amorces et sonde	Séquence
E6 HPV 16	Amorce sens	5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3'
	Amorce anti-sens	5'-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-3'
	Sonde	5'-FAM-CAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTT-BHQ1-3'
E6 HPV 18	Amorce sens	5'-TGTCTAAGTTTTCTGCTGGATTCA-3'
	Amorce anti-sens	5'-TATGGAGACACATTGGAAAACTAACTAA-3'
	Sonde	5'-VIC-ACCGCAGGCACCTT-MGB-3'
E6 HPV 45	Amorce sens	5'-GCCTGCGGTGCCAGAA-3'
	Amorce anti-sens	5'-CTATGCTGTGAAATCTTCGTTTGTC-3'
	Sonde	5'-FAM-ACAGATGCAAAAAGACGACCCAAGTTACC-BHQ1-3'
Albumine	Amorce sens	5'-GCTGTCATCTCTTGT-GGGCTGT-3'
	Amorce anti-sens	5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'
	Sonde	5'-FAM-GGACAGTACGGGTGTGTTTAGAGAGG-BHQ1-3'

3. Résultats

3.1. Diagnostic cytologique en fonction des groupes d'âge

La répartition des résultats cytologiques en fonction des groupes d'âge est représentée dans la figure 1, publication 1. Les anomalies cytologiques étaient fréquentes (31,4% des cas). Les cytologies en faveur des cancers concernaient 2,9% des échantillons dont 78,2% étaient des SCC et 21,8% des ADC. Tous les cancers et environ 90% des HSIL ont été trouvés chez des femmes non dépistées. Il est à noter que les lésions bénignes (normales ou ≤LSIL) se retrouvaient fréquemment chez les femmes

âgées entre 66 et 75 ans tandis que les lésions sévères ($\geq$ HSIL) étaient préférentiellement détectées chez les femmes âgées de plus de 76 ans

3.2. Prévalence d'HPV-HR

La distribution en fonction de l'âge et de la cytologie des HPV-HR et notamment les HPV16, 18 et 45 est représentée respectivement dans les tableaux 2 et 3, publication 1. L'ADN d'HPV-HR a été détecté dans 22,7% des cas. Les qPCR HPV16/18/45 (Figures 32,33 et 34) ont montré que l'HPV16 était le génotype le plus prévalent (23,8%) suivi de l'HPV45 (7,7%) puis de l'HPV18 (3,9%). Par ailleurs, 2 cas ont été infectés par les 3 génotypes et un seul cas par l'HPV16 et 45. Il est intéressant de noter que la prévalence d'HPV-HR augmentait avec la sévérité des lésions de 25% dans les ASC-H, 28,9% dans les ASC-US, 69,5% dans les LSIL, 90,6% dans les HSIL à 94,4% dans les SCC. La prévalence d'HPV16 augmentait avec la sévérité de la lésion de 3,1% dans les ASC-US à 50% dans les cancers.

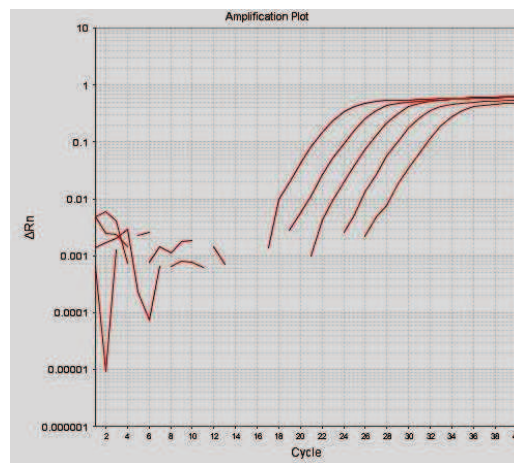


Figure 32: Courbes d'amplification de la gamme albumine

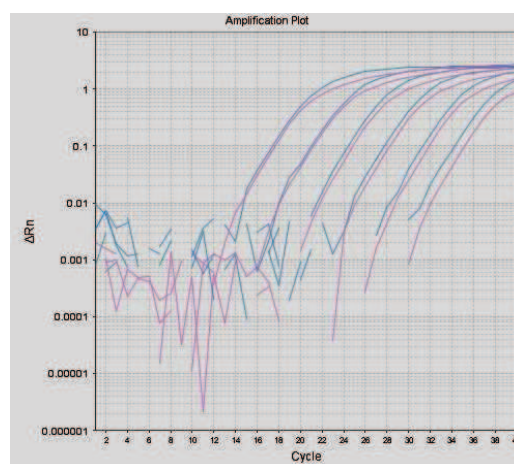


Figure 33: Courbes d'amplification de la gamme duplex 16/18

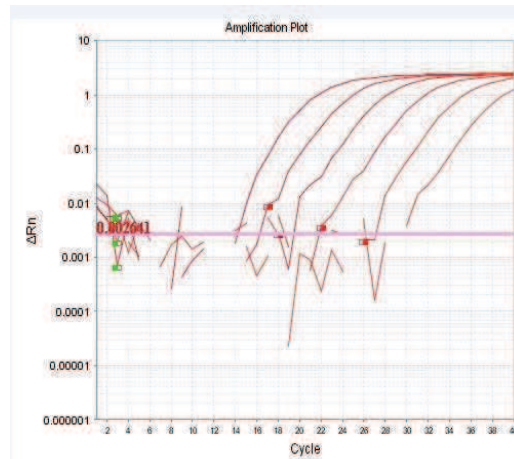


Figure 34 : Courbes d'amplification de la gamme d'HPV45

3.3. Suivi cytologique des patientes

Les données de suivi cytologique des patientes à frottis normaux sont illustrées dans la figure 1, publication 1.

Parmi les 546 patientes ayant un suivi pour un frottis normal, 494 femmes (90,5%) avaient un résultat négatif par test hc2. Parmi elles, seulement 65 (13,2%) ont été suivies au cours d'une période moyenne de 31 mois. Il est à signaler que 4 femmes avaient des lésions de bas grade associées à une infection incidente par des HPV-HR, mais aucune d'entre elles n'a développé de lésion de haut grade. Cinquante deux femmes (9,5%) avaient un résultat positif par test hc2. Parmi elles, 31 (59,6%) ont été suivies sur une période de 25 mois en moyenne. Il est intéressant de noter que la persistance de l'infection aux HPV-HR a été observée chez 21 femmes (67,7%) dont 13 (61,9%) avaient toujours un frottis normal. Six (28,6%) ont développé une LSIL et 2 (9,5%) ont développé une HSIL confirmée histologiquement comme CIN3 et HPV16 positive.

4. Conclusion

Les résultats de notre étude sont en faveur d'un dépistage du cancer du col de l'utérus après 65 ans chez une population recrutée à l'hôpital en particulier, symptomatique et qui n'a pas été ou peu dépistée selon les recommandations françaises. Compte tenu du nombre important des anomalies du col utérin et la forte prévalence d'HPV-HR, on pourrait tout d'abord sensibiliser davantage les médecins à l'importance du dépistage régulier avant 65 ans, et en particulier les médecins généralistes qui ont un accès à une plus large partie de la population. Nous recommandons ensuite la prise en considération des préférences et des caractéristiques individuelles des patientes âgées, une initiative qui pourrait être utile par rapport aux lignes directrices d'âge, pour guider le dépistage du cancer du col de l'utérus après 65 ans.

5. Travaux complémentaires

Charge virale du génome d'HPV16 et HPV18 et sévérité des lésions du col de l'utérus

La figure 35 représente la médiane de la charge virale des HPV16 et HPV18 en fonction de la sévérité des lésions du col de l'utérus dans 60 cas testés. Une augmentation graduelle de charge virale médiane d'HPV16 avec la sévérité des lésions a été observée. La charge virale d'HPV18 a été élevée dans les LSIL, comparée à celle retrouvée dans les frottis normaux.

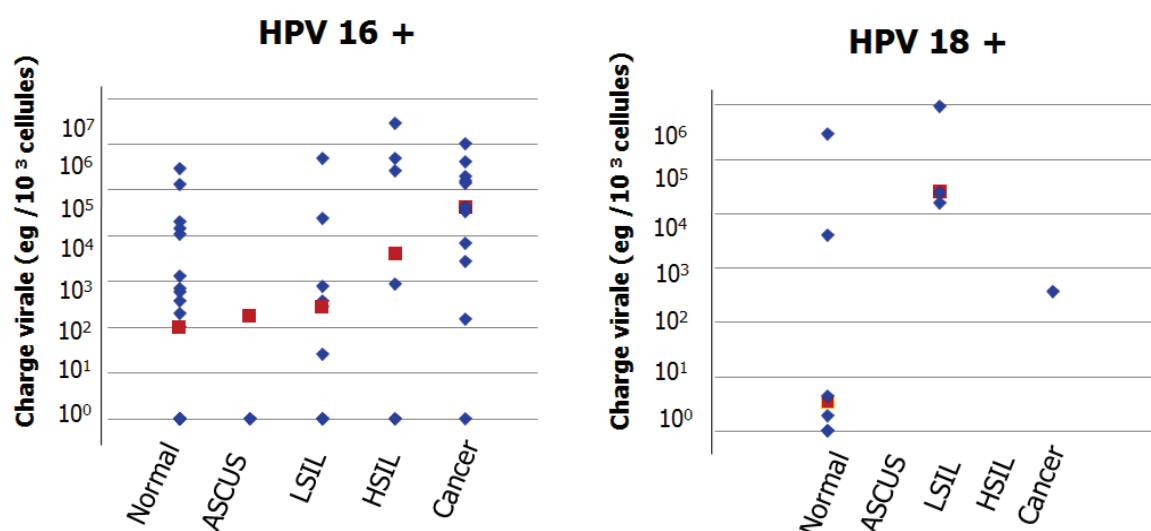


Figure 35: Charge virale des HPV16 et HPV18 dans les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus chez les femmes âgées de plus de 65 ans.

Figure 35 : Charge virale des HPV16 et HPV18 dans les lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus chez les femmes âgées de plus de 65 ans



High prevalence of abnormal cervical smears in a hospital cohort of French women beyond the upper age limit screening program



Alexandra Luquain^{a,1}, Essaada Belglaiaa^{b,c,d,1}, David Guenat^{a,c}, Sindy Vrecko^c, Didier Riethmuller^{a,c,d}, Séverine Valmary-Degano^{a,c,d}, Isabelle Bedgedjian^a, Said Chouham^b, Jean-Luc Prétet^{a,c,d}, Christiane Mougín^{a,c,d,*}

^a Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, F-25000, France

^b Laboratoire de Biologie Cellulaire et Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc

^c Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

^d EA 3181, LabEx LipSTIC ANR-11-LABX-0021, FED4234, CIC-1431 F-25000 Besançon, France

ARTICLE INFO

Available online 5 September 2015

Keywords:

Pap smears

hrHPV

HPV 16

Cervical cancer

Women aged over 65

ABSTRACT

Objective. To determine the prevalence of cytological abnormalities and high risk Human PapillomaVirus (hrHPV) in cervical smears from French women aged over 65 years who attended the referent Gynecology Clinic of the Besançon University Hospital.

Methods. Between 2002 and 2012, 796 French women aged 66–99 years were cotested for cytology and hrHPV by Hybrid Capture 2 (hc2). hc2-positive cases were subjected to real time PCR for specific HPV 16/18/45 genotyping. Women with normal Pap smears and positive for hrHPV were followed-up every 12 months.

Results. Cytological abnormalities were detected in more than 30% of women and cervical cancers (CC) in 2.9% of women. Benign lesions were more frequent in women aged 66–75 years while (pre)-malignant lesions were preferentially found in women over 76. The prevalence of hrHPV was 22.7%. HPV 16 was the most frequent (23.8%), followed by HPV 45 (7.7%) and HPV 18 (3.9%). The rate of hrHPV increased with the lesion severity and HPV 16 was identified in 50% of CC. Among the followed-up women, those who developed CIN3 were HPV16 positive at study entry.

Conclusion. The study provides important estimates of the prevalence of cervical abnormalities and hrHPV positivity in a French hospital based-population over 65. Findings suggest to consider this high risk population in regards to cervical cancer.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cervical cancer (CC) is a public health problem in women worldwide, affecting 530,000 women and responsible for 275,000 deaths each year. Wide variations exist between high and low-burden countries and incidence rates range from <3 to >50 per 100,000 (Arbyn et al., 2011; Ferlay et al., 2010). In USA, most cases of CC occur in women younger than 50 years of age, but more than 15% are found in

women over 65 (American Cancer Society, 2014). Knowledge about pathogenesis has shown that nearly 100% of CC are caused by a persistent high risk Human PapillomaVirus (hrHPV) infection (Schiffman et al., 1993; Walboomers et al., 1999; Wallin et al., 1999). HPV 16 is the most frequently detected genotype worldwide followed, in general, by HPV 18 and HPV 45 (Guardado-Estrada et al., 2014; Monsonego et al., 2015; Munoz et al., 2003; Pretet et al., 2008).

At present, the best way to reduce the number of CC is to implement screening programs to detect precancerous lesions. The Papanicolaou (Pap) test, which was introduced in the 1940s, led to a reduction of up to 60% in the incidence of invasive squamous cervical cancer and mortality due to the disease (La Vecchia et al., 1984; Quinn et al., 1999). In France, CC incidence decreased from an estimated 5100 in 1980 to 3000 cases in 2005 and mortality declined from 2200 to 1000 cases over the same period (Belot et al., 2008). Because of limitations relating to the sensitivity of cervical cytology (Spence et al., 2007), it has recently been recommended to introduce HPV test in clinical practice, including in primary screening (Arbyn et al., 2012; Saslow et al., 2012). Studies in the USA, Canada and Europe indicate that the high risk HPV test may be more

* Corresponding author at: Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CHRU J Minjoz, Bld A Fleming, 25000 Besançon, France. Fax: +33 381669370.

E-mail addresses: alexandra.luquain@orange.fr (A. Luquain), essaadabelglaiaa@gmail.com (E. Belglaiaa), david.guenat@univ-fcomte.fr (D. Guenat), sindy.vrecko@edu.univ-fcomte.fr (S. Vrecko), didier.riethmuller@univ-fcomte.fr (D. Riethmuller), severine.valmary@univ-fcomte.fr (S. Valmary-Degano), ibedgedjian@chu-besancon.fr (I. Bedgedjian), s.chouham@uiz.ac.ma (S. Chouham), jean_luc.pretet@univ-fcomte.fr (J.-L. Prétet), christiane.mougin@univ-fcomte.fr (C. Mougín).

¹ These two authors have contributed equally to the work and must be considered as two first authors.

effective than cytology alone in detecting CIN3 or progressively worse histological findings (Katki et al., 2011; Leinonen et al., 2012; Mayrand et al., 2007; Ogilvie et al., 2012; Ronco et al., 2014). In addition, HPV16, 18 and 45 genotyping would be advantageous to manage hrHPV positive women (Rijkaart et al., 2012; Saraiya et al., 2014; Wright et al., 2015).

The French guidelines for CC screening recommend a Pap smear every three years after two annual consecutive normal smears for women aged 25 to 65 years (Haute Autorité de Santé, 2013). American guidelines also recommend cessation of CC screening at age 65 for adequately screened women with no history of CIN2+ within the last 20 years (Saslow et al., 2012).

In Europe, the number of elderly patients being diagnosed with CC is increasing and the age of screening exit may be raised up to 70 years in some countries (Elfstrom et al., 2015). In 2014, a review of the literature concluded that cervical cancer screening is beneficial for women aged over 60 in order to prevent the occurrence of, and mortality from CC (Elit, 2014).

In this hospital-based retrospective cohort investigation we estimated the rate of pathological smears and the prevalence of hrHPV including HPV 16, 18 and 45 by cotesting in a population of French women aged over 65 who attended the referent Gynecology Clinic of the Besançon University Hospital. This study contributes to the current debate about the value of CC screening after 65 years, taking into account personal characteristics of patients and public health issues.

Patients and methods

Study population and sample collection

Data on cytology and HPV testing were obtained from 796 women aged over 65 (age range 66–99 years, median age 70 years) who attended the Gynecology Clinic of the Besançon University Hospital between January 2002 and December 2012. Patients had been referred to a referent gynecologist for symptoms suggestive of gynecological disorders (i.e. menopausal vaginal symptoms, vaginal itching, abdominal and pelvic pain) or for follow-up of chronic diseases (i.e. grafted patients, autoimmune disorders).

The cohort consisted of 693 women (87%) with no history of cervical cancer screening in our gynecology/pathology medical records and 103 women (13%) having had one Pap smear. As a whole we considered that women were not adequately screened.

Women underwent a pelvic examination and two cervical samples were obtained and used for conventional cytology and HPV testing as we previously described (Dalstein et al., 2004). When necessary, a short course (3–4 weeks) of intravaginal estrogen cream was given. Women with abnormal cytology were clinically managed according to the French guidelines (Anaes, 2002). Women with normal cytology were followed-up by co-testing in line with usual practice in our reference Clinic (Dalstein et al., 2004; Riethmuller et al., 2013).

Cytology data

Cytology results were reported based on the Bethesda System as Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM) or epithelial cell abnormalities, while abnormalities were classified as Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASC-US), Atypical Squamous Cells – cannot exclude High Grade Squamous Intraepithelial Lesions (ASC-H), Atypical Glandular Cells (AGC), Low grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSIL), High grade SIL (HSIL), and Squamous Cell Carcinoma (SCC) and ADenoCarcinoma (ADC), without knowledge of HPV status.

HPV DNA testing

HPV DNA testing was performed with the *digene*® hc2 High-Risk HPV DNA Test® (hc2) (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) using the

specific HPV RNA probe cocktail for hrHPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68. Presence or absence of HPV DNA in the specimen was defined according to the strength in relative light units (RLU) compared to 1 pg/mL HPV16 DNA-positive control. The sample was considered positive when the ratio of RLU/CO was ≥ 1 .

Samples were stored into a biobank approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes), and for which a declaration of collection and storage of human samples for research use has been sent to the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) (declaration number DC-2014-2086).

DNA extraction from cervical exfoliated cells

DNA was extracted from hc2 positive cases with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Three hundred and twenty microliters of denatured solution were neutralized with 80 μ L of 5 M acetic acid and 3 M potassium acetate. Then, 400 μ L of AL buffer (Qiagen) and 40 μ L proteinase K (Qiagen) were added and the mix was digested overnight at 56 °C. All lysates were processed according to the manufacturer's recommendations; DNA was eluted in 80 μ L of elution buffer.

Real-time PCR

Detection of HPV16, HPV18 and HPV45 DNA as well as albumin gene (*ALB*) DNA copies were performed by real-time PCR with an AB7500 thermocycler (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France) using TaqMan technology. Primers and hydrolysis probes were designed to target a polymorphic region of the E6 gene and *ALB* (Supplementary Table).

A real-time duplex PCR assay was carried out for simultaneous detection of HPV16 and HPV18 DNA as detailed previously (Jacquin et al., 2013).

Detection of HPV45 DNA was conducted in a final volume of 25 μ L containing the 1X Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer (Eurogentec, Seraing, Belgium), 250 nM of probe (Eurogentec) and 4 μ L of DNA sample. The thermal cycling program was 2 min at 50 °C followed by 10 min at 95 °C and then 40 cycles of amplification (95 °C–15 s, 60 °C–1 min).

To discriminate between failed amplification due to technical error and an absence of HPV16 and/or HPV18 and/or HPV45, each cervical sample was also subjected to real-time PCR for the detection of human *ALB* DNA copies as previously described (Laurendeau et al., 1999).

Statistical analysis

Prevalence of NILM and abnormal cytologies, as well as hrHPV and HPV 16/18/45, was calculated with the corresponding 95% confidence intervals (CI), stratified by age category. Prevalence of hrHPV and specific genotypes according to cytology with the associated 95% CI was also calculated. The chi-square test or Fisher's exact test were used to compare trends in HPV frequency by 5-year intervals, and trends in cytology frequency according to age groups. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using the R statistical software version 3.2.0 on the website BiostaTGV (The R Foundation, Vienna, Austria).

Results

Cytology results according to age groups

Age of the 796 women was categorized into 5-year age groups (66–70, 71–75, 76–80 and >81). Among the Pap smears, 546 (68.6%, 95% CI 65.4–71.8) were NILM and 250 (31.4%, 95% CI 28.2–34.6) were abnormal. One hundred and twenty-six samples (15.8%, 95% CI 13.3–

18.3) were diagnosed ASC-US, 2 (0.3%, 95% CI 0–0.7) were in favor of AGC, 8 (1% 95% CI 0.3–1.7) of ASC-H, 59 (7.4%, 95% CI 5.6–9.2) were LSIL, 32 (4%, 95% CI 2.6–5.4) were HSIL, and 23 (2.9%, 95% CI 1.7–4.1) were CC (Table 1). There were half as many cases of ASC-US in women aged over 81 (6.7%, 95% CI 1.5–11.9) compared to the other age groups (16.2–17.4%). LSIL were most prevalent (10.4%, 95% CI 7.5–13.3) in the 66–70 age group, while HSIL were found most frequently (6.6%, 95% CI 1.5–11.7) in 76–80 year old women. During the period 2002 to 2012, 23 women were cytologically diagnosed with CC with a prevalence reaching 5.6% (95% CI 0.8–10.4) in very elderly patients. Eighteen of the 23 CC smears (78.2%, 95% CI 61.3–95.1) were SCC and 5 (21.8%, 95% CI 4.9–38.7) were ADC. Taken together, most patients diagnosed with NILM or benign lesions ($\leq$ LSIL) were aged between 66 and 75 years, while patients with severe lesions ($\geq$ HSIL) were aged 76 and over ($p = 0.04$).

hrHPV prevalence according to age groups

The prevalence of hrHPV and specific HPV16/18/45 genotypes according to age is presented in Table 2. The overall prevalence of positive hrHPV was 22.7% (95% CI 19.8–25.6) (181/796). Among the 181 samples positive for hrHPV, 5 samples were inadequate for PCR due to insufficient material. The pooled frequency of HPV 16, HPV 18 and HPV 45 infections was 35.4% (95% CI 28.4–42.4) and HPV 16 was the most prevalent genotype (23.8%, 95% CI 17.6–30) followed by HPV 45 (7.7%, 95% CI 3.8–11.6) and HPV 18 (3.9%, 95% CI 1.1–6.7). Three women showed co-infections with HPV 16, 18, and/or 45 (two cases were infected by the 3 genotypes and one case with HPV 16 and HPV 45). The rate of hrHPV and HPV 16/18/45 did not differ significantly between age groups, but there was a trend towards a higher rate of HPV16 in women aged 76–80 years (42.1%, 95% CI 19.9–64.3).

hrHPV prevalence according to cytology

The distribution of hrHPV types according to cytology is presented in Table 3. Among patients with normal smears, 9.5% [(95% CI 7–12), 52/546] harbored hrHPV. The rate of hrHPV positivity increased with the severity of cytological abnormalities from 25% (95% CI 0–55) in ASC-H, and 28.9% (95% CI 21.1–36.8) in ASC-US to 69.5% (95% CI 57.8–81.3) in LSIL, 90.6% (95% CI 80.5–100) in HSIL and 94.4% (95% CI 83.8–100) in SCC ($p < 0.001$). Likewise, the prevalence of the 3 specific hrHPV genotypes tested increased from low to high grade lesions. The rate of HPV16 increased statistically with the lesion severity from 3.1% (95% CI 0.1–6.1) in the ASC-US group to 12.5% in ASC-H (95% CI 0–35.4), 15.2% (95% CI 6–24.4) in LSIL, 31.3% (95% CI 15.2–47.4) in HSIL, to reach more than 50% (95% CI 34.9–75.5) in smears showing CC ($p < 0.001$).

Follow-up

Fig. 1 summarizes the follow-up (FU) data over a mean period of 29 months (95% CI 24.9–33) in women with NILM cytology at baseline.

Table 2

Prevalence of hrHPV, HPV 16, HPV 18, HPV 45 according to age group in 796 French elderly women tested between 2002 and 2012.

Age group years	Global cohort	66–70	71–75	76–80	81 and +
n	796	424	192	91	89
hrHPV positive n (%) [*]	181 (22.7)	106 (25)	39 (20.3)	19 (20.9)	17 (19.1)
HPV 16 n (%) [#]	43 (23.8)	24 (22.6)	6 (15.4)	8 (42.1)	5 (29.4)
HPV 18 n (%) [#]	7 (3.9)	5 (4.7)	2 (5.1)	0	0
HPV 45 n (%) [#]	14 (7.7)	8 (7.6)	3 (7.7)	1 (5.3)	2 (11.8)
Other HPV n (%) [#]	117 (64.6)	69 (65.1)	28 (71.8)	10 (52.6)	10 (58.8)

n: number, hrHPV: high-risk human papillomavirus, ^{*}: % by row, [#]: % in comparison with number of hrHPV positive.

In this population of 546 women, 52 were tested hrHPV positive. Among these, 31/52 (59.6%) had a mean FU of 25 months (95% CI 18.2–31.8). Persistent hrHPV positivity was observed in 21/31 (67.7%) women; 13 women still had NILM smears, 6 showed cytological mild abnormalities and 2 presented HSIL. The latter lesions were confirmed histopathologically as CIN3 that developed in women positive for HPV16 at study entry. Among the 494 women who had NILM and were hrHPV negative, only 65 (13.2%) had a FU over a mean period of 31 months (95% CI 25.9–36.1). Four of these (4/65, 6.2%) presented mild abnormalities associated with an incident hrHPV infection but none developed HSIL at cytological control and colposcopic examination.

Discussion

High prevalence of cervical abnormalities may be related to low screening coverage

This retrospective study, conducted on a hospital cohort of 796 French women over 65 years for cervical cancer screening, reports a high rate of hrHPV infection as well as of cytological abnormalities of either low or high grade and a notable rate of carcinomas. These findings are in line with those of Mandelblatt et al. who reported 2% of smears with suspected malignancy in a population of poor, elderly and black women from New York (Mandelblatt et al., 1993) but differ from those of Meyer et al., who recorded a 0.34% cancer rate among a large series of 53,644 French women aged 65 to 100 years having had a normal and sufficient cytological FU according to the guidelines (Meyer et al., 2012). Thus, we point out that women attending a referent hospital Gynecology Clinic are at high risk of cervical lesions and are not representative of older women in France. For the vast majority of the studied women (>85%), no history of cervical cancer screening was noted in our gynecology/pathology medical records while a minority of women would have had one Pap smear. Thus, we can reasonably think that these women were largely underscreened. The completeness of the records is however not warranted because (i) screening could have been performed outside the hospital and not necessarily according to the French guidelines, (ii) cervical cancer screening is mainly opportunistic in France (with the exception in some departments), (iii) of the

Table 1

Cytological data according to age in 796 French elderly women tested between 2002 and 2012.

Age group (years)	Global cohort	66–70	71–75	76–80	81 and +
Subjects n (% by row)	796 (100)	424 (53.3)	192 (24.1)	91 (11.4)	89 (11.2)
NILM n (% by column)	546 (68.6)	273 (64.4)	138 (71.9)	64 (70.3)	71 (79.8)
ASC-US n (% by column)	126 (15.8)	74 (17.4)	31 (16.2)	15 (16.5)	6 (6.7)
AGC n (% by column)	2 (0.3)	2 (0.5)	0	0	0
ASC-H n (% by column)	8 (1)	3 (0.7)	2 (1)	1 (1.1)	2 (2.3)
LSIL n (% by column)	59 (7.4)	44 (10.4)	10 (5.2)	2 (2.2)	3 (3.4)
HSIL n (% by column)	32 (4)	19 (4.5)	5 (2.6)	6 (6.6)	2 (2.2)
Cancer n (% by column)	23 (2.9)	9 (2.1)	6 (3.1)	3 (3.3)	5 (5.6)

n: number, NILM negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-H: atypical squamous cells – cannot exclude a high grade squamous intraepithelial lesions, AGC: atypical glandular cells, LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL: high grade SIL.

Table 3

Prevalence of hrHPV, HPV 16/ 18/45 and other HPV according to cytological data in 796 French elderly women tested between 2002 and 2012.

Cytology	NILM	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	All Cancers	SCC	ADC
hrHPV n (%)	52/546* (9.5)	37/128* (28.9)	2/8* (25)	41/59 (69.5)	29/32 (90.6)	20/23 (87)	17/18 (94.4)	3/5 (60)
HPV 16 n (%)	7/546 (1.3)	4/128 (3.1)	1/8 (12.5)	9/59 (15.2)	10/32 (31.3)	12/23 (52.2)	10/18 (55.6)	2/5 (40)
HPV 18 n (%)	1/546 (0.2)	2/128 (1.6)	0	3/59 (3.4)	1/32 (3.1)	1/23 (4.3)	0	1/5 (20)
HPV45 n (%)	2/546 (0.4)	4/128 (3.1)	0	3/59 (5.1)	2/32 (6.3)	3/23 (13)	3/18 (16.7)	0
Other HPV n (%)	39/546 (7.1)	29/128 (22.7)	0	27/59 (45.8)	18/32 (56.3)	4/23 (17.4)	4/18 (22.2)	0

n: number, hrHPV: high-risk human papillomavirus, NILM: negative for intraepithelial lesion or malignancy, ASC-US: atypical squamous cells of undetermined significance, ASC-H: atypical squamous cells — cannot exclude a high grade intraepithelial lesion, AGC: atypical glandular cells, LSIL: low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL: high grade SIL, SCC: squamous cell carcinoma, ADC: adenocarcinoma, % by row, *5 samples inadequate for PCR (2 NILM, 2 ASCUS, 1 ASCH).

absence of national cervical cancer screening registry, (iv) of the overwriting of the health insurance data every two years. These findings may also illustrate that the low coverage of Pap smear testing with age in France (57–59% between 25 and 44 years and 42% between 60 and 65 years (DREES, 2015)) is mainly responsible for late diagnosis of precancerous and cancerous cervical lesions. Underprivileged French women likely contribute to the high rate of cervical lesions in older women as it was recently confirmed that 33.1% of them aged 25–65 have ever realized a cervical smear in their lives, and more than a third did not know cervical smear (Chappuis et al., 2014). Moreover, several authors have reported that poor prognosis and advanced stage at diagnosis of cervical cancer in elderly women might be explained by the cessation of cervical screening in this population (Andrae et al., 2008; Brun et al., 2003; Ioka et al., 2005; Spayne et al., 2008; Wright et al., 2005). Based on these data and on the fact that pre-cancerous lesions regress less with age (van Oortmarssen and Habbema, 1991), women beyond 65 with inadequate past screening cannot be considered in forming exiting policy.

Otherwise in the general population, a recent case–control study performed on members of two health plans in the United States suggested that the implementation of screening for women aged 65–79 years was associated with a reduced risk of invasive cancer of 78–84% (Kamineni et al., 2013). USA guidelines recommend stopping screening at 65, but in practice, screening continues up to 85 years of age [Sasieni P, personal communication, EUROGIN 2015]. Indeed, Sirovich et al. showed that 43% of American women aged over 65 had cytology screening (Sirovich et al., 2003). As proposed by Castañón et al. stopping screening between age 60 and 69 years in women with a lifetime of adequate negative screening seems sensible. But in the context of

increasing life expectancy further screening may be justifiable (Castanon et al., 2014).

hrHPV prevalence is high in older women

As expected in a population at high risk of cervical lesions, the prevalence of hrHPV is high and reaches 22.7%, a prevalence comparable with that reported by Centurioni et al. in a cohort of Italian women older than 60 (Centurioni et al., 2005). Several authors noted a second HPV peak in women older than 55 in Europe, Canada, Central and South America and Africa (Baay et al., 2004; Castle et al., 2006; de Sanjose et al., 2007; Franceschi et al., 2006; Sellors et al., 2002). The increased prevalence of hrHPV among elderly women might reflect higher rates of previous HPV exposure (cohort effect from the generation of the sexual revolution). Nevertheless, we cannot exclude that older women initiating new sexual relationships in later life were exposed to new HPV infection. Moreover, declining immune function with aging may facilitate viral persistence (Garcia-Pineres et al., 2006) or reactivation of latent HPV infection and/or accelerate progression from cervical intraepithelial neoplasia to invasive cancer.

Here, the rate of hrHPV is stable across older age groups as described in Lindau's study (Lindau et al., 2008) but increased with the severity of cervical lesions, which is in line with data reported by Chiang et al. among Taiwanese women (Chiang et al., 2013). Among the specific HPV genotypes, HPV 16 was the most prevalent (23.8%) as reported by Zietkowiak et al. in women aged 56 to 78 years (26%) (Zietkowiak et al., 2002) and Baay et al. in women older than 65 (35.3%) (Baay et al., 2004). The frequency of HPV 16 increased with lesion severity, as also noted by Chiang et al. (Chiang et al., 2013), and confirms its

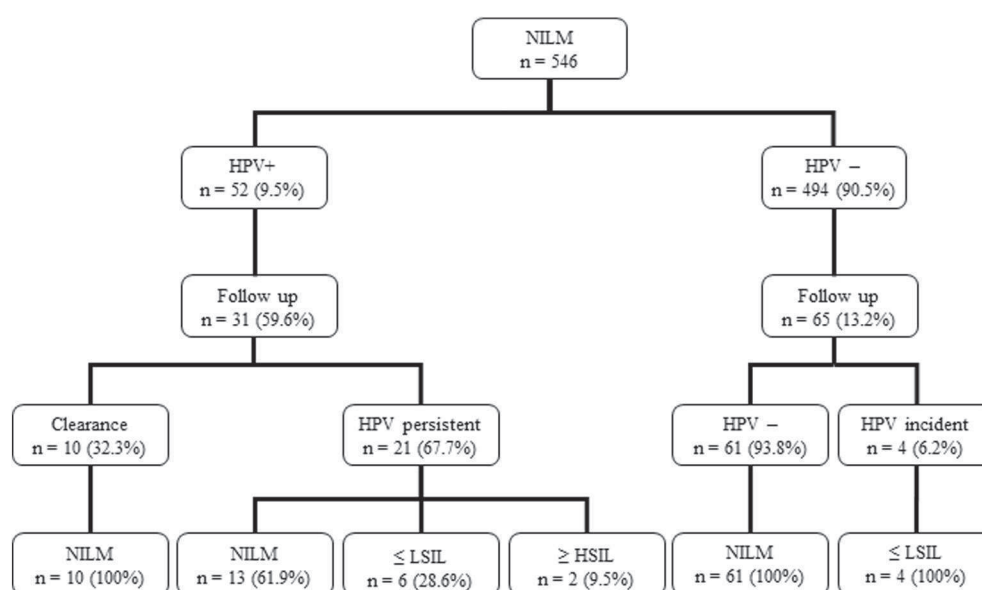


Fig. 1. Follow-up of French elderly women with a normal smear on a mean period of 29 months. NILM: Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, HPV: Human PapillomaVirus, LSIL: Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL: High Grade SIL.

distribution in women with or without cervical neoplastic diseases in all world regions (Clifford et al., 2006).

Strength and limitations of the FU study

The FU of women with normal smear at entry made it possible to detect incident CIN3 in 6% of HPV positive cases. This finding is comparable to Meyer's (Meyer et al., 2012) and Mandelblatt's (Mandelblatt et al., 1993) studies, that reported cases of HSIL + in women who presented a negative smear. Dinkelspiel et al. observed that 25% of women older than 65 with cervical cancer have had three previous consecutive negative smears (Dinkelspiel et al., 2012). Consequently, negative cytological screening is not sufficient to prevent cancer because the low risk period after several negative results does not stretch indefinitely. On the other hand, we demonstrate a beneficial effect of HPV testing. Indeed, in the population of women with normal cytology, those who developed CIN3 were HPV16 positive indicating the potential value of partial genotyping even in elderly women. This study had limitations: less than 15% of women with NILM and HPV negative were followed up and the duration of the follow up was short.

Cancer screening decisions in older patients should estimate life expectancy and weigh potential benefits and harms according to patient's characteristics and preferences (Rustagi et al., 2013; Walter and Covinsky, 2001). A study evaluating older women's preferences regarding their screening revealed that the majority of them were willing to use a HPV test to make decisions about the frequency and duration of cervical cancer screening (Huang et al., 2008). As discussed by Castañón et al., since the long term NPV of HPV testing is better than that of cytology one would expect the period of low risk to be longer following an HPV test, but no current study is looking at the risk 15–20 y after a negative HPV test (Castanon et al., 2014).

Conclusion

According to our overall results, it is essential to pay particular attention to hospital Gynecology Clinic attendees aged over 65, emphasizing the importance of HPV counseling, screening decisions and health-related quality of life. A conceptual framework based on individual patient characteristics and wishes to guide cancer screening decisions in older women may be more useful to practicing clinicians than age guidelines.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2015.08.018>.

Author contributions

Conceived and designed the study: CM, JLP, and DG. Helped to recruit the patients and collect the samples analyzed: DR. Contributed to cytology/pathology analysis: SVD, IB. performed the experiments: AL, EB and SV. Analyzed the data: AL, EB, DG, SC and CM. Drafted the manuscript: AL, EB, JLP, DG and CM.

Conflict of interest

none.

Acknowledgments

The authors would like to thank pathologists, gynecologists and technicians for their collaboration in this study. We are grateful to F. Ecarnot (EA3920, University Hospital Besancon, France) for critical revision of this manuscript. We thank E.M. de Villiers (DKFZ, Heidelberg, Germany) for kindly providing us with the HPV 16, HPV 18 and HPV 45 plasmids. The grant sponsor was The Ligue Contre Le Cancer (Comité du Doubs and CCIR-GE) and the Région de Franche-Comté. Mrs E. Belglaiaa is a recipient of a predoctoral scholarship from the Moroccan

Ministry of Higher Education and Scientific Research, and was also granted a Leclère- Giry scholarship from the Association Française des Femmes Diplômées des Universités (AFFDU), Paris, France.

References

- American Cancer Society, 2014. Cervical Cancer Available at <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003094.pdf>.
- Anaes, 2002. *Recommandations pour la pratique clinique. Conduite à tenir devant une patiente ayant un frottis cervico-utérin anormal*.
- Andrae, B., Kemetli, L., Sparen, P., et al., 2008. Screening-preventable cervical cancer risks: evidence from a nationwide audit in Sweden. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 622–629.
- Arbyn, M., Castellsague, X., de Sanjose, S., et al., 2011. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann. Oncol.* 22, 2675–2686.
- Arbyn, M., Ronco, G., Anttila, A., et al., 2012. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine* 30 (Suppl. 5), F88–F99.
- Baay, M.F., Smits, E., Tjalma, W.A., et al., 2004. Can cervical cancer screening be stopped at 50? The prevalence of HPV in elderly women. *Int. J. Cancer* 108, 258–261.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., et al., 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 56, 159–175.
- Brun, J.L., Stoven-Camou, D., Trouette, R., Lopez, M., Chene, G., Hocke, C., 2003. Survival and prognosis of women with invasive cervical cancer according to age. *Gynecol. Oncol.* 91, 395–401.
- Castanon, A., Landy, R., Cuzick, J., Sasieni, P., 2014. Cervical screening at age 50–64 years and the risk of cervical cancer at age 65 years and older: population-based case control study. *PLoS Med.* 11, e1001585.
- Castle, P.E., Jeronimo, J., Schiffman, M., et al., 2006. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res.* 66, 1218–1224.
- Centurioni, M.G., Puppo, A., Merlo, D.F., et al., 2005. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infect. Dis.* 5, 77.
- Chappuis, M., Antonielli, A.B., Laurence, S., Rochefort, J., Giboin, C., Corty, J.F., 2014. Cervical and breast cancer prevention among underprivileged women in France: an epidemiological study. *Bull. Cancer* 101, 663–668.
- Chiang, Y.C., Cheng, W.F., Chen, Y.L., et al., 2013. High-risk human papillomavirus, other than type 16/18, in predominantly older Taiwanese women with high-grade cervical preinvasive lesions. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 52, 222–226.
- 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) (S3/26–34).
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Sautiere, J.L., et al., 2004. Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population; benefits of testing for human papillomavirus. *Eur. J. Cancer* 40, 1225–1232.
- de Sanjose, S., Diaz, M., Castellsague, X., et al., 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 453–459.
- Dinkelspiel, H., Fetterman, B., Poitras, N., et al., 2012. Screening history preceding a diagnosis of cervical cancer in women age 65 and older. *Gynecol. Oncol.* 126, 203–206.
- DREES, 2015. *Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques. L'état de santé de la population en France. Édition 2015*. pp. 330–334.
- Elfstrom, K.M., Arnheim-Dahlstrom, L., von Karsa, L., Dillner, J., 2015. Cervical cancer screening in Europe: quality assurance and organisation of programmes. *Eur. J. Cancer* 51, 950–968.
- Elit, L., 2014. Role of cervical screening in older women. *Maturitas* 79, 413–420.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917.
- Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, G.M., et al., 2006. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int. J. Cancer* 119, 2677–2684.
- Garcia-Pineros, A.J., Hildesheim, A., Herrero, R., et al., 2006. Persistent human papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Res.* 66, 11070–11076.
- Guardado-Estrada, M., Juarez-Torres, E., Roman-Bassaura, E., et al., 2014. The distribution of high-risk human papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PLoS One* 9, e109406.
- Haute Autorité de Santé, 2013. *Dépistage et Prévention du cancer du col de l'utérus. Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé (EPS)*.
- Huang, A.J., Perez-Stable, E.J., Kim, S.E., et al., 2008. Preferences for human papillomavirus testing with routine cervical cancer screening in diverse older women. *J. Gen. Intern. Med.* 23, 1324–1329.
- Ioka, A., Tsukuma, H., Ajiki, W., Oshima, A., 2005. Influence of age on cervical cancer survival in Japan. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35, 464–469.
- Jacquin, E., Saunier, M., Mauny, F., Schwarz, E., Mougin, C., Pretet, J.L., 2013. Real-time duplex PCR for simultaneous HPV 16 and HPV 18 DNA quantitation. *J. Virol. Methods* 193, 498–502.
- Kamineni, A., Weinmann, S., Shy, K.K., Glass, A.G., Weiss, N.S., 2013. Efficacy of screening in preventing cervical cancer among older women. *Cancer Causes Control* 24, 1653–1660.
- Katki, H.A., Kinney, W.K., Fetterman, B., et al., 2011. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol.* 12, 663–672.
- La Vecchia, C., Franceschi, S., Decarli, A., Fasoli, M., Gentile, A., Tognoni, G., 1984. "Pap" smear and the risk of cervical neoplasia: quantitative estimates from a case-control study. *Lancet* 2, 779–782.

- Laurendeau, I., Bahuaui, M., Vodovar, N., et al., 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.
- Leinonen, M.K., Nieminen, P., Lonnberg, S., et al., 2012. Detection rates of precancerous and cancerous cervical lesions within one screening round of primary human papillomavirus DNA testing: prospective randomised trial in Finland. *BMJ* 345, e7789.
- Lindau, S.T., Drum, M.L., Gaumer, E., Surawska, H., Jordan, J.A., 2008. Prevalence of high-risk human papillomavirus among older women. *Obstet. Gynecol.* 112, 979–989.
- Mandelblatt, J., Traxler, M., Lakin, P., et al., 1993. Breast and cervical cancer screening of poor, elderly, black women: clinical results and implications. Harlem Study Team. *Am. J. Prev. Med.* 9, 133–138.
- Mayrand, M.H., Duarte-Franco, E., Rodrigues, I., et al., 2007. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 357, 1579–1588.
- Meyer, R., Lemay, A.L., Guy, X., Giraud, C., Mathevet, P., Flori, M., 2012. Is there a benefit to continue pap smear screening for cervical cancer after 65 years of age? A retrospective study on 53,644 women. *Bull. Cancer* 99, 409–415.
- Monsonog, J., Cox, J.T., Behrens, C., et al., 2015. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large U.S. screening population: data from the ATHENA trial. *Gynecol. Oncol.* 137, 47–54.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., et al., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518–527.
- Ogilvie, G.S., Krajden, M., van Niekerk, D.J., et al., 2012. Primary cervical cancer screening with HPV testing compared with liquid-based cytology: results of round 1 of a randomised controlled trial — the HPV FOCAL Study. *Br. J. Cancer* 107, 1917–1924.
- Pretet, J.L., Jacquard, A.C., Carcopino, X., et al., 2008. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH study. *Int. J. Cancer* 122, 428–432.
- Quinn, M., Babb, P., Jones, J., Allen, E., 1999. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *BMJ* 318, 904–908.
- Riethmuller, D., Pretet, J.L., Mougin, C., 2013. Comment surveiller un test hr-HPV positif? Mises à jour en gynécologie médicale. — Trente-septièmes Journées nationales du CNGOF, Paris, pp. 625–635.
- Rijkaart, D.C., Berkhof, J., Rozendaal, L., et al., 2012. Human papillomavirus testing for the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer: final results of the POBASCAM randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 13, 78–88.
- Ronco, G., Dillner, J., Elfstrom, K.M., et al., 2014. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet* 383, 524–532.
- Rustagi, A.S., Kamineni, A., Weiss, N.S., 2013. Point: cervical cancer screening guidelines should consider observational data on screening efficacy in older women. *Am. J. Epidemiol.* 178, 1020–1022.
- Saraiya, M., Benard, V.B., Greek, A.A., et al., 2014. Type-specific HPV and Pap test results among low-income, underserved women: providing insights into management strategies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 211 (354), e351–e356.
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H.W., et al., 2012. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J. Clin.* 62, 147–172.
- Schiffman, M.H., Bauer, H.M., Hoover, R.N., et al., 1993. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 958–964.
- Sellers, J.W., Karwalajtys, T.L., Kaczorowski, J.A., et al., 2002. Prevalence of infection with carcinogenic human papillomavirus among older women. *CMAJ* 167, 871–873.
- Sirovich, B.E., Gottlieb, D.J., Fisher, E.S., 2003. The burden of prevention: downstream consequences of Pap smear testing in the elderly. *J. Med. Screen.* 10, 189–195.
- Spayne, J., Ackerman, I., Milosevic, M., Seidenfeld, A., Covens, A., Paszat, L., 2008. Invasive cervical cancer: a failure of screening. *Eur. J. Pub. Health* 18, 162–165.
- Spence, A.R., Goggin, P., Franco, E.L., 2007. Process of care failures in invasive cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Prev. Med.* 45, 93–106.
- van Oortmarssen, G.J., Habbema, J.D., 1991. Epidemiological evidence for age-dependent regression of pre-invasive cervical cancer. *Br. J. Cancer* 64, 559–565.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., et al., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12–19.
- Wallin, K.L., Wiklund, F., Angstrom, T., et al., 1999. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 341, 1633–1638.
- Walter, L.C., Covinsky, K.E., 2001. Cancer screening in elderly patients: a framework for individualized decision making. *JAMA* 285, 2750–2756.
- Wright, J.D., Gibb, R.K., Geervarghese, S., et al., 2005. Cervical carcinoma in the elderly: an analysis of patterns of care and outcome. *Cancer* 103, 85–91.
- Wright, T.C., Stoler, M.H., Behrens, C.M., Sharma, A., Zhang, G., Wright, T.L., 2015. Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test. *Gynecol. Oncol.* 136, 189–197.
- Zietkowiak, W., Zimna, K., Sroka, L., Uchman, P., Sajdak, S., 2002. Frequency of HPV infection of the uterine cervix among perimenopausal women in Wielkopolska Region. *Ginek. Pol.* 73, 939–944.

Publication n°2

Human papillomavirus genotypes among women with or without HIV infection:

An epidemiological study of Moroccan women from the Souss area

E. Belglaiaa, B. Mouaouya, M. Aksim, H. El annaz, M. Mercier, J.L Prétet, S. Chouham, C. Mougin.

Manuscrit soumis à *Infectious Agents and Cancer*

Travail présenté à :

30th International Papillomavirus Conference,

Lisbonne, Portugal, 17-21 Septembre 2015

Risk factors, HIV status and oncogenic HPV in cervical smears: A study of Moroccan women from the Souss area

E. Belglaiaa, B. Mouaouya, H. El annaz, M. Mercier, J.L Prétet, S. Chouham, C. Mougin.

10ème Conférence Internationale sur le Cancer en Afrique, AORTIC

Marrakech, Maroc, 18-22 Novembre 2015

Epidemiology and genotype distribution of Human Papillomavirus (HPV) among Moroccan women in the Souss area

E. Belglaiaa, B. Mouaouya, H. El annaz, M. Mercier, J.L Prétet, S. Chouham, C. Mougin.

1. Objectifs

Le cancer du col de l'utérus (CCU) constitue un fardeau de plus en plus lourd pour le système de la santé. Au Maroc, il est le deuxième cancer féminin après celui du sein. Les données actuelles disponibles indiquent que 1076 décès et 2258 nouveaux cas sont enregistrés chaque année (« WHO/ICO. (2014b). Human Papillomavirus and Related Diseases Report in Morocco. Information Centre On HPV and Cancer (HPV Information Centre); summary report 2014. Retrieved 22/06/2015 from <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/MAR.pdf> », s. d.).

Il est bien établi que les Papillomavirus humains (HPV) sont les agents étiologiques du CCU mais non suffisants. D'autres cofacteurs de risque peuvent intervenir dans la progression de l'infection à HPV vers le CCU. Par ailleurs, l'histoire naturelle de ce cancer est longue ce qui représente une opportunité pour la mise en place de programme de prévention secondaire en vue de sa détection précoce.

Dans ce contexte, il apparaît essentiel de mieux évaluer la prévalence et la distribution de génotypes d'HPV ainsi que les résultats de cytologie, chez des femmes marocaines de la région de Souss selon des facteurs sociodémographiques, style de vie et statut VIH.

2. Matériels et Méthodes

2. 1. Population étudiée

Le présent travail consistait en une étude épidémiologique réalisée sur une période de neuf mois (Juin 2014 à Février 2015) auprès des femmes marocaines consultant le centre hospitalier régional Hassan II, centre publique de référence dans la région Souss-Massa-Drâa, Maroc.

Les patientes ont été référées à l'hôpital pour des symptômes évocateurs de troubles gynécologiques (pertes vaginales, saignements vaginaux, verrues génitales, démangeaisons au niveau de la vulve, douleurs abdominales et pelviennes, infertilité, ménorragies) ou pour le suivi gynécologique de maladies auto-immunes ou le suivi de patientes immunodéprimées (VIH/SIDA).

Les femmes ont été adressées au service d'anatomopathologie par le service de gynécologie du centre hospitalier Hassan II, le service des maladies infectieuses du même hôpital, les centres de santé, les centres de planification familiale, et autres....

2. 2. Réalisation des frottis cervico-utérins (FCU)

2.2.1. Recueil de l'information

Après avoir expliqué aux femmes le but de l'étude, chaque femme a signé une attestation de consentement éclairé. Le recueil de l'information a été réalisé par la suite à l'aide d'un interrogatoire (voir en annexe). Le questionnaire a été élaboré par mes soins et à l'aide des chercheurs français. Ce questionnaire comportait plusieurs parties :

Données socio-économiques : âge, niveau d'éducation, emploi.

Activité sexuelle : âge au 1^{er} rapport sexuel, nombre de partenaires sexuels, moyens de contraception utilisés et leurs durées.

Vie reproductive : âge à la première grossesse, nombre d'enfants et de fausses couches, ménopause.

Antécédents de lésions gynécologiques et de dépistage par FCU.

Statut VIH.

Tabagisme.

2.2.2. Prélèvement pour FCU et test HPV

L'examen gynécologique a été effectué par une infirmière du service. Après insertion d'un spéculum en position gynécologique, l'infirmière a examiné le col utérin en identifiant la zone de jonction pavimento-cylindrique. Deux prélèvements ont ensuite été effectués :

a. Frottis conventionnel

La technique adoptée dans le service d'anatomopathologie du centre hospitalier Hassan II d'Agadir est le FCU conventionnel ou technique de Papanicolaou (Figure 36), qui comprend généralement 2 prélèvements:

Le prélèvement de l'exocol et de la jonction exo-endocervicale

Il est réalisé à l'aide de la spatule d'Ayre qui permet d'obtenir, entre autre, les cellules de la zone de jonction. Le matériel cellulaire est ensuite étalé sur une première lame en verre, en évitant de repasser au même endroit, pour un étalement régulier des cellules. La fixation se fait immédiatement à l'aide d'un spray, projeté perpendiculairement à la lame, à une vingtaine de centimètres de distance pour éviter le décollement des cellules.

Le prélèvement de l'endocol

Une cytobrosse est introduite dans le premier centimètre du canal endocervical, suivi d'un mouvement de va et vient à l'intérieur de l'endocol. Ce matériel cellulaire est étalé sur une 2^{ème} lame.



Figure 36 : Matériel utilisé pour la réalisation du frottis cervico-utérin classique, sur lames

b. Milieu liquide pour test HPV

La spatule et la cytobrosse utilisées pour le FCU conventionnel ont été ensuite placées dans un tube contenant 3 mL de milieu de transport UTM™ (Figure 37) pour la recherche d'HPV. Après une agitation du tube, la spatule et la cytobrosse sont retirées et le tube est mis à -20°C jusqu'à utilisation pour la recherche d'HPV.



Figure 37: Milieu de transport UTM™ pour frottis en milieu liquide

2.2.3. Méthode de coloration des FCU

La coloration utilisée est celle de Papanicolaou. Cette coloration associe un colorant nucléaire, l'hématoxyline de Harris à des colorants cytoplasmiques, l'orange G et le mélange polychrome EA50 de Papanicolaou.

2.2.4. Méthode de lecture des lames

Une fois les lames correctement, fixées et colorées, la lecture a été faite par le médecin anatomopathologiste du service et les résultats sont rendus selon la classification de Bethesda.

2.2.5. Prise en charge des lésions

Le compte rendu est remis à la patiente qui le transmet à son médecin traitant; pour les patientes qui ont des lésions suspectes un complément biopsique est souvent demandé.

2. 3. Etude moléculaire des HPV

Une partie des extractions d'ADN et des PCR (60 FCU déposés dans un milieu liquide) ont été réalisées dans le laboratoire de biologie moléculaire du 5^{ème} hôpital militaire de Guelmim (ville située à 200 km au sud d'Agadir) et qui est le seul dans cette région. Malheureusement, depuis le mois de septembre 2014, ce laboratoire a été désigné pour assurer le diagnostic de la maladie à virus Ebola, puisqu'il possède un confinement L3 (P3). Par conséquent, les responsables m'ont interdit l'accès à ce laboratoire compte-tenu des risques pour ma santé. Le reste des extractions d'ADN et des PCR (172 FCU en milieu liquide) ainsi que le génotypage ont été effectués dans le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du CHRU Jean Minjoz, Besançon, France.

2.3. 1. Extraction de l'ADN

Les échantillons conservés à -20°C, ont été soumis à une extraction de l'ADN à l'aide de la trousse commerciale QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), en suivant le protocole fourni par le fabricant. Brièvement, un aliquot de 3 mL de milieu de transport de frottis a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été ensuite éliminé et le culot cellulaire a été repris dans 400 µL de tampon TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). Ensuite, 400 µL de tampon AL (Qiagen) et 40 µL de protéinase K (Qiagen) ont été ajoutés au tube contenant l'échantillon et incubés à 56 °C pendant une nuit. Cette étape permet de lyser les protéines cellulaires et virales. Après une précipitation par l'éthanol, la totalité de l'échantillon a été déposée sur des colonnes de purification. Deux lavages successifs à l'aide des tampons spécifiques (AW1 et AW2) ont été effectués, suivis d'une étape d'élution d'ADN avec le tampon AE. L'ADN ainsi obtenu a pu être utilisé immédiatement pour la PCR ou conservé à - 20°C jusqu'à utilisation.

2.3. 2. Détection de l'ADN d'HPV

a. PCR β-globine

La qualité de l'ADN extrait a été évaluée par une amplification en chaîne (PCR) d'un fragment de 265 pb (paires de bases) du gène de β-globine en utilisant le couple d'amorces PC04 (5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3') et GH20 (5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3').

b. PCR HPV consensus

Cette PCR permet la détection de l'ADN d'HPV par amplification d'une séquence de 450 pb commune à un grand nombre de types d'HPV, située dans la région L1, à l'aide du couple d'amorces consensus MY09/MY11 (5'-CGT-CCM-ARR-GGA-WAC-TGA-TC-3' et 5'-GCM-CAG-GGW-CAT-AAY-AAT-GG-3').

Dans un volume réactionnel de 25 µL, 100 pmoL de chaque amorce consensus, 10 mM de chaque dNTP ont été additionnés de 5 unités de Thermo Scientific™ DreamTaq™ DNA Polymerase (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) et de 2,5 µL d'extrait d'ADN. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Biometra T3000 selon le programme suivant :

94°C	3 min	1 cycle
92°C	30 sec	35 cycles
58°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 cycle

Dans chaque série de PCR est introduit un témoin de non contamination (eau de qualité biologie moléculaire), un témoin négatif (sans ADN d'HPV) et un témoin positif (ADN des cellules Ca Ski (HPV16 positif)).

c. Electrophorèse et migration sur gel

Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse en utilisant un gel d'agarose à 1,2% dans un tampon TBE (1X) contenant du SYBR Safe. Un volume de 10 µL d'amplifiat migre sous une tension de 100 V à température ambiante.

d. Révélation à l'aide de la lumière ultraviolette

La visualisation du gel a été réalisée sous la lumière ultraviolette et le gel a été photographié par KODAK Gel Logic 100 Imaging System. L'image est saisie sur ordinateur (Figure 38).

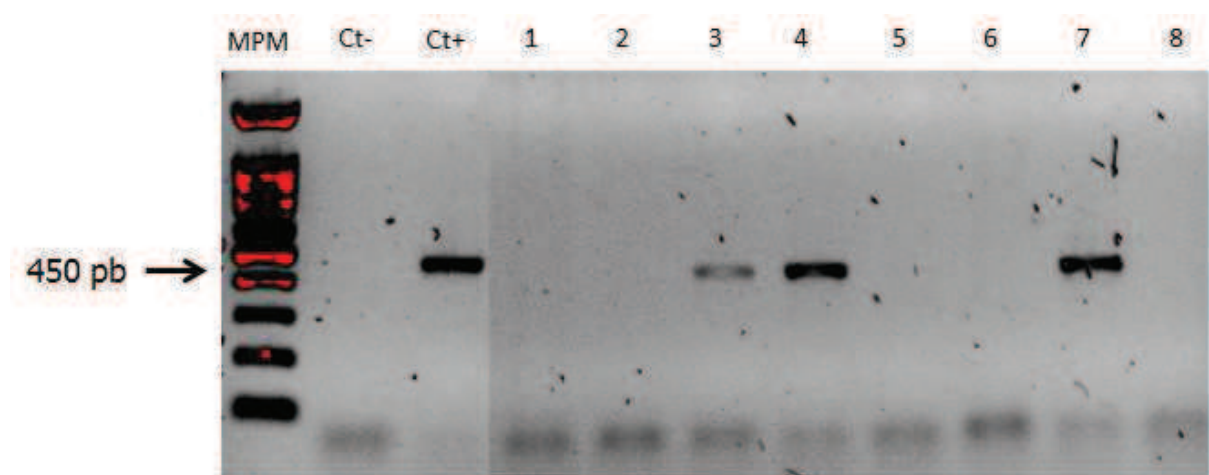


Figure 38 : Migration sur gel d'agarose des produits de PCR MY09/11

MPM : Marqueur de poids moléculaire; Ct- : Contrôle négatif (H2O qualité biologie moléculaire; Ct+ : Contrôle positif (cellules Caski HPV16+); 1,2,5,6,8 : Echantillons HPV négatifs; 3,4,7 : Echantillons HPV positifs.

2.3.3. Génomotypage d'HPV : technique INNO-LiPA HPV Genotyping Extra®

Le génotypage des HPV a été réalisé avec la trousse INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Fujirebio, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. La technique repose sur l'amplification par PCR d'un fragment de 65 pb au sein de la région L1 du génome d'HPV en utilisant les amorces consensus SPF10 biotinylées. Les amplicons biotinylés sont ensuite hybridés avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques de type d'HPV qui sont immobilisées sur des bandelettes de nitrocellulose. Après hybridation et lavage stringent, le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline est ajouté et se lie à tout hybride biotinylé formé. L'incubation avec le chromogène BCIP/NBT forme un précipité violet au niveau des bandes d'hybrides permettant ainsi une interprétation visuelle des résultats. L'intégralité des étapes d'hybridation est réalisée avec un système d'automatisation Auto-LiPA 48® (Tecan).

La lecture de la position des bandes, réalisée manuellement ou de façon automatisée (logiciel LIRAS®), permet d'identifier les types d'HPV présents dans les échantillons, à savoir (Martel et al. 2012) :

- 18 HPV haut risque (HR) et potentiellement à haut risque (pHR) : HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 et 82
- 7 HPV de bas risque (BR) : HPV 6, 11, 40, 43, 44, 54 et 70
- 3 HPV non classés: HPV 69, 71 et 74
- 1 HPV classé X

Les performances de ce test ont été évaluées par le fabricant avec une sensibilité de 97% et une spécificité de 90,5 %. Un témoin positif (HPV16) et un témoin négatif (eau) passés en parallèle avec les échantillons testés valident chaque série d'analyses.

2.3. 4. Analyse statistique

Un modèle de régression logistique a été utilisé pour l'analyse univariée et multivariée de l'association entre les facteurs de risque et l'infection par tous types d'HPV, les HPV oncogènes et les anomalies du col de l'utérus. Les Odds Ratios et leurs intervalles de confiance (IC) à 95% ont été utilisés pour estimer l'association entre les facteurs de risque et la positivité de tous types d'HPV, des génotypes oncogènes et des anomalies du col utérin. Nous n'avons considéré que les génotypes 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68 et 82 comme des types oncogènes. Une p-value <0.05 est considérée statistiquement significative. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS, version 9.4 (SAS Institute., Inc, Cary, North California, USA).

3. Résultats

3.1. Caractéristiques des patientes

Un total de 232 femmes avaient consulté l'hôpital Hassan II d'Agadir, soit pour un soin gynécologique ou pour différents symptômes cliniques à savoir : l'infertilité, leucorrhées, métrorragies, douleurs pelviennes ou autres. L'âge moyen au moment du diagnostic était de 42 ans (17-76 ans). Il est important de noter que la majorité des femmes (81,5%) n'avait jamais bénéficié d'un dépistage par FCU au cours de leur vie.

Les caractéristiques sociodémographiques, cliniques et comportementales des patientes sont décrites dans le tableau 1 (publication 2). Notre série comporte 36,2% de femmes VIH-positives, référées au laboratoire de pathologie par le service des maladies infectieuses de l'Hôpital Hassan II (Agadir) pour leur suivi gynécologique par FCU. Les femmes VIH-négatives représentaient 45,3% de notre cohorte. Le statut VIH était inconnu chez 18,5% des cas. Il a été observé que la majorité des femmes étaient analphabètes (66,8%) et sans emploi (84,1%). Presque la moitié des femmes étaient mariées (56%) et avaient eu leur premier rapport sexuel à un âge inférieur à 20 ans (56,8%) et avaient eu leur première grossesse après l'âge de 18 ans (58,2%). Environ 41% des femmes avaient 2 ou 3 enfants et 36% avaient fait au moins une fausse couche. Presque 66,4% des femmes signalaient avoir eu un seul partenaire sexuel au cours de leur vie. Il a été observé que trois quarts des femmes (75,4%) avaient rapporté l'utilisation de moyens contraceptifs (pilule, préservatif, stérilet) et 51% utilisaient la pilule depuis plus de 5 ans. Il a été observé que 13% des femmes avaient une histoire de

lésions gynécologiques (condylomes anaux et vulvaires, kyste ovarien, polype utérin, myome et fibrome), et 18% étaient ménopausées (10% l'étaient depuis plus de 5 ans). Le tabagisme a été signalé chez 10,3% des femmes.

3.2. Résultats de cytologie

Le diagnostic cytologique a montré que 82% des frottis étaient normaux et 18% étaient pathologiques : 13% étaient des LGSIL et 5% étaient des HGSIL. En revanche, aucune cytologie suggestive du CCU n'a été observée.

3.3. Prévalence et distribution des HPV

Nous avons montré que la prévalence d'HPV dans notre cohorte était de 23,7%. Des infections simples et multiples ont été observées respectivement dans 34,6% et 65,4% des cas. L'HPV16 (6,5%) est le génotype le plus fréquemment retrouvé dans la population générale, suivi par les types 53 et 74 (3,4% chacun).

Nous avons détecté l'HPV dans 17,4% des frottis normaux, 43,3% des LGSIL et 75% des HGSIL. Un total de 22 génotypes d'HPV ont été trouvés dans des frottis normaux, 15 dans des LGSIL et 6 dans les HGSIL. HPV16 a été détecté dans 2,1 % des frottis normaux, 23,3 % des LGSIL et 33,3 % des HGSIL, tandis que l'HPV 18 a été le génotype le plus prévalent dans les frottis HGSIL (25%) (Tableau 2, publication 2). Il est intéressant de noter que la présence des anomalies cytologiques était fortement associée avec l'infection par des HPV oncogènes ($p=0,001$ pour LGSIL et $p<0,0001$ pour HGSIL) (Tableau 3, publication 2).

Après avoir exclu les femmes dont le statut VIH est inconnu, nous avons trouvé que la prévalence d'HPV était de 39,3% chez les femmes VIH-positives comparée à 13,3% chez les femmes VIH-négatives. La distribution des HPV chez les femmes VIH-positives est représentée dans la figure 1 (publication 2).

Les infections multiples étaient majoritaires chez les femmes VIH-positives (75,7%, 95% CI 66,5-84,8) par rapport aux femmes VIH-négatives (57,1%, 95% CI 47,6 -66,5). Il a été observé qu'au sein de la population des femmes VIH positives, l'HPV a été détecté dans 32,2% des frottis normaux, 42,8% des LGSIL et 87,5% des HGSIL.

3.4. Facteurs de risque

L'analyse univariée a montré une association significative entre l'infection par des HPV oncogènes et le nombre de partenaires sexuels ($p=0,04$), le tabagisme ($p=0,03$) et l'infection par le VIH ($p=0,0004$) (Tableau 4, publication 2). L'analyse multivariée a montré que l'infection par le VIH est associée à une augmentation significative du risque d'infection par des HPV-HR et pHR ($p=0,0005$) après ajustement par le niveau d'éducation, le statut marital, l'âge à la première grossesse, le nombre de fausses couches, le nombre de partenaires sexuels et l'exposition au tabac (Tableau 10).

Tableau 10 : Analyse multivariée* des caractéristiques associées à l'infection par des HPV-HR et pHR.

<i>Caractéristiques</i>	<i>OR (95% CI)</i>	<i>p-value</i>
<i>Niveau d'éducation</i>		
Secondaire et supérieur	1,00	
Primaire	0,51 [0,12-2,05]	0,34
Analphabète	1,35 [0,49-3,68]	0,56
<i>Statut marital</i>		
Mariée	1,00	
Célibataire+divorcée+veuve	1,17 [0,50-2,73]	0,72
<i>Statut VIH</i>		
Négatif	1,00	
Positif	4,16 [1,87-9,24]	0,0005
<i>Age à la 1ère grossesse (année)</i>		
> 18	1,00	
≤ 18	1,41 [0,66-3,03]	0,38
<i>Nombre de fausses couches</i>		
0	1,00	
≥1	0,96 [0,45-2,07]	0,92
<i>Nombre de partenaires sexuels</i>		
Unique	1,00	
Multiple	0,71 [0,30-1,70]	0,44
<i>Exposition au tabac</i>		
Non	1,00	
Oui	2,04 [0,65-6,42]	0,22

* Le modèle inclut toutes les variables dans l'analyse univariée avec une valeur de $p \leq 0.2$.

Dans une deuxième analyse univariée, nous avons trouvé une association entre la présence des anomalies cytologiques et l'absence d'emploi ($p=0,03$), le nombre de fausses couches ($p=0,03$), et le statut VIH ($p=0,01$) (Tableau 4, publication 2). Il est intéressant de noter que l'analyse multivariée a démontré que l'infection par le VIH et le nombre de fausses couches étaient associés aux anomalies cytologiques (OR 3,98, 95% CI 1,39-11,40, $p=0,01$; OR 2,84, 95% CI 1,14-7,12, $p=0,02$) après ajustement par l'âge, le niveau d'éducation, l'emploi, l'âge au premier rapport sexuel, la ménopause, et le nombre de frottis de dépistage réalisés (Tableau 11).

Tableau 11 : Analyse multivariée* des caractéristiques associées aux anomalies cytologiques (lésions intraépithéliales de bas et de haut grade).

<i>Caractéristiques</i>	<i>OR [95% CI]</i>	<i>p-value</i>
<i>Age (année)</i>		
<45	1,00	
≥ 45	0,30 [0,09-1,01]	0,052
<i>Niveau d'éducation</i>		
Secondaire et supérieur	1,00	
Primaire	3,77 [0,44-32,36]	0,23
Analphabète	3,18 [0,30-33,71]	0,34
<i>Emploi</i>		
Non	1,00	
Oui	5,86 [0,69-50,13]	0,11
<i>Status VIH</i>		
Négatif	1,00	
Positif	3,98 [1,39-11,40]	0,01
<i>Age au 1er rapport sexuel (année)</i>		
≥20	1,00	
17-19	2,41 [0,64-9,08]	0,19
≤16	2,43 [0,69-8,60]	0,17
<i>Nombre de fausses couches</i>		
0	1,00	
≥1	2,84 [1,14-7,12]	0,02
<i>Menopause</i>		
Non	1,00	
Oui	1,33 [0,35-5,12]	0,68
<i>Nombre de frottis de dépistage</i>		
Aucun	1,00	
≥1	0,74 [0,20-2,66]	0,64

*Le modèle inclut toutes les variables dans l'analyse univariée avec une valeur de $p \leq 0.2$ ainsi que les variables considérées importantes (dépistage par FCU).

4. Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons démontré une forte prévalence d'HPV et une grande diversité de génotypes d'HPV chez les femmes marocaines de la région de Souss. Ceci implique la nécessité de la mise en place d'un programme de dépistage et de la vaccination. En particulier, il sera important d'accorder plus d'attention aux femmes VIH-positives car elles sont plus susceptibles à l'infection par l'HPV et par la suite au développement des lésions précancéreuses et cancéreuses du col utérin.

5. Résultats complémentaires

Au sein de la population des femmes infectées par le VIH, nous avons trouvé une prévalence d'HPV de 39,3% (33/84). Huit femmes (24,2%) sont infectées par un seul type d'HPV, alors que 75,7% sont infectées par plusieurs génotypes dont la majorité est infectée par 2 et 3 génotypes différents (51,5%). La distribution des génotypes d'HPV est représentée dans le tableau 12. L'HPV16 est apparu comme le seul génotype dans 3 cas (9,1%). Dans les autres cas, il est apparu en combinaison avec les autres génotypes d'HPV (tableau 12).

Tableau 12 : Prévalence des infections HPV simples et multiples et distribution des HPV16 chez les femmes infectées par le VIH

<i>Nombre de différents génotypes d'HPV*</i>	<i>n (%)[§]</i>
1	8 (24,2)
2	12 (36,4)
3	5 (15,1)
4	3 (9,1)
5	3 (9,1)
6	1 (3)
7	1 (3)
<i>Distribution d'HPV16</i>	<i>n (%)[§]</i>
16	3 (9,1)
16-18	1 (3)
16-56	1 (3)
16-18-52	1 (3)
16-18-58	1 (3)
16-52-56	1 (3)
16-31-33-39-69/71	1 (3)
16-52-56-69/71-X	1 (3)
16-52-56-69/71-82-X	1 (3)

*Inclus les HPV-BR, HPV-pHR et HPV-HR.

[§] % calculée à partir des résultats positifs (n=33).

Nous avons montré que la prévalence d'HPV est de 13,3% chez les femmes VIH-négatives. Des infections simples et multiples sont observées respectivement dans 42,9% et 57,1% des cas. Parmi tous types d'infections (simples ou multiples), l'HPV52 (36%) est le génotype le plus fréquemment retrouvé suivi par l'HPV58 (21%) (Figure 39).

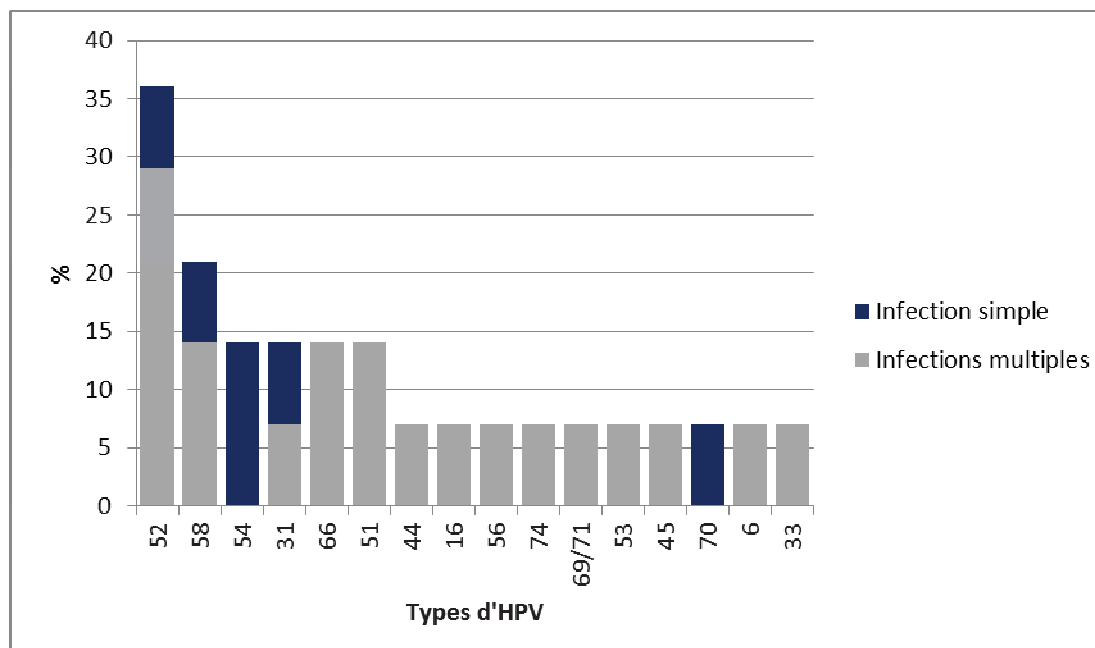


Figure 39: Prévalence des génotypes d'HPV dans les infections simples et multiples chez 14 femmes marocaines non infectées par le VIH

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Human papillomavirus genotypes among women with or without HIV infection: an epidemiological study of Moroccan women from the Souss area

Essaada Belglaiaa^{1,2}, Hicham El annaz³, Bouchra Mouaouya⁴, Mohamed Aksim⁴, Mariette Mercier², Jean-Luc Prétet^{2,5}, Said Chouham¹ and Christiane Mougin^{2,5*}

Abstract

Background: Data on Human PapillomaVirus (HPV) infection are scarce in Morocco. The objective of the study was to determine the prevalence of HPV and cervical cytology abnormalities in women from the Souss area, Morocco.

Methods: Two hundred and thirty two women who attended the Hassan II hospital (Agadir, Morocco) were recruited in this study. Socio-economic data, sexual activity, reproductive life, history of Pap smear, smoking and HIV status were recorded. Cervical samples were taken using an Ayre spatula. Cytology was reported using the Bethesda system. HPVs were first detected by MY09/11 consensus PCR and then genotyped with INNO-LiPA[®] assay. Data were analyzed using the logistic regression model.

Results: The median age of women was 42 years (18–76 years). HIV prevalence was 36.2 %. Any HPV type prevalence was 23.7 % in the study population, lower in HIV-negative women (13.3 %) than in HIV-positive women (39.3 %). HPV16 was the most prevalent type (6.5 %), followed by HPV53 and HPV74 (3.4 % each). Most women had normal cervical smears (82 %), the remaining were diagnosed with LGSIL (13 %) and HGSIL (5 %). HPV was detected in 17.4 % of normal smears, 43.4 % of LGSIL and 75 % of HGSIL. HIV status was the most powerful predictor of high risk (hr) and probable hr (phr) HPV infection (odds ratio 4.16, 95 % confidence interval 1.87–9.24, $p = 0.0005$) followed by abnormal cytology (OR 3.98, 95 % CI 1.39–11.40, $p = 0.01$), independently of socio-demographic and behavioral risk factors.

Conclusions: In a Moroccan hospital based-population of the Souss area, HPV infections are frequently detected. In addition, high prevalence of hr and phrHPVs and precancerous lesions among HIV-positive women is likely associated with an increased risk of cervical cancer. This highlights the need for HPV and cervical cancer prevention campaigns in Morocco.

Keywords: HPV, HIV, Pap smear, Cervical cancer, Morocco

* Correspondence: christiane.mougin@univ-fcomte.fr

²EA 3181, Lab Ex LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Université de Franche-Comté UBFC, F-25000 Besançon, France

⁵Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Inserm CIC 1431, CHRU Jean Minjoz, Boulevard Fleming, 25000 Besançon, France

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

Background

Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted infection (STI) worldwide and the necessary causative agent of precancerous and cancerous lesions of the cervix. The role of high risk HPV (hrHPV) in the development of virtually all cervical cancers (CC) has been well established for more than 20 years [1–3]. CC is the second most common cancer in Moroccan women, after breast cancer. Current estimates indicate that the age-standardized incidence of CC among women in Morocco is 14.3 new cases per 100 000 women/year corresponding to 2258 new cases /year, and the death rate due to this disease is 7 per 100 000 corresponding to 1076 cases/year [4].

To date, more than 200 HPV genotypes have been identified. About 40 of them infect the genital tract, of which 12 were classified as carcinogenic, one as “probably carcinogenic” and 12 as “possibly carcinogenic” to humans [5]. HPV types 16 and 18 are responsible for about 70 % of CC worldwide [6] and 60–70 % of high grade lesions, depending on the geographical area [7]. However, HPV infection of the uterine cervix does not always induce cellular abnormalities [8], indicating that other factors play a role in the development of cervical neoplasia. Human immunodeficiency virus (HIV) infection, another STI with extensive public health impact [9], shares many common behavioural risk factors with HPV infection. HPV and HIV coinfection increases the risk of neoplasia of the lower genital tract [10]. Women with HIV infection commonly harbor a broader range of HPV genotypes, often with multiple concurrent HPV infections, compared to HIV-negative women [11, 12]. HIV influences the natural history of HPV by increasing virulence and the likelihood of persistent infection, and also by hastening the time-course of HPV disease [13, 14].

In late 2013, it was estimated that there were 31 000 persons living with HIV in Morocco, with 50 % of the cases having been registered between 2006–2013. The Souss-Massa-Draa region of Morocco is one of the 5 areas with a high HIV burden accounting for 70 % of notified cases [15]. In the Souss area, women who attend public health-care clinics are most of the time not screened and not treated for HPV-associated lesions. Moreover, there is no epidemiological data available on HPV infection in this region and, as such, the prevalence of HPV infection remains unknown. Therefore, in the present study, we evaluated the prevalence and distribution of HPV genotypes, as well as cervical cytology results, in a hospital based-population of women from the Souss area according to demographic and lifestyle factors and HIV status which may influence HPV infection.

Patients and methods

Study population and sample collection

Data on cytology and HPV detection were obtained from 232 women 18 years and older who attended the Hassan II Hospital of Agadir between June 2014 and February 2015. Patients consulted physicians for gynecological care or for different clinical symptoms such as vaginal discharge, vaginal bleeding, vulva itching, lower abdominal and pelvic pain, infertility, menorrhagia, or other symptoms suggestive of gynecological disorders. Women who were virgin, pregnant or had a history of hysterectomy were excluded from the study. More than 80 % of the study population have been diagnosed with or without HIV infection in a free and anonymous screening centre (CIDAG) and HIV status was noted in medical records.

Women received counselling regarding HPV infection and cervical cancer screening. They underwent a pelvic examination and cervical samples were obtained using an extended tip “Ayre” spatula. After the conventional cervical smear was spread onto a glass slide, the tip of the spatula was broken off and placed in a container containing 3 mL of universal transport medium specimen (UTM™) and stored at -20 °C until HPV testing. Furthermore, interviews were conducted to record epidemiological data concerning socio-economic data (level of educational, employment), sexual activity (age at first intercourse, number of sexual partners, contraceptive use and duration), reproductive life (age at first pregnancy, number of births and miscarriages, menopause), past history of Pap smear tests, gynecological lesions and smoking.

Informed consent was obtained prior to enrollment of participants. The study was approved by the institutional board of the Hassan II Hospital of Agadir and conducted in accordance with good clinical practices to benefit the patient.

Cytology data

The smears were processed for Papanicolaou staining and analyzed according to the Bethesda classification as Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy (NILM) or epithelial cell abnormalities, LGSIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion) and HGSIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion).

DNA extraction from cervical samples

DNA extraction from cervical smears was performed using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Aliquots of 3 mL of samples were centrifugated at 4000 rpm for 10 min, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 400 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8). Then, 400 µL of AL buffer (Qiagen) and 40 µL proteinase K (Qiagen)

Table 1 Sociodemographic, behavioral, and clinical characteristics of Moroccan women participating in the study ($n = 232$)

Characteristic	n (%)
Age (years)	
<45	149 (64.2)
≥45	83 (35.8)
Educational level	
Illiterate	155 (66.8)
Primary school	38 (16.4)
Secondary and high school	39 (16.8)
Employment	
No	195 (84.0)
Yes	37 (16.0)
Marital status	
Married	130 (56.0)
Single + divorced + widowed	102 (44.0)
HIV status	
Negative	105 (45.3)
Positive	84 (36.2)
Unknown	43 (18.5)
Age at first intercourse (years)	
≥20	100 (43.1)
17–19	66 (28.4)
≤16	66 (28.4)
Age at first pregnancy (years)	
≤ 18	97 (41.8)
> 18	135 (58.2)
Number of live births	
0–1	83 (35.8)
2–3	96 (41.4)
≥4	53 (22.8)
Number of miscarriage	
0	149 (64.2)
≥1	83 (35.8)
Lifetime sexual partners	
Single	154 (66.4)
Multiple	78 (33.6)
History of contraception use	
No	57 (24.6)
Yes	175 (75.4)
Oral contraceptive use	
No	77 (33.2)
Yes (alone or in combination)	155 (66.8)
Intra-uterine device use	
No	221 (95.2)
Yes (alone or in combination)	11 (4.8)

Table 1 Sociodemographic, behavioral, and clinical characteristics of Moroccan women participating in the study ($n = 232$) (Continued)

Condom use	
No	192 (82.8)
Yes (alone or in combination)	40 (17.2)
Duration of oral contraceptive use (years)	
< 5	114 (49.1)
≥ 5	118 (50.9)
Smoking exposure	
No	208 (89.7)
Yes	24 (10.3)
Past history of gynecological lesions ^a	
No	202 (87.1)
Yes	30 (12.9)
Menopause	
No	190 (81.9)
Yes	42 (18.1)
Number of Pap smears	
Never	189 (81.5)
≥1	43 (18.5)
Pap smear ^b	
NILM	190 (81.9)
LGSIL	30 (12.9)
HGSIL	12 (5.2)

Abbreviations: HIV Human Immunodeficiency Virus, NILM Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, LGSIL Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HGSIL High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion

^aPast history of gynecological lesions includes 3 anal warts, 3 vulvar condylomas, 7 uterine polyps, 2 myomas, 3 fibromas and 12 ovarian cysts

^bPerformed at entrance in the study

were added and the mix was digested overnight at 56 °C. All lysates were processed according to the manufacturer's instructions; DNA was eluted in 80 µL of elution buffer and stored at -20 °C until use.

The quality of extracted DNA was controlled by PCR amplification of the β-globin gene using the primers PC04 (5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3') and GH20 (5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3'), which gives a fragment of 265 bp.

Human Papillomavirus DNA detection and genotyping

HPV DNA was detected by a standard polymerase chain reaction (PCR) protocol with consensus primer pair MY09/MY11 (5'-CGT-CCM-ARR-GGA-WAC-TGA-TC-3' and 5'-GCM-CAG-GGW-CAT-AA-Y-AAT-GG-3'), allowing the production of 450-bp fragments in the HPV L1 open reading frame and the detection of more than 40 low- and high-risk genital HPV types [16]. Identification of HPV genotype(s) in samples positive

for HPV DNA by MY09/11 PCR was done using the INNO-LiPA HPV Genotyping Extra® (Fujirebio, Courtaboeuf, France).

HPV genotyping was centrally performed at the Department of Cellular and Molecular Biology at the University Hospital of Besançon (France) according to the manufacturer's instructions. The genotyping test allows the detection of 28 HPV genotypes: 18 high risk (hr) HPV and probable hr (phr) types (HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 and 82), 7 low-risk (lr) (HPV-6, 11, 40, 43, 44, 54 and 70) and 3 HPV types not classified (HPV-69, 71 and 74). HPV amplimers which did not hybridize to any specific probe were considered as uncharacterized (HPVX) [17].

Statistical analysis

Quantitative and qualitative variables were described as number and percentages. The distribution of HPV genotypes was summarized using frequency distribution and stratified by cytology results (NILM, LGSIL, and HGSIL). Univariate and multivariate logistic regression models were used to identify risk factors associated successively with HPV infection (any HPV and/or hr and phrHPV) and abnormal cytology. Odds ratios (ORs) and 95 % confidence intervals (CI) were used to quantify the association between risk factors and positivity for any HPV and/or hr and phrHPV genotypes or abnormal cytology. A p -value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, North California, USA).

Results

Patient characteristics

Among the study population, 84/232 (36.2 %) women were diagnosed HIV-positive and 105/232 (45.3 %) HIV-negative. HIV status was unknown for 43/232 (18.5 %) women. Table 1 describes the sociodemographic, behavioral and clinical variables. Median age was 42 years (range 18-76). The majority of women were illiterate (66.8 %) and unemployed (84.1 %). More than half were married (56 %), had their first intercourse at age less than 20 (56.8 %), had their first pregnancy after 18 years of age (58.2 %). About 41 % of women had two or three live births, and 36 % reported one miscarriage or more. The majority (66.4 %) reported that they had only one lifetime sexual partner. A history of contraceptive use was noted in three quarters of women (75.4 %) and 51 % of women said they took oral contraception over a period of more than 5 years. According to their answers, 10.3 % of women were smokers, 13 % had past history of gynecological lesions including anal warts, vulvar condylomas, ovarian cysts, uterine polyps, myomas and fibromas and 18 % were postmenopausal. With regard to

the history of cervical cancer screening, 81.5 % of the women had never had a Pap smear.

As regards the results of the Pap smears, 190 (81.9 %, 95 % CI [76.9 – 86.9]) were NILM, 30 (12.9 %, 95 % CI [8.6 – 17.2]) were LGSIL and 12 (5.2 %, 95 % CI [2.3 – 8.1]) were HGSIL. In this series, no cervical cancer was detected.

HPV detection and genotyping

HPV DNA was detected in 23.7 % (55/232) of the cases but 3 samples (1.3 %) could not be genotyped because they did not match any of the specific probes of the assay (HPVX); thus specific HPV genotypes were available

Table 2 Distribution of specific Human Papillomavirus (HPV) genotypes in all infections (single or multiple) tested in 55 Moroccan women from the Souss area, Morocco

HPV genotypes	Total n (%)	NILM n (%)	LGSIL n (%)	HGSIL n (%)
hrHPV				
16	15 (6.5)	4 (2.1)	7 (23.3)	4 (33.3)
18	7 (3.0)	2 (1.1)	2 (6.7)	3 (25.0)
31	6 (2.6)	4 (2.1)	2 (6.7)	-
33	6 (2.6)	1 (0.5)	4 (13.3)	1 (8.3)
35	2 (0.9)	2 (1.1)	-	-
39	4 (1.7)	2 (1.1)	2 (6.7)	-
45	2 (0.9)	2 (1.1)	-	-
51	5 (2.2)	5 (2.6)	-	-
52	7 (3.0)	5 (2.6)	2 (6.7)	-
56	6 (2.6)	4 (2.1)	1 (3.3)	1 (8.3)
58	5 (2.2)	4 (2.1)	-	1 (8.3)
68	1 (0.4)	1 (0.5)	-	-
82	3 (1.3)	2 (1.1)	1 (3.3)	-
phr HPV				
26	3 (1.3)	2 (1.1)	-	1 (8.3)
53	8 (3.4)	5 (2.6)	3 (10.0)	-
66	5 (2.2)	4 (2.1)	1 (3.3)	-
lrHPV				
6	5 (2.2)	3 (1.6)	2 (6.7)	-
11	1 (0.4)	-	1 (3.3)	-
44	3 (1.3)	3 (1.6)	-	-
54	7 (3.0)	7 (3.7)	-	-
70	4 (1.7)	2 (1.1)	2 (6.7)	-
Additional HPV				
69/71	5 (2.2)	2 (1.1)	3 (10.0)	-
74	8 (3.4)	7 (3.7)	1 (3.3)	-
HPVX	9 (3.9)	8 (4.2)	-	1 (8.3)

NILM Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy, LGSIL Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HGSIL High Grade Squamous Intraepithelial Lesion

Table 3 Association between infection by any HPV and by hr and phrHPV types and cytology results among Moroccan women from the Souss area, Morocco

Cytology	n (%)	HPV+ n (%)	OR [95 % CI]	p-value	hr and phr ^a n (%)	OR [95 % CI]	p-value
NILM	190 (81.9)	33 (17.4)	1.00		27 (14.2)	1.00	
LGSIL	30 (12.9)	13 (43.3)	4.25 [1.76–10.26]	0.001	12 (40.0)	4.02 [1.74–9.28]	0.001
HGSIL	12 (5.2)	9 (75.0)	13.97 [3.24–60.26]	<0.001	9 (75.0)	18.10 [4.60–71.16]	<.0001

^ahr and phrHPV types: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68 and 82. NILM, Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy; LGSIL, Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion; HGSIL, High Grade Squamous Intraepithelial Lesion

for 52 cases. Eighteen women (34.6 %) were infected by a single HPV genotype and 34 (65.4 %) by multiple HPV genotypes. Among women with multiple genotypes, there were 15 women with dual infection (44.1 %), 9 women with triple infection (26.5 %), 4 women with 4 genotypes (11.7 %) and 6 women with 5 or more genotypes (17.6 %). Multiple infections were only half as frequent in HGSIL (33.3 %, 3/9) as in LGSIL (69.2 %, 9/13) and NILM smears (66.6 %, 22/33).

The distribution of HPV genotypes tested in this study is shown in Table 2. HPV16 was the most prevalent genotype among the study population with 4 mono-infected women and 11 women with mixed infections giving a total prevalence of 6.5 % (15/232). HPV53 and HPV74 were the second most frequent genotypes in the overall population (3.4 %, 8/232 each).

After stratifying by Pap cytology, HPV was found in 17.4 % (33/190) of women with NILM smear, in 43.3 % (13/30) of LGSIL and in 75 % (9/12) of HGSIL. Twenty two specific genotypes were detected in NILM smears, 15 in LGSIL and only 6 in HGSIL namely HPV16, 18,

26, 33, 56 and 58. The grade of cytological abnormalities was highly associated with hr and phrHPV genotypes ($p = 0.001$ for LGSIL and $p < 0.0001$ for HGSIL) (Table 3). HPV16 was detected in 2.1 % (4/190) of NILM, 23.3 % (7/30) of LGSIL and 33.3 % (4/12) of HGSIL. HPV18 was the second most prevalent HPV genotype in HGSIL (25 %, 3/12) (Table 2).

After excluding women whose HIV status was unknown, the prevalence of HPV infection was 39.3 % (33/84, 95 % CI 28.8-49.7) in HIV infected women and 13.3 % (14/105, 95 % CI 6.8-19.8) in HIV-negative women. Type-specific HPV distribution in the series of HIV-positive women is shown in Fig. 1; a total of 23 individual HPV types were detected at a frequency of more than 3.0 % in this population. The prevalence of multiple HPV types was higher in HIV-positive women (75.7 % (25/33), 95 % CI 66.5-84.8) compared to HIV-negative women (57.1 % (8/14), 95 % CI 47.6 -66.5). Among the HIV population, HPV DNA was found in 32.2 % (20/62) of NILM smears, 42.8 % (6/14) of LGSIL and 87.5 % (7/8) of HGSIL.

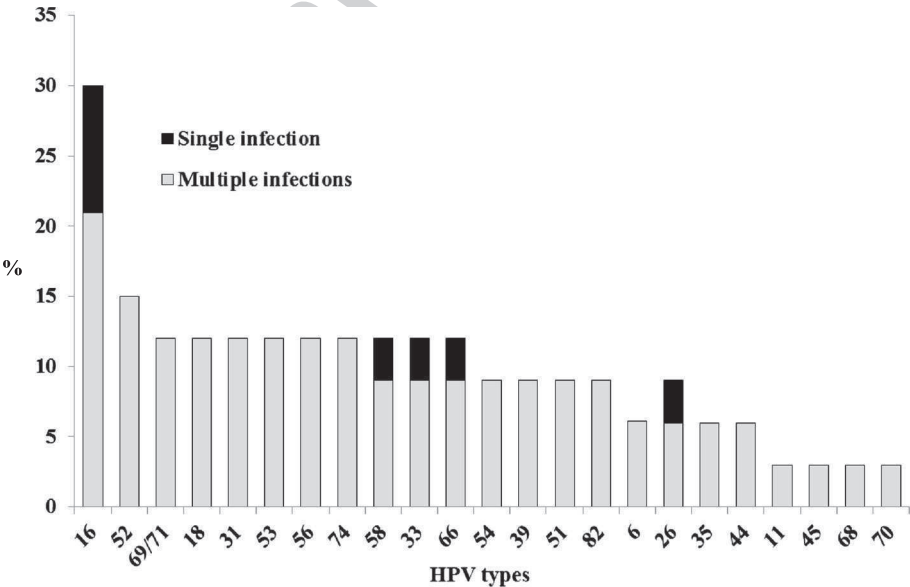


Fig. 1 Distribution of HPV genotypes among the 33 HIV+/HPV+ Moroccan women from the Souss area, Morocco. The prevalence of HPV genotypes was calculated by dividing the number of women harboring specific HPV genotype as a single infection (black bars) or multiple infections (grey bars) by the number of HIV+/HPV+ women

Table 4 Univariate model for identification of factors associated with any HPV, hr and phrHPV genotypes and the presence of abnormal Pap smear

Characteristic	HPV+			hr and phrHPV ^a			Abnormal Pap**		
	n (%)	OR (95 % CI)	p-value	n (%)	OR (95 % CI)	p-value	n (%)	OR (95 % CI)	p-value
Age (years)									
≥ 45	18 (21.7)	1.00		17 (20.5)	1.00		19 (22.9)	1.00	
<45	37 (24.8)	1.19 [0.63–2.26]	0.59	31 (20.8)	1.02 [0.53–1.98]	0.95	23 (15.4)	0.43 [0.22–0.85]	0.01
Educational level									
Secondary and high school	9 (23.1)	1.00		7 (17.9)	1.00		2 (5.1)	1.00	
Primary school	6 (15.8)	0.60 [0.19–1.91]	0.39	4 (10.5)	0.52 [0.14–1.95]	0.33	7 (18.4)	8.35 [0.97–71.65]	0.05
Illiterate	40 (25.8)	1.12 [0.49–2.57]	0.79	37 (23.9)	1.39 [0.57–3.41]	0.47	33 (21.3)	10.00 [1.32–75.68]	0.02
Employment									
Yes	8 (21.6)	1.00		8 (21.6)	1.00		1 (2.7)	1.00	
No	47 (24.1)	1.15 [0.49–2.69]	0.75	40 (20.5)	0.94 [0.40–2.20]	0.88	41 (21)	9.58 [1.27–72.00]	0.03
Marital status									
Married	26 (20.0)	1.00		21 (16.1)	1.00		18 (13.8)	1.00	
Single + divorced + widowed	29 (28.4)	1.59 [0.87–2.92]	0.14	27 (26.5)	1.87 [0.98–3.55]	0.05	24 (23.5)	1.51 [0.77–2.96]	0.22
HIV status									
Negative	14 (13.3)	1.00		13 (12.4)	1.00		12 (11.4)	1.00	
Positive	33 (39.3)	4.21 [2.06–8.58]	<0.0001	29 (34.5)	3.73 [1.79–7.78]	0.0004	22 (26.2)	2.75 [1.27–5.96]	0.01
Age at first intercourse (years)									
≥20	23 (23.0)	1.00		20 (20)	1.00		14 (14)	1.00	
17–19	14 (21.2)	1.15 [0.50–2.64]	0.73	12 (18.2)	1.65 [0.72–3.82]	0.24	12 (18.2)	1.60 [0.63–4.09]	0.32
≤16	18 (27.3)	1.61 [0.73–3.56]	0.24	16 (24.2)	1.15 [0.48–2.77]	0.76	16 (24.2)	2.31 [0.94–5.66]	0.06
Age at first pregnancy (years)									
> 18	28 (20.7)	1.00		24 (17.7)	1.00		22 (16.3)	1.00	
≤ 18	32 (32.9)	1.47 [0.8–2.71]	0.21	24 (24.7)	1.52 [0.80–2.98]	0.20	20 (20.6)	1.19 [0.60–2.32]	0.62
Number of live births									
0–1	22 (26.5)	1.00		18 (21.7)	1.00		14 (63.6)	1.00	
2–3	23 (23.9)	0.87 [0.44–1.72]	0.69	21 (21.9)	1.01 [0.50–2.06]	0.97	21 (21.9)	1.38 [0.65–2.92]	0.40
≥4	10 (18.8)	0.65 [0.28–1.50]	0.30	9 (17)	0.74 [0.30–1.79]	0.50	7 (13.2)	0.75 [0.28–2.00]	0.56
Number of miscarriage									
0	33 (22.1)	1.00		27 (18.1)	1.00		19 (12.7)	1.00	
≥1	22 (26.5)	1.27 [0.68–2.36]	0.45	21 (25.3)	1.53 [0.80–2.92]	0.20	23 (27.7)	2.06 [1.05–4.06]	0.03
Number of sexual partners									
Single	33 (21.4)	1.00		26 (16.8)	1.00		27 (17.5)	1.00	
multiple	22 (28.2)	1.44 [0.77–2.69]	0.25	21 (26.9)	1.93 [1.01–3.70]	0.04	15 (19.2)	0.86 [0.42–1.77]	0.68
History of contraception use									
No	11 (19.3)	1.00		10 (17.5)	1.00		9 (15.8)	1.00	
Yes	44 (25.1)	0.40 [0.67–2.95]	0.37	38 (21.7)	1.30 [0.60–2.82]	0.50	33 (18.8)	1.05 [0.48–2.30]	0.89
Oral contraceptive use									
No	16 (20.7)	1.00		14 (18.2)	1.00		13 (16.8)	1.00	
Yes (alone or in combination)	39 (25.1)	1.28 [0.66–2.48]	0.46	34 (21.9)	1.26 [0.63–2.53]	0.51	29 (18.7)	0.87 [0.43–1.75]	0.70
Condom use									
No	44 (22.9)	1.00		38 (19.8)	1.00	0.46	35 (18.2)	1.00	
Yes (alone or in combination)	11 (27.5)	1.28 [0.59–2.76]	0.54	10 (25)	1.35 [0.61–3.00]		7 (17.5)	1.16 [0.49–2.74]	0.73

Q5

Table 4 Univariate model for identification of factors associated with any HPV, hr and phrHPV genotypes and the presence of abnormal Pap smear (*Continued*)

t4.47	Smoking exposure									
t4.48	No	46 (22.1)	1.00		39 (18.7)	1.00		36 (17.3)	1.00	
t4.49	Yes	9 (37.5)	2.11 [0.87–5.14]	0.1	9 (37.5)	2.60 [1.06–6.37]	0.03	6 (25)	0.89 [0.29–2.77]	0.84
t4.50	History of gynecological lesions									
t4.51	No	49 (24.2)	1.00		43 (21.3)	1.00		36 (17.8)	1.00	
t4.52	Yes	6 (20.0)	1.28 [0.50–3.31]	0.61	5 (16.7)	1.35 [0.49–3.74]	0.56	6 (20)	1.12 [0.4–3.12]	0.82
t4.53	Menopause									
t4.54	No	47 (24.7)	1.00		40 (21)	1.00		33 (17.3)	1.00	
t4.55	Yes	8 (19.0)	1.40 [0.60–3.23]	0.43	8 (19)	1.13 [0.49–2.64]	0.77	9 (21.4)	0.55 [0.25–1.20]	0.13
t4.56	Number of Pap smears									
t4.57	never	48 (25.4)	1.00		41 (21.7)	1.00		37 (19.5)	1.00	
t4.58	≥1	7 (16.3)	0.57 [0.24–1.37]	0.21	7 (16.3)	0.70 [0.29–1.69]	0.43	5 (11.6)	0.54 [0.20–1.47]	0.22

t4.59 ^ahr and phrHPV types: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68 and 82. NILM, Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy; LGSIL, Low Grade
t4.60 Squamous Intraepithelial Lesion; HGSIL, High Grade Squamous Intraepithelial Lesion

264 Risk factors

265 The association between any HPV, hr and phrHPV,
266 abnormal smear and sociodemographic characteristics as
267 well as sexual behavior was also investigated in the
268 population. By univariate analysis, hr and phrHPV ge-
269 notypes were associated with number of sexual part-
270 ners ($p = 0.04$), smoking exposure ($p = 0.03$) and HIV
T4 271 infection ($p = 0.0004$) (Table 4). By multivariate ana-
272 lysis, HIV positivity was associated with a significantly
273 increased risk of hr and phrHPV infection (OR 4.16,
274 95 % CI 1.87–9.24, $p = 0.0005$) after adjustment for
275 educational level, marital status, age at first preg-
276 nancy, number of miscarriages, number of sexual
T5 277 partners and smoking exposure (Table 5).

278 In a second univariate analysis, abnormal Pap smears
279 were associated with unemployment (OR 9.58, 95 % CI
280 1.27–72.00, $p = 0.03$), number of miscarriages (OR 2.06,
281 95 % CI 1.05–4.06, $p = 0.03$) and HIV infection (OR 2.75,
282 95 % CI 1.27–5.96, $p = 0.01$) (Table 4). By multivariate
283 analysis, HIV positivity and number of miscarriages were
284 associated with a significant increase in the risk of
285 abnormal Pap smears (OR 3.98, 95 % CI 1.39–11.40,
286 $p = 0.01$; OR 2.84, 95 % CI 1.14–7.12, $p = 0.02$ respect-
287 ively) after adjustment for age, educational level, em-
288 ployment, age at first intercourse, menopause and
T6 289 number of Pap smears (Table 6).

290 Discussion

291 In Morocco, cervical cancer (CC) is the second cause of
292 cancer deaths in women after breast cancer, and repre-
293 sents a major public health problem. Here, we observed
294 that more than 80 % of women had never been screened
295 for CC, and the prevalence of HPV infection was high
296 (23.7 %), with differences according to HIV status. In-
297 deed, the rate of HPV was 13.3 % in HIV-negative

Table 5 Multivariate analysis^a of the characteristics associated with hr and phrHPV types

Characteristics	OR (95 % CI)	p-value	
Educational level			t5.4
Secondary and high school	1.00		t5.5
Primary school	0.51 [0.12–2.05]	0.34	t5.6
Illiterate	1.35 [0.49–3.68]	0.56	t5.7
Marital status			t5.8
Married	1.00		t5.9
Single or divorced or widowed	1.17 [0.50–2.73]	0.72	t5.10
HIV status			t5.11
Negative	1.00		t5.12
Positive	4.16 [1.87–9.24]	0.0005	t5.13
Age at first pregnancy (years)			t5.14
> 18	1.00		t5.15
≤ 18	1.41 [0.66–3.03]	0.38	t5.16
Number of miscarriages			t5.17
0	1.00		t5.18
≥1	0.96 [0.45–2.07]	0.92	t5.19
Number of sexual partners			t5.20
Single	1.00		t5.21
Multiple	0.71 [0.30–1.70]	0.44	t5.22
Smoking exposure			t5.23
No	1.00		t5.24
Yes	2.04 [0.65–6.42]	0.22	t5.25

^aThe model included all variables with a p-value ≤ 0.2 by univariate analysis

t5.26

Table 6 Multivariate analysis* of the characteristics associated with an abnormal cytology (Low Grade and High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

Characteristics	OR [95 % CI]	p-value
Age (years)		
<45	1.00	
≥ 45	0.30 [0.09–1.01]	0.052
Educational level		
Secondary and high school	1.00	
Primary school	3.77 [0.44–32.36]	0.23
Illiterate	3.18 [0.30–33.71]	0.34
Employment		
No	1.00	
Yes	5.86 [0.69–50.13]	0.11
HIV status		
Negative	1.00	
Positive	3.98 [1.39–11.40]	0.01
Age at first intercourse (years)		
≥20	1.00	
17–19	2.41 [0.64–9.08]	0.19
≤16	2.43 [0.69–8.60]	0.17
Number of miscarriages		
0	1.00	
≥1	2.84 [1.14–7.12]	0.02
Menopause		
No	1.00	
Yes	1.33 [0.35–5.12]	0.68
Number of Pap smears		
Never	1.00	
≥1	0.74 [0.20–2.66]	0.64

*The model included all variables with a p-value ≤ 0.2 by univariate analysis as well as variables considered to be important (Pap screening)

high HPV prevalence, especially misconceptions and beliefs that prevent people from discussing diseases of the genital tract.

In our study, HPV16 was the most prevalent genotype among the overall HPV-positive population, followed by HPV53 and HPV74. This is in line with studies from around the world, where HPV16 was identified as the most common hrHPV [24–26]. HPV16 and HPV18 represented 3.3 % in NILM smears, 30 % in LGSIL and 58.3 % of HGSIL (Table 2). This finding is consistent with data published recently by the Morocco-ICO Information Centre on HPV and Cancers [4]. Bearing in mind that HPV16 and 18 are responsible for about 70 % of CC cases [3, 27, 28], we suggest the need for HPV screening and anti-HPV vaccination as a primary preventive measure among Moroccan women.

We noted that low risk HPV types were found in 8 % of women with NILM smears and 16.7 % of women with LGSIL but not in women with HGSIL. This confirms that hrHPV rarely cause CIN3 or cancer [29–31].

Interestingly, in the present study, multiple HPV infections were observed in 65.4 % of HPV-positive specimens, but only in 33.3 % of HGSIL cases. Meftah el khair *et al.* reported 34 % of multiple infections in CC from Moroccan women [32]. Co-infection with multiple HPV genotypes has been described in many molecular epidemiologic studies [33–35] and confers an increased risk of high-grade lesions and invasive cervical cancer [36]. This has recently been confirmed in a study including 5,871 sexually active women aged 18–25 years from Costa Rica, in which Chaturvedi *et al.* reported that women with multiple infections were at significantly increased risk of CIN2+ and HGSIL+ as compared with those with single infections [34]. The present findings provide evidence that women with multiple infections should be closely monitored to prevent progression to CC especially in the context of co-infection with HIV.

Reported data on smoking and sexual behavior may be biased because the women may give what is believed to be the desired or socially acceptable answers. This would result in the absence of association between known risk factors with HPV infection in our population.

By contrast, a significant association was found between HIV infection and hr and phrHPV as well as between HIV infection and abnormal cytology. An important clinical consequence of our results is that HIV appears to be the strongest risk factor for HPV infection, independently of the usual socio-demographic and behavioural risk factors.

In the Souss area, the burden of HIV/AIDS is high. In female sex-workers, the prevalence of HIV is above 5 % in Agadir [15]. In recent years, HIV-infected women were referred from the infectious diseases department of the Hassan II Hospital in Agadir to the pathology

women and 39.3 % in HIV-positive women. Three Moroccan studies in patients attending the Hospital in Rabat [18, 19] and Casablanca [20] reported results similar to ours. The overall prevalence of HPV was lower (6 %) in the study by Amrani *et al.*, but the number of cytological intraepithelial lesions was low (2.5 % LGSIL and 0.7 % HGSIL) [21] compared to our series (12.9 % of LGSIL and 5.2 % of HGSIL). By contrast, the rate of HPV was high in two geographical areas with high incidence of CC (according to the Rabat and Casablanca Cancer Registries), reaching 32 % in a series of women living in Rabat [22] and 42.5 % in women with normal cytology native of north-central of Morocco [23]. We cannot exclude a bias in the latter studies that did not report HIV status of women. As in most developing countries, some cultural factors can be related to this

department of the same Hospital for CC screening at no cost. To the best of our knowledge, there are no previously published studies from Morocco that have investigated the prevalence of HPV genotypes in the population of HIV-positive women, and the relationship between HPV, HIV and cervical cytology. The prevalence of HPV infection in HIV+ women with normal smears (32.2 %) is quite similar to that published in the meta-analysis of Clifford *et al.* reporting a 36.3 % HPV prevalence among 3230 HIV-infected women with no cytological abnormalities [11]. Moreover, multiple infections were found in 75.7 % of HIV-positive women. This is in agreement with the study of Stuardo *et al.* who reported 78.4 % of multiple infections in HIV-infected Spanish women [37] and consistent with data from other studies showing that HIV-infected women not only have a higher prevalence of HPV infection, but are also infected by a wider variety of HPV types than HIV-negative [11, 38, 39]. This has been attributed to lower clearance of HPV [10, 40] or continued sexual exposure to novel HPV types allowing different viral types to settle in the cervical epithelium. Multiple infections could also be due to the reduced systemic and local immunity in HIV-positive women [41].

This study has limitations. The limited number of women included in the study may explain the absence of significant relationship between HPV infection and classical risk factors such as sexual habits. Furthermore, the study population is not representative of the general population of the Souss area. However, this pilot study on a hospital based-population in Agadir is groundwork and a great opportunity to define a more complete research in the future.

In summary, the high prevalence of HPV infection and the diverse distribution of HPV genotypes among Moroccan women from the Souss area emphasizes the need to implement CC screening programs and HPV vaccination for primary prevention [42].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived, coordinated, and supervised the study: CM, JLP and SC. Contributed to the recruitment of the participants and to the acquisition of the clinical and epidemiological data: EB, BM and MA. Coordinated and contributed to the laboratory testing for HPV-DNA and HPV genotyping: EB, HE, CM, and JLP. Conducted the statistical analysis: EB and MM. Evaluated the results, contributed to the conception and design of the study, secured study funding and wrote the manuscript: EB, CM, JLP and SC. All the authors read, revised, and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the pathology department of Hassan II Hospital for technical support and data collection. We are indebted to E. Chezy for excellent technical assistance with INNO-LiPA[®] Genotyping assay. We are grateful to F. Ecarnot (EA3920, University Hospital Besançon, France) for critical revision of this manuscript. Financial support for this work

was provided by the University of Franche-Comté, Ligue Contre le Cancer (CCIR-GE) and Doctoral School "Environnements-Santé", Besançon, France. Mrs E. Belglaiaa is a recipient of a predoctoral scholarship from the Moroccan Ministry of Higher Education and Scientific Research, and was also granted two scholarships from the Association Française des Femmes Diplômées des Universités (AFFDU), Dole and Besançon, France.

Author details

¹Laboratoire de Biologie Cellulaire et Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc. ²EA 3181, Lab Ex LipSTIC ANR-11-LABX-0021, Université de Franche-Comté UBFC, F-25000 Besançon, France. ³Laboratoire de biologie moléculaire, 5ème Hôpital Militaire, Guelmim, Maroc. ⁴Service d'anatomopathologie, Hôpital Hassan II, Agadir, Maroc. ⁵Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Inserm CIC 1431, CHRU Jean Minjoz, Boulevard Fleming, 25000 Besançon, France.

Received: 13 July 2015 Accepted: 21 October 2015

References

- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796–802.
- 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(6):518–27. doi:10.1056/NEJMoa021641.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12–9. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F.
- ICO Information Centre on HPV and Cancer. Human Papillomavirus and related cancers. Institut Català d'Oncologia. Fact Sheet 2014 (Dec 15). http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/MAR_FS.pdf 2014.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321–2.
- Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer.* 2004;111(2):278–85. doi:10.1002/ijc.20244.
- Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/26–34. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.026.
- de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklav H, Wahrendorf J, et al. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet.* 1987;2(8561):703–6.
- McClelland RS, Ndinya-Achola JO, Baeten JM. Re: distinguishing the temporal association between women's intravaginal practices and risk of human immunodeficiency virus infection: a prospective study of South African women. *Am J Epidemiol.* 2007;165(4):474–5. doi:10.1093/aje/kwk101. author reply 5–6.
- Ferenczy A, Coutlee F, Franco E, Hankins C. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ.* 2003;169(5):431–4.
- Clifford GM, Goncalves MA, Franceschi S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis. *AIDS.* 2006;20(18):2337–44. doi:10.1097/01.aids.0000253361.63578.14.
- Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(8):577–86. doi:10.1093/jnci/dji073.
- Chaturvedi AK, Madeleine MM, Biggar RJ, Engels EA. Risk of human papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(16):1120–30. doi:10.1093/jnci/djp205.
- De Vuyst H, Lillo F, Broutet N, Smith JS. HIV, human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev.* 2008;17(6):545–54. doi:10.1097/CEJ.0b013e3282f75ea1.

Q7

- 491 15. Rapport national 2014. Mise en œuvre de la déclaration politique sur le VIH/
492 sida. Royaume du Maroc, Ministère de la Santé. [www.unaids.org/sites/
493 default/files/country/documents/MAR_narrative_report_2014.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/MAR_narrative_report_2014.pdf). 2014.
- 494 16. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of
495 polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human.
496 *Cancer Cells*. 1989;7:209–14.
- 497 17. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global
498 burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic
499 analysis. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):607–15. doi:10.1016/s1470-2045(12)70137-7.
- 500 18. Alhamany Z, El Mzibri M, Kharbach A, Malihi A, Abouqal R, Jaddi H, et al.
501 Prevalence of human papillomavirus genotype among Moroccan women
502 during a local screening program. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4(11):732–9.
- 503 19. Chaouki N, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, El Gueddari B, El Ghazi A, et al.
504 The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. *Int J Cancer*.
505 1998;75(4):546–54.
- 506 20. EL Gnaoui N, Benchakroun N, Benider A, Hassar M, Saile R, Benoma H.
507 Typing of human papillomavirus and evaluation of risk factors associated
508 with cervical cancer in Morocco. *Eur J Sci Res*. 2009;31:229–36.
- 509 21. Amrani M, Lalaoui K, El Mzibri M, Lazo P, Belabbas MA. Molecular detection
510 of human papillomavirus in 594 uterine cervix samples from Moroccan
511 women (147 biopsies and 447 swabs). *J Clin Virol*. 2003;27(3):286–95.
- 512 22. Birrou K, Tagajdid R, Elannaz H, Elkochri S, Abi R, Zouhdi M, et al. Human
513 papillomavirus genotype prevalence and distribution among Moroccan
514 pregnant women. *Int J Res Med Sci*. 2015;3:95–9.
- 515 23. Bennani B, Bennis S, Nejari C, Ouafik L, Melhouf MA, El Rhazi K, et al.
516 Correlates of HPV: a cross-sectional study in women with normal cytology
517 in north-central Morocco. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6(7):543–50.
- 518 24. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, et al.
519 Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical
520 cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(17):1325–30.
- 521 25. Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH,
522 Fransen-Daalmeijer N, et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in
523 women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns
524 for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*. 2000;87(2):221–7.
- 525 26. Rolon PA, Smith JS, Munoz N, Klug SJ, Herrero R, Bosch X, et al. Human
526 papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int J
527 Cancer*. 2000;85(4):486–91.
- 528 27. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al.
529 Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and
530 type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*. 2008;26 Suppl
531 10:K1–16. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.064.
- 532 28. Usubutun A, Alemany L, Kucukali T, Ayhan A, Yuce K, de Sanjose S, et al. Human
533 papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J
534 Gynecol Pathol*. 2009;28(6):541–8. doi:10.1097/PGP.0b013e3181aaba0d.
- 535 29. Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, et al.
536 Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and
537 cervical neoplasia in Guanacaste. *Costa Rica J Infect Dis*.
538 2005;191(11):1796–807. doi:10.1086/428850.
- 539 30. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Charlot JF, Bouhour D, Kantelip B, et al.
540 Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical
541 cancers in France: EDITH study. *Int J Cancer*. 2008;122(2):428–32.
542 doi:10.1002/ijc.23092.
- 543 31. Pretet JL, Jacquard AC, Carcopino X, Monnier-Benoit S, Averous G,
544 Soubeyrand B, et al. Human papillomavirus genotype distribution in high
545 grade cervical lesions (CIN 2/3) in France: EDITH study. *Int J Cancer*.
546 2008;122(2):424–7. doi:10.1002/ijc.23093.
- 547 32. Meftah el khair M, Ait Mhand R, Mzibri ME, Ennaji MM. Risk factors of
548 invasive cervical cancer in Morocco. *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)*.
549 2009;55:OL1175–85.
- 550 33. Carrillo-Garcia A, Ponce-de-Leon-Rosales S, Cantu-de-Leon D,
551 Fragoso-Ontiveros V, Martinez-Ramirez I, Orozco-Colin A, et al. Impact
552 of human papillomavirus coinfections on the risk of high-grade
553 squamous intraepithelial lesion and cervical cancer. *Gynecol Oncol*.
554 2014;134(3):534–9. doi:10.1016/j.jgyno.2014.06.018.
- 555 34. Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodriguez AC, Quint W, Schiffman
556 M, et al. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of
557 coinfection and risk of cervical disease. *J Infect Dis*. 2011;203(7):910–20.
558 doi:10.1093/infdis/jiq139.
- 559 35. Yang Z, Cuzick J, Hunt WC, Wheeler CM. Concurrence of multiple human
560 papillomavirus infections in a large US population-based cohort. *Am J
561 Epidemiol*. 2014;180(11):1066–75. doi:10.1093/aje/kwu267.
- 562 36. van der Graaf Y, Molijn A, Doornewaard H, Quint W, van Doorn LJ, van den
563 Tweel J. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia.
564 *Am J Epidemiol*. 2002;156(2):158–64.
- 565 37. Stuardo V, Agusti C, Godínez JM, Montoliu A, Torne A, Tarrats A, et al.
566 Human papillomavirus infection in HIV-1 infected women in Catalonia
567 (Spain): implications for prevention of cervical cancer. *PLoS One*.
568 2012;7(10):e47755. doi:10.1371/journal.pone.0047755.
- 569 38. Louie KS, de Sanjose S, Mayaud P. Epidemiology and prevention of
570 human papillomavirus and cervical cancer in sub-Saharan Africa: a
571 comprehensive review. *Trop Med Int Health*. 2009;14(10):1287–302.
572 doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02372.x.
- 573 39. Temmerman M, Tyndall MW, Kidula N, Claeys P, Muchiri L, Quint W. Risk
574 factors for human papillomavirus and cervical precancerous lesions, and the
575 role of concurrent HIV-1 infection. *Int J Gynaecol Obstet*. 1999;65(2):171–81.
- 576 40. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, et al.
577 Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency
578 virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst*.
579 1999;91(3):226–36.
- 580 41. Del Mistro A, Chieco BL. HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals.
581 *Eur J Cancer*. 2001;37(10):1227–35.
- 582 42. Riethmuller D, Jacquard AC, Lacau St Guily J, Aubin F, Carcopino X, Pradat P,
583 et al. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of
584 HPV-related diseases in France. *BMC Public Health*. 2015;15:453. doi:10.1186/
585 s12889-015-1779-1.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



587

588

Partie 3: Discussion et perspectives

Le cancer du col de l'utérus (CCU) demeure une problématique majeure pour la santé féminine dans le monde puisqu'il représente à ce jour le quatrième cancer féminin le plus fréquent. Les pays en voie de développement, où l'accès au dépistage est absent ou quasi limité, payent un lourd tribut à cette maladie qui représente la cause principale de mortalité chez les femmes. En revanche, dans les pays développés l'incidence du CCU a chuté depuis les années 1950 en raison de la pratique de dépistage.

Compte tenu, notamment, de son évolution lente et de l'existence de nombreuses lésions précancéreuses curables ainsi que de tests de dépistage et de diagnostic acceptables par la population et de stratégies de traitement disponibles, le CCU est un candidat idéal au dépistage.

A l'heure actuelle, la prévention du CCU repose sur le dépistage cytologique par frottis cervico-utérin (FCU) : les recommandations françaises émanant de l'HAS en 2010 préconisent un dépistage cytologique à partir de 25 ans avec un premier contrôle un an plus tard, puis une cytologie tous les trois ans en l'absence d'anomalie du frottis ou de manifestations cliniques, jusqu'à 65 ans. Au-delà de 65 ans, le dépistage peut cesser si les femmes ont été régulièrement surveillées et si deux frottis consécutifs, au minimum, étaient normaux. Le test HPV n'est indiqué et remboursé que dans le triage des frottis ASC-US (ANAES 2004).

Le risque du CCU le plus élevé est observé chez les femmes qui n'ont jamais eu de test de dépistage et chez celles qui n'ont eu qu'un seul examen de dépistage datant de plus de cinq ans. L'absence de surveillance joue donc un rôle prépondérant dans la survenue d'un CCU.

Ainsi, l'objectif de la première partie de ce travail de thèse était d'estimer la fréquence des frottis pathologiques et la prévalence des HPV-HR notamment HPV16, 18 et 45 dans une cohorte hospitalière de femmes françaises âgées de plus de 65 ans, qui n'avaient pas bénéficié de dépistage du CCU ou qui n'avaient pas suivi les recommandations du dépistage au cours leur vie.

Un taux élevé des frottis pathologiques peut être lié à la faible couverture de dépistage

Le CCU a un caractère progressif, débutant par des lésions intra-épithéliales pouvant progresser vers un cancer *in situ* puis vers un cancer invasif, à la suite d'un processus de longue durée. Notre étude a montré une prévalence très élevée d'anomalies cytologiques du col dans une cohorte française hospitalière de 796 femmes de plus de 65 ans et un taux non négligeable de lésions suggestives de cancers a été observé. Ces résultats sont en accord avec les données publiées par Mandelblatt *et al.* qui a rapporté 2% de frottis suspects dans une population de femmes âgées, noires et pauvres, résidant dans l'état de New York (Mandelblatt *et al.* 1993). En revanche, nos résultats sont différents de ceux trouvés par Meyer *et al.* qui a noté seulement un taux de 0,34% de lésions suggestives de cancers au sein d'une large cohorte de 53 644 femmes françaises âgées de 65 à 100 ans dont le rythme de suivi cytologique antérieur avait été normal et suffisant selon les recommandations françaises (Meyer *et al.* 2012). Il est intéressant de noter que la majorité de nos femmes étudiées (>85%) n'avaient pas à notre connaissance été dépistées pour le CCU, et une

minorité avait eu un FCU. Or les informations obtenues par notre recueil sont incomplètes pour différentes raisons :

Le dépistage a pu être effectué en dehors de l'hôpital et pas nécessairement selon les recommandations.

La démarche de dépistage, en France, est individuelle (ou spontanée) et repose sur la patiente et/ou son médecin. Historiquement, des expérimentations de dépistage organisé, financées par le Fonds National de Prévention, d'Éducation et d'Information Sanitaires (FNPEIS), ont été initiées en France au début des années 90 dans 4 départements disposant d'un registre du cancer, de façon à faciliter l'évaluation de l'activité de dépistage. Il s'agissait du Bas-Rhin, du Doubs, de la Martinique et de l'Isère (Institut National du Cancer 2007). En 2009, seules trois structures de gestion organisaient toujours le dépistage : l'Isère, l'Alsace (Bas-Rhin et Haut-Rhin) et la Martinique ; le département du Doubs a arrêté son programme de dépistage depuis fin 2004 en raison de difficultés organisationnelles. Donc, en l'absence de dépistage organisé, la pratique du dépistage est laissée à l'initiative de chaque médecin et de chaque femme. Une telle politique aboutit à ne surveiller que certaines femmes, c'est-à-dire en général les femmes jeunes consultant pour contraception, donc à faible risque de cancer invasif, et non les femmes plus âgées peu ou pas surveillées, alors que la majorité des cancers sont diagnostiqués chez des femmes de 50 ans et plus.

Les données d'assurance de santé sont écrasées tous les deux ans.

En France, il n'existe pas de registre national de dépistage du cancer du col dont le but serait de s'assurer que le suivi approprié a bien été réalisé. En revanche, il existe 2 grands types de registres des cancers : des registres généraux et des registres spécialisés (Figure 40), qui sont regroupés au sein du réseau FRANCIM. En 2011, la France métropolitaine disposait d'un réseau de 25 registres qualifiés par le CNR (Comité national des registres) :

- 13 registres généraux répartis dans 14 départements sur l'ensemble du territoire couvrent actuellement environ 20% de la population : Bas Rhin, Calvados, Doubs et territoire de Belfort, Gironde, Haut Rhin, Herault, Isère, Lille et sa région, Limousin, Pays de Loire Atlantique, Manche et Tarn.
- 9 registres spécialisés d'organes : digestif (Bourgogne, Calvados, Finistère), hémopathies malignes (Basse Normandie, Côte d'Or, Gironde), cancers du sein et gynécologiques (Côte d'Or), thyroïde (Marne Ardenne) et système nerveux central (Gironde).
- 2 registres nationaux des cancers de l'enfant : Registre national de l'hémopathie de l'enfant (RNHE) et registre national des tumeurs solides de l'enfant (RNTSE).

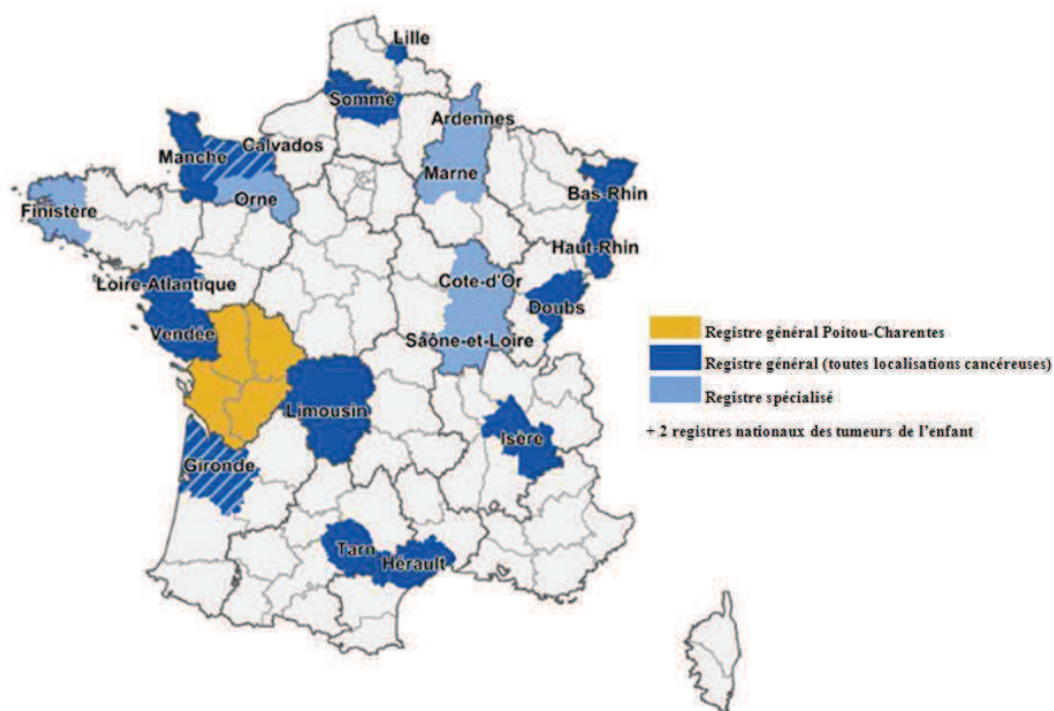


Figure 40 : Situation des registres du cancer en France métropolitaine

Le nombre de frottis annuels réalisés en France est estimé à 6 millions (en incluant les frottis en milieu hospitalier) (Institut National du Cancer 2007) dont 7 à 10 % après 65 ans (Flori et al. 2009 ; Loi de financement de la sécurité sociale 2010). Certains auteurs expliquent que ce volume de frottis suffirait à couvrir théoriquement la quasi-totalité de la population éligible, alors qu'il couvre environ 55% de la population (Rousseau et al. 2002) : ceci souligne le fait qu'une partie de la population est «sur-dépistée», alors qu'une autre partie n'est pas suivie.

En France, le taux de couverture baisse avec l'âge. Il est de 57-59% entre 25 et 44 ans, puis il diminue rapidement à 42% dans le groupe des 60 à 65 ans (DREES 2015). Une baisse du taux de couverture pourrait être en relation avec un taux non négligeable de lésions précancéreuses et cancéreuses tardives. A noter que la disparité dans la pratique du dépistage du CCU peut être due au niveau socioprofessionnel. Les femmes d'un niveau socioprofessionnel favorisé effectueraient plus souvent un FCU que les autres. En revanche, les femmes sans couverture médicale pratiqueraient moins fréquemment un FCU. Dans une étude consacrée à la santé des pauvres faite par l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (de Saint Pol 2007), il a été observé que 12% des femmes appartenant à un ménage modeste et qui avaient entre 20 et 70 ans n'avaient jamais réalisé de FCU. Une autre étude récente publiée par Chappuis *et al.* a noté que 33,1% de femmes favorisées âgées de 25 à 65 ans n'ont jamais effectué de frottis dans leur vie et que plus d'un tiers ne savaient pas ce que signifie un frottis de dépistage (Chappuis et al. 2014).

En outre, plusieurs études ont rapporté que l'arrêt de dépistage du CCU chez les femmes âgées peut conduire à des stades plus tardifs au moment du diagnostic et à un pronostic péjoratif (Brun et al. 2003 ; Ioka et al. 2005 ; Andrae et al. 2008 ; Spayne et al. 2008 ; Wright et al. 2005). Sur la base de ces données et sur le fait que les lésions précancéreuses régressent moins avec l'âge (van Oortmarssen et Habbema 1991), le dépistage des femmes à risque au-delà de 65 ans pourrait être encore plus efficace dans la réduction de l'incidence et la mortalité liée à ce cancer. Récemment, une étude cas-témoins réalisée sur des membres de deux plans de santé aux Etats-Unis a suggéré que la mise en œuvre du dépistage chez les femmes âgées de 65-79 ans a été associée à une réduction de 78-84% de risque du cancer invasif (Kamineni et al. 2013). Les lignes directrices américaines recommandent l'arrêt de dépistage à 65 ans, mais dans la pratique, le dépistage se poursuit jusqu'à 85 ans. En effet, Sirovich *et al.* a montré que 43% des femmes américaines âgées de plus de 65 ans avaient eu un dépistage cytologique (Sirovich et al. 2003). Même si le dépistage par frottis est très répandu chez les femmes âgées dans de nombreux pays, il devrait être intégré dans de nouvelles lignes directrices dans le cadre de l'augmentation de l'espérance de vie éventuellement en étendant les intervalles de dépistage final de 5 à 10 ans (Castañón et al. 2014).

Taux élevé des HPV-HR chez les femmes âgées sous-dépistées

Nous avons constaté qu'il existait un pourcentage élevé des HPV-HR au sein de notre population à risque, une prévalence de 22,7% comparable à celle retrouvée dans une cohorte de femmes italiennes de plus de 60 ans (Centurioni et al. 2005). Un taux élevé des HPV-HR chez les femmes âgées pourrait refléter une plus grande exposition antérieure aux HPV (effet cohorte de la génération de la révolution sexuelle). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que les femmes âgées ayant de nouvelles relations sexuelles assez tardivement dans la vie, soient exposées à une nouvelle infection aux HPV. En outre, la baisse du système immunitaire avec le vieillissement peut faciliter la persistance virale (García-Piñeres et al. 2006), ou la réactivation d'une infection latente par l'HPV ou même accélérer la progression des néoplasies intra-épithéliales du col vers un cancer invasif. Devant cette situation, Il apparaît judicieux d'améliorer les pratiques du dépistage dans cette population pour éviter un risque de morbidité et de mortalité associé à ces lésions du col.

Il est à noter que le taux des HPV-HR est stable dans les groupes les plus âgés, comme décrit dans l'étude de Lindau *et al* (Lindau et al. 2008), mais augmente avec la sévérité des lésions, ce qui est en accord avec les données rapportées par Chiang et collaborateurs chez des femmes taiwanaises (Chiang et al. 2013). L'HPV 16 est le génotype le plus fréquent (23,8%) comme indiqué par Zietkowiak *et al.* chez les femmes âgées de 56 à 78 ans (26%) (Zietkowiak et al. 2002) et Baay *et al.* chez les femmes de plus de 65 ans (35,3%) (Baay et al. 2004). La prévalence d'HPV16 augmente avec la sévérité de lésions (Chiang et al. 2013) et confirme sa distribution chez les femmes avec ou sans lésions dysplasiques dans toutes les régions du monde (Clifford et al. 2006).

Pour mesurer quantitativement la charge virale dans notre étude, nous avons utilisé la PCR en temps réel (qPCR) qui permet de suivre 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 comme résultats préliminaires que la charge virale de l'HPV16 augmentait avec le grade de la lésion. Ce résultat est en accord avec une publication au sein de notre équipe de recherche française (Saunier et al. 2008).

Il est souhaitable d'étudier le statut physique du génome viral : génome sous forme intégrée seule, sous forme épisomale seule ou sous forme mixte car ce phénomène représente un des facteurs clefs de la carcinogenèse induite par les HPV.

Suivi cytologique après 65 ans

En terme de santé publique, le rythme de suivi optimal après 65 ans serait celui qui permettrait de diminuer la morbi-mortalité et d'augmenter l'espérance de vie de bonne qualité. Nous avons constaté que le suivi cytologique des femmes avec frottis normaux a permis de détecter des lésions CIN3 incidentes dans 6% des cas. Ce résultat est similaire à celui retrouvé dans des études rapportant des cas de lésions de haut grade (HSIL) chez des femmes dont le suivi antérieur avait été régulier et sans antécédent de frottis anormal (Mandelblatt et al. 1993 ; Meyer et al. 2012). Dinkelspiel *et al* a observé que 25% des femmes de plus de 65 ans ayant un CCU avaient eu trois frottis consécutifs négatifs avant la fin de dépistage (Dinkelspiel et al. 2012). Ceci suggère qu'un frottis négatif ne suffit pas à prévenir le CCU. A signaler aussi que notre étude a démontré un effet bénéfique de dépistage virologique (test HPV). En effet, dans notre cohorte des femmes âgées ayant un frottis normal celles qui ont développé les CIN3 étaient HPV16 positives, ce qui indique la valeur potentielle d'un génotypage partiel dans cette population. La limite de notre étude réside dans la durée courte de suivi courte de moins de 15% des femmes ayant un frottis normal et un test HPV négatif.

Obstacles au dépistage du CCU

L'ensemble des obstacles au dépistage du CCU est résumé dans la figure 41.

▪ Obstacles liés aux patientes

Méconnaissance de l'existence et de l'intérêt du dépistage : Le détachement du suivi gynécologique par les patientes une fois la période de procréation et menstruations terminée : «organe sans activité, donc sans danger ». La méconnaissance du CCU, moins médiatisé que d'autres cancers féminins (cancer du sein)

Peur vis-à-vis de l'examen ou de son résultat : Le frottis peut être refusé par peur, peur de la douleur liée à l'atrophie génitale après 50 ans mais aussi peur du résultat. Il est important de signaler l'inconfort de l'examen au speculum après la ménopause. En effet, l'examen peut-être techniquement difficile à réaliser, du fait du rétrécissement du canal cervical, de la sécheresse vaginale et de l'ascension de la zone jonctionnelle après la ménopause, mais aussi par les

polyopathologies associées (rhumatologiques, cardiaques, respiratoires...). En fait, par l'administration d'oestrogènes, le col s'ouvre et permet la réalisation du FCU.

Obstacles économiques et sociaux : D'autres obstacles comme la précarité, la barrière linguistique ou encore la présence d'une pathologie grave peuvent prendre le dessus sur le dépistage.

- **Obstacles liés aux médecins**

Bénéfice du frottis perçu comme faible : Certains médecins ont confié ne pas être convaincus de l'intérêt du frottis après la ménopause ou en l'absence de relations sexuelles depuis plusieurs années. De même, l'âge à l'arrêt des frottis est sujet à controverses (55 à 75 ans).

Difficultés techniques et logistiques : Elles sont de trois ordres : l'absence de formation initiale pour de nombreux médecins qui ont appris la technique sur le tas, l'atrophie de la muqueuse vaginale, et enfin la nécessité d'acheminer le frottis au laboratoire, ce qui peut parfois être un frein à sa réalisation.

Faible motivation du médecin pour la pratique des frottis : De nombreuses études ont montré que le taux de couverture par frottis des patientes ayant pour médecin traitant des femmes est supérieur à celui des patientes ayant pour médecin traitant des hommes (Lurie et al. 1993 ; Franks et Clancy 1993 ; Kreuter et al. 1995 ; Woodward et al. 1996 ; Ahmad et al. 2001). Cet écart peut être dû à une différence entre les patientes mais il est aussi sûrement lié au fait que les médecins femmes proposent plus souvent des frottis (Lurie et al. 1997). C'est ce que suggère une étude canadienne (Woodward et al. 1996) dans laquelle les médecins femmes rapportent des taux supérieurs d'actes préventifs spécifiques aux femmes (frottis et mammographies). Certains médecins hommes préfèrent déléguer les patientes à leurs consœurs généralistes, aux gynécologues, ou plus rarement aux laboratoires, mais les patientes ne consultent pas toujours le correspondant. Donc on peut noter deux facteurs qui peuvent intervenir : la réticence des patientes à être examinées par un homme (Leach et Schoenberg 2007) et le moindre intérêt des médecins hommes pour le dépistage par frottis.

Oubli : Parfois, le médecin oublie tout simplement de proposer un frottis à sa patiente. Les médecins femmes, concernées elles-mêmes par le dépistage, y penseraient davantage. Certains motifs de consultation jouent le rôle de rappels. Il s'agit par exemple du dépistage du cancer du sein par mammographie chez les patientes de 50 à 74 ans ou des symptômes liés à la ménopause.

- **Obstacles liés à la relation médecin-patient**

Pudeur : La pudeur a souvent été considérée comme un obstacle lié aux patientes, car le frottis touche à l'intime, alors qu'elle concerne aussi le médecin qui craint de briser la relation de confiance qui l'unit à sa patiente. Ce sentiment de pudeur semble plus prégnant encore chez certaines femmes immigrées.

Manque de disponibilité spécifique : Le frottis est perçu comme un acte prenant du temps car il nécessite, outre l'approche psychologique, la mise en place de matériel. Il nécessite aussi que la patiente soit prête, en particulier qu'elle ait fait sa toilette. Or il se rajoute souvent à d'autres motifs de consultation, les médecins n'ont donc pas toujours le temps d'en parler ou de le faire, que la patiente l'ait demandé ou non. Dans une étude réalisée en Picardie, 71 % des médecins généralistes interrogés ont déclaré rencontrer des difficultés dans leurs actions de prévention par manque de temps (Ganry et Boche 2004).

Faible fréquence de consultation et alliance thérapeutique fragile : Plusieurs médecins ont dit ne pas parler du frottis aux patientes qui consultent rarement. Cette attitude est multifactorielle : pudeur, manque de temps, oubli, mais aussi alliance thérapeutique fragile dans laquelle le généraliste se sent considéré comme un simple prestataire de services.

▪ Obstacles liés à l'organisation du système de santé

On peut citer deux lacunes : l'absence de rémunération spécifique et l'absence d'organisation du dépistage du CCU, qui pourrait améliorer l'adhésion des patientes mais aussi celle des médecins.

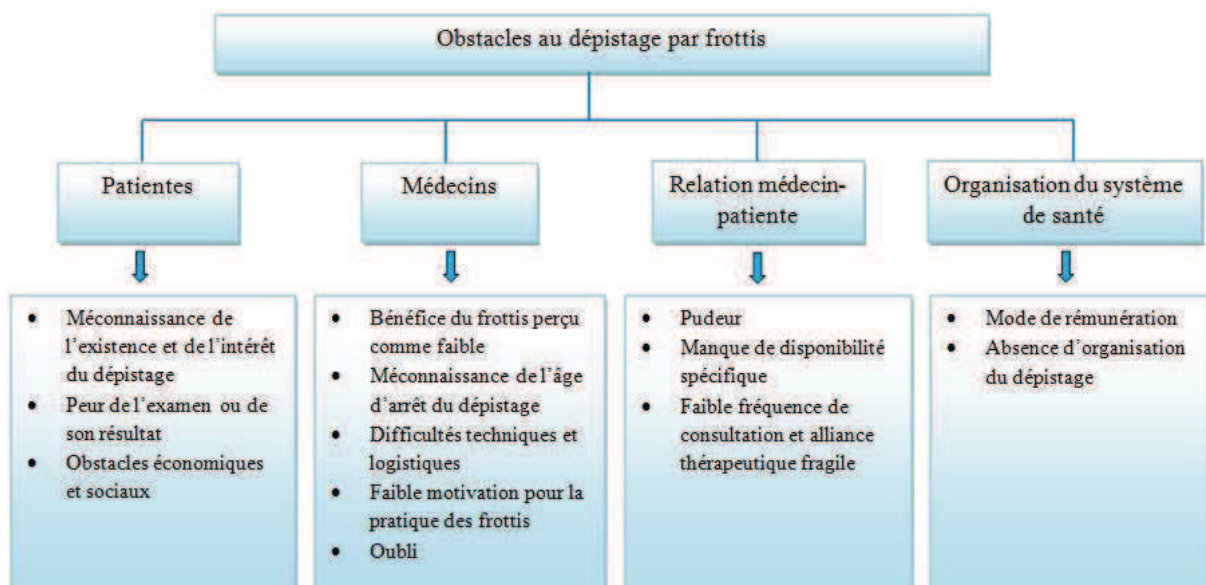


Figure 41: Ensemble des obstacles au dépistage du CCU par frottis chez les femmes (Badet 2012)

Solutions pour améliorer le dépistage

Toutefois, nous proposons plusieurs solutions pour améliorer le taux de couverture par frottis:

▪ Mesures organisationnelles de dépistage et campagnes d'information auprès des patientes

L'organisation du dépistage du CCU reste tributaire des mesures d'ordre organisationnel pour minimiser le circuit à parcourir par les femmes, garantir la qualité des actes et assurer une prise en charge thérapeutique. Dans ce cadre il est souhaitable de proposer

- des campagnes d'information auprès du public et l'invitation individuelle des femmes non dépistées permettrait probablement d'améliorer le taux de couverture par frottis.
- Une solution également pour le succès de ce dépistage serait de l'associer à l'organisation du dépistage du cancer du sein, qui est l'action de prévention la mieux intégrée et acceptée par la population féminine. L'association de ces deux dépistages est par ailleurs reconnue comme facteur de potentialisation (Oscarsson et al 2008).
- L'intégration d'alarmes dans les logiciels médicaux et la possibilité de visualiser rapidement le statut de la patiente vis-à-vis du dépistage permettraient aussi d'améliorer la situation.

▪ Revalorisation des actions de prévention

La création de consultations dédiées à la prévention en dehors des consultations habituelles semble être une autre solution pour améliorer le taux de couverture par frottis. Elles favoriseraient probablement le développement d'une culture de prévention chez les patientes.

▪ Sensibilisation et formation des prestataires

Dans le secteur privé, les médecins gynécologues sont conscients de l'importance du dépistage du CCU. Ce niveau de conscience est à renforcer davantage avec implication des médecins généralistes. C'est pourquoi il semble primordial de repenser l'action de dépistage en y incluant en priorité des professionnels de santé. Ce sont probablement eux qui permettraient d'inclure le plus grand nombre de patientes, en favorisant la communication, le déroulement et la coordination du suivi.

La féminisation de la profession ainsi qu'une formation à la relation médecin-patient, une formation à la prévention et une formation pratique en gynécologie au profil des jeunes médecins permettrait, à terme, une meilleure adhésion à la réalisation des FCU.

- **Prise en compte des préférences et des souhaits des femmes âgées**

Les recommandations de dépistage du CCU chez les patientes âgées doivent tenir compte de leur espérance de vie et des avantages et dommages potentiels de son retard ainsi que leurs caractéristiques et préférences (Walter et Covinsky 2001 ; Rustagi et al. 2013). Une étude évaluant les préférences des femmes âgées au sujet de leur dépistage a révélé que la majorité d'entre elles sont prêtes à utiliser un test HPV pour prendre des décisions au sujet de la fréquence et durée du dépistage (Huang et al. 2008). Un test HPV peut aussi être proposé sous la forme d'auto-prélèvement vaginal (Lindell et al. 2012) ou urinaire (Vorsters et al. 2012) auprès de ces femmes car il peut vaincre certains freins comme les difficultés d'accès à un médecin (délais de rendez-vous, distance) ou les réticences vis-à-vis de l'examen gynécologique. Ces deux alternatives au dépistage par FCU peuvent se faire à domicile par la femme, qui doit ensuite envoyer le prélèvement par la poste au laboratoire. Les femmes ayant un résultat positif pour l'HPV pourraient être prises en charge et celles avec un résultat négatif seraient rassurées pour au moins cinq ans.

Lors de la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons mené une étude épidémiologique, dans une population hospitalière de femmes marocaines à risque du CCU issue de la région de Souss, visant à évaluer la prévalence des différents génotypes d'HPV et leur répartition dans les frottis du col de l'utérus selon les facteurs sociodémographiques, le style de vie et le statut VIH.

Prévalence élevée de l'infection HPV chez les femmes marocaines de la région Souss

Nous avons montré une prévalence élevée d'HPV (23,7%) dans cette population majoritairement non-dépistée (80%) avec des différences selon le statut VIH : le taux d'HPV était de 13,3% chez les femmes VIH-négatives comparé à 39,3% chez les femmes VIH-positives. Cette prévalence est similaire à celle enregistrée dans des études marocaines antérieures menées à Rabat, la capitale du pays (Chaouki et al. 1998 ; Alhamany et al. 2010) et Casablanca, la capitale économique (El Gnaoui et al. 2009). En revanche, cette prévalence est inférieure à celle retrouvée dans deux régions géographiques du Maroc où l'incidence du CCU est très élevée (selon les registres du cancer de Rabat et Casablanca), allant de 32% chez une cohorte de femmes de Rabat (Birrou et al. 2015) à 42,5% chez des femmes indemnes de lésions néoplasiques du col issues du nord central du Maroc (Bennani et al. 2012). En outre, le taux obtenu dans notre étude est élevé par rapport à l'étude d'Amrani *et al.* qui a rapporté une prévalence d'HPV de l'ordre de 6% et un taux d'anomalies cytologiques faible (2,5% de LGSIL et 0,7% de HGSIL) (Amrani et al. 2003). A signaler que ces dernières études n'ont pas rapporté le statut VIH chez les femmes participantes. La prévalence élevée dans notre étude peut être due à certains facteurs culturels et religieux qui empêchent les gens de discuter des maladies qui touchent les parties intimes.

A noter aussi que la prévalence élevée des HPV chez les femmes séropositives peut être corrélée au style de vie telles que les douches vaginales et le manque d'utilisation de préservatifs. Cependant,

d'autres facteurs doivent être pris en considération, notamment le niveau d'éducation, le niveau socio-économique et les facteurs comportementaux.

Distribution des génotypes d'HPV chez les femmes marocaines de la région Souss

Le type HPV16 s'est avéré le plus fréquent dans la population globale par rapport à tous les autres types viraux répertoriés, suivi par l'HPV53 et l'HPV74. Ce résultat est en accord avec les études effectuées au monde où l'HPV16 est rapporté comme le génotype à haut risque le plus fréquent (Jacobs et al. 2000 ; Rolón et al. 2000 ; Berumen et al. 2001). Il est intéressant de signaler que l'HPV16 et l'HPV18 ont été identifiés dans 3,3% des frottis normaux, 30% des LGSIL et 58,3% des HGSIL. Ce constat est concordant avec les données récemment publiées par le Centre d'Information sur l'HPV et Cancers (ICO) (WHO/ICO 2014b). Etant donné que les HPV16 et 18 sont deux génotypes reconnus comme associés à un risque élevé de progression vers un cancer invasif du col (Walboomers et al. 1999 ; Bosch et al. 2008 ; Usubütün et al. 2009), nous relevons la nécessité de l'implémentation d'un test HPV et de la vaccination anti-HPV comme moyen de prévention du CCU au sein de la population marocaine.

Par ailleurs, avec la technologie de la qPCR, il est souhaitable d'étudier les phénomènes de la charge virale et l'intégration de l'HPV16 et l'HPV18, comme étant deux marqueurs viraux impliqués dans la carcinogenèse induites par les HPV (Rousseau et al. 2007 ; Damay et al. 2009).

Nous avons trouvé les HPV non oncogènes dans 8% des frottis normaux et 16,7% des lésions LGSIL. Cependant, il est à noter qu'aucune infection par ces génotypes n'a été détectée dans les frottis HGSIL. Ce résultat confirme le fait que les HPV à bas risque sont rarement impliqués dans le développement des lésions de type CIN3 voire du cancer (Herrero et al. 2005 ; Prétet et al. 2008a; Prétet et al. 2008b).

Il est intéressant de noter que les infections multiples ont été observées dans 65,4% des cas HPV positifs, et dans 33,3% des HGSIL. Ce résultat est concordant avec les données issues d'une étude conduite par Khair *et al.* qui montrait un taux de 34% d'infections multiples dans les cancers du col chez les femmes marocaines (Khair et al. 2009).

L'infection par plusieurs types d'HPV a été décrite par plusieurs études épidémiologiques (Chaturvedi et al. 2011 ; Carrillo-García et al. 2014 ; Yang et al. 2014), elle est responsable d'un risque élevé de progression vers des lésions de haut grade et de cancer (van der Graaf et al. 2002). Ce constat a été confirmé récemment par une étude de 5,871 femmes sexuellement actives âgées entre 18 et 25 ans au Costa Rica, qui a rapporté que les femmes infectées par plusieurs types d'HPV ont un risque significativement plus élevé de développement de lésions de type CIN2/HGSIL comparées aux femmes infectées par un seul type d'HPV (Chaturvedi et al. 2011).

L'infection par le VIH est le facteur de risque puissant de l'infection à HPV et de développement des lésions du col de l'utérus

▪ *Taux alarmant de l'épidémie VIH/sida dans la région Souss-Massa-Drâa* : La région Souss-Massa-Drâa arrive en tête des régions touchées par l'épidémie VIH/sida au niveau national. Des taux au-delà de 5% sont rapportés chez les femmes professionnelles du sexe, ce qui témoigne d'une épidémie concentrée. La recrudescence du fléau dans cette zone est due à plusieurs facteurs : la pauvreté, la précarité, le mariage précoce, le divorce, la charge familiale, l'exode rural et l'analphabétisation qui marquent la région sont pointés du doigt. A cela, il faut ajouter le tourisme sexuel et le phénomène de la prostitution favorisés par une population mobile nombreuse (routiers, marins, ouvrières saisonnières) qui sont aussi un facteur déterminant dans l'évolution de l'épidémie. Aujourd'hui, tous les malades du sida au Maroc sont pris en charge gratuitement par le ministère de la santé et l'ALCS et peuvent ainsi accéder gratuitement à la trithérapie (traitement du VIH à base de trois antirétroviraux) et aux différents soins médicaux. Mais les fonds pour la lutte contre ce fléau sont toujours insuffisants. La nouveauté sur Agadir est l'ouverture, depuis mai 2004, d'un centre des maladies infectieuses au sein de l'hôpital régional Hassan II, le seul département accrédité dans le suivi et le traitement des personnes vivant avec le VIH dans la région et même dans le Sud marocain. Dernièrement, les femmes infectées par le VIH sont systématiquement référées par ce centre au département de pathologie du même hôpital pour une surveillance gynécologique y incluant la réalisation de FCU.

▪ *L'infection par le VIH est fortement associée à l'infection par des HPV oncogènes* : Un des objectifs majeurs de notre étude était d'identifier les facteurs sociodémographiques et ceux liés au style de vie associés à l'infection aux HPV dans la région Souss. Il n'existe à ce jour aucune étude marocaine qui rapporte la prévalence des différents génotypes d'HPV, et la relation entre infection à VIH, HPV et cytologie du col utérin. Nous avons trouvé une association statistiquement significative entre l'infection à VIH et l'infection par des HPV oncogènes Il est important de signaler que les infections multiples ont été détectées chez 75,7% des femmes VIH-positives. Ce taux est en accord avec l'étude de Stuardo *et al.* qui a rapporté 78,4% des infections multiples chez des femmes espagnoles infectées par le VIH (Stuardo et al. 2012). Ceci est cohérent avec d'autres études qui ont montré que les femmes VIH-positives sont infectées avec une prévalence élevée d'HPV mais aussi qu'elles sont infectées par une grande variété de types d'HPV en comparaison avec les femmes VIH négatives (Temmerman et al. 1999 ; Strickler et al. 2005 ; Clifford et al. 2006 ; Louie et al. 2009 ; Chaturvedi et al. 2009). Ceci peut être dû à la diminution de la clairance virale de l'HPV chez ces femmes (Palefsky et al. 1999 ; Ferenczy et al. 2003) ou encore à une exposition sexuelle à de nouveaux types d'HPV ce qui donne l'opportunité à différents types d'HPV de se nicher dans l'épithélium du col utérin. L'infection par une multitude d'HPV pourrait aussi être due à la réduction de l'immunité systémique et locale liée à l'infection à VIH (Del Mistro et Chieco Bianchi 2001). Par ailleurs, nous avons trouvé une association statistiquement significative entre l'infection par le VIH et la présence des anomalies cytologiques (LSIL, HSIL). Ce constat est concordant avec celui de Rousseau *et al.* qui a trouvé que l'infection par le VIH est un facteur de risque pour la présence des HSIL (Didelot-Rousseau et al. 2006).

Assez curieusement, l'incidence du CCU n'a pas augmenté de manière spectaculaire en Afrique malgré le développement de l'épidémie de SIDA. Cette situation peut s'expliquer par la faible espérance de vie des femmes infectées par le VIH et non traitées par les antirétroviraux. Avec l'accès de plus en plus répandu aux traitements antirétroviraux, l'espérance de vie de ces femmes devrait s'allonger de manière très significative et par conséquent, l'incidence des cancers invasifs du col pourrait sensiblement augmenter au cours des prochaines années. L'ensemble de ces éléments souligne ainsi l'importance de la prévention primaire et secondaire du CCU chez les femmes au Maroc, tout particulièrement si elles sont infectées par le VIH.

Les limites de notre étude

Nous n'avons pas mis en évidence les autres facteurs de risque classiques connus pour être associés à l'infection HPV tels que le statut marital, l'âge au premier rapport sexuel, le nombre de grossesses, la contraception orale.... Néanmoins, le nombre de partenaire sexuels et le tabagisme, marquant de manière indirecte l'exposition aux agents infectieux sexuellement transmissibles tels que l'HPV, ne sont pas observés en analyse multivariée comme facteurs de risque dans notre étude, mais seulement en analyse univariée. Les données auto-déclarées peuvent introduire un biais de réponse associé à des réponses socialement non acceptées ou non désirées.

- *Volet qualitatif*: Les entretiens ont fait intervenir vraisemblablement une certaine subjectivité des femmes interrogées. Des sentiments et des présuppositions sur le sujet ont été abordées et la réponse aux questions était fonction de l'aptitude et du goût pour la communication du chaque participante. Par conséquent, les interviews ont probablement été biaisés par le biais de «plaire» : les femmes interrogées pouvaient se comporter d'une façon autre que d'habitude. D'autre part, certaines informations n'ont pas été fournies avec précision par certaines interviewées faute de fil conducteur dans leurs pensées et dans leurs paroles.

- *Volet quantitatif*: L'étude reste entachée par un biais de sélection : les femmes recrutées dans le service hospitalier ne sont pas représentatives de la population féminine de la région Souss, ceci a probablement donné lieu à une sous-estimation de l'état de connaissance de l'infection à HPV et des facteurs de risque associés. Par conséquent on peut considérer notre étude comme une étude descriptive d'une population hospitalière à risque du CCU au sein de la région. Le biais peut se décliner en :

- Biais de mensonge : les femmes interrogées pouvaient nous induire en erreur en fournissant des fausses réponses à certaines questions.
- Biais de censure : lié au fait d'interroger les femmes dans les centres de santé à l'occasion d'une prestation donnée. Nous avons tenté de réduire ce biais en interrogeant les femmes dans une salle privée tout en leur expliquant l'objet de l'étude et en les rassurant sur l'anonymat et la confidentialité des informations, avec leur consentement éclairé qu'elles ont signé.

Les contraintes rencontrées lors de la réalisation de l'étude

- *Contrainte du temps consacré à l'entretien* : L'entretien a souvent duré moins de quinze minutes car beaucoup des patientes attendaient dans la salle d'attente.
- *Contrainte de langue d'entretien* : La majorité des femmes participantes sont d'origine berbère, elles parlent le dialecte berbère, rarement l'arabe et encore moins le français. Certains entretiens ont été interrompus parfois par des appels téléphoniques et dans certaines situations par l'entrée de l'infirmière.
- *Contraintes logistiques, financières et temporelles* : La rareté ou l'absence des productions scientifiques dans le domaine médical et surtout dans le domaine de l'oncologie et de la biologie moléculaire à Agadir nous a posé un problème organisationnel pour le projet d'étude, auquel s'est ajouté le manque de moyens financiers pour l'achat des réactifs et des consommables pour les différentes manipulations. Enfin, le programme a évolué assez lentement car la collecte des échantillons a duré presque 9 mois. Evidemment, avec plus de ressources, nous aurions pu collecter davantage d'échantillons.
- *Contraintes de transport des FCU* : Vu la distance entre la ville d'Agadir et Guelmim (200 km) où ont eu lieu les expérimentations marocaines (extraction d'ADN et PCR MY09/11) et la non-disponibilité de carboglace, nous avons transporté les échantillons dans une glacière (avec des condensateurs de froid), ce qui nous a apparu au départ une contrainte pouvant donner lieu à une dégradation de l'ADN! Par ailleurs, le transport d'une partie des échantillons a dû être organisé lors des événements d'inondations meurtrières qui ont secoué la région Souss et la ville de Guelmim durant le mois de novembre 2014, ce qui a fortement compliqué le transport des échantillons vers le laboratoire de biologie moléculaire du 5^{ème} hôpital militaire de Guelmim.

Utilité des résultats de l'étude

Ce travail de recherche confirme que nos résultats peuvent avoir un impact sur la santé publique. Ils peuvent servir pour une campagne de tests et de surveillance épidémiologique de différentes souches d'HPV circulant dans la région Souss pour les décideurs politico-sanitaires en vue d'éventuelle planification d'une stratégie de lutte contre le CCU.

Actions ciblées

La plupart des femmes marocaines sont frustrées dès l'annonce du mot « cancer ». En fait, il s'agit d'une maladie que l'on refuse de nommer. La société marocaine l'avait décrit comme « Al Mard El Khaib » (la maladie du mal). C'est une maladie qui fait peur et que l'on croit forcément mortelle. Par conséquent, dans notre pays, peu ou pas de femmes sont dépistées pour cette maladie ce qui aggrave la situation.

Dans ce cadre, il nous apparaît judicieux de proposer quelques recommandations :

- *Sensibilisation et information de la population cible* : La sensibilisation des femmes peut se faire par des messages adaptés au contexte socioculturel et économique tels que :
 - Développement des activités d'information sur le CCU dans les lycées et les collèges.
 - Implication des *maris* dans la prise en charge de leurs femmes pour soulager leurs souffrances psychologiques et permettre la levée des freins psychologiques et culturels.
 - Création des associations féminines dont la mission serait sociale et sanitaire.
- *Sensibilisation et formation des prestataires*
 - Sensibilisation du personnel médical et paramédical.
 - Augmentation de l'effectif des anatomopathologistes.
 - Implication et formation des médecins généralistes.
 - Implication et formation des infirmières des cellules de santé maternelle.
 - Formation des gynécologues et des cytotechniciens au niveau des hôpitaux provinciaux et régionaux en matière de tests de dépistage, de conduite à tenir devant un frottis anormal et la lecture des comptes rendus anatomopathologiques.
- *Financement des activités de dépistage du CCU* : La mise en place de différents régimes d'assurance maladie (AMO, INAYA et RAMED) a amélioré l'accessibilité financière des femmes au dépistage. Nous recommandons d'introduire le test d'HPV à la nomenclature des examens biologiques remboursables par les assurances médicales. La vaccination prophylactique anti-HPV doit être par ailleurs envisagée. Les femmes issues des milieux défavorisés doivent bénéficier gratuitement des actes relatifs au dépistage du CCU dans les centres de santé et les hôpitaux publics.
- *Offre de soins*
 - Développement progressif de l'offre de soins au niveau de toutes les régions du Royaume en matière de dépistage du CCU.
 - Dotation des structures de santé en matériel médico-technique et consommables.
- *Mise en place d'une stratégie de dépistage* : Cette stratégie doit tenir compte des éléments suivants : population cible, histoire de la maladie, tests de dépistage, et rapports cout-efficacité et cout-bénéfice.

Méthodes d'inspection visuelle du col utérin (IVA):

C'est une technique simple et facile à exécuter par tout professionnel de santé non-médecin. Elle exige peu d'équipement et un minimum d'infrastructure. De plus, les professionnels de la santé peuvent partager immédiatement les résultats de l'IVA avec les patientes, ce qui rend possible le

dépistage et le traitement des femmes au cours d'une même visite (Denny et al. 2005). Ceci aide à garantir un suivi médical sur place et réduit le nombre de femmes qui pourraient manquer le traitement parce qu'il est impossible pour elles de revenir à la clinique à un autre moment.

Pratique du FCU-Etude cytologique

La fiabilité de cette démarche nécessite :

- Des salles d'examen et des laboratoires équipés,
- Une démarche qualité pour réduire les erreurs de prélèvement et de lecture,
- Un système de communication rapide des résultats aux femmes dépistées,
- Un système d'orientation des femmes chez lesquelles une lésion précancéreuse est diagnostiquée vers l'hôpital provincial pour la prise en charge thérapeutique.

La principale limite du FCU étant sa subjectivité et sa faible sensibilité qui nécessite plusieurs visites lesquelles sont un obstacle majeur, une des alternatives est le dépistage de l'ADN des HPV. Le test de l'ADN d'HPV est plus efficace que le FCU, ou l'IVA dans la réduction du risque de développer un CCU (Sankaranarayanan et al. 2009). Le test « *careHPV* » de Qiagen, simple, peu coûteux (8 € en moyenne) pourrait être proposé. Il a été testé en Chine dans les régions rurales chez 754 femmes (Chen et al. 2014) et en Afrique chez 75 femmes d'Afrique du Sud et 74 femmes du Burkina Faso infectées par le VIH (Ngou et al. 2013) et s'avère aussi sensible que le test Hybrid Capture 2.

Un test « *careHPV* » 3 fois au cours d'une vie est plus efficace (en terme de prévention et de coût) que le FCU traditionnel (Levin et al. 2010) et pourrait être une stratégie de choix pour le Maroc pour les femmes qui n'auraient pas été vaccinées.

Conclusion

En France, le CCU est au 12^{ème} rang des cancers féminins. Mais s'agissant d'un cancer viro-induit et précédé de lésions précancéreuses, le CCU est évitable grâce au dépistage par FCU et en traitant les lésions précancéreuses.

Au Maroc, le CCU est le deuxième cancer féminin après le cancer du sein. Ceci est en grande partie lié aux différences culturelles et à la quasi absence de dépistage.

Deux vaccins prophylactiques, ciblant les deux génotypes d'HPV les plus à risque, sont disponibles sur le marché en vue d'éradiquer le CCU. Un vaccin nonavalent ciblant 5 types d'HPV à haut risque supplémentaires (HPV31/33/45/52/58) développé par la Société Merck pourrait prévenir au moins 90% des cancers à travers le monde (Serrano et al. 2012) et en France (Riethmuller et al. 2015). Toutefois, chez les femmes âgées, de plus de 40-50 ans, qui ne sont plus en âge d'être vaccinées, un dépistage doit s'imposer de façon à réduire la mortalité liée au CCU.

Qu'il s'agisse de la population française ou marocaine, le FCU et/ou un test HPV (par auto-prélèvement si nécessaire) restent des examens clés de la prévention du CCU. C'est dans ce contexte que les travaux conduits dans le cadre de cette thèse, sur 2 cohortes à risque du CCU (une cohorte française et une cohorte marocaine), ont permis de confirmer l'intérêt de ces tests pour dépister les lésions de haut grade en particulier, et pour aborder l'épidémiologie des HPV dans la population marocaine, et notamment chez les femmes infectées par le VIH.

En accord avec « Cervical Cancer Action : Coalition to STOP Cervical Cancer » fondée en 2007, les décès par le CCU sont en partie évitables. « *Chaque femme dans le monde a droit à la prévention. Au vu des outils disponibles, même un seul décès dû au cancer du col de l'utérus est un décès de trop* » (Sarah Nyombi, Membre du Parlement d'Ouganda, Journée Internationale des Femmes-2008).

Références bibliographiques

- Abenhaim, L. 2003. Rapport de la commission d'orientation sur le cancer. Direction générale de la santé.
- Abramowitz, L., V. Rémy, and A. Vainchtock. 2010. Economic burden of anal cancer management in France." *Revue d'épidémiologie et de santé publique*. 58 (5): 331–8.
- Adewuyi, S.A., S.O. Shittu, and A.H. Rafindadi. 2008. Sociodemographic and clinicopathologic characterization of cervical cancers in northern Nigeria. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 29 (1): 61–4.
- Ahmad, F., D. E. Stewart, J. I. Cameron, and I. Hyman. 2001. Rural Physicians' Perspectives on Cervical and Breast Cancer Screening: A Gender-Based Analysis. *Journal of Women's Health & Gender-Based Medicine*. 10 (2): 201–8.
- Aleman, L., M. Saunier, I. Alvarado-Cabrero, B. Quirós, J. Salmeron, H-R. Shin, E.C. Pirog, et al. 2015. Human Papillomavirus DNA Prevalence and Type Distribution in Anal Carcinomas Worldwide. *International Journal of Cancer*. 136 (1): 98–107.
- Alhamany, Z., M. El Mzibri, A. Kharbach, A. Malihi, R. Abouqal, H. Jaddi, A. Benomar, M. Attaleb, N. Lamalmi, and N. Cherradi. 2010. Prevalence of Human Papillomavirus Genotype among Moroccan Women during a Local Screening Program. *Journal of Infection in Developing Countries* 4 (11): 732–39.
- ALSC. 2011. Guide de détection précoce des cancers du sein et du col de l'utérus. Royaume du Maroc, ministère de la santé.
- Amrani, M., K. Lalaoui, M. El Mzibri, L. Rouas, L. Benkirane, N. Lamaalmi, A. Regragui, L. Gamra, and M.A. Belabbas. 2002. HPV Typing and Cervical Cancer Screening: Results of a Moroccan Critical Study. *Maroc Médical*. 24(3): 206-11.
- Amrani, M., K. Lalaoui, M. El Mzibri, P. Lazo, and M.A. Belabbas. 2003. Molecular Detection of Human Papillomavirus in 594 Uterine Cervix Samples from Moroccan Women (147 Biopsies and 447 Swabs). *Journal of Clinical Virology*. 27 (3): 286–95.
- ANAES. 2002. Conduite À Tenir Devant Une Patiente Ayant Un Frottis Cervico-Utérin Anormal.
- ANAES. 2004. Evaluation de l'intérêt de la recherche des Papillomavirus Humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus.
- Andersson-Ellström, A., J. Dillner, B. Hagmar, J. Schiller, and L. Forssman. 1994. No serological evidence for non-sexual spread of HPV16. *Lancet*. 344 (8934): 1435.
- Andrae, B., L. Kemetli, P. Sparén, L. Silfverdal, B. Strander, W. Ryd, J. Dillner, and S. Törnberg. 2008. Screening-preventable cervical cancer risks: evidence from a nationwide audit in Sweden. *Journal of the National Cancer Institute* 100 (9): 622–9.
- Arnold, M., M.J. Aarts, M. van der Aa, O. Visser, and J.W. Coebergh. 2013. Investigating cervical, oesophageal and colon cancer risk and survival among migrants in the Netherlands. *European Journal of Public Health* 23 (5): 867–73.
- Aubin, F., J.L. Prétet, and C. Mougin. 2003. Papillomavirus Humains : Biologie et Pathologie Tumorale. Editions EM inter, TEC & DOC.759p.
- Aubin, F., J.L. Prétet, A.-C. Jacquard, M. Saunier, X. Carcopino, F. Jaroud, P. Pradat, et al. 2008. Human Papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: A large French national study (EDITH IV). *Clinical Infectious Diseases*. 47 (5): 610–5.
- Baay, M.F.D., E. Smits, W.A.A. Tjalma, F. Lardon, J. Weyler, P. Van Royen, E.A.E. Van Marck, and J.B. Vermorken. 2004. Can cervical cancer screening be stopped at 50? The prevalence of HPV in elderly women. *International Journal of Cancer*. 108 (2): 258–61.
- Badet-Phan, A., A. Moreau, C. Colin, F. Canoui-Poitrine, AM. Schott-Pethelaz, and M. Flori. 2012. Obstacles au dépistage du cancer du col de l'utérus rencontrés par les médecins généralistes chez les femmes âgées de 50 à 65 ans. *Pratiques et Organisation des Soins*.43(4).
- Baker, T. S., W.W. Newcomb, N.H. Olson, L.M. Cowser, C. Olson, and J.C. Brown. 1991. Structures of bovine and Human Papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal* .60 (6): 1445–56.

- Baldez da Silva, M.F.P.T., B. S. Chagas, V. Guimarães, L.M.C. Katz, P.M. Felix, P.M. Miranda, A.A. Lima, et al. 2009. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 8 (4): 1437–43.
- Banura, C., S. Franceschi, L.J.van. Doorn, A. Arslan, B. Kleter, F. Wabwire-Mangen, E.K. Mbide, W. Quint, and E. Weiderpass. 2008. Prevalence, incidence and clearance of human papillomavirus infection among young primiparous pregnant women in Kampala, Uganda. *International Journal of Cancer*. 123 (9): 2180–7.
- Belot, A., P. Grosclaude, N. Bossard, E. Jougl, E. Benhamou, P. Delafosse, A.-V. Guizard, et al. 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Revue d'épidémiologie et de santé publique*. 56 (3): 159–75.
- Bennani, B., S. Bennis, C. Nejari, L'H. Ouafik, M.A. Melhouf, K. El Rhazi, K. Znati, H. Chaara, C. Bouchikhi, and A. Amarti Riffi. 2012. Correlates of HPV: A cross-sectional study in women with normal cytology in north-central Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries*. 6 (7): 543–50.
- Bernard, H.-U., R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, and E.-M. de Villiers. 2010. Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401 (1): 70–9.
- Berraho, M., K. Bendahhou, M. Obtel, A. Zidouh, A. Benider, H. Errihani, and C. Nejari. 2012. Cervical cancer in Morocco: Epidemiological profile from two main oncological centers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13 (7): 3153–7.
- Berrébi, A., W. Badiou, and A. Duclusaud. 2008. Frequency, persistence and recurrence of HPV lesions of the uterine cervix in HIV-seropositive women. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*. 36 (5): 521–24.
- Berumen, J., R.M. Ordoñez, E. Lazcano, J. Salmeron, S.C. Galvan, R.A. Estrada, E. Yunes, A. Garcia-Carranca, G. Gonzalez-Lira, and A. Madrigal-de la Campa. 2001. Asian-American variants of Human Papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: A case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*. 93 (17): 1325–30.
- Biddlecom, A., L. Hessburg, S. Singh, A. Bankole, and L. Darabi. 2009. Protéger La prochaine génération en Afrique Subsaharienne. *Guttmacher Institute*. Monographie. 59p.
- Birrou, K., R. Tagajdid, H. Elannaz, S. Elkochri, R. Abi, M. Zouhdi, and S. Mrani. 2015. Human Papillomavirus genotype prevalence and distribution among Moroccan pregnant women. *Int. J. Res. Med. Sc*. 3(1): 95-99.
- Bosch, F.X., A.N. Burchell, M. Schiffman, A.R. Giuliano, S. de Sanjose, L. Bruni, G. Tortolero-Luna, S.Kruger. Kjaer, and N. Muñoz. 2008. Epidemiology and natural history of Human Papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 26 Suppl 10: K1–16.
- Bosch, F.X., and S. de Sanjosé. 2007. The epidemiology of Human Papillomavirus infection and cervical cancer. *Disease Markers* 23 (4): 213–27.
- Bouchardy, C., D. M. Parkin, P. Wanner, and M. Khat. 1996. Cancer Mortality among North African Migrants in France. *International Journal of Epidemiology* 25 (1): 5–13.
- Bouchbika, Z., H. Haddad, N. Benchakroun, H. Eddakaoui, S. Kotbi, A. Megrini, H. Bourezgui, et al. 2013. Cancer incidence in Morocco: Report from Casablanca registry 2005-2007. *The Pan African Medical Journal* 16 :31.
- Boulet, G.A.V., I.H. Benoy, C.E. Depuydt, C.A.J. Horvath, M. Aerts, N. Hens, A.J. Vereecken, and J.J. Bogers. 2009. Human Papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: Biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 18 (11): 2992–99.
- Bousarghin, L., A. Touzé, P.-Y. Sizaret, and P. Coursaget. 2003. Human Papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of Virology*. 77 (6): 3846–50.
- Broccolo, F., L. Fusetti, S. Rosini, D. Caraceni, R. Zappacosta, L. Ciccocioppo, B. Matteoli, P. Halfon, M.S. Malnati, and L. Ceccherini-Nelli. 2013. Comparison of oncogenic HPV type-specific viral DNA load and E6/E7 mRNA detection in cervical samples: Results from a multicenter study. *Journal of Medical Virology*. 85 (3): 472–82.

- Brown, D.R., J. M. Schroeder, J.T. Bryan, M.H. Stoler, and K.H. Fife. 1999. Detection of multiple Human Papillomavirus types in condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (10): 3316–22.
- Brun, J.L., D. Stoven-Camou, R. Trouette, M. Lopez, G. Chene, and C. Hocké. 2003. Survival and prognosis of women with invasive cervical cancer according to age. *Gynecologic Oncology*. 91 (2): 395–401.
- Burghardt, E., and A.G. Ostör. 1983. Site and Origin of Squamous Cervical Cancer: A Histomorphologic Study. *Obstetrics and Gynecology*. 62 (1): 117–27.
- Carcopino, X., M. Henry, J. Mancini, S. Giusiano, L. Boubli, D. Olive, and C. Tamalet. 2012. Significance of HPV 16 and 18 viral load quantitation in women referred for colposcopy. *Journal of Medical Virology*. 84 (2): 306–13.
- Carrillo-García, A., S. Ponce-de-León-Rosales, D. Cantú-de-León, V. Fragoso-Ontiveros, I. Martínez-Ramírez, A. Orozco-Colín, A. Mohar, and M. Lizano. 2014. Impact of Human Papillomavirus coinfections on the risk of High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 134 (3): 534–9.
- Cartier, R. 1984. *Colposcopie Pratique, 2 Edn*. Laboratoire Cartier.
- Castañón, A., R. Landy, J. Cuzick, and P. Sasieni. 2014. Cervical screening at age 50-64 years and the risk of cervical cancer at age 65 years and older: Population-based case control study. *PLoS Medicine*. 11 (1): e1001585.
- Castellsagué, X., J. Paavonen, U. Jaisamrarn, C.M. Wheeler, S. R. Skinner, M. Lehtinen, P. Naud, et al. 2014. Risk of first cervical HPV infection and pre-cancerous lesions after onset of sexual activity: Analysis of women in the control arm of the randomized, controlled PATRICIA trial. *BMC Infectious Diseases*. 14: 551.
- CDC. 1998. Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. *MMWR*. 47:1–111.
- Centurioni, M.G., A. Puppo, D.F. Merlo, G. Pasciucco, E.R. Cusimano, R. Sirito, and C.A. Gustavino. 2005. Prevalence of human papillomavirus cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infectious Diseases*. 5: 77.
- Chaouki, N., F. X. Bosch, N. Muñoz, C. J. Meijer, B. El Gueddari, A. El Ghazi, J. Deacon, X. Castellsagué, and J. M. Walboomers. 1998. The viral origin of cervical cancer in rabat, Morocco. *International Journal of Cancer*. 75 (4): 546–54.
- Chappuis, M., A.B. Antonielli, S. Laurence, J. Rochefort, C. Giboin, and J.F. Corty. 2014. Cervical and breast cancer prevention among underprivileged women in France: an epidemiological study. *Bulletin Du Cancer*. 101 (7-8): 663–8.
- Chaturvedi, A.K., H.A. Katki, A. Hildesheim, A.C. Rodríguez, W. Quint, M. Schiffman, L.-J. Van Doorn, et al. 2011. Human Papillomavirus infection with multiple types: Pattern of coinfection and risk of cervical disease. *The Journal of Infectious Diseases*. 203 (7): 910–20.
- Chaturvedi, A.K., M.M. Madeleine, R.J. Biggar, and E.A. Engels. 2009. Risk of Human Papillomavirus-associated cancers among persons with AIDS. *Journal of the National Cancer Institute*. 101 (16): 1120–30.
- Chen, W., J. Jeronimo, F.-H. Zhao, Y.-L. Qiao, M. Valdez, X. Zhang, L.-N. Kang, et al. 2014. The concordance of HPV DNA detection by Hybrid Capture 2 and careHPV on clinician- and self-collected specimens. *Journal of Clinical Virology*. 61 (4): 553–7.
- Cheng, E.M.Y., P.M. Atkinson, and A.K. Shahani. 2011. Elucidating the spatially varying relation between cervical cancer and socio-economic conditions in England. *International Journal of Health Geographics*. 10: 51.
- Chiang, Y.-C., W.-F. Cheng, Y.-L. Chen, M.-C. Chang, C.-Y. Hsieh, M.-C. Lin, and C.-A. Chen. 2013. High-risk Human Papillomavirus, other than type 16/18, in predominantly older Taiwanese women with high-grade cervical preinvasive lesions. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 52 (2): 222–6.
- Clifford, G., S. Franceschi, M. Diaz, N. Muñoz, and L.L. Villa. 2006. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/26–34.
- Clifford, G.M., M.A.G. Gonçalves, S. Franceschi, and HPV and HIV Study Group. 2006. Human Papillomavirus types among women infected with HIV: A meta-analysis. *AIDS*. 20 (18): 2337–44.

- Collins, S.I., S. Mazloomzadeh, H. Winter, T.P. Rollason, P. Blomfield, L.S. Young, and C.B.J. Woodman. 2005. Proximity of first intercourse to menarche and the risk of Human Papillomavirus infection: A longitudinal study. *International Journal of Cancer*. 114 (3): 498–500.
- Dalstein, V., D. Riethmuller, J.-L. Prétet, K. Le Bail Carval, J.-L. Sauti  re, 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. *International Journal of Cancer*. 106 (3): 396–403.
- Damay, A., M.-N. Didelot-Rousseau, V. Costes, I. Konate, A. Ouedraogo, N. Nagot, V. Foulongne, P. Van de Perre, P. Mayaud, and M. Segondy. 2009. Viral load and physical status of Human Papillomavirus (HPV) 18 in cervical samples from female sex workers infected with HPV 18 in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology*. 81 (10): 1786–91.
- Del Mistro, A., and L. Chieco Bianchi. 2001. HPV-related neoplasias in HIV-infected individuals. *European Journal of Cancer*. 37 (10): 1227–35.
- De Martel, C., J. Ferlay, S. Franceschi, J. Vignat, F. Bray, D. Forman, and M. Plummer. 2012. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*. 13 (6): 607–15.
- Denny, L., L. Kuhn, M. De Souza, A. E. Pollack, W. Dupree, and T.C. Wright. 2005. Screen-and-treat approaches for cervical cancer prevention in low-resource settings: A randomized controlled trial. *JAMA*. 294 (17): 2173–81.
- Denslow, S.A., A.F. Rositch, C. Firnhaber, J. Ting, and J.S. Smith. 2014. Incidence and progression of cervical lesions in women with HIV: A systematic global review. *International Journal of STD & AIDS*. 25 (3): 163–77.
- De Roda Husman, A. M., J. M. Walboomers, A. J. van den Brule, C. J. Meijer, and P. J. Snijders. 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. *The Journal of General Virology*. 76 (Pt 4) 1057–62.
- De Saint Pol, T. 2007. La santé des plus pauvres, *Insee Première edition*. n  1161.
- De Sanjose, S., W.G. Quint, L. Alemany, D.T. Geraets, J.E. Klaustermeier, B. Lloveras, S. Tous, et al. 2010. Human Papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet*. 11 (11): 1048–56.
- De Villiers, E.-M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.-U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of Papillomaviruses. *Virology*. 324 (1): 17–27.
- De Villiers, E.-M. 2013. Cross-roads in the classification of Papillomaviruses. *Virology* 445 (1-2): 2–10.
- De Vuyst, H., G.M. Clifford, M. C. Nascimento, M.M. Madeleine, and S. Franceschi. 2009. Prevalence and type distribution of Human Papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*. 124 (7): 1626–36.
- Didelot-Rousseau, M.-N., N. Nagot, V. Costes-Martineau, X. Vall  s, A. Ouedraogo, I. Konate, H. A. Weiss, et al. 2006. Human Papillomavirus genotype distribution and cervical squamous intraepithelial lesions among high-risk women with and without HIV-1 infection in Burkina Faso. *British Journal of Cancer*. 95 (3): 355–62.
- Dinkelspiel, H., B. Fetterman, N. Poitras, W. Kinney, J.T. Cox, T. Lorey, and P.E. Castle. 2012. Screening history preceding a diagnosis of cervical cancer in women age 65 and older. *Gynecologic Oncology*. 126 (2): 203–6.
- DREES. 2015. L'  tat de santé de la population en France.   dition 2015 :330-4.
- Dunne, E.F., C.M. Nielson, K.M. Stone, L.E. Markowitz, and A.R. Giuliano. 2006. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *The Journal of Infectious Diseases*. 194 (8): 1044–57.
- Eggleston, K. S., A.L. Coker, M. Williams, G. Tortolero-Luna, J.B. Martin, and S.R. Tortolero. 2006. Cervical cancer survival by socioeconomic status, race/ethnicity, and place of residence in Texas, 1995-2001. *Journal of Women's Health*. 15 (8): 941–51

- Einstein, M.H., M.J. Levin, A. Chatterjee, N. Chakhtoura, P. Takacs, G. Catteau, F.J. Dessy, et al. 2014. Comparative humoral and cellular immunogenicity and safety of Human Papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine and HPV-6/11/16/18 vaccine in healthy women aged 18-45 years: Follow-up through month 48 in a phase III randomized study. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* .10 (12): 3455–65.
- El Gnaoui, N., N. Benchakroun, A. Benider, M. Hassar, R. Saile, and H. Benomar. 2009. Typing of Human Papillomavirus and evaluation of risk factors associated with cervical cancer in Morocco. 31 (2): 229–36.
- El Hamdani, W., M. Amrani, M. Attaleb, N. Laantri, M. M. Ennaji, M. Khyatti, and M. El Mzibri. 2010. EGFR, p16INK4a and E-Cadherin immuno-histochemistry and EGFR point mutations analyses in invasive cervical cancer specimens from Moroccan women. *Cellular and Molecular Biology*. 56 Suppl: OL1373–84.
- Ezechi, O.C., P.O. Ostergren, F. O. Nwaokorie, I.A.O. Ujah, and K. Odberg Pettersson. 2014. The burden, distribution and risk factors for cervical oncogenic Human PapillomaVirus infection in HIV positive Nigerian women. *Virology Journal*.11: 5.
- Ferenczy, A., F. Coutlée, E. Franco, and C. Hankins. 2003. Human Papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: A review of recent developments. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*.169 (5): 431–34.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, and F. Bray. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 136 (5): E359–86.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* . 49 (6): 1374–403.
- Flores, Y. N., D.M. Bishai, K.V. Shah, E. Lazcano-Ponce, A. Lörcincz, M. Hernández, D. Ferris, and J. Salmerón. 2008. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud Pública De México*. 50 (1): 49–58.
- Flori, M., C. Dupraz, S. Erpeldinger, and M.-F. Le Goaziou. 2009. Cervical smears among women after 65 years. One-year retrospective descriptive study. *La Revue Du Praticien* .59 (10 Suppl): 29–32.
- Fontaine, J., P. Gravitt, L.-M. Duh, J. Lefevre, K. Pourreaux, C. Hankins, and F. Coutlée. 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 14 (9): 2200–07.
- Franceschi, S., T. Rajkumar, S. Vaccarella, V. Gajalakshmi, A. Sharmila, P.J.F. Snijders, N. Muñoz, C. J. L. M. Meijer, and R. Herrero. 2003. Human Papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: A case-control study. *International Journal of Cancer*. 107 (1): 127–33.
- Franco, E. L. 1995. Cancer causes revisited: Human Papillomavirus and cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 87 (11): 779–80.
- Franks, P., and C. M. Clancy. 1993. Physician gender bias in clinical decision making: Screening for cancer in primary care. *Medical Care*. 31 (3): 213–8.
- From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. 1993. *JAMA* 269 (6): 729–30.
- Gage, J.C., C. Ferreccio, M. Gonzales, R. Arroyo, M. Huivín, and S.C. Robles. 2003. Follow-up care of women with an abnormal cytology in a low-resource setting. *Cancer Detection and Prevention* 27 (6): 466–71.
- Ganry, O., and T. Boche. 2004. Prevention practices and cancer screening among general practitioners in Picardy (France). *Bulletin Du Cancer* .91 (10): 785–91.
- García-Piñeres, A.J., A. Hildesheim, R. Herrero, M. Trivett, M. Williams, I. Atmetlla, M. Ramírez, et al. 2006. Persistent Human Papillomavirus infection is associated with a generalized decrease in immune responsiveness in older women. *Cancer Research*. 66 (22): 11070–6.

- Ghanem, K.G., S. Deblina Datta, E.R. Unger, M. Hagensee, J.C. Shlay, P. Kerndt, K. Hsu, and L.A. Koutsky. 2011. The association of current hormonal contraceptive use with type-specific HPV detection. *Sexually Transmitted Infections*. 87 (5): 385–8.
- Graham, J.E., and A. Mishra. 2011. Global challenges of implementing Human Papillomavirus vaccines. *International Journal for Equity in Health*. 10: 27. doi:10.1186/1475-9276-10-27.
- Gravitt, P.E. 2012. Evidence and impact of Human Papillomavirus latency. *The Open Virology Journal*. 6: 198–203.
- Gravitt, P.E., M. Butsch Kovacic, R. Herrero, M. Schiffman, C. Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, et al. 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. *International Journal of Cancer*. 121 (12): 2787–93.
- Gravitt, P.E., C. Peyton, C. Wheeler, R. Apple, R. Higuchi, and K.V. Shah. 2003. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan Real-Time PCR assays. *Journal of Virological Methods*. 112 (1-2): 23–33.
- Gravitt, P. E., J. V. Lacey, L. A. Brinton, W. A. Barnes, J. R. Kornegay, M. D. Greenberg, S. M. Greene, et al. 2001. Evaluation of self-collected cervicovaginal cell samples for Human Papillomavirus testing by Polymerase Chain Reaction. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10 (2): 95–100.
- Guardado-Estrada, M., E. Juárez-Torres, E. Román-Bassaure, I. Medina-Martinez, A. Alfaro, R. E. Benuto, M. Dean, N. Villegas-Sepulveda, and J. Berumen. 2014. The distribution of high-risk Human Papillomaviruses is different in young and old patients with cervical cancer. *PloS One*. 9 (10): e109406.
- Hagensee, M. E., N. Yaegashi, and D. A. Galloway. 1993. Self-assembly of Human Papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *Journal of Virology*. 67 (1): 315–22.
- HAS. 2010. Etat des lieux et recommandations pour le dépistage du cancer du col de l’utérus en France.
- HAS. 2013. Commission de la transparence. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-04/gardasil_modif_population_cible_avis2_ct_12747.pdf.
- Hawes, S.E., C.W. Critchlow, P. S. Sow, P. Touré, I. N’Doye, A. Diop, J.M. Kuypers, A.A. Kasse, and N.B. Kiviat. 2006. Incident high-grade squamous intraepithelial lesions in Senegalese women with and without Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and HIV-2. *Journal of the National Cancer Institute*. 98 (2): 100–9.
- Heard, I., J. M. Tassie, V. Schmitz, L. Mandelbrot, M. D. Kazatchkine, and G. Orth. 2000. Increased risk of cervical disease among Human Immunodeficiency Virus-infected women with severe immunosuppression and high Human Papillomavirus load. *Obstetrics and Gynecology*. 96 (3): 403–9.
- Herfs, M., S.O. Vargas, Y. Yamamoto, B.E. Howitt, M.R. Nucci, J.L. Hornick, F.D. McKeon, W. Xian, and C.P. Crum. 2013. A novel blueprint for ‘Top down’ differentiation defines the cervical squamocolumnar junction during development, reproductive life, and neoplasia. *The Journal of Pathology*. 229 (3): 460–68.
- Hernández-Hernández, D.M., L. Ornelas-Bernal, M. Guido-Jiménez, T. Apresa-Garcia, I. Alvarado-Cabrero, M. Salcedo-Vargas, A. Mohar-Betancourt, and A. Garcia-Carranca. 2003. Association between High-Risk Human Papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecologic Oncology*. 90 (2): 310–7.
- Herrero, R., P.E. Castle, M. Schiffman, M. Concepción Bratti, A. Hildesheim, J. Morales, M. Alfaro, et al. 2005. Epidemiologic profile of type-specific Human Papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *The Journal of Infectious Diseases*. 191 (11): 1796–1807.
- Huang, A.J., E.J. Pérez-Stable, S.E. Kim, S.T. Wong, C.P. Kaplan, J.M.E. Walsh, A.Y. Iwaoka-Scott, and G.F. Sawaya. 2008. Preferences for Human Papillomavirus testing with routine cervical cancer screening in diverse older women. *Journal of General Internal Medicine*. 23 (9): 1324–9.
- Institut National du Cancer. 2007. Etat des lieux du dépistage du cancer du col utérin en France.

- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. 2006. Cervical carcinoma and reproductive factors: Collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *International Journal of Cancer*.119 (5): 1108–24.
- International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, P. Appleby, V. Beral, A. Berrington de González, D. Colin, S. Franceschi, A. Goodhill, et al. 2007. Cervical cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* . 370 (9599): 1609–21.
- Ioka, A., H. Tsukuma, W. Ajiki, and A. Oshima. 2005. Influence of age on cervical cancer survival in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology* .35 (8): 464–9.
- Jacobs, M. V., J. M. Walboomers, P. J. Snijders, F. J. Voorhorst, R. H. Verheijen, N. Franssen-Daalmeijer, and C. J. Meijer. 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. *International Journal of Cancer*. 87 (2): 221–7.
- Jacquin, E., D. Guenat, D. Riethmuller, C. Mougin, J.-L. Prétet. 2014. Nouveaux biomarqueurs viraux des lésions du col de l’utérus associées aux papillomavirus humains. *Virologie*. 18(4):211–28.
- Jacquin, E., M. Saunier, F. Mauny, E. Schwarz, C. Mougin, and J.-L. Prétet. 2013. Real-Time duplex PCR for simultaneous HPV 16 and HPV 18 DNA quantitation. *Journal of Virological Methods*. 193 (2): 498–502.
- Jayaprakash, V., M. Reid, E. Hatton, M. Merzianu, N. Rigual, J. Marshall, S. Gill, et al. 2011. Human Papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: A meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncology*. 47 (11): 1048–54.
- Jenson, A. B., J. D. Rosenthal, C. Olson, F. Pass, W. D. Lancaster, and K. Shah. 1980. Immunologic relatedness of Papillomaviruses from different species. *Journal of the National Cancer Institute*. 64 (3): 495–500.
- Joura, E.A., A.R. Giuliano, O.-E. Iversen, C. Bouchard, C. Mao, J. Mehlsen, E.D. Moreira, et al. 2015. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *The New England Journal of Medicine*. 372 (8): 711–23.
- Kamineni, A., S. Weinmann, K.K. Shy, A.G. Glass, and N.S. Weiss. 2013. Efficacy of screening in preventing cervical cancer among older women. *Cancer Causes & Control*. 24 (9): 1653–60.
- Keller, M.J., R.D. Burk, X. Xie, K. Anastos, L. Stewart Massad, H. Minkoff, X. Xue, et al. 2012. Risk of cervical precancer and cancer among HIV-infected women with normal cervical cytology and no evidence of oncogenic HPV infection. *JAMA*. 308 (4): 362–69.
- Kemp, T.J., M. Safaeian, A. Hildesheim, Y. Pan, K.J. Penrose, C. Porras, J.T. Schiller, D.R. Lowy, R. Herrero, and L.A. Pinto. 2012. Kinetic and HPV infection effects on cross-type neutralizing antibody and avidity responses induced by Cervarix(  ). *Vaccine*. 31 (1): 165–70.
- Kessels, S.J.M., H.S. Marshall, M. Watson, A.J. Braunack-Mayer, R. Reuzel, and R.L. Tooher. 2012. Factors Associated with HPV vaccine uptake in teenage girls: A systematic review. *Vaccine*. 30 (24): 3546–56.
- Khair, M.M., M. El Mzibri, R. Ait Mhand, A. Benider, N. Benchekroun, E. M. El Fahime, M. N. Benchekroun, and M. M. Ennaji. 2009. Molecular detection and genotyping of Human Papillomavirus in cervical carcinoma biopsies in an area of high incidence of cancer from Moroccan women. *Journal of Medical Virology*. 81 (4): 678–84.
- Khair, M.M., R. Ait Mhand, M. El Mzibri, and M. M. Ennaji. 2009. Risk factors of invasive cervical cancer in Morocco. *Cellular and Molecular Biology* .55 Suppl: OL1175–85.
- Khlat, M. 1995. Cancer in Mediterranean migrants-based on studies in France and Australia. *Cancer Causes & Control*.6 (6): 525–31.
- Kim, J. W., S. H. Song, C. H. Jin, J. K. Lee, N. W. Lee, and K. W. Lee. 2012. Factors affecting the clearance of High-Risk Human Papillomavirus infection and the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *The Journal of International Medical Research*. 40 (2): 486–96.

- Kjaer, S. K., B. Chackerian, A. J. van den Brule, E. I. Svare, G. Paull, J. M. Walbomers, J. T. Schiller, et al. 2001. High-Risk Human Papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10 (2): 101–6.
- Kleter, B., L. J. van Doorn, L. Schrauwen, A. Molijn, S. Sastrowijoto, J. ter Schegget, J. Lindeman, B. ter Harmsel, M. Burger, and W. Quint. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (8): 2508–17.
- Koffi, B., E. Serdouma, W. Mbolissa-Nguérékoudou, M. Ngadjou-Kouchou-Fondjo, V. Pengoussou-Gbatoumba, A. Sépou, and G. Grésengué. 2010. Cervical dysplasia in women with human immunodeficiency virus (HIV) in areas of high prevalence of infection. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*. 38 (10): 576–80.
- Kreuter, M.W., V.J. Strecher, R. Harris, S.C. Kobrin, and C.S. Skinner. 1995. Are patients of women physicians screened more aggressively? A prospective study of physician gender and screening. *Journal of General Internal Medicine*. 10 (3): 119–25.
- Lalaoui, K., M. El Mzibri, M. Amrani, M. A. Belabbas, and P. A. Lazo. 2003. Human Papillomavirus DNA in cervical lesions from Morocco and its implications for cancer control. *Clinical Microbiology and Infection*. 9 (2): 144–8.
- Laurent, R., and J. L. Kienzler. 1985. Epidemiology of HPV Infections. *Clinics in Dermatology*. 3 (4): 64–70.
- Leach, C.R., and N.E. Schoenberg. 2007. The vicious cycle of inadequate early detection: A complementary study on barriers to cervical cancer screening among middle-aged and older women. *Preventing Chronic Disease*. 4 (4): A95.
- Lebelo, R.L., J.J. Bogers, S. Thys, C. Depuydt, I. Benoy, S.G. Selabe, M.N. Bida, and M. Jeffrey Mphahlele. 2015. Detection, genotyping and quantitation of multiple HPV infections in South African women with cervical squamous cell carcinoma. *Journal of Medical Virology*. June.doi:10.1002/jmv.24132.
- Levin, C.E., J. Sellors, J.-F. Shi, L. Ma, Y.-I. Qiao, J. Ortendahl, M.K.H. O'Shea, and S.J. Goldie. 2010. Cost-effectiveness analysis of cervical cancer prevention based on a rapid Human Papillomavirus screening test in a high-risk region of China. *International Journal of Cancer*. 127 (6): 1404–11.
- Lindau, S.T., M.L. Drum, E. Gaumer, H. Surawska, and J.A. Jordan. 2008. Prevalence of High-Risk Human Papillomavirus among older women. *Obstetrics and Gynecology*. 112 (5): 979–89.
- Lindell, M., K. Sanner, I. Wikström, and E. Wilander. 2012. Self-sampling of vaginal fluid and High-Risk Human Papillomavirus testing in women aged 50 years or older not attending Papanicolaou smear screening. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 119 (2): 245–8.
- Liu, Z.-C., W.-D. Liu, Y.-H. Liu, X.-H. Ye, and S.-D. Chen. 2015. Multiple sexual partners as a potential independent risk factor for cervical cancer: A meta-analysis of epidemiological studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16 (9): 3893–900.
- Loi de financement de la sécurité sociale 2010. 2010. Rapport Chiffré. 86-9.
- Louie, K.S., S. de Sanjose, and P. Mayaud. 2009. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus and cervical cancer in Sub-Saharan Africa: A comprehensive review. *Tropical Medicine & International Health*. 14 (10): 1287–1302.
- Lowe, B., D. O'Neil, D. Loeffert, and I. Nazarenko. 2011. Distribution of Human Papillomavirus load in clinical specimens. *Journal of Virological Methods*. 173 (1): 150–52.
- Luciani, S., and J. Winkler. 2006. Cervical cancer prevention in Peru: Lessons learned from the TATI demonstration project, Washington. *Pan American Health Organization edition*.
- Lurie, N., K. L. Margolis, P. G. McGovern, P. J. Mink, and J. S. Slater. 1997. Why do patients of female physicians have higher rates of breast and cervical cancer screening? *Journal of General Internal Medicine*. 12 (1): 34–43.
- Lurie, N., J. Slater, P. McGovern, J. Ekstrum, L. Quam, and K. Margolis. 1993. Preventive care for women. Does the sex of the physician matter? *The New England Journal of Medicine*. 329 (7): 478–82.

- Mandelblatt, J., M. Traxler, P. Lakin, P. Kanetsky, L. Thomas, P. Chauhan, S. Matseoane, and E. Ramsey. 1993. Breast and cervical cancer screening of poor, elderly, black women: Clinical results and implications. Harlem Study Team. *American Journal of Preventive Medicine* .9 (3): 133–38.
- Massad, L.S., X. Xie, G. D’Souza, T. M. Darragh, H. Minkoff, R. Wright, C. Colie, L. Sanchez-Keeland, and H.D. Strickler. 2015. Incidence of cervical precancers among HIV-seropositive women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* .212 (5): 606.e1–8.
- Ma, Y. T., S. I. Collins, L. S. Young, P. G. Murray, and C. B. J. Woodman. 2011. Smoking initiation is followed by the early acquisition of epigenetic change in cervical epithelium: A longitudinal study. *British Journal of Cancer*.104 (9): 1500.
- McDonald, A.C., A.I. Tergas, L. Kuhn, L. Denny, and T.C. Wright. 2014. Distribution of Human Papillomavirus genotypes among HIV-positive and HIV-negative women in Cape Town, South Africa. *Frontiers in Oncology* 4: 48.
- 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. *Obstetrics and Gynecology* .92 (4 Pt 2): 727–35.
- Meyer, R, A.-L. Lemay, X. Guy, C. Giraud, P. Mathevet, and M. Flori. 2012. Is there a benefit to continue pap smear screening for cervical cancer after 65 years of age? A retrospective study on 53,644 women. *Bulletin Du Cancer* 99 (4): 409–15.
- Middleton, K., W. Peh, S. Southern, H. Griffin, K. Sotlar, T. Nakahara, A. El-Sherif, et al. 2003. Organization of Human Papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *Journal of Virology* .77 (19): 10186–201.
- Monnat, S.M., and S.F. Wallington. 2013. Is there an association between maternal Pap test use and adolescent Human Papillomavirus vaccination? *The Journal of Adolescent Health*. 52 (2): 212–8.
- Monsonogo, J. 2003. Nouvelles approches de prise en charge en colposcopie. In: Aubin F, Prétet JL, Mougin C . Papillomavirus Humains: Biologie et Pathologie Tumorale. EM inter, Editions TEC et DOC, 267–83.
- Moodley, J.R., M. Hoffman, H. Carrara, B.R. Allan, D.D. Cooper, L. Rosenberg, L.E. Denny, S. Shapiro, and A.-L. Williamson. 2006. HIV and pre-neoplastic and neoplastic lesions of the cervix in South Africa: A case-control study. *BMC Cancer* .6: 135.
- Moody, C.A., and L.A. Laimins. 2010. Human Papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews. Cancer* .10 (8): 550–60.
- Moscicki, A.-B., M. Schiffman, S. Kjaer, and L.L. Villa. 2006. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3 : S3/42–51.
- Mouallif, M., H.L. Bowyer, S. Festali, A. Albert, Y. Filali-Zegzouti, S. Guenin, P. Delvenne, J. Waller, and M. M. Ennaji. 2014. Cervical cancer and HPV: Awareness and vaccine acceptability among parents in Morocco. *Vaccine* 32 (3): 409–16.
- Muñoz, N., F.X. Bosch, S. de Sanjosé, R. Herrero, X. Castellsagué, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, C.J.L.M. Meijer, and International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003. Epidemiologic classification of Human Papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* .348 (6): 518–27.
- Muñoz, N., S. Franceschi, C. Bosetti, V. Moreno, R. Herrero, J.S. Smith, K.V. Shah, C.J.L.M. Meijer, F.X. Bosch, and International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. 2002. Role of parity and Human Papillomavirus in cervical cancer: The IARC multicentric case-control study. *Lancet* .359 (9312): 1093–1101.
- Ng’ayo, M. O., E. Bukusi, A. Rowhani-Rahbar, L. A. Koutsky, Q. Feng, Z. A. Kwen, and K. K. Holmes. 2008. Epidemiology of Human Papillomavirus infection among fishermen along Lake Victoria Shore in the Kisumu District, Kenya. *Sexually Transmitted Infections*. 84 (1): 62–6.
- Ngou, J., M.P. Magooa, C. Gilham, F. Djigma, M.-N. Didelot, H. Kelly, A. Yonli, et al. 2013. Comparison of careHPV and Hybrid Capture 2 assays for detection of High-Risk Human Papillomavirus DNA in cervical samples from HIV-1-infected African women. *Journal of Clinical Microbiology* .51 (12): 4240–2.

- ONUSIDA. 2014. Mise en Œuvre de la déclaration politique sur le VIH/sida. Rapport national 2014. Ministère de la santé. Royaume du Maroc.144p
- ONUSIDA. 2015. Emanciper les jeunes femmes et les adolescents: Accélérer la fin de l'épidémie de sida en Afrique. 32p. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/JC2746_fr.pdf. Consulté le 26 Juin 2015. »
- Oscarsson, M.G., B.E. Wijma, E.G. Benzein. 2008. « I do not need to... I do not want to... I do not give it priority... -Why women choose not to attend cervical cancer screening ». *Health Expectations*. 11 (1): 26-34.
- Ostör, A. G. 1993. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. *International Journal of Gynecological Pathology*.12 (2): 186–92.
- Palefsky, J. M., H. Minkoff, L. A. Kalish, A. Levine, H. S. Sacks, P. Garcia, M. Young, S. Melnick, P. Miotti, and R. Burk. 1999. Cervicovaginal Human Papillomavirus infection in Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV)-positive and High-Risk HIV-negative women. *Journal of the National Cancer Institute*. 91 (3): 226–36.
- Parkin, D. M., J. Stjernsward, and C. S. Muir. 1984. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bulletin of the World Health Organization*. 62 (2): 163–82.
- Peh, W.L., K. Middleton, N. Christensen, P. Nicholls, K. Egawa, K. Sotlar, J. Brandsma, et al. 2002. Life cycle heterogeneity in animal models of Human Papillomavirus-associated disease. *Journal of Virology* .76 (20): 10401–16.
- Perrons, C., R. Jelley, B. Kleter, W. Quint, and N. Brink. 2005. Detection of persistent High Risk Human Papillomavirus infections with Hybrid Capture II and SPF10/LiPA. *Journal of Clinical Virology*.32 (4): 278–85.
- Prétet, J.-L., A.-C. Jacquard, X. Carcopino, J.-F. Charlot, D. Bouhour, B. Kantelip, B. Soubeyrand, et al. 2008a. Human Papillomavirus (HPV) genotype distribution in invasive cervical cancers in France: EDITH Study. *International Journal of Cancer*. 122 (2): 428–32.
- Prétet, J.-L., A.-C. Jacquard, X. Carcopino, S. Monnier-Benoit, G. Averous, B. Soubeyrand, Y. Leocmach, C. Mougin, D. Riethmuller, and EDITH study group. 2008b. Human Papillomavirus genotype distribution in High Grade Cervical Lesions (CIN 2/3) in France: EDITH Study. *International Journal of Cancer*. 122 (2): 424–7.
- Puranen, M., M. Yliskoski, S. Saarikoski, K. Syrjänen, and S. Syrjänen. 1996. Vertical transmission of Human Papillomavirus from infected mothers to their newborn babies and persistence of the virus in childhood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* .174 (2): 694–9.
- Qmichou, Z., M. Khyatti, M. Berraho, M.M. Ennaji, L. Benbacer, C. Nejari, N. Benjaafar, A.Benider, M. Attaleb, and M. El Mzibri. 2013. Analysis of mutations in the E6 oncogene of Human Papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. *BMC Infectious Diseases* 13: 378.
- Resnick, R. M., M. T. Cornelissen, D. K. Wright, G. H. Eichinger, H. S. Fox, J. ter Schegget, and M. M. Manos. 1990. Detection and typing of Human Papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *Journal of the National Cancer Institute*. 82 (18): 1477–84.
- Richart, R. M. 1973. Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathology Annual* .8: 301–28.
- Riethmuller, D., A.-C. Jacquard, J.L. St Guily, F. Aubin, X. Carcopino, P. Pradat, A. Dahlab, and J.-L. Prétet. 2015. Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC Public Health*. 15: 453.
- Ritchie, J.M., E.M. Smith, K.F. Summersgill, H.T. Hoffman, D. Wang, J.P. Klusmann, L.P. Turek, and T.H. Haugen. 2003. Human Papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *International Journal of Cancer*. 104 (3): 336–44.
- Roden, R.B., D.R. Lowy, and J.T. Schiller. 1997. Papillomavirus is resistant to desiccation. *The Journal of Infectious Diseases*. 176 (4): 1076–9.
- Rolón, P. A., J. S. Smith, N. Muñoz, S. J. Klug, R. Herrero, X. Bosch, F. Llamasas, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers. 2000. Human Papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *International Journal of Cancer*. 85 (4): 486–91.

- Rousseau, A., P. Bohet, J. Merlière, H. Bauer, B. Heules-Bernin, and R. Ancelle-Park. 2002. Evaluation du dépistage organisé et du dépistage individuel du cancer du col de l'utérus : Utilité des données de l'assurance maladie. *BEH*. 19: 81-83.
- Rousseau, M.-N., V. Costes, I. Konate, N. Nagot, V. Foulongne, A. Ouedraogo, P. Van de Perre, P. Mayaud, M. Segondy, and Yerelon Study Group. 2007. Viral load and genomic integration of HPV 16 in cervical samples from HIV-1-infected and uninfected women in Burkina Faso. *Journal of Medical Virology*. 79 (6): 766–70.
- Rustagi, A.S., A. Kamineni, and N.S. Weiss. 2013. Point: Cervical cancer screening guidelines should consider observational data on screening efficacy in older women. *American Journal of Epidemiology*. 178 (7): 1020–2.
- Sahli S. Politique et infécondité volontaire en Tunisie. In: les modes de régulation de la reproduction humaine (Actes Du Colloque de Delphes) 1992. Available at: <http://www.erudit.org/livre/aidelf/1992/000974co.pdf>. Accessed 22 June 2015." n.d.
- Sankaranarayanan, R., B.M. Nene, S.S. Shastri, K. Jayant, R. Muwonge, A.M. Budukh, S. Hingmire, et al. 2009. HPV screening for cervical cancer in rural India. *The New England Journal of Medicine*. 360 (14): 1385–94.
- Saunier, M., S. Monnier-Benoit, F. Mauny, V. Dalstein, J. Briolat, D. Riethmuller, B. Kantelip, E. Schwarz, C. Mougin, and J.-L. Prétet. 2008. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 46 (11): 3678–85.
- Schiffman, M., P.E. Castle, J. Jeronimo, A.C. Rodriguez, and S. Wacholder. 2007. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 370 (9590): 890–907.
- Schiffman, M. H., H. M. Bauer, R. N. Hoover, A. G. Glass, D. M. Cadell, B. B. Rush, D. R. Scott, M. E. Sherman, R. J. Kurman, and S. Wacholder. 1993. Epidemiologic evidence showing that Human Papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 85 (12): 958–64.
- Schiller, J.T., X. Castellsagué, and S.M. Garland. 2012. A review of clinical trials of Human Papillomavirus prophylactic vaccines. *Vaccine* 30 Suppl 5: F123–38.
- Schmitt, M., C. Depuydt, I. Benoy, J. Bogers, J. Antoine, M. Pawlita, M. Arbyn, and VALGENT study group. 2013. Viral load of High-Risk Human Papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 22 (3): 406–14.
- Seilles, E., I. Greslin, and C. Mougin. 1999. Biology of papillomavirus infections. IV. Sero-epidemiological data. *Annales De Biologie Clinique*. 57 (4): 393–400.
- Serrano, B., L. Alemany, S. Tous, L. Bruni, G. M. Clifford, T. Weiss, F.X. Bosch, and S. de Sanjosé. 2012. Potential impact of a nine-valent vaccine in Human Papillomavirus related cervical disease. *Infectious Agents and Cancer*. 7 (1): 38.
- Sharon, Z., M. Shani, and B. Modan. 1977. Clinicoepidemiologic study of uterine cancer. Comparative aspects of the endometrial and cervical sites. *Obstetrics and Gynecology*. 50 (5): 536–40.
- Shastri, S.S., I. Mittra, G.A. Mishra, S. Gupta, R. Dikshit, S. Singh, and R.A. Badwe. 2014. Effect of VIA screening by primary health workers: Randomized controlled study in Mumbai, India. *Journal of the National Cancer Institute*. 106 (3): dju009.
- Shibata, D., Y. S. Fu, J. W. Gupta, K. V. Shah, N. Arnheim, and W. J. Martin. 1988. Detection of Human Papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the Polymerase Chain Reaction. *Laboratory Investigation*. 59 (4): 555–9.
- Sirovich, B. E., D. J. Gottlieb, and E. S. Fisher. 2003. The burden of prevention: Downstream consequences of Pap smear testing in the elderly. *Journal of Medical Screening*. 10 (4): 189–95.
- 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. *International Journal of Cancer*. 121 (3): 621–32.

- Snijders, P. J., C. J. Meijer, and J. M. Walboomers. 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. *The Journal of General Virology*. 72 (Pt 11) :2781–6.
- Snijders, P. J., A. J. van den Brule, H. F. Schrijnemakers, G. Snow, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers. 1990. The use of general primers in the Polymerase Chain Reaction permits the detection of a broad spectrum of Human Papillomavirus genotypes. *The Journal of General Virology*. 71 (Pt 1) : 173–81.
- Soler, C., P. Allibert, Y. Chardonnet, P. Cros, B. Mandrand, and J. Thivolet. 1991. Detection of Human Papillomavirus types 6, 11, 16 and 18 in mucosal and cutaneous lesions by the multiplex Polymerase Chain Reaction. *Journal of Virological Methods*. 35 (2): 143–57.
- Soto-De Leon, S., M. Camargo, R. Sanchez, M. Munoz, A. Perez-Prados, A. Purroy, M. Elkin Patarroyo, and M. Alfonso Patarroyo. 2011. Distribution patterns of infection with multiple types of Human Papillomaviruses and their association with risk factors. *PloS One*. 6 (2): e14705.
- Spayne, J., I. Ackerman, M. Milosevic, A. Seidenfeld, A. Covens, and L. Paszat. 2008. Invasive cervical cancer: A failure of screening. *European Journal of Public Health*. 18 (2): 162–65.
- Srivastava, S., U.P. Shahi, A. Dibya, S. Gupta, and J.K. Roy. 2014. Distribution of HPV genotypes and involvement of risk factors in cervical lesions and invasive cervical cancer: A study in an Indian population. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 3 (2): 61–73.
- Stanley, M.. 2010. HPV - Immune response to infection and vaccination. *Infectious Agents and Cancer*. 5: 19.
- St Guily, J.L., A.-C. Jacquard, J.-L. Prétet, J. Haesebaert, A. Beby-Defaux, C. Clavel, G. Agius, et al. 2011. Human Papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France-The EDiTH VI Study. *Journal of Clinical Virology*. 51 (2): 100–4.
- Strickler, H.D., R.D. Burk, M. Fazzari, K. Anastos, H. Minkoff, L.S. Massad, C. Hall, et al. 2005. Natural history and possible reactivation of Human Papillomavirus in Human Immunodeficiency Virus-positive women. *Journal of the National Cancer Institute*. 97 (8): 577–86.
- Stuardo, V., C. Agust  , J.M. Godinez, A. Montoliu, A. Torn  , A. Tarrats, C. Alcalde, et al. 2012. Human Papillomavirus infection in HIV-1 infected women in Catalonia (Spain): Implications for prevention of cervical cancer. *PloS One*. 7 (10): e47755.
- Temmerman, M., M.W. Tyndall, N. Kidula, P. Claeys, L. Muchiri, and W. Quint. 1999. Risk factors for Human Papillomavirus and cervical precancerous lesions, and the role of concurrent HIV-1 infection. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. 65 (2): 171–81.
- Thakur, A., B. Gupta, A. Gupta, and R. Chauhan. 2015. Risk factors for cancer cervix among rural women of a hilly state: A case-control study. *Indian Journal of Public Health*. 59 (1): 45–8.
- Thorsteinsson, K., S. Ladelund, S. Jensen-Fangel, T.I. Katzenstein, I. Somuncu Johansen, G. Pedersen, J. Junge, et al. 2015. Incidence of cervical dysplasia and cervical cancer in women living with HIV in Denmark: Comparison with the general population. *HIV Medicine*. July. doi:10.1111/hiv.12271.
- Torresi, A., A. Del Mistro, G. L. Onnis, F. Merlin, R. Bertorelle, and D. Minucci. 2000. Colposcopy, cytology and HPV-DNA testing in HIV-positive and HIV-negative women. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 21 (2): 168–72.
- Trimble, C.L., J. M. Genkinger, A.E. Burke, S.C. Hoffman, K.J. Helzlsouer, M. Diener-West, G.W. Comstock, and A. J. Alberg. 2005. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstetrics and Gynecology* 105 (1): 174–81.
- Tsai, H.-T., C.-H. Wu, H.-L. Lai, R.-N. Li, Y.-C. Tung, H.-Y. Chuang, T.-N. Wu, et al. 2005. Association between quantitative High-Risk Human Papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 14 (11 Pt 1): 2544–9.
- Usub  t  n, A., L. Alemany, T. K    kali, A. Ayhan, K. Y  ce, S. de Sanjosé, R. Font, et al. 2009. Human Papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *International Journal of Gynecological Pathology*. 28 (6): 541–8.

- Valmary-Degano, S., E. Jacquin, J.-L. Prétet, F. Monnien, B. Girardo, F. Arbez-Gindre, M. Joly, J.-F. Bosset, B. Kantelip, and C. Mougin. 2013. Signature patterns of Human Papillomavirus type 16 in invasive anal carcinoma. *Human Pathology*. 44 (6): 992–1002.
- Van den Brule, A.J., C.J. Meijer, V. Bakels, P. Kenemans, and J.M. Walboomers. 1990. Rapid detection of Human Papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 28 (12): 2739–43.
- Van der Graaf, Y., A. Molijn, H. Doornewaard, W. Quint, L.-J. van Doorn, and J. van den Tweel. 2002. Human Papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *American Journal of Epidemiology*. 156 (2): 158–64.
- Van Oortmarssen, G.J., and J.D. Habbema. 1991. Epidemiological evidence for age-dependent regression of pre-invasive cervical cancer. *British Journal of Cancer*. 64 (3): 559–65.
- Vessey, M., and D. Yeates. 2013. Oral contraceptive use and cancer: Final report from the Oxford-Family Planning Association Contraceptive study. *Contraception*. 88 (6): 678–83.
- Vlachtsis, K., A. Nikolaou, K. Markou, G. Fountzilas, and I. Daniilidis. 2005. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 262 (11): 890–8.
- Vorsters, A., I. Micalessi, J. Bilcke, M. Ieven, J. Bogers, and P. Van Damme. 2012. Detection of Human Papillomavirus DNA in urine. A review of the literature. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 31 (5): 627–40.
- Walboomers, J.M.M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J.F. Snijders, J. Peto, C.J.L.M. Meijer, and N. Muñoz. 1999. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology* 189 (1): 12–19.
- Walter, L.C., and K.E. Covinsky. 2001. Cancer screening in elderly patients: A framework for individualized decision making. *JAMA* .285 (21): 2750–56.
- Wentzensen, N., J. Walker, M. Schiffman, H.P. Yang, R.E. Zuna, S. T. Dunn, R. A. Allen, et al. 2013. Heterogeneity of high-grade cervical intraepithelial neoplasia related to HPV16: Implications for natural history and management. *International Journal of Cancer*. 132 (1): 148–54.
- WHO/ICO. 2014a. Human Papillomavirus and related diseases report in France. Information Centre On HPV and Cancer (HPV Information Centre); Summary Report 2014.
- WHO/ICO. 2014b. Human Papillomavirus and related diseases report in Morocco. Information Centre On HPV and Cancer (HPV Information Centre); Summary Report 2014.
- Winer, R.L., J.P. Hughes, Q. Feng, S. O’Reilly, N.B. Kiviat, K.K. Holmes, and L.A. Koutsky. 2006. Condom use and the risk of genital Human Papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine* .354 (25): 2645–54.
- 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 (9271): 1831–6.
- Woodward, C. A., B. G. Hutchison, J. Abelson, and G. Norman. 1996. Do female primary care physicians practise preventive care differently from their male colleagues? *Canadian Family Physician*. 42: 2370–9.
- Wright, J.D., R.K. Gibb, S. Geervarghese, M.A. Powell, T. J. Herzog, D.G. Mutch, P.W. Grigsby, F. Gao, K.M. Trinkaus, and J.S. Rader. 2005. Cervical carcinoma in the elderly: An analysis of patterns of care and outcome. *Cancer* .103 (1): 85–91.
- Wright, T.C., M.H. Stoler, C.M. Behrens, R. Apple, T. Derion, and T.L. Wright. 2012. The ATHENA Human Papillomavirus study: Design, methods, and baseline results. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* .206 (1): 46.e1–46.e11.
- Xi, L.F., G.W. Demers, L.A. Koutsky, N.B. Kiviat, J. Kuypers, D.H. Watts, K.K. Holmes, and D.A. Galloway. 1995. Analysis of Human Papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 172 (3): 747–55.

- Yang, Z., J. Cuzick, W.C. Hunt, and C.M. Wheeler. 2014. Concurrence of multiple Human Papillomavirus infections in a large US population-based cohort. *American Journal of Epidemiology*. 180 (11): 1066–75.
- Yoshinouchi, M., A. Hongo, K. Nakamura, J. Kodama, S. Itoh, H. Sakai, and T. Kudo. 1999. Analysis by multiplex PCR of the physical status of Human Papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (11): 3514–7.
- Zietkowiak, W., K. Zimna, Ł. Sroka, P. Uchman, and S. Sajdak. 2002. Frequency of HPV infection of the uterine cervix among perimenopausal women in Wielkopolska Region. *Ginekologia Polska*. 73 (11): 939–44.
- Zur Hausen, H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 (9): 690–8.

Annexes

Annexe 1 : Questionnaire

Dépistage de l'infection à HPV par FCU chez les femmes marocaines de la région Souss

N° de patiente :

Médecin traitant :

Age : ans

Statut marital : Célibataire ☐ Mariée ☐ Divorcée ☐ Veuve ☐

Niveau d'éducation : Primaire ☐ Secondaire ☐

Supérieur ☐ Analphabète ☐

Emploi : oui ☐ non ☐

Parité : - Nombre d'enfants vivants : - Nombre de fausses couches :

Age au 1^{er} rapport sexuel : ans

Age à la 1^{ère} grossesse : ans

Partenaires sexuels : singulier ☐ multiple ☐

Utilisation de moyens contraceptifs : oui ☐ non ☐

Contraception orale ☐ Stérilet ☐ Préservatif ☐

Années d'utilisation de contraception orale :

< 1 ☐ 2-5 ☐ > 5 ☐

Number de frottis de dépistage :

Statut VIH : Oui ☐ Non ☐ Inconnu ☐

Exposition au tabac: Oui ☐ ☐ Non

Histoire de lésions gynécologiques : Oui ☐ Les quelles ?

Non ☐

Ménopause : Oui ☐ Non ☐

Durée de ménopause (en année) :

Annexe 2: Interprétation graphique de la lecture des résultats de génotypage par INNO-LiPA

	HPV genotypes																																		
Probe #	6 LR	11 LR	16 HR	18 HR	18 HR	26* pHR	31 HR	33 HR	35 HR	39 HR	40 LR	43 LR	44 LR	45 HR	45 HR	51 HR	52 HR	53* pHR	53* pHR	54 LR	56 HR	58 HR	58 HR	58 HR	58 HR	59 HR	66* pHR	68 HR	69/71**	70 LR	70 LR	73 HR	74**	82 HR	
1	X																																		
2		X																																	
3			X																																
4				X																															
5					X																														
6						X																													
7																														X					
8							X				X													X	X										
9							X	X												X															
10						(X)***	X																												
11									X																										
12				X	X					X																		X					X		
13											X																								
14												X																							
15													X																						
16														X	X																				
17																X																			
18							X	X			X						X	X	X	X			X	X	X	X									
19																		X	X																
20																					X													X	
21																					X		X		X										
22																						X	X	X	X										
23																										X									
24																											X								
25															X													X				X	X		
26																															X	X			
27																																	X		
28																																			X

* : 26, 53 and 66 are considered probable high-risk (pHR) genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518

27.

** : 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.

*** : probeline 10 may show weak reactivity when probelines 8 and 9 are positive; in this case the sample should be interpreted as genotype 31